



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Jéssica Carina Simões Giraldo

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Monitorização *in vivo* de neurotransmissores e neuromoduladores com sensores e biossensores baseados em microelétrodos” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Carla Borlido e do Professor Doutor Rui Barbosa apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2019

Jéssica Carina Simões Giraldo

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Monitorização *in vivo* de neurotransmissores e neuromoduladores com sensores e biossensores baseados em microelétrodos”, sob a orientação, da Dra. Carla Borlido e do Professor Doutor Rui Barbosa, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2019

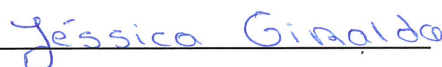


UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Eu, Jéssica Carina Simões Giraldo, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº2014201590, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Monitorização *in vivo* de neurotransmissores e neuromoduladores com sensores e biossensores baseados em microelétrodos” 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, 03 de setembro de 2019,



Jéssica Carina Simões Giraldo

AGRADECIMENTOS

Os meus sinceros agradecimentos:

À minha mãe, que foi o meu pilar.

À equipa técnica da Farmácia Margato Pereira pelo apoio, amizade e aprendizagem e, em especial, à minha orientadora, Dra. Carla Borlido.

Ao meu orientador, Professor Doutor Rui Barbosa, pela orientação e disponibilidade.

Aos meus padrinhos de curso, Patrícia e Flávio.

Às minhas amigas, Marcela, Marta, Juliana, Débora e Daniela.

Por fim, um grande obrigado a ti, Coimbra.

ÍNDICE

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA – FARMÁCIA MARGATO PEREIRA

ABREVIATURAS.....	7
RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. ANÁLISE SWOT	11
2.1. PONTOS FORTES.....	12
2.1.1. Equipa técnica	12
2.1.2. 4DigitalCare®.....	12
2.1.3. Caixa de pagamento automático	12
2.1.4. Atendimento ao público / Clientes fidelizados	13
2.1.5. Diversidade de produtos	13
2.1.6. Receção de encomendas.....	14
2.1.7. Consultas de podologia e nutrição.....	15
2.1.8. Códigos matrix.....	15
2.2. PONTOS FRACOS	16
2.2.1. Conhecimento na área da veterinária e dermo-cosmética	16
2.2.2. Prescrição por DCI.....	17
2.2.3. Receitas manuais	18
2.3. OPORTUNIDADES.....	18
2.3.1. Formações.....	18
2.3.2. Realização de encomendas	18
2.3.3. Realização de devoluções	19
2.3.4. População envelhecida e com pouca instrução	19
2.3.5. Cartão de pontos da farmácia.....	20
2.4. AMEAÇAS	20
2.4.1. Medicamentos esgotados.....	20
2.4.2. Medicamentos rateados	21
3. CASOS PRÁTICOS.....	21

3.1.	CASO PRÁTICO 1	21
3.2.	CASO PRÁTICO 2	22
3.3.	CASO PRÁTICO 3	22
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

MONOGRAFIA – MONITORIZAÇÃO *IN VIVO* DE NEUROTRANSMISSORES E NEUROMODULADORES COM SENSORES E BIOSSENSORES BASEADOS EM MICROELÉTRODOS

	ABREVIATURAS.....	26
	RESUMO.....	27
	ABSTRACT	28
1.	INTRODUÇÃO.....	29
2.	SISTEMA NERVOSO CENTRAL	29
2.1.	ORGANIZAÇÃO CELULAR: NEURÓNIO E GLIA.....	29
2.2.	SINAPSE	31
2.3.	COMUNICAÇÃO QUÍMICA.....	32
3.	NEUROTRANSMISSORES E NEUROMODULADORES.....	33
3.1.	COMPOSTOS ELETROATIVOS E NÃO ELETROATIVOS.....	33
3.2.	DETEÇÃO E MONITORIZAÇÃO NO ESPAÇO EXTRACELULAR DO CÉREBRO.....	35
4.	SENSORES QUÍMICOS E BIOSSENSORES BASEADOS EM MICROELÉTRODOS	37
4.1.	MICROELÉTRODOS DE FIBRA DE CARBONO	38
4.2.	DETEÇÃO DA DOPAMINA	40
5.	MÉTODOS ELETROQUÍMICOS EM NEUROCIÊNCIAS.....	42
5.1.	AMPEROMETRIA	42
5.2.	VOLTAMETRIA CÍCLICA DE VARRIMENTO RÁPIDO	44
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA
COMUNITÁRIA**

FARMÁCIA MARGATO PEREIRA

Orientado pela:
Doutora Carla Borlido

ABREVIATURAS

- **DCI** – Denominação Comum Internacional
- **EU** – União Europeia
- **FMG** – Farmácia Margato Pereira
- **GTIN** – *Global Trade Item Number*
- **IMC** – Índice de Massa Corporal
- **INFARMED** – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde
- **MNSRM** – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica
- **MSRM** – Medicamentos Sujeitos a Receita Médica
- **SWOT** – *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

RESUMO

O estágio curricular em farmácia comunitária, inserido no segundo semestre do quinto ano, tem como finalidade colocar em prática os conhecimentos adquiridos ao longo de todo o curso. Prepara-nos para a realidade do que é o contacto direto com os doentes e ajuda-nos a perceber quais as nossas principais dúvidas, inseguranças e o que pode ser melhorado, a fim de um maior sucesso no início da carreira profissional.

Este relatório é elaborado segundo uma análise SWOT, onde são discriminados os pontos fortes, pontos fracos, oportunidades e ameaças deparadas ao longo do estágio.

Palavras-chave: Receitas, Medicamentos, Encomendas, Devoluções, Formações.

ABSTRACT

The curricular internship in a community pharmacy, inserted within the second semester of the fifth year has the purpose of putting into practice the knowledge acquired during the course. It prepares us for the reality of direct contact with patients and helps us understand which are our biggest doubts, insecurities and what can be improved in order to have greater success in the early stages of the professional career.

This report is elaborated according to a SWOT analysis, where the strong points, weak points, opportunities and potential threats that might be experienced during the internship are discussed and evaluated.

Keywords: Prescriptions, Drugs, Orders, Returns, Formations.

I. INTRODUÇÃO

Não sendo apenas o especialista do medicamento, de ouvido e olhar atento, o farmacêutico é também um promotor da saúde pública e do bem-estar de todos os doentes, criando laços de amizade e confidencialidade. Por outras palavras, além do uso racional do medicamento, implementa uma das mais poderosas substâncias ativas no dia-a-dia, o sorriso.

A farmácia onde realizei o meu estágio foi a Farmácia Margato Pereira, situada no Bom Sucesso, no concelho da Figueira da Foz, sob a orientação da Dra. Carla Borlido.

Iniciei o estágio no dia 7 de janeiro de 2019, tendo terminado no dia 3 de julho de 2019, após perfazer, no mínimo, as 810 horas previstas no regulamento.

Escolhi esta farmácia porque se situa próxima do local onde resido e porque sempre foi uma farmácia frequentada por mim e pelos meus familiares, pelo que já existia um elevado grau de confiança e empatia na equipa de profissionais que lá trabalha.

Relativamente ao espaço físico, a farmácia apresenta uma sala de atendimento ao público com três balcões de atendimento, um armazém para a arrumação dos mais variados produtos e medicamentos, um escritório, um laboratório, uma sala multiusos, uma casa de banho e dois gabinetes onde efetuamos medições da tensão arterial, diabetes, colesterol, triglicéridos e ácido úrico.

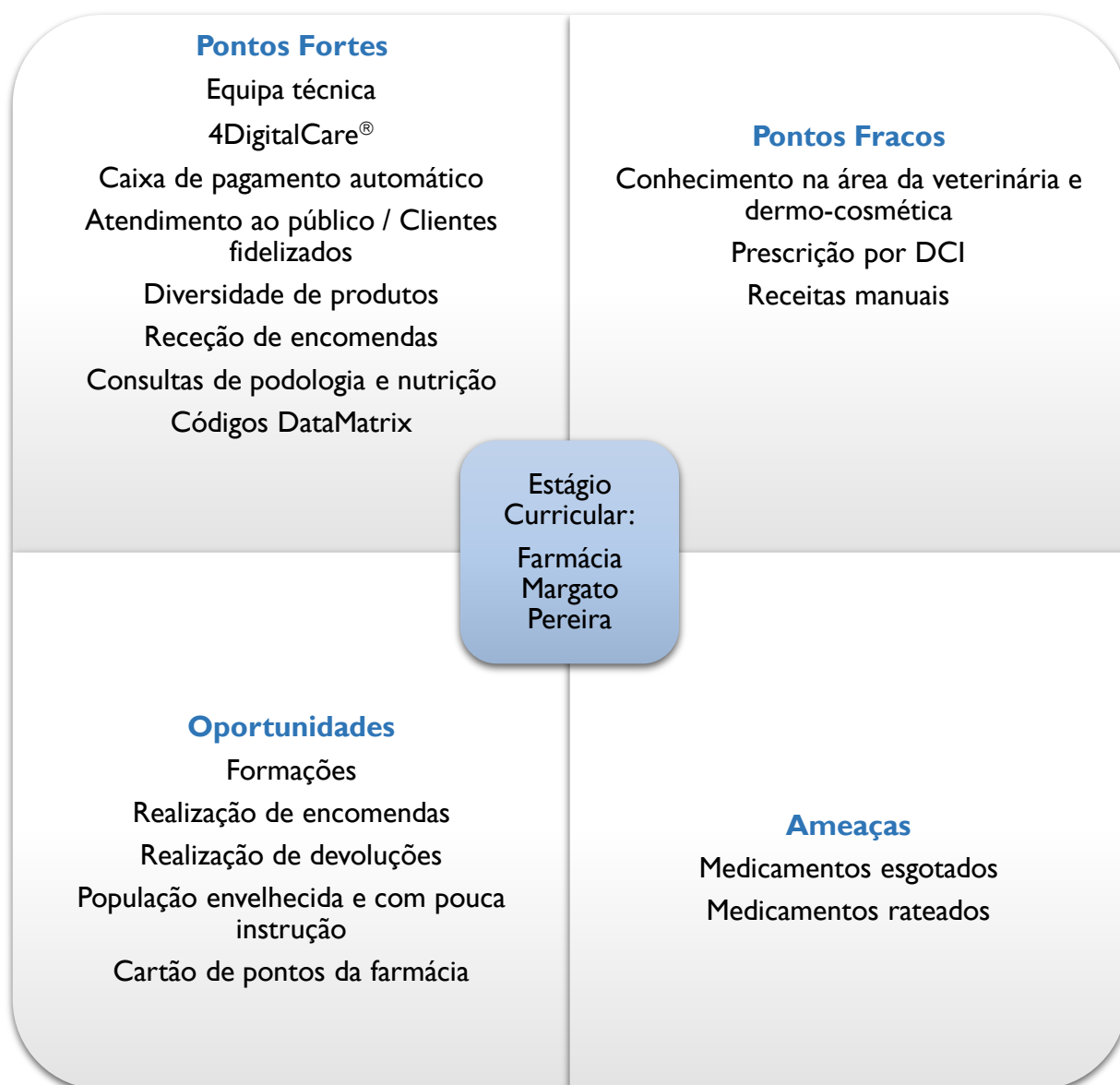
Quanto à disposição dos produtos, esta é de forma organizada e por categorias. A farmácia dispõe de produtos ortopédicos, capilares, de cosmética, de nutrição, de higiene, perfumaria, oftalmologia e entre outros. A sala de atendimento ao público também dispõe de uma balança automática para medições do IMC e ainda um espaço infantil que proporciona um momento de lazer às crianças enquanto esperam pelo atendimento de quem as acompanha.

