

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

TAYNA CARVALHO BITENCOURT DE SOUZA

**ESTUDO VISANDO A PRODUÇÃO DE BIOSSENSOR COM
POTENCIALIDADE DE APLICAÇÃO PARA DIAGNÓSTICO DA
DOENÇA DE ALZHEIMER**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2019

TAYNA CARVALHO BITENCOURT DE SOUZA

**ESTUDO VISANDO A PRODUÇÃO DE BIOSSENSOR COM
POTENCIALIDADE DE APLICAÇÃO PARA DIAGNÓSTICO DA
DOENÇA DE ALZHEIMER**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2 (TCC2), do Curso de Licenciatura em Química do Departamento Acadêmico de Química – DAQUI – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Licenciado em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Rafaelle B. Romero

Co-Orientador: Prof. Msc. Adriano Lopes Romero

CAMPO MOURÃO

2019



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
Câmpus Campo Mourão
Diretoria de Graduação e Educação Profissional
Departamento Acadêmico de Química - DAQUI
Curso de Licenciatura em Química



TERMO DE APROVAÇÃO

ESTUDO VISANDO A PRODUÇÃO DE BIOSSENSOR COM POTENCIALIDADE DE APLICAÇÃO PARA DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

por

TAYNA CARVALHO BITENCOURT DE SOUZA

Este trabalho foi apresentado em 09 de julho de 2019 como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciada em Química. A Candidata foi argüida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Prof^ª. Dr^ª. Daniela Aline Barancelli
(UTFPR)

Prof^ª. Dr^ª. Leila Cottet
(UTFPR)

Prof. Mrs. Adriano Lopes Romero
(UTFPR)
Co-orientador

Prof^ª. Dr^ª. Rafaelle Bonzanini Romero
(UTFPR)
Orientadora

Ao meu querido primo Filipe Carvalho (*in memoriam*) que me ensinou de diferentes formas sobre o amor e o perdão.

Um dia nos reencontraremos em Cristo!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida, por sua graça e seu cuidado para comigo. Por ter me dado a oportunidade de realizar esta pesquisa que de certa forma poderá ser um instrumento abençoador, gerando qualidade de vida e ajuda para o próximo.

Agradeço aos meus pais que sempre me incentivaram a realizar meus sonhos e que mesmo com todas as dificuldades da vida, batalharam para que um dia eu chegasse até aqui, obrigada pelo amor, pelo cuidado e pelos ensinamentos. Aos meus tios e avós pelo cuidado ao longo da vida, pelos conselhos, por me apoiar e que diversas vezes estenderam a mão para mim em momentos de dificuldades. Todos vocês são fundamentais na realização deste sonho, eu os amo imensamente!

Agradeço ao Kaio, meu grande amor, por ser esse anjo da guarda em minha vida e sempre cuidar de mim sem medir esforços. Obrigada por tudo, eu te amo!

Agradeço aos meus orientadores, a professora Dra. Rafaelle Bonzanini Romero e o professor Msc. Adriano Lopes Romero pela dedicação, orientação, ensinamentos, paciência e trabalho incansável. E também agradeço pelo cuidado, ajuda e acolhimento, por serem muito além de meros professores, mas verdadeiros pais, serei eternamente grata a isso. Vocês marcaram a minha história e são minhas inspirações profissionais, amo vocês!

Aos meus amigos e parceiros David Lucas Marcondes e Guilherme Basconi, muito obrigada por toda a ajuda e participação, foi um imenso prazer dividir a bancada do laboratório com vocês!

Aos professores membros da banca examinadora, Nelson Consolin Filho e Stênio Cristaldo Heck por suas contribuições.

Ao professor Dr. Rafael Porto Ineu, por sua ajuda, conselhos e contribuições a este trabalho.

Agradeço à Universidade Tecnológica Federal do Paraná por estes anos de ensino com excelência e qualidade, que serão de extrema importância para o meu exercício profissional.

“Descobri que há uma harmonia maravilhosa nas verdades complementares da fé e da ciência. O Deus da Bíblia é também o Deus do genoma. Deus pode ser encontrado na igreja e no laboratório. Investigando a criação incrível e majestosa de Deus, a ciência pode na verdade ser uma forma de louvor”.

Francis Collins (1960).

RESUMO

SOUZA, T. C. B. Estudo visando a produção de biossensor com potencialidade de aplicação para diagnóstico da Doença de Alzheimer. TCC (Curso de Licenciatura em Química). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2019.

A Doença de Alzheimer tem sido amplamente investigada, por pesquisadores de várias áreas do conhecimento, devido sua alta ocorrência, e aumento de sua incidência, principalmente na população mais idosa. Essa doença ainda não possui cura, mas possui tratamento, e o diagnóstico precoce é de suma importância para a eficácia do tratamento. Há cerca de duas décadas tem se buscado meios de diagnosticar a Doença de Alzheimer com alta precisão a partir de métodos menos invasivos, para isso uma alternativa é o uso de biossensores. Nesse contexto, o trabalho ora apresentado teve como objetivo a obtenção de um biossensor - explorando o monitoramento da acetilcolina e/ou de um dos seus produtos de hidrólise - capaz de detectar a Doença de Alzheimer de forma não invasiva, visando torná-lo uma alternativa acessível e de fácil manuseio. Para isso, idealizou-se um dispositivo no qual a enzima acetilcolinesterase estivesse presente (aderido à superfície de um suporte - placa de vidro {sensor 1} ou cubeta {sensor 2} - ou a superfície de esferas de materiais poliméricos, tal como as esferas de quitosana {sensor 3}). Como fonte de acetilcolinesterase utilizou-se extratos aquosos obtidos de cabeças de baratas de Madagascar (*Gromphadorhina Portentosa*), que apresentou perfil espectroscópico semelhante a enzima padrão. Após a obtenção dos sensores idealizados a viabilidade de uso dos mesmos foram estudadas a partir do monitoramento de acetilcolina ou de ácido acético em solução aquosa. Os resultados obtidos indicam a viabilidade de obtenção de um dispositivo no qual a enzima acetilcolinesterase esteja presente, assim como a detecção das substâncias acetilcolina e ácido acético, cujas concentrações podem ser relacionadas aos níveis de demência reportados na literatura.

Palavras chave: Química de materiais. Acetilcolinesterase. Acetilcolina.

ABSTRACT

SOUZA, T. C. B. Study aiming at the production of a biosensor with application potential for the diagnosis of Alzheimer's disease. TCC (Graduation in Chemistry). University Technological Federal of Paraná, Campo Mourão, 2019.

Alzheimer's disease has been widely investigated by researchers in various fields of knowledge, due to its high occurrence and its incidence, especially in the elderly population. This disease does not yet have a cure, but it has treatment, and the early diagnosis is for the effectiveness of the treatment. For about two decades we have sought ways to diagnose Alzheimer's disease with high precision from less invasive methods, so an alternative is the use of biosensors. In this context, the objective of this study was to obtain a biosensor - exploring the monitoring of acetylcholine and / or one of its hydrolysis products - capable of detecting Alzheimer's disease in a non-invasive way, aiming to make it an alternative accessible and easy to handle. For this purpose, a device in which the acetylcholinesterase enzyme was present (adhered to the surface of a support - glass plate (sensor 1) or cuvette (sensor 2) - or the surface of beads of polymeric materials, such as beads of chitosan (sensor 3)). The results indicate the feasibility of obtaining a device in which the enzyme acetylcholinesterase is present, as well as the detection of the substances acetylcholine and acetic acid, whose concentrations related to the levels of dementia reported in the literature.

Keywords: Chemistry of materials. Acetylcholinesterase. Acetylcholine.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Reação de síntese da acetilcolina.....	19
FIGURA 2: Hidrólise da Ach pela AchE.....	20
FIGURA 3: Passos envolvidos na síntese e libertação de acetilcolina	21
FIGURA 4: Espécime de barata de Madagascar	22
FIGURA 5: Espécimes de Gromphadorhina portentosa utilizadas para obtenção de extrato de acetilcolinesterase.....	24
FIGURA 6: Procedimento realizado para obtenção de extrato enriquecido de acetilcolinesterase.	25
FIGURA 7: Procedimento para determinação de ACh através da Hidroxilamina.....	29
FIGURA 8: Obtenção Bicamadas	30
FIGURA 9: Processo de revestimento da cubeta com bicamadas de Quitosana/Amido.....	31
FIGURA 10: Procedimento obtenção das esferas de Quitosana	32
FIGURA 11: Gotejamento quitosana.....	33
FIGURA 12: Esferas de quitosana em solução aquosa de glutaraldeído 6%	34
FIGURA 13: Esboço sensor qualitativo.....	35
FIGURA 14: Espectro de Varredura AChE padrão e AChE extrato.....	36
FIGURA 15: Espectro de Absorção ensaio enzimático AChE.....	37
FIGURA 16: Formação do N-hidroxiacetaminda resultado da reação da ACh com a hidroxilamina	38
FIGURA 17: Soluções calibração S1,S2, S3,S4,S5,S6,S7,S8 e S9 respectivamente.	38
FIGURA 18: Curva de calibração de ACh não hidrolisada	38
FIGURA 19: Espectro de Absorção curva de calibração ácido acético.....	40

FIGURA 20: Espectro de Absorção curva de calibração cloreto de acetilcolina.....	40
FIGURA 22: Placa de vidro utilizada antes do processo dedopagem.....	42
FIGURA 22: Placa de vidro com 3 bicamadas de quitosana e amido.....	42
FIGURA 23: Microscopia óptica superfície placa de vidro com 3 bicamadas de quitosana e amido.....	42
FIGURA 24: Espectro de absorção no UV-Vis dos filmes de quitosana e amido em função do número de bicamadas	43
FIGURA 25: Espectro de absorção no UV-Vis dos filmes na enzima Pepsina em função do tempo depositadas.....	44
FIGURA 26: Gráfico de varredura no UV-Vis das cubetas revestidas internamente com 3 bicamadas de quitosana e amido.....	45
FIGURA 27: Espectros de absorção, monitoramento hidrólise ACh em cubeta.....	45
FIGURA 28: Microscopia óptica da esfera de quitosana obtida.....	46
FIGURA 29: Esferas em meios de ácido acético a 0%, 0,01%, 0,03%, 0,05%, 0,1%, 0,5 e 1,0%, respectivamente.....	47
FIGURA 30: Análise das esferas com as soluções de Cloreto de acetilcolina nas concentrações de 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001 e 0,0005, e água respectivamente.	48
FIGURA 31: Esferas em capilar de PET.....	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS	16
2.1.1 Doença de Alzheimer.....	17
2.1.1.1 <i>Histórico</i>	17
2.1.1.2 <i>Sintomas</i>	17
2.1.1.3 <i>Fisiopatologia</i>	18
2.1.2 DIAGNÓSTICO	18
2.2 NEUROTRANSMISSORES	19
2.2.1 Acetilcolina (ACh).....	19
2.2.2 Acetilcolinesterase (AChE).....	20
2.3 BIOSSENSORES.....	22
2.3.1 Biossensores colorimétricos.....	22
2.4 <i>GRAMPHADORIA PORTENTOSA</i> COMO FONTE DE ACETILCOLINESTERASE	23
3 OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVO GERAL	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4 METODOLOGIA	25
4.1 OBTENÇÃO DE EXTRATO ENRIQUECIDO COM ACETILCOLINESTERASE ...	25
4.2 Avaliação do biossensor	30
4.3 DETERMINAÇÃO DE ACh COM HIDROXILAMINA.....	30
4.4 PREPARO CURVA DE CALIBRAÇÃO	31

4.5 SENSOR PARA ANÁLISE QUANTITATIVA.....	27
4.5.1 Avaliação do suporte	Erro! Indicador não definido.
4.5.2 Teste de Imobilização Enzimática	Erro! Indicador não definido.
4.5.3 Obtenção do sensor.....	28
4.5.4 Avaliação do biossensor.....	32
4.6 SENSOR PARA ANÁLISE QUALITATIVA.....	32
4.6.1 Obtenção esferas de quitosana	32
4.6.2 Imobilização Enzimática em esferas de quitosana	33
4.6.2 Teste com indicador.....	34
4.6.4 Produção do sensor.....	34
4.6.5 Análise do sensor.....	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 EXTRATO ENZIMÁTICO.....	36
5.2 ENSAIO DA ACETILCOLINESTERASE	37
5.3 DETERMINAÇÃO DE ACh COM HIDROXILAMINA.....	38
5.4 CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	40
5.5 SENSOR QUANTITATIVO.....	43
5.5.1 Avaliação do suporte	43
5.5.2 Teste Imobilização da enzima.....	Erro! Indicador não definido.
5.5.3 Obtenção do Sensor	44
5.5.4 Análise Cloreto de Acetilcolina.....	45
5.6 SENSOR QUALITATIVO.....	46
5.6.1 Obtenção de esferas de Quitosana.....	46
5.6.2 Teste com indicador.....	47
5.6.4 Análise do sensor.....	48

REFERÊNCIAS.....51

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Associação Brasileira de Alzheimer, a Doença de Alzheimer (DA) é um distúrbio cerebral que se agrava ao longo dos anos no paciente, aumentando sua incidência em pessoas de idade avançada. A Doença de Alzheimer causa morte de células cerebrais, tornando-se responsável pela perda de funções cognitivas, como memória, orientação, atenção e linguagem. Atualmente, estima-se haver cerca de 46,8 milhões de pessoas com demência no mundo. Este número praticamente irá dobrar a cada 20 anos, segundo o relatório de 2015 da Associação Internacional de Alzheimer (ABRAZ, 2018).

A Doença de Alzheimer ainda não possui cura, mas possui tratamento, e o diagnóstico precoce é de suma importância para a eficácia do tratamento. Há cerca de duas décadas tem se buscado meios de diagnosticar a Doença de Alzheimer com alta precisão a partir de métodos menos invasivos, para isso uma alternativa é o uso de biossensores (LENIGK *et al.*, 2000; KAUSHIK *et al.*, 2016).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), publicou o relatório "*Dementia: a public health priority*" (OMS, 2015) que aponta a urgência do desenvolvimento de um plano nacional para as demências em cada país, que inclua soluções que impulsionem o diagnóstico precoce da doença cada mediante o avanço das técnicas de neuroimagem e biomarcadores.

Segundo o laboratório de Materiais Eletroativos do Instituto de Química da Universidade de São Paulo "[...] um biossensor consiste em um dispositivo analítico que contém um componente biológico que garante a especificidade e produz uma resposta que é traduzida pelo componente físico em um sinal óptico ou elétrico". Dentre as formas de obtenção de sensores, destaca-se a técnica *layer-by-layer*, um método que possibilita a produção de filmes ultrafinos organizados em nível nanométrico, por meio de diferentes tipos de materiais, de maneira simples e de baixo custo (GREGOURT, 2012). Nessa técnica, as diferentes camadas se mantêm unidas por interações eletrostáticas.

No contexto apresentado, o trabalho ora apresentado teve como objetivo a obtenção de um biossensor capaz de detectar a Doença de Alzheimer de forma não invasiva, visando torná-lo uma alternativa acessível e de fácil manuseio.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

Os distúrbios neurodegenerativos (ROPPER; SAMUELS, 2009) são doenças que se caracterizam pela perda progressiva e irreversível de neurônios, e ocorrem em regiões específicas do Sistema Nervoso Central (SNC). São doenças caracterizadas pelo seu desenvolvimento tardio, sendo de maior incidência em pessoas com idade avançada. Além disso, apresentam características em comuns tais como o fato de serem crônicas e de estarem associadas à destruição celular progressiva e irreversível.

Existem inúmeras doenças neuro degenerativas sendo as mais frequentes a Doença de Alzheimer (DA), o Mal de Parkinson e a Doença de Huntington (ODDONE; IMBRIANI, 2015). Porém, segundo a OMS (2017) quando se trata de demência, a Doença de Alzheimer é a doença neurodegenerativa mais comum, e corresponde de 60 a 70% dos casos.

Segundo o relatório "*Dementia: a public health priority*", publicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2015) relatou que em 2015 aproximadamente 47,5 milhões de cidadãos no mundo sofrem de algum tipo de demência. O mesmo estudo prevê que em 2030 a incidência seja de 75,6 milhões de casos e para 2050 é previsto 135,5 milhões de casos, considerando que as doenças neurodegenerativas passarão a ser a causa de morte mais frequente em idosos.

2.1.1 Doença de Alzheimer

2.1.1.1 Histórico

Segundo Arbo (ALZHEIMER, 1911 *apud* ARBO, 2016) a Doença de Alzheimer foi descrita no início do século XX pelo médico alemão Alois Alzheimer após ter recebido um paciente, do sexo feminino no Hospital de Frankfurt em 1901, que apresentava um quadro clínico de perda progressiva de memória, delírios e alucinações. Alzheimer definiu a doença como uma patologia neurológica desconhecida, associada com demência, sintomas de déficit de memória, alterações comportamentais e dificuldade para a realização de atividades de rotina. Posteriormente, quando a paciente em questão veio a falecer, a realização de autópsia possibilitou a análise do cérebro da mesma, o que revelaria a presença de placas senis e de emaranhados neurofibrilares, as duas principais características histopatológicas dessa doença, que permitiram que Alzheimer a classificasse como uma doença distinta das patologias conhecidas até então (ALZHEIMER, 1911 *apud* ARBO, 2016).

2.1.1.2 Sintomas

Os sintomas da DA são variáveis conforme o estágio em que a doença se encontra, podendo ser inicial, intermediário e avançado. Em estágios iniciais da doença, podem ser observadas a perda de memória episódica e a dificuldade na aquisição de novas tarefas. Esses danos gradualmente envolvem outros comprometimentos cognitivos, como a capacidade de julgamento, cálculo, capacidade de abstração e habilidades visuoespaciais. A afasia pode ocorrer na fase intermediária, o portador da doença demonstra dificuldade em nomear objetos ou escolher a palavra certa para expressar ideias, assim como apraxia. Em estágios terminais da doença, mudanças notáveis são observadas, desde alteração do ciclo

do sono, alterações comportamentais (irritação e agressividade), sintomas psicóticos, até inabilidade para caminhar, falar e realizar o autocuidado (NETO; TAMELINI; FORLENZA, 2005). Para Bertolucci (2005) este declínio gradual das funções cognitivas e afetivas leva a um processo progressivo de deterioração funcional que afeta a autonomia nos indivíduos diagnosticados com DA.

2.1.1.3 Fisiopatologia

Os dados neuropatológicos mais relevantes em pacientes de DA são a presença de atrofia cortical difusa, degeneração neurovascular, perdas neuronais e sinápticas envolvendo vários sistemas de neurotransmissão, presença de placas senis extracelulares compostas de agregados filamentosos da proteína β -amiloide ($A\beta$) e massas neurofibrilares intracelulares, formadas principalmente pela proteína *tau* (SERRANO, 2011).

Para Melo (2013), a proteína *tau* é responsável pela montagem e estabilidade dos microtúbulos na célula neuronal e pelo transporte axoplasmático. Na Doença de Alzheimer, essa proteína é anormalmente hiperfosforilada, separando-se dos microtúbulos axonais e agregando-se em emaranhados neurofibrilares. Essas alterações resultam na interrupção do transporte axonal, conduzindo à perda de atividade biológica e à morte celular de neurônios.

2.1.2 DIAGNÓSTICO

Segundo Nitrini et. al. (2005) o diagnóstico de DA no Brasil baseia-se nos critérios de diagnóstico do Manual de Diagnóstico e Estatística da Associação Psiquiátrica Americana (DSM) e o de DA). Assim, ao exames recomendados são: hemograma completo, concentrações séricas de uréia, creatinina, tiroxina livre, hormônio tireo-estimulante, albumina, enzimas hepáticas, vitamina B12 e cálcio.

Exame do líquido cefalorraqueano está indicado em situações particulares. Tomografia computadorizada (ou preferentemente ressonância magnética, quando disponível) é exame obrigatório. Para Nitrini *et al.* (2005), cabe ao médico especialista avaliar os resultados obtidos e considerar a possibilidade do quadro clínico do paciente ser compatível com DA.

2.2 NEUROTRANSMISSORES

A funcionalidade do sistema nervoso depende da comunicação entre os neurônios. Os neurotransmissores têm um papel fundamental na eficácia desta comunicação, qualquer alteração na sua libertação, ligação aos receptores ou recaptação compromete, de forma mais ou menos grave, o estado físico e mental do indivíduo (BORODINSKY *et al.*, 2012; PEREDA, 2014). Resumidamente, Sámano *et al.* (2012) afirma que os neurotransmissores são mensageiros químicos capazes de transmitir, modular e amplificar sinais (informação) entre neurônios e outras células do organismo como, por exemplo, células musculares. A atuação dos neurotransmissores se dá através da mediação química na comunicação intercelular através da ativação de receptores específicos e mensageiros secundários.

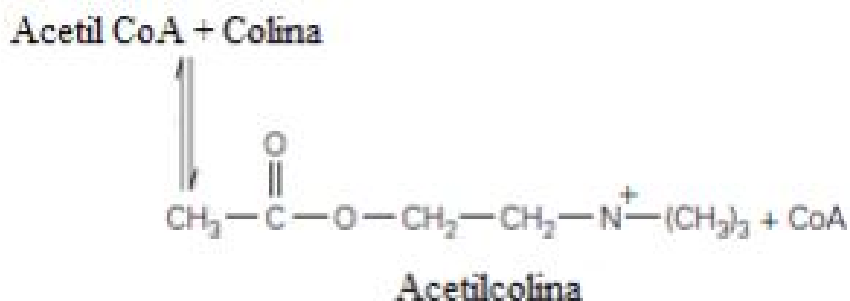
2.2.1 Acetilcolina (ACh)

A ACh possui uma ampla ação no sistema nervoso central, periférico, entérico e autônomo. Essa substância está presente em todos os neurônios motores, participando na junção neuromuscular; nos neurônios pré-ganglionares do sistema nervoso autônomo; e nos neurônios pós-ganglionares do sistema nervoso parassimpático, sendo um dos principais neurotransmissores da formação reticular que controla o ciclo do sono e o despertar (KANDEL *et al.*, 2008).