Os MNSRM encontram-se atrás dos balcões, inacessíveis aos utentes. Na área restrita à equipa técnica, entre o laboratório e o armazém, encontram-se os MSRMs arrumados em gavetas que se encontram dispostas por ordem alfabética. Os psicotrópicos e estupefacientes encontram-se nas gavetas mais altas, separados dos restantes medicamentos e, os medicamentos que necessitam de serem conservados a temperaturas mais baixas estão arrumados no frigorífico cuja temperatura está programada entre 2 a 8°C. Existem também

divisões mais específicas dos medicamentos, como: gotas/ampolas orais, suspensões/soluções orais, usos externos e pós/granulações.

Os produtos veterinários estão arrumados num armário, separados dos restantes produtos e dispostos por ordem alfabética. As prateleiras são usadas para fazer algumas distinções, como injetáveis, animais de criação e animais de pequeno e grande porte.

2. ANÁLISE SWOT



2.1. Pontos Fortes

2.1.1. Equipa técnica

A equipa técnica foi um dos pontos mais fortes do meu estágio curricular. Além de excelentes profissionais, aprendi com eles o valor da amizade no local de trabalho e a elevada responsabilidade do farmacêutico. A minha integração foi bastante fácil, tendo recebido da equipa toda a ajuda que precisava, bem como todo o esclarecimento de dúvidas que me foram surgindo.

Trata-se de uma equipa empenhada, de confiança, profissional e muito querida pela comunidade. É constituída pelo diretor técnico (Dr. João Margato Pereira), farmacêutica substituta (Dra. Cristina Botelho Costa), pela farmacêutica Dra. Carla Borlido e por 3 técnicos de farmácia (David Gonçalves, Eloísa Curto e Tatiana Cardoso).

2.1.2. 4DigitalCare®

O programa informático utilizado durante o meu estágio foi o 4DigitalCare®. Considero que tenha sido um ponto forte porque achei o programa muito intuitivo, com poucos erros e fácil de usar. As reservas de medicamentos e outros produtos estavam sempre corretas, bem como notificações de fim de validade, *stocks* e outras funcionalidades de extrema importância que numa farmácia poderão facilmente causar erros e incongruências.

Um dos programas mais usados nas farmácias portuguesas é o Sifarma2000® e, segundo me foi transmitido, as características do Sifarma2000® são muito semelhantes às do 4DigitalCare®, por isso achei uma excelente oportunidade para contactar com um dos programas diferentes do mais usado.

2.1.3. Caixa de pagamento automático

Na FMP, a existência de uma caixa de pagamento automático é um ponto forte, pois impede erros de trocos e, além do mais, o dinheiro fica logo contabilizado e em segurança.

Após finalizar a venda, era impresso um papel com um código de barras associado ao meu utilizador e com o montante respetivo. Depois, dirigia-me à caixa, onde lia o código de barras e colocava o dinheiro do cliente (as notas eram colocadas à parte das moedas). Por último, a caixa dava a minha venda por terminada e, de forma automática, efetuava o troco. Caso o pagamento fosse por via multibanco, tinha que carregar na opção “multibanco” e

guardar o recibo do multibanco. Se não carregasse na opção de multibanco ou não depositasse o dinheiro, o ecrã da caixa iria sempre exibir que não dei a minha venda por terminada.

2.1.4. Atendimento ao público / Clientes fidelizados

Comecei por assistir a alguns atendimentos, de modo a recordar algumas perguntas essenciais antes de dispensar um medicamento, como escrever nas caixas dos medicamentos e todas as informações necessárias e úteis a prestar ao doente, uma vez que é com o farmacêutico que o doente tem o último contacto antes da toma do medicamento e não devemos, de modo algum, deixar dúvidas por esclarecer. Assim, quando me senti mais à vontade e confiante foi-me dada a oportunidade, de modo pertinente, de interagir com os doentes e realizar vendas.

Considero que o atendimento ao público tenha sido um ponto forte porque permitiu-me ser mais perspicaz a associar a substância ativa ao nome comercial e a encontrar os medicamentos com mais rapidez. Além do mais, tive que resolver alguns casos clínicos e associar doenças às respetivas sintomatologias, o que criou em mim mais confiança e dinâmica nos atendimentos ao longo do tempo.

Os clientes no geral sempre foram bastante simpáticos e pacientes comigo, o que facilitou o atendimento e me permitiu evoluir.

O facto de a farmácia estar localizada próxima de várias aldeias e um pouco longe da cidade mais próxima (Figueira da Foz, cerca de 20 minutos), ajuda a que os clientes sejam fidelizados, o que considero de uma importância extrema, pois existe uma proximidade grande entre o farmacêutico e o doente. Era bastante comum tratarmos os doentes pelo nome, criando um laço forte de confiança. Aproveitávamos igualmente para saber como estava o estado de saúde dos parentes mais próximos ou simplesmente saber acerca dos animais de estimação. Poderá, à primeira vista, parecer algo banal, mas os utentes sentiam-se importantes e únicos, levando a que pudessem falar mais livremente dos seus problemas ou simplesmente desabafar, encontrando na farmácia compreensão e uma palavra amiga.

2.1.5. Diversidade de produtos

A FMP é uma farmácia que aposta na inovação e diversidade de produtos, acompanhando as tendências. Considero um ponto forte, pois obriga a manter-me sempre atualizada das tendências e a trabalhar com vários produtos da mesma categoria e ao mesmo tempo.

Na perfumaria, por exemplo, oferecemos uma vasta gama de perfumes da marca Pharma iap parfums®. Na dermo-cosmética, trabalhamos essencialmente com 5 linhas: Uriage®, Lierac®, Noreva®, Aveeno® e Papillon®. Para tratamento capilar contamos com um expositor só com produtos da Phyto®, apesar de também disponibilizarmos outras marcas. Na área do desporto, barras energéticas, bebidas isotónicas e muitos outros produtos. Também temos uma vasta gama da marca EasySlim® para clientes que procuram uma alimentação que ajude a perder ou a manter o peso. Os produtos ortopédicos e para bebé também são igualmente diversos, ocupando estes últimos a maior área de exposição da sala de atendimento ao público.

Como a maior parte dos clientes habituais faz criação de animais, a farmácia dispõe de uma enorme diversidade e quantidade de produtos veterinários, o que me proporciona contacto com imensos produtos e medicamentos veterinários que não exclusivamente de animais de estimação como o cão e o gato.

2.1.6. Receção de encomendas

A receção de encomendas foi uma das primeiras coisas que me ensinaram quando comecei a estagiar e foi um dos pontos fortes do meu estágio curricular porque permitiu-me contactar diretamente com os mais variados produtos e medicamentos que iam chegando, criando assim desde logo uma certa familiaridade com alguns deles.

Quando as encomendas chegavam, eu abria o programa, carregava em *stock* e a seguir em gestão de encomendas. Verificava na fatura que as acompanhava qual o armazém fornecedor e escolhia a lista da encomenda para esse fornecedor caso estivesse pré-feita, senão fazia receção direta. De seguida, verificava a quantidade e estado de conservação dos produtos e procedia à sua inserção no programa. Os produtos eram adicionados, lendo o código de barras dos mesmos e, desse modo, eram contabilizados automaticamente, atualizando o *stock* existente na farmácia. Além da sua inserção, tinha que ter o cuidado de ir atualizando os prazos de validade, caso o *stock* do medicamento estivesse a zero. Se fosse um produto de venda livre, era retirado 6 meses ao prazo real e, desse modo, o produto podia ser sinalizado com antecedência quando o seu prazo estivesse a acabar, dando prioridade de escoamento.

No fim da receção era impresso um talão, associado ao nome do cliente, caso tenha produtos reservados. Havia ainda a possibilidade de enviar uma mensagem automática a informar a chegada dos mesmos.

2.1.7. Consultas de podologia e nutrição

As consultas de nutrição são semanais (todas as segundas-feiras) e são um sucesso no que toca, especialmente, à perda de peso. Foi notória a confiança dos clientes após começarem a ter resultados positivos derivados de uma alimentação dirigida às suas necessidades. Tal como as consultas de podologia (que são mensais e igualmente um enorme sucesso), foram um ponto forte no meu estágio porque me deram a oportunidade de ter um maior contacto com os mais variados produtos destas categorias, uma vez que as recomendações destes profissionais eram maioritariamente aviadas nesta farmácia.

2.1.8. Códigos DataMatrix

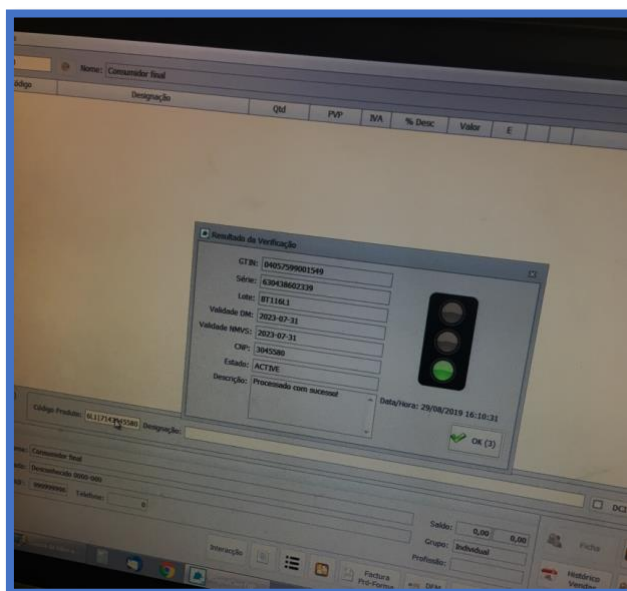


Figura 1 – Resultado da verificação de um código DataMatrix da Aspirina[®] no 4DigitalCare[®].

Os códigos DataMatrix têm como objetivo implementar a “Diretiva 2011/62/EU, “Diretiva dos Medicamentos Falsificados” e do Regulamento Delegado (EU) 2016/161, da Comissão, de 2 de outubro de 2015, pelos estados membros da EU”, pelo que uma das suas funções é a deteção de medicamentos falsos.¹



Figura 2 – Fotografia exemplo de um código DataMatrix e dispositivo de prevenção de adulterações.