A síntese da ACh ocorre no citoplasma nos terminais dos axônios a partir dos seus precursores: colina e acetil coenzima A (AcetilCoA), numa reação mediada

pela acetilcolina transferase (Figura 1). Posteriormente, a ACh é empacotada em vesículas sinápticas (PURVES *et al.*, 2001). Uma vez que os neurônios não têm a capacidade de produzir colina, esta provém da alimentação ou da própria degradação da ACh.

Figura 01 - Reação de síntese da acetilcolina.

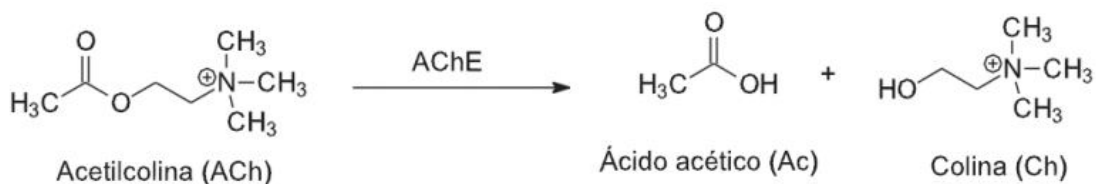


Fonte: Adaptado de KANDEL *et al.* (2008, p. 177).

2.2.2 Acetilcolinesterase (AChE)

Segundo Colovic *et al.* (2013) a acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima que pertence à família das colinesterases e é responsável pelo processo de finalização dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas, pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh). As colinesterases estão presentes nas sinapses colinérgicas, são responsáveis por catalisar a hidrólise da ACh em ácido acético e colina (Figura 2) na fenda sináptica, e permitem que o neurônio colinérgico retorne ao seu estado de repouso após ser ativado.

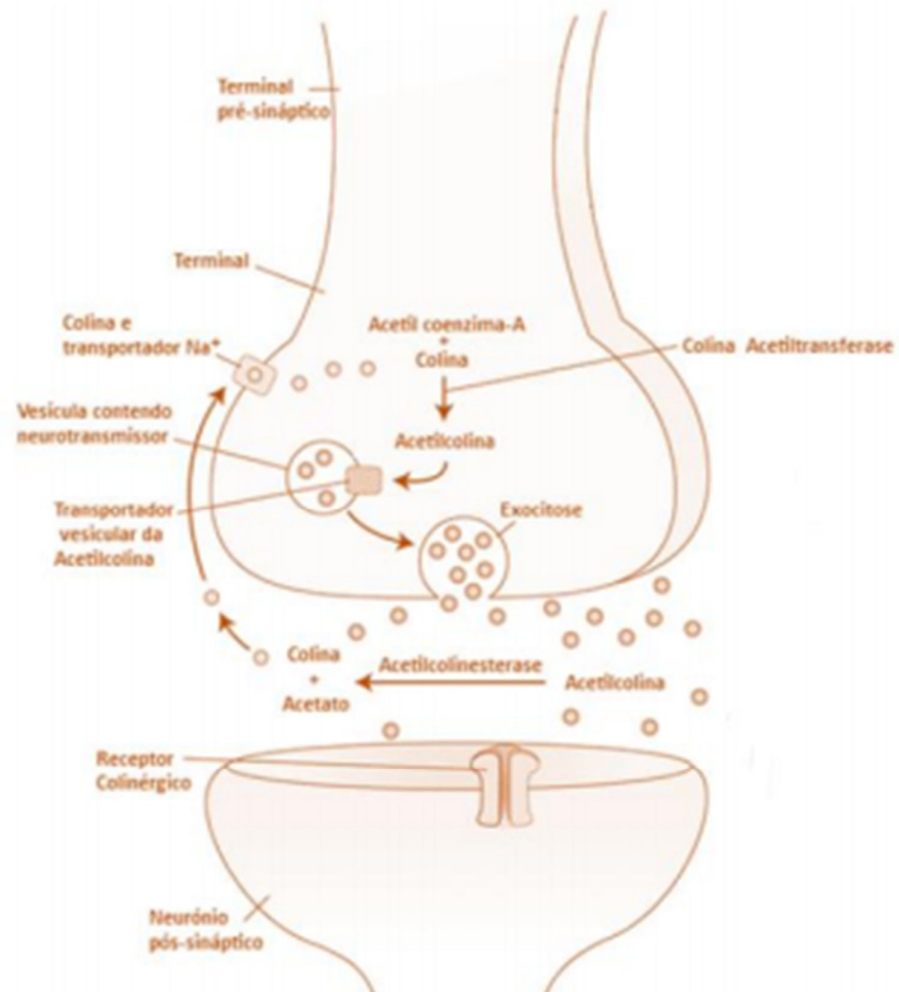
Figura 02 - Hidrólise da ACh pela AChE.



Fonte: Petronilho *et al.* (2011, p. 3).

Na Figura 03 apresenta-se o processo de formação e hidrólise da ACh nos terminais pré-sinápticos e na fenda sináptica.

Figura 03 - Passos envolvidos na síntese e liberação de acetilcolina.



Fonte: Siegel; Sapru (2006, p. 400)

2.3 BIOSSENSORES

Sacramento (2014) define biossensor como um dispositivo analítico que une um elemento de reconhecimento biológico com um componente físico-químico que é classificado como transdutor. Portanto, considera-se que a informação química que revela a concentração do analito é transformada em um sinal que pode ser reconhecido. A facilidade de utilização, a portabilidade, o custo reduzido e os baixos limites de detecção são as particularidades que tornam estes dispositivos interessantes (TURNER, 2013). Os biossensores podem ser classificados de acordo com o tipo de detecção utilizado: colorimétricos, amperométricos, condutivimétricos, entre outros. No presente trabalho, optou-se em estudar o biossensor do tipo colorimétrico.

2.3.1 Biossensores colorimétricos

Os sensores colorimétricos são dispositivos que fornecem uma informação visual (cor) quando entram em contato com o analito de uma determinada amostra. A maior vantagem deste tipo de sensor é que pode ser produzido com diversos tipos de substratos, tais como o papel e a quitosana, que possuem baixo custo, alta abundância, alta biodegradabilidade, excelente compatibilidade química, está disponível em diferentes formas e formatos, possui acessibilidade global e apresenta facilidade de estocagem e transporte (MAHADEVA; WALUS; STOEBER, 2015).

2.4 GRAMPHADORIA PORTENTOSA COMO FONTE DE ACETILCOLINESTERASE

A barata de Madagascar (*Gromphadorhina portentosa*, Figura 4) apresenta coloração avermelhada no abdômen e negra na região do tórax e cabeça, possui hábito noturno. Quando ameaçadas, produzem um ruído que funciona como mecanismo de defesa, com a finalidade de assustar o predador que está ao seu redor e permanecer viva no meio ambiente (NELSON, M. C.; FRASER, 1980; SPADONI *et al.*, 2015).

Figura 04 - Espécime de barata de Madagascar.



Fonte: Mundo Natureza (2017).

Essa espécie de barata, devido a facilidade de manutenção em condições de laboratório, tem sido utilizada há várias décadas (NELSON, M. C.; FRASERGRUNDY; STILL, 1985) como fonte de acetilcolinesterase para realização de bioensaios.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Obter um biossensor com potencialidade de aplicação para detecção da Doença de Alzheimer.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Obtenção de extrato enriquecido de acetilcolinesterase a partir do inseto *Gromphadorhina portentosa*.
- ✓ Produção de dois biossensores de vidro, para análise quantitativa e qualitativa, sendo um baseado na adesão de um polímero (quitosana) e reticulação com acetilcolinesterase usando glutaraldeído como agente reticulante e outro com a utilização de esferas de quitosana e indicador de pH.
- ✓ Quantificar a Acetilcolina através de um método colorimétrico para determinar a quantidade de ACh não hidrolisada.
- ✓ Avaliação dos biossensores produzidos utilizando a técnica de espectroscopia UV-Vis.

4 METODOLOGIA

4.1 OBTENÇÃO DE EXTRATO ENRIQUECIDO COM ACETILCOLINESTERASE

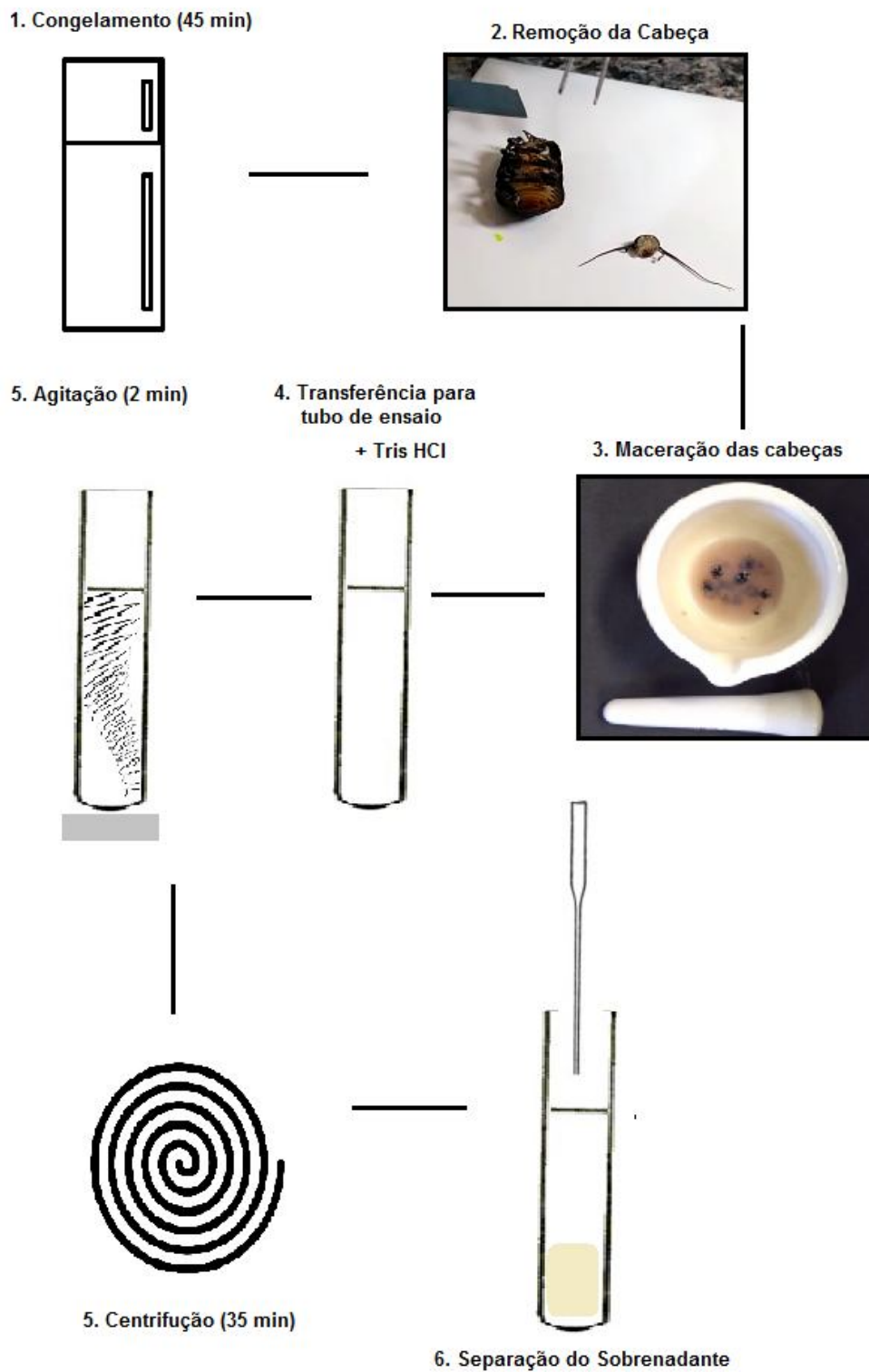
Para a obtenção do extrato enriquecido com acetilcolinesterase foram utilizadas nove baratas da espécie *Gromphadorhina portentosa* (Figura 5), popularmente conhecida como barata de Madagascar, adquiridas do criador Ozório Gonçalves. Para isso utilizou-se a metodologia adaptada de Nogueira (2015). Inicialmente as baratas foram colocadas no congelador durante 45 minutos, na sequência, realizou-se a remoção da cabeça das mesmas com o auxílio de um estilete e uma pinça, removendo também as antenas (Figura 6). Em seguida as cabeças foram maceradas utilizando solução tampão Tris-HCl 0,5M pH 7,5, obtendo desta forma um extrato heterogêneo conforme a Figura 6. Transferiu-se o mesmo para um tubo de ensaio e foi adicionado tampão Tris-HCl até a obtenção da massa igual a 10g, prosseguindo com agitação utilizando vortex e centrifugação a 4000 rpm durante 35 min. O sobrenadante obtido nesse processo foi utilizado como extrato enriquecido de acetilcolinesterase.