Os códigos antigos são os chamados GTIN e permitem reconhecer um medicamento. Já os códigos novos, DataMatrix, funcionam como identificadores únicos.²

Ainda é possível fazer o *picking* tanto dos novos códigos, como dos antigos. Contudo, existem novas embalagens que já vêm exclusivamente com os novos códigos.

Considerei o aparecimento desta diretiva durante o meu estágio um ponto forte, pois fiquei com a oportunidade de estar familiarizada com estes novos códigos. O processo é um pouco demoroso (na leitura) e com algumas falhas, pelo que o seu funcionamento ainda não é completamente correto, mas num futuro próximo irá com certeza funcionar sem erros.

Testar a autenticidade dos medicamentos é uma mais valia na confiança do farmacêutico durante a dispensa dos medicamentos e na confiança do doente aquando a receção.

2.2. Pontos Fracos

2.2.1. Conhecimento na área da veterinária e dermocosmética

Tendo em conta os clientes habituais, agricultores com criação de animais, o pedido de aconselhamento farmacêutico na área da veterinária é muito comum nesta farmácia. Um dos pontos fracos no meu estágio foi a escassez de conhecimento no que toca a animais de criação, como galinhas, porcos, vacas, pombos, entre outros.

No início senti-me igualmente pouco confiante e à vontade para fazer aconselhamentos de dermocosmética porque o mercado oferece uma vasta gama de produtos e porque tinha

receio de fazer uma análise não correta ao tipo e necessidades dos mais variados tipos de pele.

Contudo, a equipa técnica, que sempre foi excelente, apresentou-me de forma detalhada as linhas cosméticas que vendiam na farmácia e em que situações aconselharia um produto em detrimento de outro, por exemplo. Os conhecimentos de veterinária foram os mais difíceis de assimilar, mas no fim do estágio já me sentia mais à vontade para fazer aconselhamentos para animais de criação. Já nos animais domésticos, senti sempre um pouco mais à vontade e confiante, dado estar mais familiarizada.

2.2.2. Prescrição por DCI

A maioria dos clientes são fidelizados e, por isso, quase todos possuem histórico de vendas. Por isso, quando aparecia um cliente com uma receita médica, o procedimento inicial consistia em procurar o nome no programa e aceder ao seu histórico de vendas. Era de elevada importância dispensar sempre o mesmo laboratório porque a maioria dos clientes eram idosos e pouco instruídos, não sabendo associar substâncias ativas ou os nomes dos medicamentos à respetiva doença e hora de toma, decorando, por isso, as caixas. Ao trocar de laboratório e dispensar uma caixa diferente, geraria então muita confusão e dificuldades para esses clientes.

Como existiam clientes que levavam medicamentos não genéricos, quando abria o histórico de vendas tinha uma certa dificuldade em associar o nome comercial à respetiva prescrição por DCI. Contudo, com o ganho de experiência, habituei-me primeiro a abrir a receita, no caso de ser eletrónica, e a carregar na lupa que aparecia ao lado do medicamento para ver qual a denominação da marca. Só depois abria o histórico de vendas e, caso o cliente levasse o medicamento de marca, já era mais fácil para mim fazer essa deteção. Era um procedimento mais demoroso, considerando assim um ponto fraco.

Já no final do estágio, o programa sofreu uma atualização e, ao abrir a receita, era logo indicado o último laboratório dispensado ao cliente, tendo facilitado e agilizado a dispensa de medicamentos.

2.2.3. Receitas manuais

Considero as receitas manuais um ponto fraco porque tinha muita dificuldade em perceber a letra de alguns médicos e, por isso, não me sentia confiante para disponibilizar um medicamento sem perguntar previamente a um elemento da equipa técnica.

Além do mais, requeria cuidados extra. Uma receita manual só pode ter 4 medicamentos no máximo, sendo que não pode ter mais de 2 medicamentos iguais, excetuando se for unidose, que nesse caso poderá conter até 4 medicamentos iguais. Também deverá vir acompanhada da assinatura do médico, da data de prescrição e das respetivas vinhetas. O regime de participação e os protocolos também me obrigavam a analisar a receita com mais atenção e estaria sempre mais vulnerável a erros, quando comparado com a dispensa de medicamentos numa receita eletrónica.

Contudo, apesar de considerar um ponto fraco, as receitas manuais têm a grande vantagem de poderem possibilitar a cedência de medicamentos quando o sistema falha ou nas consultas do médico ao domicílio.

2.3. Oportunidades

2.3.1. Formações

As formações são muito úteis para aprender, aprofundar e consolidar conhecimentos.

Durante o estágio, tive oportunidade de assistir a várias pequenas formações de delegados e conselheiras de linhas cosméticas (Uriage® e Lierac®) e assisti também a uma formação de suplementos alimentares, da BioActivo®, no dia 11 de abril, no Hotel Tryp, em Coimbra.

2.3.2. Realização de encomendas

A realização de encomendas é uma oportunidade para estar em contacto direto com o mercado e a ter uma melhor noção dos medicamentos que se encontravam esgotados.

Primeiro, abrimos o programa e carregamos em *stock*. Em seguida, escolhemos a opção de gestão de encomendas, depois carregamos em nova, sugerir e todos. Podemos escolher o mesmo fornecedor para todas as linhas ou escolher um a um, ou ainda escolher o mesmo fornecedor para todas as linhas e depois ir trocando só algumas linhas. No fim, carregamos

em OK, confirmar e enviar e finalizar. (Quando diz “a confirmar”, ligamos para confirmar se é possível obter o medicamento).

2.3.3. Realização de devoluções

Por vezes é necessário proceder à devolução de produtos ou medicamentos, quando: a validade está a acabar (a farmácia poderá devolver o medicamento consoante contrato com o fornecedor, normalmente 3 a 6 meses antes de acabar); o medicamento não é recebido em bom estado de conservação ou com validade curta (tendo até 48 horas para ser devolvido); quando se recebe uma circular a pedir a devolução ou ainda, quando o fornecedor envia um produto/medicamento não solicitado pela farmácia.

Para realizar o procedimento de devolução, abrimos o programa, carregamos em *stock* e, em seguida, em gestão de devoluções. Posteriormente, escolhemos a opção nova, fornecedor, seleção do motivo e, em seguida, temos que passar o código de barras do produto e o número da fatura que o acompanhou quando foi rececionado pela farmácia. Por fim, selecionamos a opção finalizar e imprimir.

2.3.4. População envelhecida e com pouca instrução

Dispensar medicamentos e comunicar com os nossos clientes habituais, que faziam parte de uma população envelhecida, teve no início alguns obstáculos que, para mim, foram encarados rapidamente como uma oportunidade de aprender e evoluir enquanto farmacêutica e ser humano.

Com o avançar da idade, os idosos têm cada vez mais problemas de visão e audição, principalmente. Aprendi a ter que comunicar, em certas situações, de forma mais pausada e num volume de voz mais aumentado, para garantir que todas as minhas recomendações eram bem compreendidas e que o cliente não ficara com nenhuma dúvida.

Ainda que em pequena percentagem, existem pessoas analfabetas e, nestes casos, recorria a desenhos nas caixas para explicar a posologia do medicamento. Por exemplo, se fosse para tomar ao pequeno almoço, desenhava um sol, se fosse ao almoço desenhava um prato com talheres e caso fosse à noite, desenhava uma lua.

Adaptar o meu discurso foi uma aprendizagem contínua e, certamente, onde mais evolui.

2.3.5. Cartão de pontos da farmácia



Figura 3 – Cartão de pontos da Farmácia Margato Pereira.

A FMP dispõe de um cartão de pontos que pode ser usado para acumular/ rebater pontos na aquisição de produtos ou serviços na farmácia. A adesão é muito simples e fácil, sendo apenas necessário o preenchimento de um formulário com alguns dos dados pessoais do titular do cartão.

O cartão + é gratuito e destina-se à fidelização dos clientes. Este é pessoal, intransmissível e destina-se a todos os clientes com idade igual ou superior a 18 anos, após o correto preenchimento do formulário. Não é um cartão de crédito ou débito e os pontos acumulados têm uma validade de 18 meses após a emissão dos mesmos. Além disso, os pontos não podem ser rebatidos por dinheiro nem dão direito a troco.

2.4. Ameaças

2.4.1. Medicamentos esgotados

Foi muito frequente estarem diversos medicamentos esgotados e, apesar de ser uma realidade que ultrapassa a farmácia, alguns clientes não ficavam muito satisfeitos.

Em situações mais complicadas, medicamentos sem similar, tinha que aconselhar o doente a ir ao médico expor a situação.

Os medicamentos esgotados, infelizmente, foi uma realidade muito presenciada durante o meu estágio e são uma ameaça à saúde de alguns doentes que precisam do acesso a estes medicamentos.

2.4.2. Medicamentos rateados

Considerarei uma ameaça porque senti não conseguir corresponder às expectativas de alguns doentes que, por vezes, não conseguiam ter logo acesso ao medicamento quando se dirigiam à farmácia, uma vez que a farmácia não conseguia ter um *stock* grande/razoável. Além disso, havia muito tempo dispensado ao telemóvel na tentativa de conseguir obter os respetivos medicamentos.

3. CASOS PRÁTICOS

3.1. Caso prático I

A senhora C., cliente habitual, dirige-se à farmácia queixando-se de dor aguda na ponta de um dos dedos da mão. Peço se posso observar e reparo que o dedo se encontra bastante inflamado e com sinais de infeção, não atingindo ainda a unha. Pergunto há quanto tempo reparou que o dedo se encontrava inflamado ou há quanto tempo sente dor e se sente comichão. Também pergunto se tinha sofrido algum traumatismo no dedo ou se o tinha perfurado com um corpo estranho. A cliente responde que tem assim o dedo há cerca de dois dias e, como trabalha no campo, com constante contacto com a água, o dedo ficou mais irritado, tendo piorado. Não sentia comichão, não tinha sofrido nenhum traumatismo, nem reparou na presença de um corpo estranho no local inflamado.



Figura 4 – Fotografia tirada ao dedo da senhora C., quando esta se dirigiu à farmácia.

Posto isto, aconselho a lavar o local com uma compressa esterilizada e soro fisiológico, a usar um spray antisséptico à base de clorhexidina para combater os microorganismos e uma pomada, Baciderma[®], à base de bacitracina e neomicina, para facilitar a cicatrização.³ Além disso, também aconselho a usar um penso à prova de água para evitar agravar ainda mais a irritação no dedo e, caso não sentisse uma melhoria ao fim de 2 ou 3 dias, para procurar um médico.

3.2. Caso prático 2

O senhor J., cliente com cerca de 40 anos, queixa-se que sente um ardor nos olhos, como se tivessem areia. Observo os olhos com atenção e reparo que estes se encontram visivelmente vermelhos e com as pálpebras inchadas. Pergunto há quanto tempo sente o ardor e se sente comichão e/ou teve alguma descarga de pus ou muco, que se manifesta, após secar, com pequenas crostas que se colam ao olho e dificultam a sua abertura ao acordar. Também pergunto se o cliente usa lentes de contacto e se tem tido os devidos cuidados de higiene com as mesmas. O cliente refere que faz uso de lentes de contacto, mas que não as tem usado nos últimos dias e que os sintomas começaram há 1 dia. Sente imensa comichão, mas que não sentiu a presença de muco nos olhos quando acordou.

Como os sintomas não começaram há muito tempo, não descarto a possibilidade de conjuntivite viral ou bacteriana, mas assumo como sendo uma conjuntivite alérgica dado que não apresenta muco e, além do mais, o cliente apresenta um histórico de medicamentos para a rinite alérgica crónica e poderá, de algum modo, estar associado.

Aconselho a limpeza dos olhos com soro fisiológico e compressas estéreis, a usar lágrimas artificiais para combater a secura ocular e a fazer uma pausa no uso das lentes de contacto. Relembro também para não esfregar os olhos porque pode acentuar a irritação e a não partilhar toalhas de limpeza do rosto, bem como a lavar bem as mãos antes e depois de lavar os olhos. Por fim, faço a advertência de procurar o médico caso os sintomas não desapareçam ao fim de 2 a 3 dias.

3.3. Caso prático 3

A senhora M., cliente regular, dirige-se à farmácia e pede aconselhamento de um creme facial para o filho. Informa que o mesmo tem 17 anos e apresenta vermelhidão na zona das bochechas, algo que o incomoda e lhe baixa a auto-estima.

Sugeri levar o *pack* roséliane creme + roséliane fluido de limpeza.^{4: 5} Expliquei que o fluido de limpeza era muito importante pois, além de limpar, iria apaziguar, suavizar e preparar a pele para a aplicação do creme. Em seguida, deverá aplicar o creme, insistindo mais na zona das bochechas, a fim de diminuir a vermelhidão e restaurar e proteger a barreira cutânea. Informo também que o fluido de limpeza não precisa de enxaguamento e pode ser aplicado com um algodão e que este procedimento deverá ser feito de manhã e/ou à noite.

Por fim, aconselhei evitar a exposição a temperaturas muito frias ou muito quentes e ao uso de um protetor solar sem perfume.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estágio curricular não só contribuiu para aprender e consolidar os conhecimentos adquiridos ao longo do mestrado, como também para aprender o valor da amizade no trabalho e o papel fulcral do farmacêutico na sociedade. Por isso, tenho a agradecer à excelente equipa técnica da FMP por me ter acolhido de braços abertos e por me ter apoiado nesta etapa tão importante do curso, assim como também à minha orientadora, Dra. Carla Borlido, pela orientação no relatório de estágio e por toda a disponibilidade que sempre me dispôs.

Aprendi que o trabalho numa farmácia comunitária é de elevada responsabilidade e importância e requer competências tanto profissionais, como humanas.

O mercado está a mudar, novos medicamentos estão a ser introduzidos e tantos outros estão constantemente esgotados ou deixam de ser produzidos. É preciso que estejamos sempre atualizados e com ideias novas e criativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INFARMED, I.P. – **Circular Informativa: Dispositivos de segurança – Implementação do Sistema – Obrigações legais entidades.** [Consultado a 19 de agosto de 2019]. Disponível em: <http://www.infarmed.pt/documents/15786/2897018/Dispositivos+de+seguranca+%3B+Implementacao+do+sistema+%3B+Obrigacoes+legais+entidades/e4715f8c-c6d0-4ec4-8a2f-bcd1934a6f83?version=1.0>
2. GSI PORTUGAL – **Guia para a Codificação de Medicamentos.** [Consultado a 19 de agosto de 2019]. Disponível em: https://www.gslpt.org/wp-content/uploads/2018/10/GSI-Portugal_Guia-para-a-Codificacao-de-Medicamentos.pdf
3. INFARMED, I.P. – **Folheto Informativo: Baciderma, pomada.** [Consultado a 9 de maio de 2019]. Disponível em: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=759&tipo_doc=fi
4. URIAGE, Eau Thermale – **Roséliane: Creme anti-vermelhidão.** [Consultado a 17 de maio de 2019]. Disponível em: <https://www.uriage.com/PT/pt/produtos/roseliane-creme-anti-rougeurs>
5. URIAGE, Eau Thermale – **Roséliane: Fluido de limpeza.** [Consultado a 17 de maio de 2019]. Disponível em: <https://www.uriage.com/PT/pt/produtos/roseliane-fluide-dermo-nettoyant>

MONOGRAFIA

**Monitorização *in vivo* de neurotransmissores e neuromoduladores
com sensores e biossensores baseados em microelétrodos**

Orientada pelo:

Professor Doutor Rui Barbosa

ABREVIATURAS

- **AMPc** – Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
- **AVC** – Acidente Vascular Cerebral
- **CFMs** – Microelétrodos de Fibra de Carbono
- **CNTs** – Nanotubos de carbono
- **DA** – Dopamina
- **DAT** – Transportador de Dopamina
- **DOPAC** – Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético
- **EC** – Eletroforese capilar
- **ECS** – Espaço Extracelular
- **fMRI** – Imagem por ressonância magnética funcional
- **FSCV** – Voltametria Cíclica de Varrimento Rápido
- **GABA** – Ácido gama-aminobutírico
- **HPLC** – Cromatografia líquida de elevada pressão
- **MAO** – Enzima Monoamina Oxidase
- **NM** – Neuromoduladores
- **NO** – Óxido nítrico
- **NT** – Neurotransmissores
- **PD** – Doença de Parkinson
- **PEPS** – Potencial Excitatório Pós-Sináptico
- **PET** – Tomografia por Emissão de Positrões
- **PIPS** – Potencial Inibitório Pós-Sináptico
- **SEM** – Microscopia eletrônica de varrimento
- **SNC** – Sistema Nervoso Central
- **TDAH** – Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade
- **VT** – *Volume Transmission*

RESUMO

O sistema nervoso central (SNC) é constituído por células neuronais que, entre outras funções, libertam neurotransmissores e neuromoduladores responsáveis pela comunicação química entre as células. Estas moléculas podem ser eletroativas e, portanto, serem detetadas por técnicas eletroquímicas como a amperometria e a voltametria cíclica de varrimento rápido.

O estudo, deteção e monitorização no espaço extracelular foi possível com a descoberta, aperfeiçoamento e miniaturização de microelétrodos implantados *in vivo*, dado que permitem a deteção e monitorização da neurotransmissão em tempo real e com elevada resolução espacial.

Os microelétrodos de fibra de carbono, dadas as vantagens que apresentam, foram os primeiros sensores químicos a revelar grande utilidade no estudo e monitorização de neurotransmissores e neuromoduladores *ex vivo* em fatias de cérebro e *in vivo* em animais anestesiados e acordados.

Palavras-chave: Sistema Nervoso Central, Neurotransmissores e Neuromoduladores, Espaço Extracelular, Microelétrodos, Amperometria, Voltametria Cíclica de Varrimento Rápido.

ABSTRACT

The central nervous system (CNS) is constituted by neuronal cells which, amongst other functions, release neurotransmitters and neuromodulators responsible for the chemical communication between cells. These molecules can be electroactive and, as such, be detected by electrochemical techniques such as amperometry and fast scanning cyclic voltammetry.

The study, detection and monitorization in the extracellular space was made possible by the discovery, enhancement and miniaturization of microelectrodes implanted *in vivo*, given that these allow for detection and monitorization of neurotransmissions in real time and with high special resolution.

The carbon fiber microelectrodes, given their advantages these allow for, were the first chemical sensors to reveal great utility in the study and monitorization of neurotransmitters and neuromodulators *ex vivo* in slices of brain and *in vivo* in anesthetized and awake animals.

Keywords: Central Nervous System, Neurotransmitters and Neuromodulators, Extracellular Space, Microelectrodes, Amperometry, Fast Scan Cyclic Voltammetry.

I. INTRODUÇÃO

A monitorização dos neurotransmissores e neuromoduladores pode ser feita recorrendo a métodos *ex vivo*, que são geralmente mais simples, apesar de necessitarem de cortes histológicos do cérebro de um organismo recentemente morto, ou através de métodos *in vivo* em animais anestesiados e acordados envolvendo registo crónicos. Como importa saber a cinética e o local onde estes neurotransmissores (NT) e neuromoduladores (NM) são libertados, é comum o uso dos métodos *in vivo*, e *ex vivo* em fatias de cérebro. (STUART, J. *et al.*, 2004)

O estudo de moléculas sinalizadoras no cérebro divide-se essencialmente em dois subgrupos: as técnicas de neuroimagem e as técnicas minimamente invasivas de microdiálise e micro(bio)sensores. A grande vantagem das técnicas de neuroimagem como a imagem por ressonância magnética funcional, (fMRI), e a tomografia de emissão de positrões, (PET), são o facto de não serem invasivas, contudo permitem uma monitorização com resolução temporal e espacial mais limitada. (KEHR, Jan e YOSHITAKE, Takashi, 2013). Por outro lado, as técnicas minimamente invasivas como a amperometria e a voltametria de varrimento rápido (FSCV) utilizando microssensores baseados em microelétrodos permitem uma monitorização mais resolutiva (temporal e espacial , além de oferecerem boa seletividade e sensibilidade. (ROBINSON, Donita L. *et al.*, 2008)

2. SISTEMA NERVOSO CENTRAL

2.1. Organização celular: Neurónio e Glia

O sistema nervoso central é constituído por neurónios e por células gliais que, entre outras funções, suportam e protegem os neurónios. Os neurónios são células altamente especializadas que formam circuitos e redes de elevada complexidade. São constituídos, de uma forma muito genérica, por dois prolongamentos celulares (dendritos e axónio), corpo celular, células de Schwann e pelos nódulos de Ranvier. Podem classificar-se tendo em conta a sua estrutura ou a sua função em neurónios aferentes (sensoriais), neurónios eferentes (motores) e neurónios de associação (interneurónios), sendo que a nível estrutural se podem ainda designar de multipolares, bipolares e unipolares. Os neurónios multipolares contêm vários dendritos e um axónio, constituindo a maioria dos neurónios do SNC. Os neurónios bipolares são constituídos apenas por um dendrito e um axónio e os neurónios unipolares contêm um axónio, mas não têm dendritos. (SEELEY, Rod R. *et al.*, 2011)

As células gliais (nevrógia) têm funções muito importantes no SNC, sendo estas responsáveis pela função fagocítica, pela formação da bainha de mielina e líquido cefalorraquidiano e ainda na formação da barreira hemato-encefálica. Os astrócitos constituem um tipo particular de células gliais importantes na regulação da composição do líquido extracelular do encéfalo, por isso uma lesão ao nível do encéfalo é acompanhada por uma astrocitose reativa. Além disso, também estão envolvidas na atividade sináptica e metabolismo, uma vez que libertam substâncias químicas que regulam estas funções.(SEELEY, Rod R. et al., 2011)