Figura 05 - Espécimes de *Gromphadorhina portentosa* utilizadas para obtenção de extrato de acetilcolinesterase.



Fonte: Autoria própria (2019).

Figura 06 - Procedimento realizado para obtenção de extrato enriquecido de acetilcolinesterase.



Fonte: Autoria própria (2019).

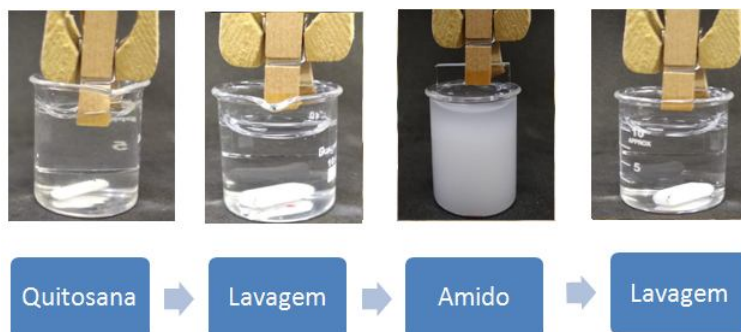
Após o processo de extração a amostra foi diluída 2 vezes e submetida a análise em espectrofotômetro UV-Vis, e comparada à solução padrão de acetilcolinesterase 0,5 mg/L (Sigma Aldrich) em solução Tris-HCl 0,5 M pH 7,5.

4.2 OBTENÇÃO DOS SENSORES

4.2.1 SENSOR 1

O **Sensor 1** foi obtido pela deposição de filmes ultrafinos utilizando a técnica de automontagem, ou seja, camada por camada, sobre placas de vidro. Inicialmente as placas de vidro foram dopadas por meio de submersão do suporte (placa) em solução aquosa de quitosana 0,01 g/mL durante 3 minutos, em seguida o suporte foi submerso em água durante 2 min para efetuar a lavagem do mesmo. Após a secagem do suporte com auxílio de *coolers*, foi realizado o mesmo processo com a solução aquosa de amido 0,005 g/mL, obtendo assim uma bicamada (Figura 07). Foram formadas o total de três bicamadas de quitosana e amido e finalizou-se com mais uma bicamada de quitosana. A cada deposição das bicamadas, o crescimento e deposição das mesmas, foram analisados em um espectrofotômetro UV-Vis T70+, *PG Instruments*.

Figura 07 - Preparação de uma bicamada quitosana-amido na superfície do suporte.



Fonte: Autoria própria (2019).

Após a deposição dos filmes ultrafinos sobre as placas de vidro, a superfície foi ativada com glutaraldeído, para isso as placas foram colocadas em solução aquosa de glutaraldeído 0,06:1 (v/v) durante 24 horas.

A imobilização de acetilcolinesterase foi realizada utilizando metodologia adaptada de Huang *et al.* (1993). Nesse trabalho, utilizou-se como fonte de acetilcolinesterase um extrato aquoso obtido da espécie *Gromphadorhia pontentosa*. Para imobilização as placas ativadas com glutaraldeído foram colocadas no extrato durante 24 horas.

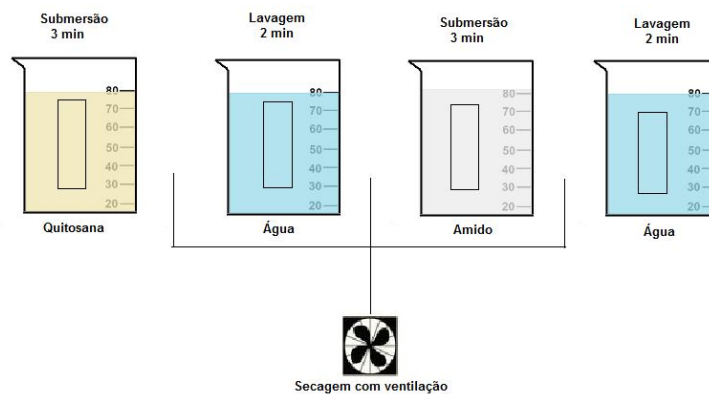
4.2.2 SENSOR 2

O **Sensor 2** foi produzido utilizando metodologia adaptada de Huang *et al.* (1993) a partir do uso de cubeta de vidro como suporte, quitosana como polímero de deposição e extrato enriquecido de acetilcolinesterase, cuja enzima foi reticulada com uso de glutaraldeído (Figura 08).

A superfície interna da cubeta de vidro foi revestida utilizando solução aquosa de quitosana 0,01 mg/L durante 3 minutos, em seguida o conteúdo foi substituído por água para lavagem durante 2 minutos. Após a secagem com auxílio de *coolers*, foi realizado o mesmo processo com a solução de amido 0,005 g/mL obtendo assim uma bicamada. Foram formadas o total de três bicamadas de quitosana e amido e finalizou-se com mais uma bicamada de quitosana. Para que a deposição fosse feita apenas na superfície interna da cubeta, a superfície externa foi revestida com PVC, conhecido comercialmente como plástico filme.

A cubeta ficou submersa em solução de glutaraldeído por 24 horas, após isso realizou-se a imobilização da enzima na superfície da mesma. Depois de seca, uma alíquota de 2000 µL de extrato enriquecido com acetilcolinesterase foi adicionado e mantido na cubeta, ao abrigo da luz por 24 horas.

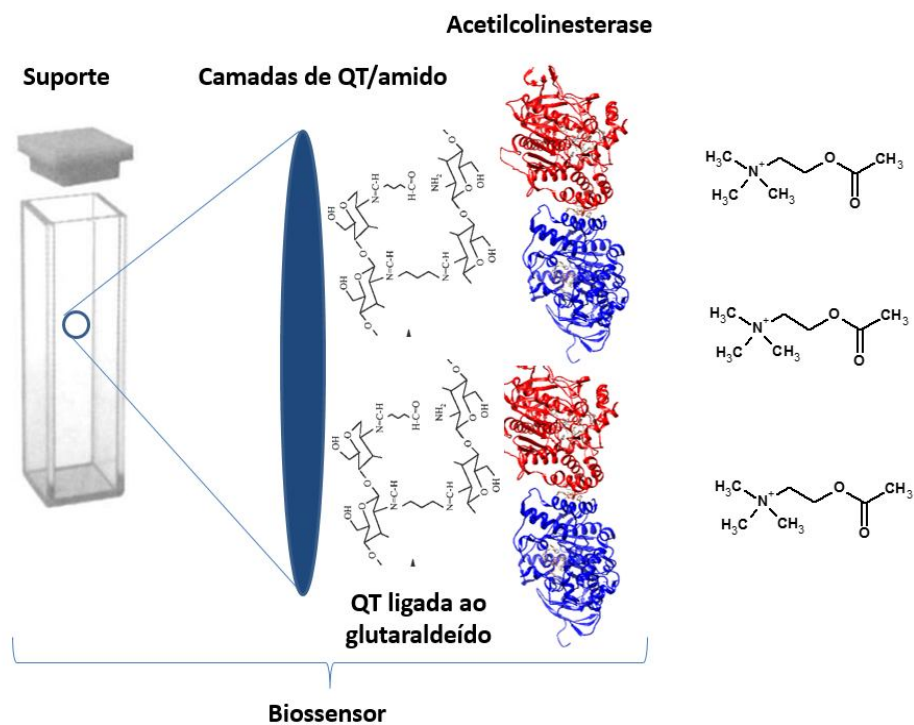
Figura 08 - Processo de revestimento da cubeta com bicamadas de quitosana/amido.



Fonte: Autoria própria (2019).

A deposição do polímero à superfície da cubeta, assim como a reticulação da enzima a esse polímero, seguindo a montagem proposta ilustrada na Figura 9 foi avaliada por espectroscopia UV-Vis.

Figura 9 - Demonstração do biossensor.



Fonte: Autoria própria (2019).

4.3 AVALIAÇÃO DO BIOSENSOR

Para avaliar a funcionalidade do biossensor em quantificar acetilcolina em fluidos biológicos utilizou-se os seguintes métodos: (1) Quantificação de acetilcolina utilizando o método colorimétrico de Hestrin (1949) e (2) Perfil espectroscópico de consumo de acetilcolina e produção de ácido acético.

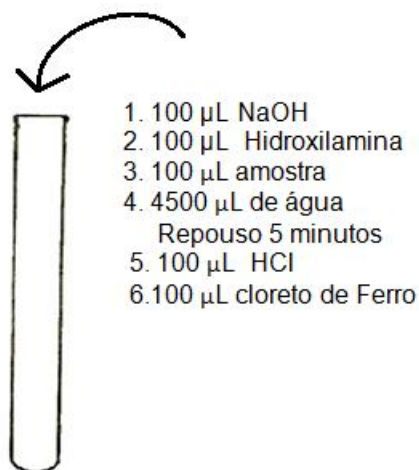
4.3.1 Determinação de ACh com Hidroxilamina

A determinação e quantificação da ACh foi realizada a partir do método colorimétrico de Hestrin (1949), tendo como princípio a complexação da ACh não hidrolisada.

Um esquema do procedimento utilizado é apresentado na Figura 10. Inicialmente, em um tubo de ensaio adicionaram-se 100 μL de solução aquosa de NaOH 3,5 mol/L, 100 μL de solução aquosa de hidroxilamina 2 mol/L, 100 μL da amostra, e 4500 μL de água. Após 5 minutos em contato, adicionou-se 100 μL de solução aquosa de HCl (1:2 v/v) e 100 μL de solução aquosa de cloreto de férrico 0,37 mol/L. Como padrão utilizou-se uma solução aquosa de cloreto de acetilcolina 0,001 mol/L.

Observa-se, a partir do uso dessa metodologia, como resultado da presença de acetilcolina uma coloração marrom arroxeada, que varia de intensidade conforme a concentração de acetilcolina não hidrolisada. Desta forma, a acetilcolina não hidrolisada foi quantificada em um Espectrofotômetro UV-Vis T70+, *PG Instruments*, utilizando o comprimento de onda de 540 nm.

Figura 10 - Procedimento para determinação de ACh pelo uso de hidroxilamina.



Fonte: Autoria própria (2019).

4.3.2 Preparo Curva de Calibração

Para a construção da curva de calibração para o ácido acético e para ao cloreto de acetilcolina preparou-se soluções aquosas em diferentes concentrações de ácido acético ou cloreto de acetilcolina, conforme a Tabela 01.

Tabela 01: Concentrações de ácido acético utilizadas para preparação da curva de calibração.

Solução	Concentração (mmol.L⁻¹)
S1	100
S2	50
S3	10
S4	5
S5	1
S6	0,5
S7	0,1
S8	0,05
S9	0,01

Fonte: Autoria Própria (2019).

4.3.2 Avaliação do Biossensor 2

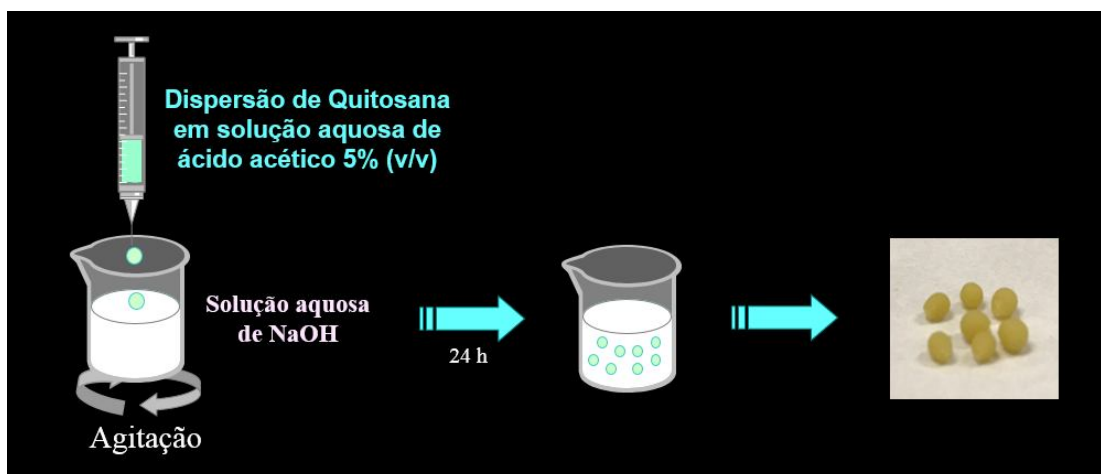
Para avaliação do biossensor, adicionou-se na cubeta 200 μL de solução aquosa de cloreto de acetilcolina 3 mg/L, e realizou-se acompanhamento da hidrólise por espectroscopia UV-Vis, varrendo num intervalo de 5 minutos durante 3 horas e depois a cada 1 hora, resultando em 6 horas de análise.

4.4 SENSOR 3

4.4.1 Obtenção esferas de quitosana

Para obtenção de esferas de quitosana utilizou-se metodologia adaptada de Reis *et al.*(2006). Para isso, foi preparada uma solução de quitosana 30 mg/mL em solução hidro-acética 5% (m/m), esta mistura ficou sob agitação durante 48 horas (Figura 11).

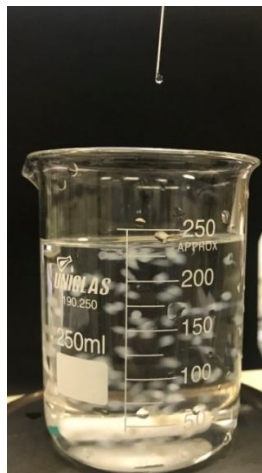
Figura 11 - Procedimento de obtenção das esferas de quitosana.



Fonte: Autoria Própria (2019).

Após esse período foi feito o gotejamento, como auxílio de uma seringa, em uma solução aquosa de NaOH 4,5 mol/L sob agitação constante (Figura 12). A mistura resultante foi mantida nesta condição por 24 horas, depois filtrada e armazenada em água para não ocorrer desidratação das esferas obtidas.

Figura 12 - Obtenção de esferas de quitosana em meio básico.



Fonte: Autoria própria (2019).

Paralelamente, obteve-se esferas com os indicadores vermelho de fenol e azul de bromotimol com a finalidade das mesmas mudarem de cor indicando a hidrólise da Ach, que libera ácido acético e alteração do pH do meio.

4.4.2 Imobilização Enzimática em esferas de quitosana

Para a adsorção da enzima na superfície da esfera de quitosana utilizou-se metodologia adaptada de Nogueira (2015). Inicialmente, as esferas de quitosana foram mantidas em solução aquosa de glutaraldeído 6% durante 24 horas (Figura 13) para ocorrer a ativação da superfície da esfera.

Figura 13 - Esferas de quitosana em solução aquosa de glutaraldeído 6% e extrato enzimático.



Fonte: Autoria própria (2019)

4.4.3 Teste com indicador

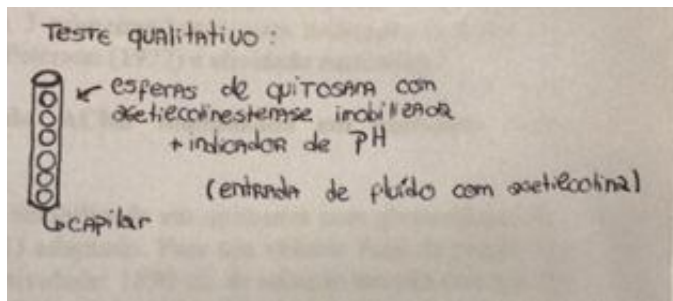
Para analisar a mudança de coloração das esferas com indicador as mesmas foram submetidas a soluções aquosa de ácido acético em diferentes concentrações (1,0%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,03% e 0,01% (v/v). Como controle utilizou-se água destilada.

Também se analisou o comportamento das esferas com o indicador e a enzima imobilizada no meio com solução aquosa de cloreto de acetilcolina nas seguintes concentrações: $1 \cdot 10^{-1}$, $5 \cdot 10^{-2}$, $1 \cdot 10^{-2}$, $5 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-3}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-5}$ e $1 \cdot 10^{-5}$ mol/L.

4.4.4 Montagem do Sensor 3

O **Sensor 3** foi confeccionado em formato de um capilar de PET, no qual as esferas ficarão contidas em seu interior. Sendo está uma alternativa economicamente viável, tornando o produto de baixo custo e ecológico, pois contribui para a reciclagem e o reuso deste material.

Figura 13 - Esboço sensor qualitativo.



Fonte: Autoria própria (2019)

4.4.5 Análise do sensor

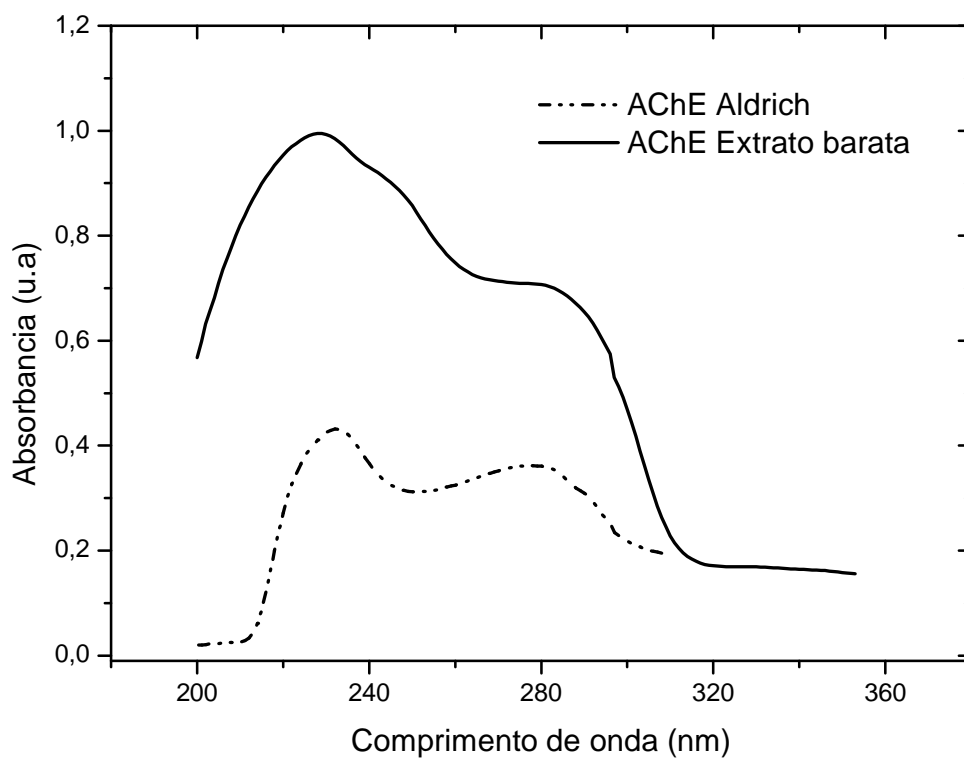
O limite de detecção do biossensor foi analisado por meio da curva de calibração de cloreto de acetilcolina (Tabela 01).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRATO ENZIMÁTICO

A análise do extrato obtido da espécie *Gromphadorhia portentosa* foi realizada por espectroscopia UV-Vis, de forma comparativa com a enzima pura adquirida da Sigma-Aldrich.

Figura 14 – Espectros de absorção no UV-Vis de soluções aquosas de AChE (padrão e extrato de *Gromphadorhia portentosa*).



Fonte: Autoria Própria (2019)

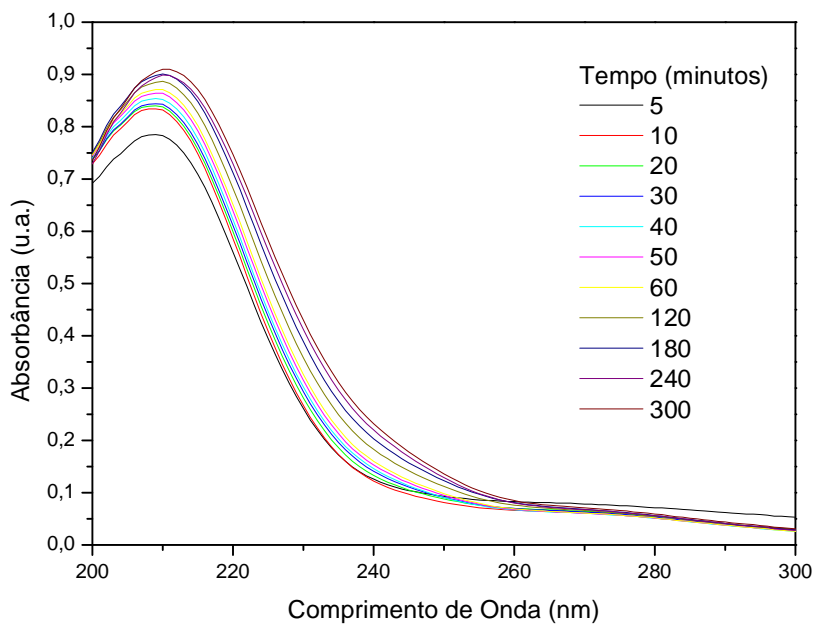
A partir da análise dos gráficos é possível observar que as varreduras das soluções de enzimas são parecidas, pois possuem o mesmo perfil, mudando apenas

a intensidade da absorbância, indicando que a concentração do extrato é maior. A partir disto é possível validar o processo de extração proposto por Nogueira (2015), tornando-se uma forma de obtenção da AChE mais acessível, permitindo assim a obtenção de um biossensor mais econômico.