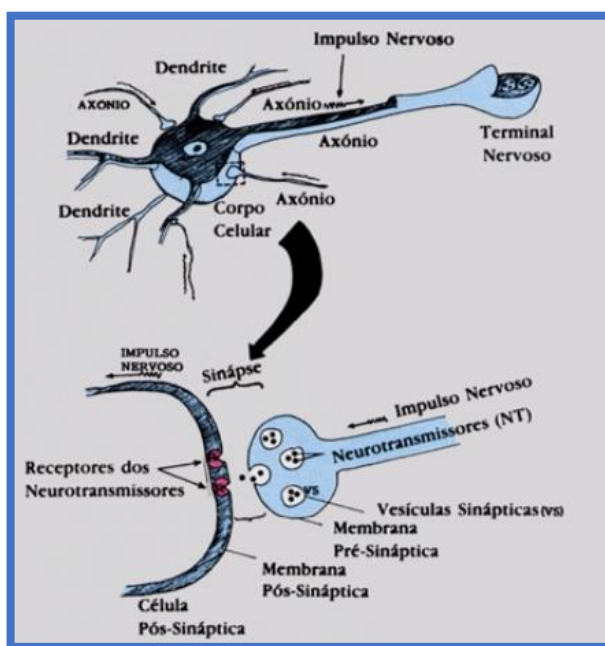


Figura 1 – Representação esquemática de um neurónio e sinapse. Representação esquemática de três zonas distintas de um neurónio: corpo celular, dendrites e axónio. São estes que, após libertação na fenda sináptica, são responsáveis pela comunicação química entre as células. (Adaptada de CARVALHO, Arsélio Pato, 1963)

As células endimárias também estão envolvidas na neurotransmissão, sendo o movimento do líquido cefalorraquidiano a sua principal função. O conjunto das células endimárias envolvidas em vasos sanguíneos constituem os plexos coroideus que são responsáveis pela secreção do líquido cefalorraquidiano. A micróglia atua, por fagocitose, em resposta a lesões ao nível do encéfalo. Por isso a sua quantificação se torna tão importante aquando da suspeita de um acidente vascular cerebral (AVC) ou uma infeção. Os oligodendrócitos constituem também a nevrógia, cuja função também reside sobretudo na formação das bainhas de mielina. (SEELEY, Rod R. et al., 2011)

2.2. Sinapse

As células comunicam umas com as outras através de sinapses, que podem ser elétricas ou químicas. Nas sinapses elétricas, os potenciais de ação são conduzidos rapidamente entre células. Através dos conexónios, o movimento de iões pode gerar uma corrente elétrica local que gera um potencial de ação na célula adjacente. As sinapses elétricas, apesar da sua importância ao nível do músculo cardíaco e músculo liso, não são muito comuns (ca. 10%) e, por isso, não irão aqui ser abordadas. (SEELEY, Rod R. et al., 2011)

As sinapses químicas são constituídas pelo terminal pré-sináptico, fenda sináptica e membrana pós-sináptica (Figura 2). Quando um potencial de ação chega a um terminal pré-sináptico, este produz e liberta neurotransmissores que se vão ligar de forma reversível a recetores específicos da membrana pós-sináptica. Portanto, é um processo que envolve a libertação de neurotransmissores e a sua posterior eliminação (*clearance*). (SEELEY, Rod R. et al., 2011)

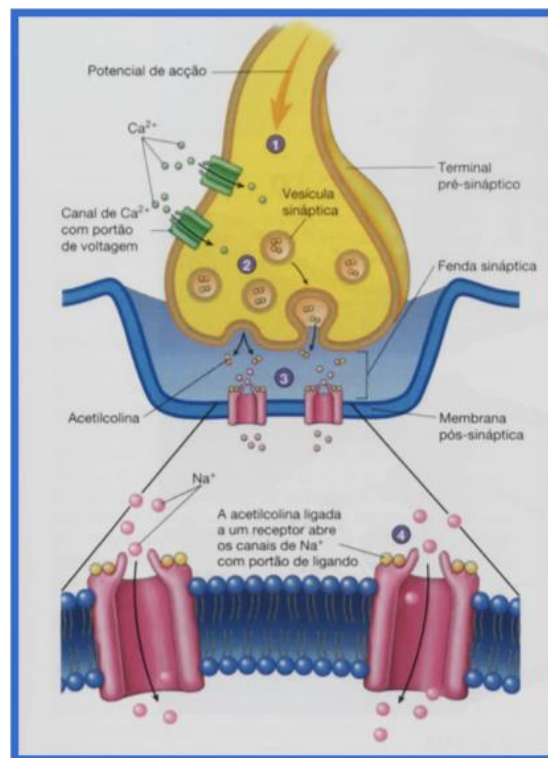


Figura 2 – Neurotransmissão química numa sinapse. (Adaptada de SEELEY, Rod R. et al., 2011)

De forma mais pormenorizada, quando um potencial de ação chega ao terminal pré-sináptico, são envolvidas reações e outros fenómenos que culminam com a libertação por exocitose de um ou mais neurotransmissores. Aos mesmo tempo, quando este potencial é aplicado, abrem-se os canais de cálcio dependentes do potencial e inicia-se a difusão destes

ções para dentro das células. A entrada destes íões nas células provoca a fusão da membrana pré-sináptica com vesículas sinápticas e estas libertarão, por exocitose, os neurotransmissores na fenda sináptica. Posteriormente, os neurotransmissores libertados poderão ligar-se, de forma reversível à membrana pós-sináptica, através da atuação de recetores específicos. Estes recetores estão estreitamente relacionados com os neurotransmissores, pelo que esta ligação é altamente específica. Além disso, os neurotransmissores poderão ligar-se a vários recetores, pelo que a resposta resultante nas células será diferente consoante a ligação que se estabeleça. (SEELEY, Rod R. *et al.*, 2011)

Por fim, os neurotransmissores serão removidos, pelo que o seu efeito na membrana pós-sináptica não é duradouro. Como exemplo, a enzima acetilcolinesterase que decompõe a acetilcolina e as enzimas monoamina oxidase (MAO) e catecol-O-metiltransferase que decompõem a noradrenalina. (SEELEY, Rod R. *et al.*, 2011)

2.3. Comunicação Química

Para que ocorra uma comunicação química entre as células, é necessário que se libertem neurotransmissores para a fenda sináptica pois, como já explicitado, os potenciais de ação não se propagam diretamente de uma membrana para a outra. (SEELEY, Rod R. *et al.*, 2011)

Inicialmente pensou-se que cada neurónio segregava apenas um tipo de neurotransmissor, contudo chegou-se à conclusão que um mesmo neurónio poderá produzir mais de um tipo de neurotransmissor. Uma vez que, dependendo do neurotransmissor e dos recetores que são recrutados, as células poderão assumir diversas atividades, uma desregulação na neurotransmissão poderá provocar doenças neuro-degenerativas ou psicóticas como por exemplo a doença de Parkinson, doença de Alzheimer e a depressão. (SEELEY, Rod R. *et al.*, 2011)

Os sinais pós-sinápticos poderão então ser de natureza excitatória ou inibitória, consoante a ligação que se estabeleça entre os neurónios e os recetores. Os neurónios excitatórios são responsáveis pela produção de um potencial excitatório pós-sináptico (PEPS), que resulta de uma despolarização local, com a conseqüente ocorrência de uma resposta estimulatória. Pelo contrário, uma resposta ao nível do SNC de natureza inibitória ocorre por ação dos neurónios inibitórios. (SEELEY, Rod R. *et al.*, 2011)

Existe também um grupo de substâncias neuroativas que atuam por “volume transmission” (VT), uma neurotransmissão particular que ocorre fora da fenda sináptica. Enquanto que a comunicação química na fenda sináptica é mais rápida e precisa, a VT ocorre

a uma menor velocidade, mas, no entanto, com um alcance maior. (TABER, Katherine H. *et al.*, 2014)

3. NEUROTRANSMISSORES E NEUROMODULADORES

Para que uma dada substância seja classificada como NT deverá ser sintetizada num neurónio, exercer um dado efeito numa célula-alvo após ser libertada do terminal pré-sináptico e ser detentora de um mecanismo capaz de a remover da fenda sináptica. (SCHWARTZ, James H., 2001)

Como exemplos de neurotransmissores/neuromoduladores temos a acetilcolina, as aminas biogénicas (serotonina, dopamina e noradrenalina), os aminoácidos (GABA, glicina, glutamato), as purinas (adenosina), os neuropeptídeos (substância P, endorfinas) e os gases (NO). (STUART, J. *et al.*, 2004; SEELEY, Rod R. *et al.*, 2011)

3.1. Compostos Eletroativos e Não Eletroativos

Tendo em conta as propriedades eletroquímicas, os neurotransmissores podem ser de dois tipos:

Eletroativos – apresentam propriedade redox de oxidação ou redução e, por isso, podem ser detetados diretamente em eléctrodos de trabalho por técnicas eletroquímicas.

Não Eletroativos – podem ser detetados por métodos eletroquímicos de forma indireta, por exemplo por via de uma reação enzimática com oxidases (biossensores eletroquímicos). (ROBINSON, Donita L. *et al.*, 2008)


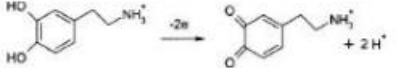
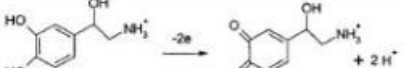

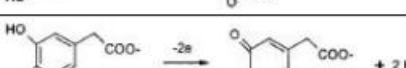
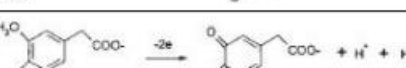
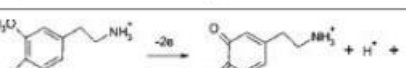


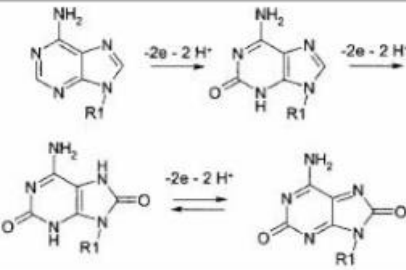
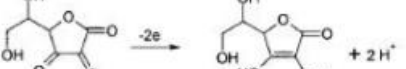

Molécula	Reação Redox	Potencial de Oxidação aproximado (in vivo). Ag/AgCl
L-DOPA		+0.4V
Dopamina		+0.2V
Noradrenalina		+0.2V
Adrenalina		+0.2V
DOPAC		+0.2V
Ácido homovanílico		+0.5V
3 – metoxitiramina		+0.5V
Serotonina		+0.35V
Ácido 5 – hidroxi-indolacético		+0.35V
Adenosina		1ª etapa: +1.2V
Ácido ascórbico		+0.2V
Ácido úrico		+0.3V

Figura 3 – Derivados da tirosina – deteção do potencial de oxidação das catecolaminas (dopamina, noradrenalina e adrenalina) e dos principais metabolitos da dopamina (DOPAC, ácido homovanílico e 3-metoxitiramina) através das suas reações redox.