5.2 ENSAIO DA ACETILCOLINESTERASE

As leituras da solução de ACh foram realizadas nos tempos de: 5, 10, 20, 30, 50, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos, a varredura feita contemplou o faixa de 200 a 300 nm.

Figura 15 - Espectro de absorção do ensaio enzimático AChE em função do tempo.



Fonte: Autoria Própria (2019).

A partir da análise do gráfico presente na Figura 15 é possível observar um aumento da intensidade da absorbância na região de 210 nm, que é resultante do

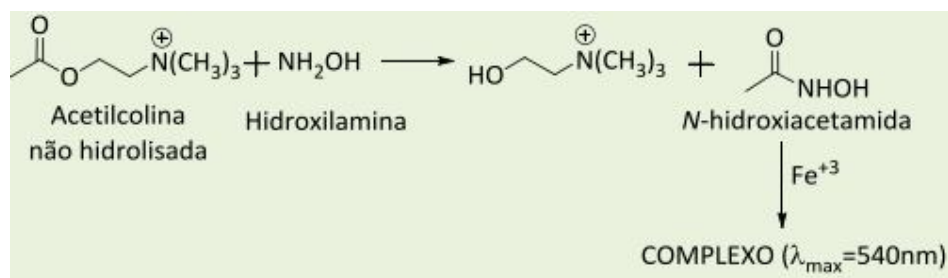
aumento da concentração de ácido acético, produto na hidrólise da acetilcolina. Esse resultado sugere a viabilidade de se monitorar a concentração de acetilcolina em um fluido biológico a partir da análise do aumento da concentração de ácido acético no meio. Realizou-se também a leitura do ácido acético em diversas concentrações para analisar a absorvidade da molécula e construir uma curva de calibração (Figura 19).

Observa-se uma maior diferença de intensidade de absorção entre os tempos de 5 e 10 minutos, e uma diminuição de diferença de intensidade a medida em que se transcorre a hidrólise. Tal resultado indica que um biossensor que utiliza o ácido acético como analito a ser identificado pode dar a resposta desejada em 10 minutos.

5.3 DETERMINAÇÃO DE ACh COM HIDROXILAMINA

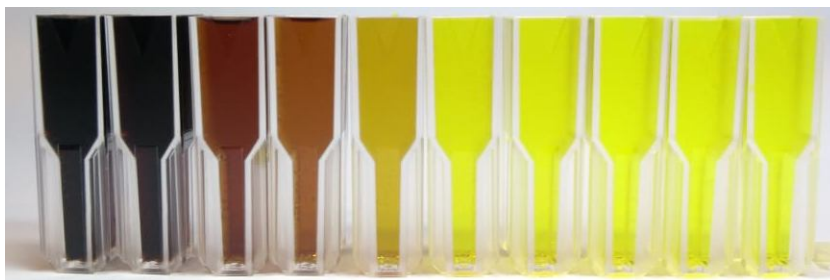
A determinação foi realizada com as soluções de concentração conhecida de cloreto de acetilcolina (Tabela 01), nesse método colorimétrico a intensidade obtida é proporcional à concentração de ACh.

Figura 16 - Formação do *N*-hidroxiacetamida resultado da reação da ACh com a hidroxilamina.



Fonte: Araújo *et al.* (2016).

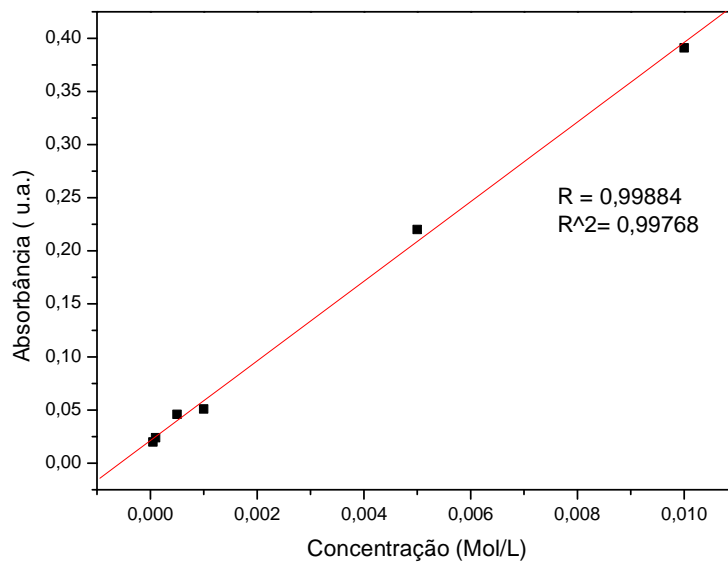
Figura 17 - Soluções calibração S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8 e S9 respectivamente.



Fonte: Autoria própria (2019).

Para a construção da curva de calibração (Figura 18) foi analisado o comprimento em 540 nm, a partir do seu crescimento obteve-se o R^2 igual a 0,99768. Através da mesma é possível a quantificação de amostras desconhecidas de ACh.

Figura 18 - Curva de calibração de ACh não hidrolisada.

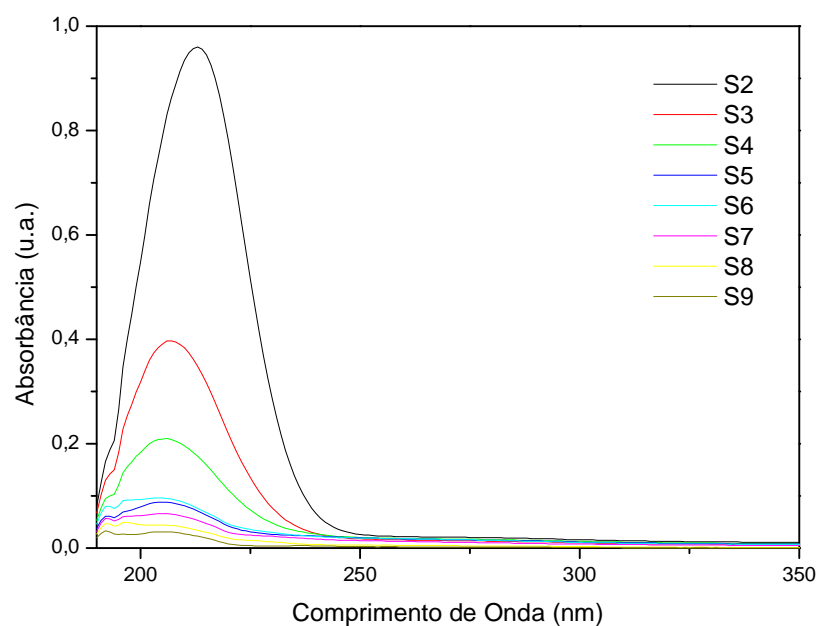


Fonte: Autoria própria (2019).

5.4 CURVA DE CALIBRAÇÃO

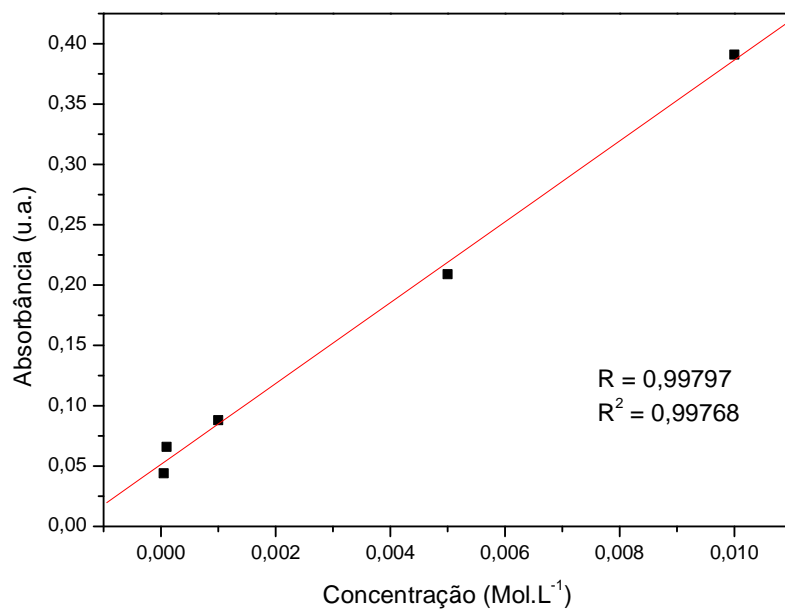
Os espectros de absorção do ácido acético são apresentados na Figura 19. O ácido acético apresenta uma absorbância máxima em aproximadamente 210 nm. Por meio dos gráficos de absorção é possível construir a curva de calibração correlacionando a absorbância *versus* concentração dos compostos, Figura 20. A curvas de calibração apresentou coeficiente de correlação acima de 0,99.

Figura 19 - Espectro de absorbância *versus* comprimento de onda do ácido acético em diferentes concentrações.



Fonte: Autoria própria (2019).

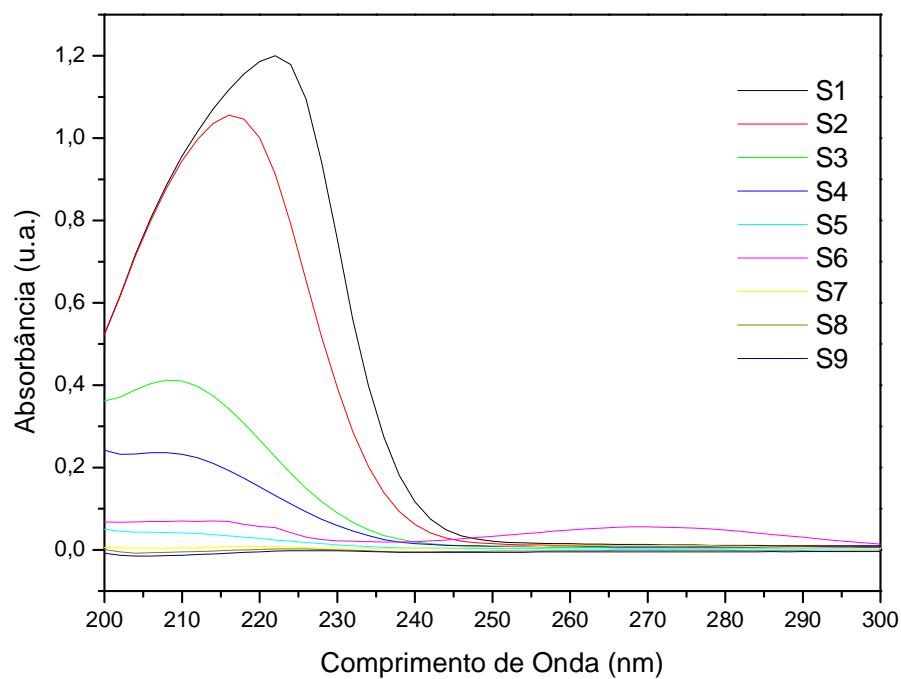
Figura 20 - Curva de calibração do ácido acético obtida no comprimentos de onda de 210 nm.



Fonte: Autorial Própria (2019).

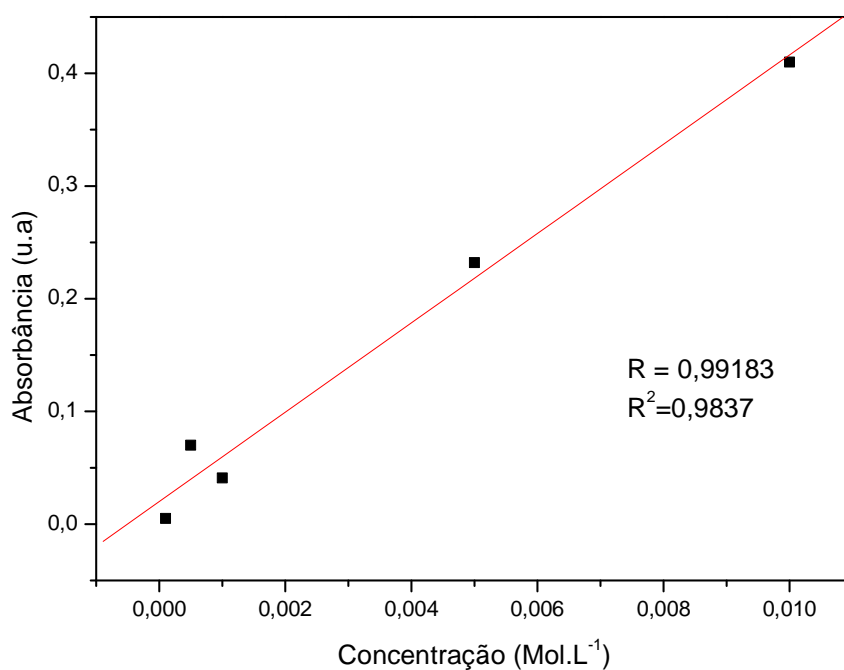
Para o cloreto de acetilcolina o espectro de absorção no UV-Vis (Figura 21) demonstrou que a mesma apresenta absorbância máxima na região de 215 a 230 nm, indicando efeito batocrômico no intervalo de concentração avaliado, e extrapolação da absorbância igual a 1 para concentrações a partir de 0,5 mol/L.

Figura 20 - Espectro de absorvância versus comprimento de onda do cloreto de acetilcolina em diferentes concentrações.



Fonte: Autoria Própria (2019).

Figura 21 - Curva de calibração do cloreto de acetilcolina obtida no comprimentos de onda de 215 nm.



Fonte: Autoria Própria (2019).

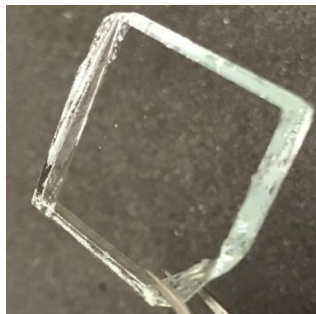
5.5 SENSOR 2

5.5.1 Avaliação do suporte

Para a avaliação do suporte e sua efetividade na constituição do sensor, obteve-se um total de 3 bicamadas, sendo que, as mesmas foram constituídas através da submersão das placas em solução do polímero (Figura 08).

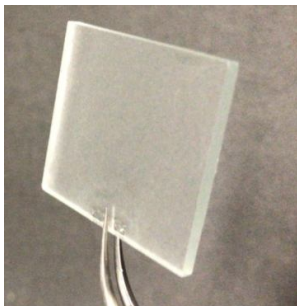
As Figuras 22 e 23 apresentam a imagem de microscopia óptica da placa de vidro antes e após a deposição dos filmes quitosana/amido ultrafinos utilizando a técnica de automontagem, respectivamente. Nota-se que o filme, é esbranquiçado, homogêneo, ausente de manchas ou espaços vazios no substrato.

Figura 22 - Placa de vidro utilizada antes do processo de dopagem.



Fonte: Autoria Própria (2019).

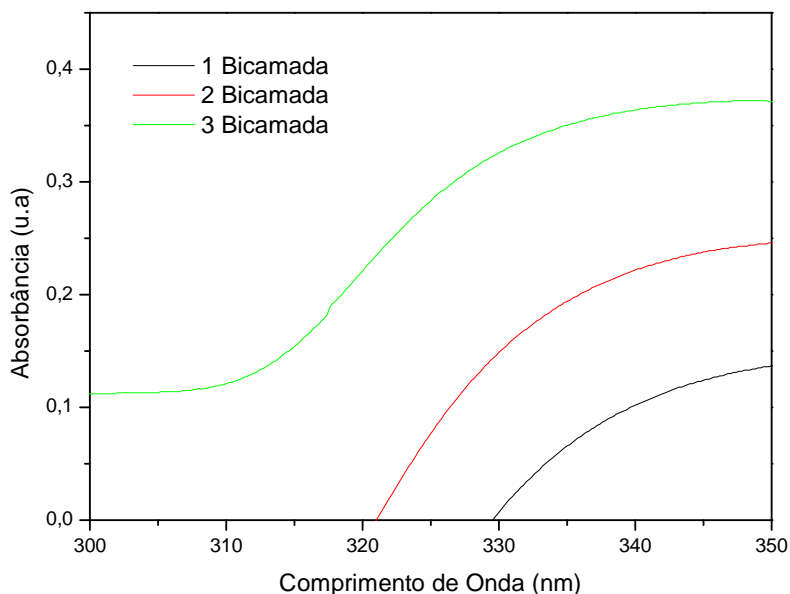
Figura 23 - Placa de vidro com 3 bicamadas de quitosana e amido



Fonte: Autoria Própria (2019).

Por meio da análise do gráfico (Figura 24) observa-se que o aumento da intensidade da absorbância é proporcional ao aumento do número de bicamada depositadas na superfície da placa de vidro, o que indica êxito na formação das bicamadas.

Figura 24 - Espectro de absorção no UV-Vis dos filmes de quitosana e amido em função do número de bicamadas depositadas.

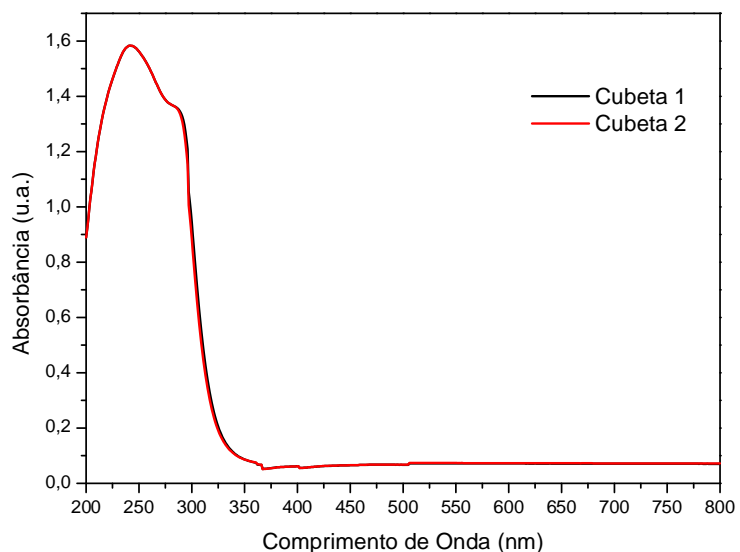


Fonte: Autoria própria (2019)

5.5.3 Obtenção do Sensor 2

Para a realização da análise em UV-Vis é necessário um branco para que apenas a amostra a ser analisada seja considerada pelo equipamento, então foi realizada a obtenção de duas cubetas e ambas foram analisadas com a finalidade de certificar a similaridade de ambas, obtendo o gráfico na Figura 25. Neste gráfico é possível notar que a deposição das bicamadas foi semelhante em ambas as cubetas e demonstra que o método é reprodutível.

Figura 25 - Gráfico de varredura no UV-Vis das cubetas revestidas internamente com 3 bicamadas de quitosana e amido.

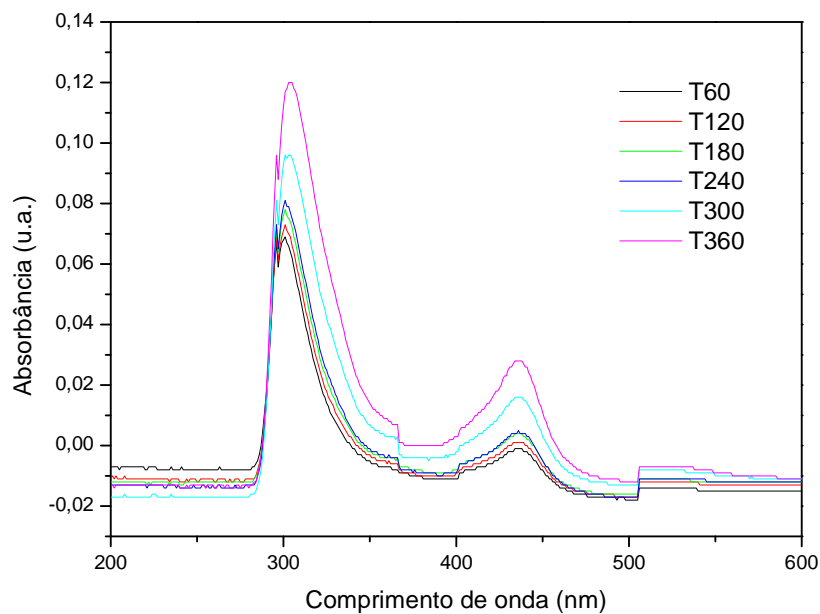


Fonte: Autoria própria (2019).

5.5.4 Análise Cloreto de Acetilcolina

Por meio da análise do gráfico (Figura 26) de absorção é possível observar um crescimento constante da absorvidade no comprimento de onda de 300 nm, novamente esse crescimento na absorvidade se dá pelo aumento da concentração de ácido acético resultante da hidrólise da acetilcolina.

Figura 26 - Espectros de absorção em função do tempo da hidrólise ACh em cubeta.

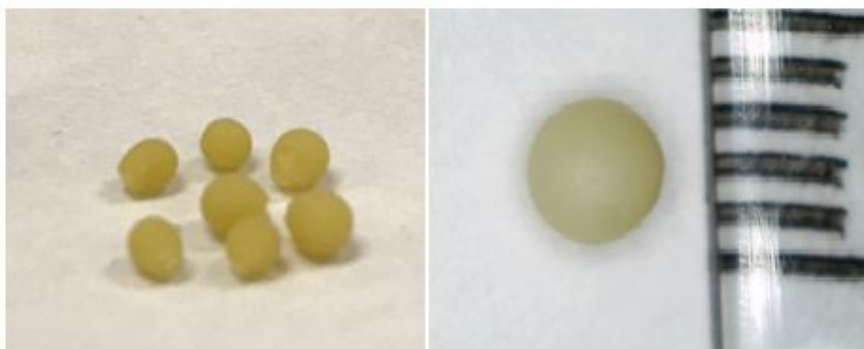


5.6 SENSOR 3

5.6.1 Obtenção de esferas de Quitosana

O processo de obtenção de esferas de quitosana ocorreu com êxito, cujo produto se mostrou uniforme em relação ao tamanho, estando numa milimétrica como indicado na Figura 27. Após isso, procedeu-se o processo de imobilização enzimática na superfície da esfera e a confecção do sensor qualitativo.