Derivados do triptofano (serotonina e seu metabolito, ácido 5-hidroxi-indolacético) e outras moléculas eletroativas (adenosina, ácido ascórbico e ácido úrico) – deteção do potencial de oxidação através das suas reações redox. (Adaptada de ROBINSON, Donita L. et al., 2008)

Por observação da figura 3, podemos constatar que o ácido homovanílico e a 3-metoxitiramina, metabolitos resultantes da dopamina, apresentam potenciais mais positivos, pois a

sua reação redox leva à formação de metanol. Também podemos observar que as catecolaminas sofrem reações de oxidação similares (oxidação de 2 elétrões), pelo que apresentam potenciais de pico semelhantes. Portanto, como as catecolaminas e os seus metabolitos sofrem reações redox semelhantes, o processo de seleção das mesmas é mais difícil só com base nestas características.

A figura também sugere que a reação redox dos derivados do triptofano também envolve a oxidação de 2 elétrões, pelo que irão apresentar semelhantes potenciais padrão das catecolaminas. A adenosina sofre oxidação decomposta por 3 etapas, sendo o potencial de oxidação da primeira evidenciado na tabela bastante mais positivo quando comparado com os outros compostos. Dado que a concentração de ácido ascórbico no espaço extracelular é muito elevada (quando comparada com a concentração das catecolaminas e outros compostos), este constituiu uma das principais interferências para o estudo eletroquímico destes neurotransmissores. A oxidação do ácido ascórbico tem uma cinética lenta de transferência de elétrões, o que permite distingui-lo das catecolaminas através de métodos de varrimento rápido. Também é possível a implementação de eléctrodos modificados (com membranas seletivas), a fim de eliminar este interferente aquando do estudo das catecolaminas. (ROBINSON, Donita L. *et al.*, 2008)

3.2. Detecção e Monitorização no Espaço Extracelular do Cérebro

A deteção e monitorização *in vivo* no espaço extracelular (ECS) de NT e NM com elevada resolução espacial e temporal tem uma importância crucial para a compreensão do funcionamento do cérebro.

O ECS (20% do volume total do tecido) é preenchido pelo fluido extracelular, por isso a sua composição física tem influência na velocidade e no movimento deste fluido. Dada a complexidade do ECS, o movimento real dos NT e NM poderá ter diferentes velocidades em diferentes zonas. (TABER, Katherine H. *et al.*, 2014)

A microdiálise é uma das técnicas bioanalíticas mais utilizadas em investigação pré-clínica para monitorizar a dinâmica associadas às variações de concentração de neurotransmissores e neuromoduladores no espaço extracelular. (HASCUP, Kevin N. e HASCUP, Erin R., 2014) Além disso, permite seleccionar e detetar um elevado número de moléculas quando associada a técnicas separativas de elevada resolução como a cromatografia líquida de elevada pressão (HPLC) ou eletroforese capilar (EC). (BUCHER, Elizabeth S. e WIGHTMAN, R. Mark, 2015)

É utilizada uma sonda fabricada com uma membrana de diálise numa das suas extremidades no interior da qual flui uma solução de perfusão. As moléculas de baixo peso molecular atravessam a membrana semipermeável devido ao gradiente de concentração e são depois analisadas por métodos separativos convencionais (e.g. HPLC, EC). (HASCUP, Kevin N. e HASCUP, Erin R., 2014) As taxas de fluxo usadas são relativamente baixas, de modo a prevenir danos nos tecidos, pelo que a técnica se torna demasiado lenta. (BUCHER, Elizabeth S. e WIGHTMAN, R. Mark, 2015)

Esta técnica apresenta como principais desvantagens o dano significativo causado nos tecidos devido à dimensão das sondas com diâmetros $>200\ \mu\text{m}$ e ainda a baixa resolução temporal (ca. 10 min). (HASCUP, Kevin N. e HASCUP, Erin R., 2014)

Uma alternativa na monitorização dos neurotransmissores envolve a utilização de métodos espectroscópicos como a fMRI ou PET cuja principal vantagem deriva de serem abordagens não invasivas e poderem ser utilizadas em humanos. No entanto, apresentam uma baixa resolução temporal e espacial e implicam a utilização de agentes farmacológicos. (KEHR, Jan e YOSHITAKE, Takashi, 2013)

Como vimos anteriormente, vários NTs e NMs são facilmente oxidáveis em eléctrodos de carbono ou platina a potenciais relativamente baixos, ca. $+0.5\ \text{V vs. Ag/AgCl}$, de que são exemplos a dopamina, a noradrenalina, serotonina e o ascorbato. Por isso, podem ser detetadas por métodos eletroquímicos com a utilização por exemplo de microeléctrodos de fibra de carbono. (ROBINSON, Donita L. *et al.*, 2008)

Também os níveis de oxigénio no cérebro e o peróxido de hidrogénio demonstraram um papel relevante como moléculas sinalizadoras e como moduladores dos neurotransmissores. A técnica da amperometria (método eletroquímico, abordado mais à frente), é uma das técnicas que permite, por exemplo a deteção de oxigénio com a utilização de microeléctrodos. (LEDO, Ana *et al.*, 2005) O glutamato (importante NT excitatório no SNC dos mamíferos) e o ascorbato são igualmente medidos no cérebro, usando biossensores de microeléctrodos. (FERREIRA, Nuno R. *et al.*, 2018; LOURENÇO, Cátia F. *et al.*, 2017) O óxido nítrico, de estrutura $\text{N}=\text{O}$, é também um neuromodulador que pode ser detetado fazendo uso de eléctrodos com membranas específicas. (ROBINSON, Donita L. *et al.*, 2008) Este é responsável essencialmente por um efeito excitatório ao nível do SNC, do pénis e da glândula supra-renal (SEELEY, Rod R. *et al.*, 2011), regulando de forma crítica diversas funções celulares e teciduais. (TOLEDO JR., Jose Carlos e AUGUSTO, Ohara, 2012) Por isso, o seu estudo é tão importante para a compreensão da neurotransmissão e na associação a diversas doenças neurológicas. Os métodos eletroquímicos têm sido usados para detetar e medir o NO *in vivo*,

recorrendo a microelétrodos implantados no cérebro. Contudo, este neuromodulador apresenta algumas dificuldades no seu estudo, uma vez que reage fortemente com outras moléculas biológicas e apresenta baixa concentração e tempo de semi-vida. Ainda assim, tratando-se de uma molécula hidrofóbica, de dimensões reduzidas, com rápida difusão e boas propriedades referentes à taxa e padrão de mudanças de concentração, faz com que seja possível estudar as várias ações realizadas no cérebro. (BARBOSA, Rui M. *et al.*, 2008; SANTOS, Ricardo M. *et al.*, 2008)

4. SENSORES QUÍMICOS E BIOSSENSORES BASEADOS EM MICROELÉTRODOS

Alguns NTs e NMs não são possíveis de estudar de forma indireta porque torna-se difícil compreender a quantidade libertada, dinâmica de concentração e a localização espacial. O início das medidas diretas da neurotransmissão foi possível com o uso dos microelétrodos. (DALE, Nicholas *et al.*, 2005)

Um sensor químico ou biossensor, de uma forma muito genérica, converte um sinal (não elétrico) num sinal geralmente elétrico, utilizando um transdutor que permitirá obter um sinal mensurável depois de processado. (KARUNAKARAN, Chandran *et al.*, 2015) A transdução de sinal pode ser de base eletroquímica, ótica, piezoelétrica entre outras. Nesta monografia irão ser abordados apenas os sensores e biossensores eletroquímicos.

O biossensor tem como principal característica possuir uma molécula biológica ou bioreceptor (e.g. enzima, DNA ou anticorpo) em estreito contacto com o transdutor. A acumulação do produto ativo no biossensor indica a concentração do analito. (DALE, Nicholas *et al.*, 2005) Os biossensores podem ainda ser classificados de catalíticos ou de afinidade, sendo que os primeiros geram produtos resultantes da reação química de uma enzima, célula ou tecido com um substrato, enquanto que nos biossensores de afinidade não ocorrem transformações químicas, mas sim formação de complexos. (KARUNAKARAN, Chandran *et al.*, 2015)

As aplicações dos sensores e biossensores são inúmeras, seja na área da saúde, controlo de qualidade, alimentos, ambiente, entre outras. No entanto, a sua aplicação na área da saúde, nomeadamente na monitorização de moléculas no cérebro, necessitou de sofrer algumas adaptações. Isto porque a zona de análise, o cérebro, sendo muito sensível, provoca facilmente reações adversas e efeitos indesejáveis aquando da sua implantação. (VASYLIEVA, Natalia, 2012)

O primeiro biossensor, o eletrodo de oxigênio de Clark, permitiu registrar continuamente e em tempo real a saturação do oxigênio no sangue, o que contribuiu para a segurança dos doentes durante as cirurgias ou quando estes estavam em condições de risco de hipoxia, por exemplo. Atualmente, os eletrodos amperométricos e potenciométricos usados para monitorização de gases, baseiam-se na ideia de Clark que implementou o uso de uma membrana ou um revestimento semipermeável para proteger o sensor de interferentes. (KEHR, Jan e YOSHITAKE, Takashi, 2013; LEDO, Ana *et al.*, 2017)

Entre os sensores eletroquímicos, os sensores voltamétricos são os mais sensíveis para o estudo de espécies eletroativas. Estes são constituídos, geralmente, por uma célula com três eletrodos: um eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência e um eletrodo auxiliar. Também é necessário um eletrólito de suporte (eletrólito inerte) com elevada concentração, de modo conferir elevada condutibilidade elétrica à solução e a impedir ou minimizar a migração dos íons eletroativos causada pelo campo elétrico. (KEHR, Jan e YOSHITAKE, Takashi, 2013)

Inicialmente, os eletrodos convencionais eram de pasta de carbono. Estes detêm boas propriedades eletroquímicas, boa compatibilidade biológica e baixo custo, mas não eram passíveis de miniaturização. Apesar da miniaturização dos eletrodos constituir uma grande vantagem porque se tornam menos invasivos, à medida que o tamanho é reduzido, também as corrente redox medidas são mais baixas, o que acarreta maiores interferências elétricas no sinal analítico. (DALE, Nicholas *et al.*, 2005)

Os microeletrodos de metal (platina, por exemplo) também conferem vantagens ao estudo eletroquímico, pois são altamente biocompatíveis e inertes (não provocam reações derivadas da corrosão, podendo ser implantados por um longo período de tempo) e têm boa condutividade. (LEDO, Ana *et al.*, 2017)

4.1. Microeletrodos de Fibra de Carbono

Os microeletrodos de fibra de carbono (CFMs) foram desenvolvidos no final da década de 1970 (SANTOS, Ricardo M. *et al.*, 2008) com o objetivo de estudar a dinâmica dos neurotransmissores no cérebro com elevada resolução temporal e espacial. (KEHR, Jan e YOSHITAKE, Takashi, 2013) As fibras de carbono podem ter dimensões variáveis, (ROBINSON, Donita L. *et al.*, 2008) sendo que as mais utilizadas têm 7 μm ou 30 μm de diâmetro.

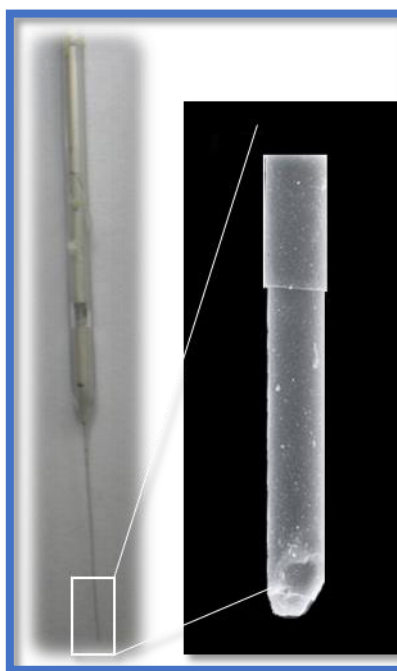


Figura 4 – Microfotografia obtida por microscopia eletrônica de varrimento de um microelétrodo de fibra de carbono com 30 μm . (Cedida por: BARBOSA, Rui)

No processo de fabricação dos CFMs, a fibra de carbono é inserida dentro de um capilar de vidro que é depois estirado num “puler” cortando-se a ponta da fibra com uma pinça ou tesoura na dimensão e geometria desejada, cilíndrica ou em disco. (SANTOS, Ricardo M. *et al.*, 2008) Usando o mesmo princípio dos CFMs, poderão fabricar-se com fios microscópicos (25 a 125 μm) de ouro ou platina. (ROBINSON, Donita L. *et al.*, 2008)

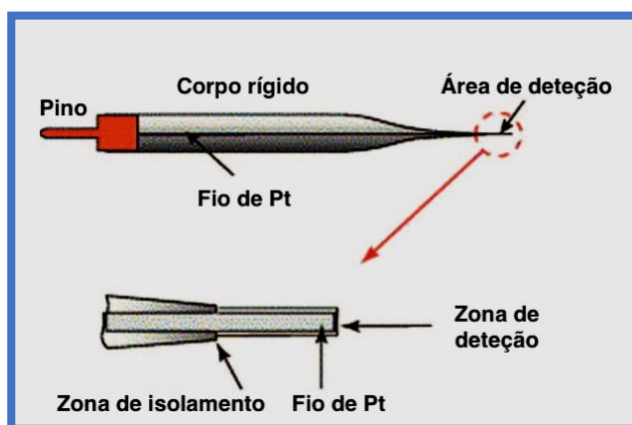


Figura 5 – Representação de um microelétrodo de fio de platina.

O corpo rígido contém um pino na extremidade (onde se liga o potenciostato) e uma ponta sensora fina na outra extremidade (onde emerge o fio de platina, conectado ao pino – área de detecção). A área de detecção contém, entre outros componentes, a camada enzimática e uma zona de isolamento para evitar interferências. (ROBINSON, Donita L. *et al.*, 2008)

Dada a sua fragilidade, estes microelétrodos quebram com facilidade o que obriga a cuidados especiais na sua utilização. Enquanto a geometria cilíndrica é considerada mais adequada para registos *in vivo* ou *ex vivo* em tecidos, a geometria em disco planar é muito útil para avaliar processos de exocitose em células individualizadas. (ROBERTS, James G. e SOMBERS, Leslie A., 2018)

Existem grupos funcionais na superfície da fibra de carbono que podem ser oxidados por aplicação de um potencial positivo usualmente entre +1.0 V e +2,0 V (anodização), possibilitando o aumento da taxa de transferência de eletrões à superfície, um aumento da sensibilidade e diminuição do limite de deteção (LOD), devido em parte a uma maior adsorção dos compostos. No entanto, a superoxidação poderá provocar uma menor seletividade, pelo que nos estudos mais recentes não é usual potenciais acima de +1,4 V. (ROBINSON, Donita L. *et al.*, 2008; ROBERTS, James G. e SOMBERS, Leslie A., 2018)

As vantagens dos microelétrodos de fibra de carbono são inúmeras: fabrico fácil e barato quando comparados com os elétrodo metálicos (não influenciando de modo negativo a cinética de transferência de eletrões); possibilidade de aplicação de um potencial de oxidação mais positivo, quando comparados com os elétrodos de metal e, dada as reduzidas dimensões com que podem ser fabricados, os CFMs induzem uma menor disrupção e dano nos tecido quando comparados com microelétrodos de maiores dimensões. Por isso, os fios de platina e ouro são usados maioritariamente em elétrodos enzimáticos (deteção *in vivo* de substratos metabólicos como a glicose ou o lactato com oxidases), também estes protegidos com um filme polimérico que irá minimizar as interferências químicas e minimizar o bloqueio da resposta devido à reação inflamatória. (ROBINSON, Donita L. *et al.*, 2008)

A seletividade *in vivo* e *in vitro*, contudo, é uma das principais desvantagens do uso dos CFMs, por isso estes recebem um pré-tratamento eletroquímico e um revestimento com membranas e polímeros semipermeáveis na área da superfície ativa. Além disso, técnicas eletroquímicas como a FSCV ou a cronoamperometria de alta velocidade, uma vez que permitem uma boa identificação da substância em estudo (através das reações de oxidação que ocorrem na superfície do elétrodo), permitem contornar o problema da seletividade. (SANTOS, Ricardo M. *et al.*, 2008)

4.2. Deteção da Dopamina

A dopamina é um neurotransmissor/neuromodulador do grupo das catecolaminas e que desempenha um papel muito importante no SNC, pois está na base de várias funções

fisiológicas e fisiopatológicas como o circuito da recompensa, dependência, cognição, memória, humor e motivação. (NIELSEN, Anne Kathrine *et al.*, 2019)

Existem 5 recetores da dopamina: D1 (responsável pela formação de AMPc), D2, D3, D4 e D5. (IVERSEN, Susan D. e IVERSEN, Leslie L., 2007)

O transportador da dopamina (DAT) tem a função de recaptar este neurotransmissor da fenda sináptica. Uma desregulação deste transportador provocará estados de doença, pelo que a sua importância é notória. Por exemplo, a Doença de Parkinson está associada à desregulação do DAT, com consequência na baixa concentração de DA. (NIELSEN, Anne Kathrine *et al.*, 2019) O primeiro tratamento a surgir, após a associação da diminuição acentuada de DA e a PD, foi com L-DOPA, cujas dosagens e combinações foram sendo melhoradas ao longo do tempo. (IVERSEN, Susan D. e IVERSEN, Leslie L., 2007)

Um elevado número de pessoas à escala mundial sofre com a Doença de Parkinson, pelo que se tem despoletado uma enorme investigação nesta área que permita entender como atua este neurotransmissor e de que forma a diminuição da sua concentração poderá provocar um estado de doença. (SOUZA, Cheylla Fabricia M. *et al.*, 2011)

Também o Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade (TDAH) está associado a uma diminuição da concentração da DA na fenda sináptica. As anfetaminas poderão ser uma forma de tratamento, mas têm a desvantagem de provocar uma libertação muito acentuada da DA. Assim sendo, o metilfenidato é uma alternativa de tratamento, pois inibe o DAT, diminuindo assim a recaptação da DA, ao invés de provocar libertações indiscriminadas da mesma. (IVERSEN, Susan D. e IVERSEN, Leslie L., 2007)

A diálise intracerebral é um dos métodos de deteção da DA. Neste processo, são implantadas sondas miniaturizadas e pequenas quantidades de DA e os respetivos metabolitos são separados por HPLC. Posteriormente, tendo em conta tratar-se de um composto eletroativo, a DA é medida por deteção eletroquímicas. (IVERSEN, Susan D. e IVERSEN, Leslie L., 2007)

As técnicas de neuroimagem dado não serem invasivas permitiram o começo do estudo da DA no cérebro do ser humano. (IVERSEN, Susan D. e IVERSEN, Leslie L., 2007) Contudo, os estudos *in vivo* e *ex vivo* por FSCV permitiram a monitorização das flutuações deste neurotransmissor. (HERMANS, Andre *et al.*, 2008)

5. MÉTODOS ELETROQUÍMICOS EM NEUROCIÊNCIAS

Os métodos eletroanalíticos fundamentam-se em propriedades elétricas mensuráveis, tais como a diferença de potencial, corrente e carga elétrica, entre outras, a partir da interação de fenômenos de oxidação-redução de uma dada espécie química. Estes fenômenos de interação podem ser observados aquando da aplicação de uma perturbação elétrica devidamente controlada. As informações sobre um dado analito são obtidas medindo a corrente redox, que resulta da aplicação de uma diferença de potencial entre o eletrodo de referência e o eletrodo de trabalho. (BUCUR, Bogdan, 2012)

5.1. Amperometria

Na análise de espécies eletroativas pela amperometria, uma vez que se trata de uma técnica eletroquímica, a transferência de eletrões durante as reações redox dessas mesmas espécies, permite a medição de uma corrente redox, possibilitando assim a deteção da substância eletroativa. (ROBINSON, Donita L. *et al.*, 2008)

Nesta técnica, é aplicado um potencial constante ao eletrodo de trabalho (geralmente mais positivo do que o necessário para a oxidação do substrato) e é medida a corrente redox ou faradaica que resulta da oxidação ou redução da espécie química, (LAMA, Rinchen D. *et al.*, 2012; WIGHTMAN, R. Mark, 2006) o que possibilita a quantificação do número de moléculas eletroativas. (KITA, Justin M. e WIGHTMAN, R. Mark, 2008)

Os neurónios, quando estimulados, libertam NTs e estes são determinados a partir da forma do pico. (BUCHER, Elizabeth S. e WIGHTMAN, R. Mark, 2015) Os poros de fusão influenciam a seletividade química das substâncias a serem libertadas das vesículas durante a neurotransmissão, pois o seu tamanho permite a passagem de certas moléculas em detrimento de outras. (FATHALI, Hoda e CANS, Ann-Sofie, 2018) A cinética da abertura do poro de fusão entre a membrana da célula e a vesícula é ditada pelo tempo que o pico demora a subir. (BUCHER, Elizabeth S. e WIGHTMAN, R. Mark, 2015)