Figura 27 - Microscopia óptica da esfera de quitosana obtida.

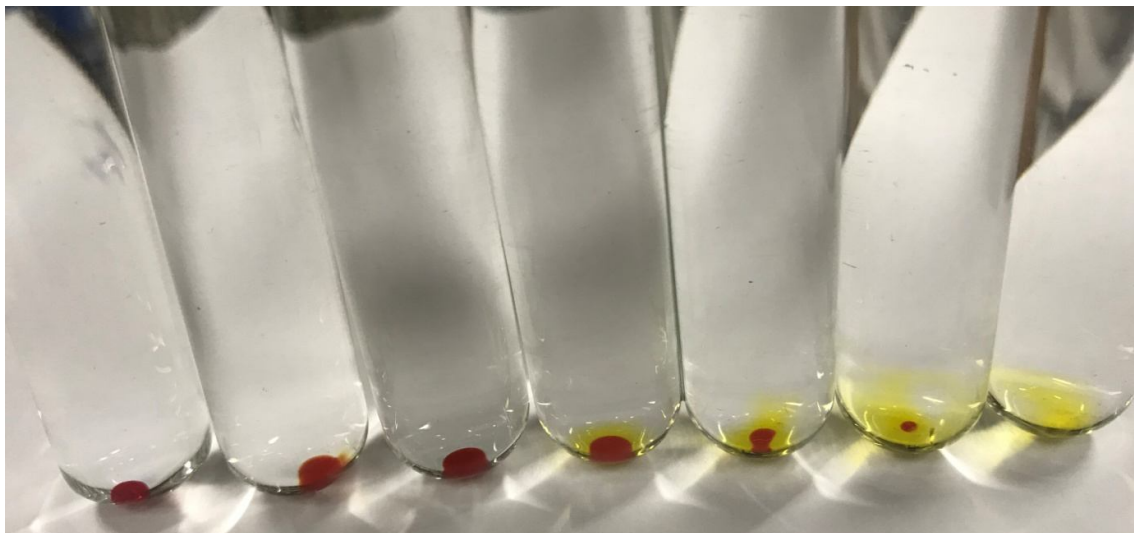


Fonte: Autoria própria (2019).

5.6.2 Teste com indicador

O teste realizado com o indicador teve a finalidade de determinar o limite de detecção do sensor por meio da mudança de pH do meio, causado pelo aumento da concentração de ácido acético. A partir da análise da Figura 28 pode-se observar que para concentrações próximas a 0,05% ocorre a solubilização da esfera no meio avaliado, isso ocorre devido ao ácido acético ser um solvente da quitosana.

Figura 28 - Esferas em meios de ácido acético a 0%, 0,01%, 0,03%, 0,05%, 0,1%, 0,5 e 1,0%, respectivamente.



Fonte: Autoria própria (2019).

O indicador vermelho de fenol tem sua variação de cor de vermelho em meio básico, e amarelo em meio ácido, porém o mesmo não foi capaz de alterar sua coloração em meios com concentração reduzida de ácido acético.

5.6.4 Análise do sensor

As esferas que foram adicionadas as soluções de diferentes concentrações de ACh, demonstram que é possível realizar a quantificação através da intensidade da coloração, sendo possível a olho nu. Mesmos em amostras com menor concentração de Acetilcolina foi possível notar a mudança de coloração, mesmo que com baixa intensidade. Também se ressalta que a esfera em água, como controle, não manifestou mudança de coloração ao redor da mesma.

Figura 29 - Análise das esferas com as soluções de Cloreto de acetilcolina nas concentrações de 100, 50, 10, 5, 1 e 0,5 mmol/L, e água respectivamente.



Fonte: Autoria própria (2019).

A montagem do sensor foi realizada, porém apenas para ter um respaldo estético do sensor, pois ainda precisa-se de uma metodologia adequada para inserção de amostra como micro fluido no mesmo. Assim neste momento limitou-se apenas na confecção do mesmo (Figura 30).

Figura 31 - Esferas em capilar de PET.



Fonte: Autoria própria (2019)

7.CONCLUSÃO

Através das técnicas de obtenção de esferas de quitosana e dopagem de bicamadas de quitosana e amido em suporte de vidro, técnicas essas utilizadas para produzir um biosensor de teste rápido e outro espectrofotométrico. Foi possível realizar a investigação de diferentes possibilidades para a quantificação do biomarcador para DA, a acetilcolina.

Ao investigar os diferentes métodos para quantificação da Acetilcolina, neste trabalho ressaltou-se a monitoração do aumento de concentração do ácido acético, produto da hidrólise de acetilcolina e também a quantificação da Acetilcolina não hidrolisada, através do método colorimétrico de Hestrin.

Para diminuição do custo da produção dos sensores a obtenção da AChE que é uma enzima de valor aquisitivo elevado, extraiu-se tal enzima dos cérebros das baratas da espécie *Gromphadorhia pontentosa*, que ao comparar com a solução padrão da enzima apresentou um gráfico de varredura com perfil semelhante.

Apesar de os métodos propostos serem simples, baratos, precisos e de baixo custo em relação ao consumo de reagentes e equipamento envolvidos, há, ainda, todo um trabalho a desenvolver. Para isso, é necessário realizar estudos exaustivos para que se possa quantificar a ACh em amostras biológicas com erros aleatórios e inferiores. Ao considerar uma perspectiva futura, seria interessante tentar reproduzir a metodologia para aplicação em matrizes complexas aprimorando a sensibilidade do sensor.

Portanto, este trabalho cumpriu com suas perspectivas e objetivos ao estudar e explorar o desenvolvimento de biossensores para a determinação de Alzheimer, abordando novas alternativas para a solução de um problema que afeta a vida e o cotidiano de muitas pessoas

REFERÊNCIAS

ARBO, B. D. **Efeitos neuroprotetores do 4'-clorodiazepam em modelos experimentais de Doença de Alzheimer *in vitro* e sobre o desenvolvimento neuronal.** Tese de Doutorado, UFRGS. Porto Alegre, 2016.

BERTOLUCCI, P. H. **Demências.** In K. Ortiz (Ed.), *Distúrbios neurológicos adquiridos: Linguagem e cognição* (p. 295-312). Barueri: Manole, 2005.

BORODINSKY, L. N. *et al.* Dynamic regulation of neurotransmitter specification: Relevance to nervous system homeostasis. **Neuropharmacology**, v. 78, p. 75-80, 2014.

HESTRIN, S. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine and its analytical application. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p.180, 1949.

HUANG, Z.; VILLARTA-SNOW, R.; LUBRANO, G. J.; GUILBAULT, G. G. Development of choline and acetylcholine Pt microelectrodes. **Analytical biochemistry**, v. 215, p. 31-37, 1993.

KANDEL, E. R. *et al.* (2008). **Overview of synaptic transmission.** Principles of neural science. Fifth edition ed. New York McGraw-Hill, pp. 177-187.

ČOLOVIĆ, M. B.; KRSTIĆ, D. Z.; LAZAREVIĆ-PAŠTI, T. D.; *et al.* Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, p. 315-335, 2013.

GRUNDY, D. L.; STILL, C. C. Inhibition of acetylcholinesterases by pulegone-1,2-epoxide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 23, n. 3, p. 383-388, 1985.

MAHADEVA, S. K.; WALUS, K.; STOEBER, B. Paper as a platform for sensing applications and other devices: a review. **Acs Applied Materials & Interfaces**, v. 7, p. 8345-8362, 2015.

MANNING, C. A.; DUCHARME, J. K. (2010). **Dementia syndromes in the older adult**. In P. Lichtenberg (Ed.), Handbook of assessment in clinical gerontology (2nd edition, pp. 155-178).

MARTINS, J. V.; DE SOUZA, A. P. R.; SALLES, M. O.; SERRANO, S. H. P. Determinação de ácido acético em amostra de vinagre adulterada com ácido clorídrico - um experimento integrado de titulação potenciométrica e condutométrica. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 755-758, 2010.

MELO, P.M.C. **Doença de Alzheimer perspectivas de tratamento**. 63f, 2013. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Universidade da Beira Interior, 2013.

NELSON, M. C.; FRASER, J. Sound production in the cockroach, *Gromphadorhina portentosa*: evidence for communication by hissing. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 6, n. 4, p. 305-314, 1980.

NOGUEIRA, P. R. R. B.(2015) **Imobilização de acetilcolinesterase para construção de biossensores de pesticidas**.Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental),Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Fluminense

ODDONE, E., & IMBRIANI, M. (2015). **Are we underestimating occupational risks for neurodegenerative diseases?** Giornale Italiano Di Medicina Del Lavoro Ed Ergonomia, 37(1), p.5–7. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26193735>>.

PEREDA, A. E. Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. **Nat. Rev.Neurosci**, v. 15, p. 250-263, 2014.

PURVES, D. *et al.* **Neuroscience** 2 ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates. 2001.

ROPPER, A.; SAMUELS, M. **Adams and Victors Principles of Neurology**. 10. ed. Canadá: KoboEditions, 2010.

SÁMANO, C., CIFUENTES, F. E MORALES, M. A. Neurotransmitter segregation: Functional and plastic implications. **Progress in Neurobiology**, v. 97, p. 277-287, 2012.

SERRANO-POZO, A.; FROSCH, M. P.; MASLIAH, E.; HYMAN, B. T. **Cold Spring Harbor Perspect. Biol.**, v. 1, p. a006189, 2011.

Siegel, A., Sapru, H., **The autonomic nervous system, Essential Neuroscience**, Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2006, p. 400.

SOUSA, A. G.; CHAGAS, F. W. M.; GOIS, L. C.; SILVA, J. G. Determinação condutométrica e potenciométrica de ácido acetilsalicílico em aspirina®: uma sugestão de prática para a análise instrumental. **Rev. Virtual Quim.**, v. 10, n. 3, p. 502-517, 2018.

PETRONILHO, E.; PINTO, A. C.; VILLAR J. D. F. Acetilcolinesterase: Alzheimer e Guerra Química. **Revista Militar de Ciência e Tecnologia**, v. 28, p.3-14, 2011.

SPADONI, A. B. *et al.* **A vida dos insetos**. 8º Congresso de extensão universitária da UNESP, p. 1-4, 2015. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/142456>>. Acesso em: 01 jul. 2019.

TOHGI, H.; ABE, T.; KIMURA, M. *et al.* Cerebrospinal fluid acetylcholine and choline in vascular dementia of Binswanger and multiple small infarct types as compared with Alzheimer-type dementia. **J. Neural Transmission**, v. 103, p. 1211-1220, 1996.

TURNER, A. Biosensors: sense and sensibility. **Chem. Soc. Rev.**, v. 48, n. 8, p. 3184- 3196, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dementia**. 2017. Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/en/>>. Acesso em: 08 out. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dementia: a public health priority**. 2015.
Disponível em:
<http://www.who.int/mental_health/neurology/dementia/dementia_thematicbrief_executivesummary.pdf>. Acesso em: 08 out. 2018.