Monitorizar vesículas de pequenas dimensões pode ser uma tarefa bastante complicada, por isso é comum a associação de técnicas eletroquímicas com técnicas de neuroimagem, pois estas últimas fornecem informações complementares no que diz respeito ao rastreamento da vesícula desde a fusão até à libertação dos NTs. (FATHALI, Hoda e CANS, Ann-Sofie, 2018)

Uma das grandes vantagens da amperometria é a possibilidade de registar sinais com elevada resolução temporal na ordem dos milissegundos. (WIGHTMAN, R. Mark, 2006) Além disso, os reagentes não sofrem adsorção na superfície dos eletrodos, uma vez que as espécies

são imediatamente eletrolisadas. (ROBINSON, Donita L. et al., 2008) A simplicidade de execução da técnica é considerada outra grande vantagem. (FATHALI, Hoda e CANS, Ann-Sofie, 2018) Uma das desvantagens é a seletividade limitada (ROBINSON, Donita L. et al., 2008) principalmente se é utilizado um potencial elevado ($> +0.5V$) a partir do qual muitos compostos presentes no espaço extracelular do cérebro sofrem oxidação em elétrodos de carbono ou platina. (ROBINSON, Donita L. et al., 2008) Por isso, dado a reduzida seletividade, os sensores e biossensores são revestidos com filmes poliméricos que conferem um aumento da seletividade, excluindo assim interferentes. (ROBERTS, James G. e SOMBERS, Leslie A., 2018)

Comparativamente à FSCV, a amperometria é uma técnica mais uniforme e necessita de apenas um único instrumento de análise, além de permitir registros contínuos ao longo de várias horas (dado que sofre menos flutuações na corrente capacitiva). (LEDO, Ana et al., 2018)

Esta técnica pode ser usada para detetar e monitorizar a dinâmica de concentração de neurotransmissores e neuromoduladores incluindo substâncias secretadas por exocitose a partir de vesículas ou grânulos contidos a partir de células individualizadas. Além disso, faz distinção entre sinais que possam surgir de estímulos elétricos não seletivos (células e nervos periféricos). (LAMA, Rinchen D. et al., 2012; ROBERTS, James G. e SOMBERS, Leslie A., 2018)

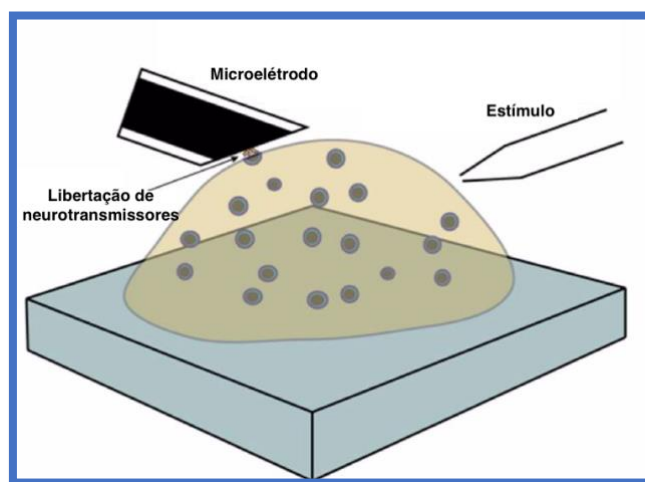


Figura 6 – Liberação de neurotransmissores por aplicação de um potencial de ação a um microelétrodo próximo de uma célula.

Após a aplicação de um potencial de ação, as vesículas libertam moléculas eletroativas (por exemplo, catecolaminas) que depois são detetadas (pela forma do pico) e quantificadas (pelo tempo que o pico demora a subir). (Adaptada de FATHALI, Hoda e CANS, Ann-Sofie, 2018)

A amperometria tem sido amplamente utilizada na detecção de catecolaminas e muitos outros neurotransmissores e neuromoduladores. (ROBINSON, Donita L. *et al.*, 2008; LEDO, Ana *et al.*, 2017) Além disso, também pode ser aplicada em imunoenaios, uma vez que correlaciona a quantidade de anticorpos e antigénios que se ligam e tem também permitido estudos adicionais de proteínas, como por exemplo, a correlação de uma diminuição da libertação de dopamina e noradrenalina com o silenciamento genético da sinaptotagmina I, ou ainda a correlação de uma maior libertação de catecolaminas com a diminuição da sinapsina. (KITA, Justin M. e WIGHTMAN, R. Mark, 2008)

5.2. Voltametria Cíclica de Varrimento Rápido

A FSCV é uma variante da voltametria cíclica, usada mais particularmente em neurociência, (ROBERTS, James G. e SOMBERS, Leslie A., 2018) pois é bastante útil em estudos onde seja necessário acompanhar mudanças químicas consideravelmente rápidas (HERMANS, Andre *et al.*, 2008), dado que permite estudar uma comunicação química em tempos na ordem do subsegundo. (ROBERTS, James G. e SOMBERS, Leslie A., 2018)

Esta técnica surgiu em alternativa à microdialise, uma vez que é menos invasiva e tem uma melhor resolução temporal. (KITA, Justin M. e WIGHTMAN, R. Mark, 2008)

Faz uso de uma forma de onda triangular que é aplicada a um microelétrodo a uma elevada taxa de varrimento (>100 V/s), oxidando e reduzindo rapidamente espécies eletroativas na superfície do eletrodo. Além disso, a forma de onda triangular, uma vez que pode ser repetida, permite recolher informações cinéticas acerca do NT em estudo. (ROBERTS, James G. e SOMBERS, Leslie A., 2018) Alterando os limites potenciais, a taxa de varrimento e a frequência de aplicação da forma de onda é possível controlar e otimizar os vários aspetos de desempenho, como a sensibilidade, a seletividade e a resolução temporal. (ROBINSON, Donita L. *et al.*, 2008; ROBERTS, James G. e SOMBERS, Leslie A., 2018)

O voltamograma cíclico (representação gráfica da análise voltamétrica – corrente redox com função de um potencial aplicado) permite detetar e identificar as espécies através dos potenciais de pico e, posteriormente, as correntes de pico são convertidas em concentrações, usando fatores de calibração que se podem obter através de padrões com uma concentração conhecida. (ROBERTS, James G. e SOMBERS, Leslie A., 2018)

Esta técnica faz uso de dois ou três eletrodos, sendo aqui referenciado o sistema de três eletrodos (circuito potenciostático) que é o mais usual para estas medições analíticas, pois contorna as limitações do uso de apenas dois eletrodos. Enquanto a técnica de dois eletrodos implica a existência de apenas do eletrodo de trabalho e do eletrodo de referência, a técnica

de três elétrodos faz uso de um terceiro eletrodo, o eletrodo auxiliar, que pode ser de platina, ouro, carbono vítreo, ou outros materiais. A inserção do eletrodo auxiliar é mais adequada em soluções de elevada resistência eletrolítica que não é o caso do fluido extracelular. No entanto, quando usado o eletrodo auxiliar em medições eletroquímicas no cérebro, este é geralmente em aço inoxidável. (PACHECO, W. F. *et al.*, 2013)

Um dos aspectos mais importantes desta técnica é a velocidade de varrimento, que pode ser aumentada (devido aos CFMs que toleram aplicações de taxas de varrimento mais rápidas) passando a ser compatível com o intervalo de tempo da sinalização neuroquímica. As elevadas velocidades de varrimento do potencial são possíveis com a utilização de microeletrodos, ainda assim geram elevadas correntes capacitivas que têm que ser subtraídas para se poder medir a corrente faradaica resultante da reação redox do analito. (ROBERTS, James G. e SOMBERS, Leslie A., 2018)

As catecolaminas, dado serem compostos catiónicos a pH fisiológico, ficam adsorvidas na superfície do eletrodo quando este é mantido a um potencial negativo, ficando pré-concentradas antes de se iniciar o processo (método para aumentar a seletividade e diminuir o limite de detecção). (ROBINSON, Donita L. *et al.*, 2008)

Esta técnica tem sido frequentemente utilizada para investigar os mecanismos reguladores da libertação e recaptção da DA em sub-regiões do estriado. (HERMANS, Andre *et al.*, 2008) A forma de onda para detetar e monitorizar a DA usualmente varia de -0,4V a +1,3V, a 400 V/s, com uma frequência de 10 Hz e mantendo um potencial de -0,4 V durante 90 ms entre cada varrimento. A amplitude do sinal traduz a mudança de concentração da DA na superfície do eletrodo e as flutuações químicas são facilmente observadas pela recolha consecutiva dos voltamogramas. (ROBERTS, James G. e SOMBERS, Leslie A., 2018)

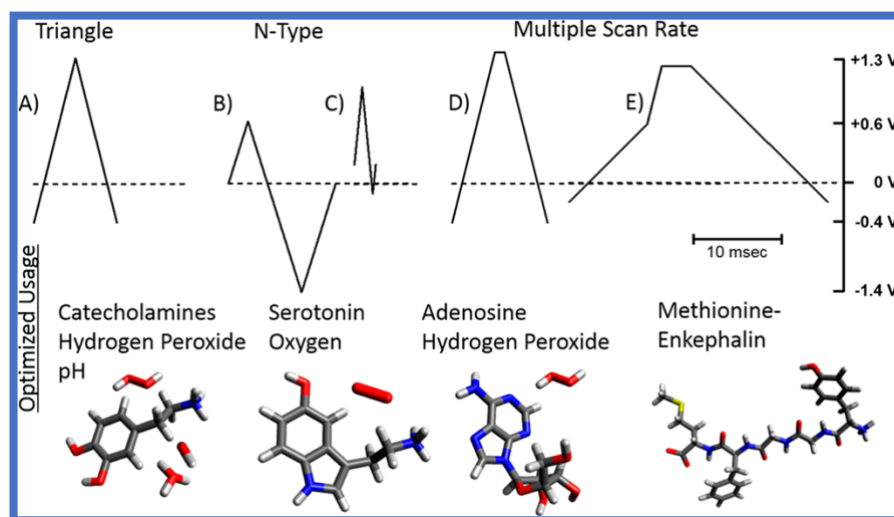


Figura 7 – Formas de onda mais comuns da FSCV: forma de onda triangular (A), formas de onda em “N” (B e C) e formas de onda com taxa de varrimento múltiplo (D e E). (Adaptada de ROBERTS, James G. e SOMBERS, Leslie A., 2018)

A forma de onda triangular padrão (Figura 7, A) é comumente utilizada para quantificar catecolaminas, peróxido de hidrogênio e mudanças no pH. Tal como podemos observar na figura, esta onda é limitada por potenciais que variam de -0,4V a +1,3V. Para diferenciar a noradrenalina da adrenalina, por exemplo, basta alterar a forma da onda, pois a adrenalina sofre uma reação secundária que irá gerar um pico adicional no voltamograma. Podemos também observar que a adenosina sofre dois picos de oxidação (Figura 7, D), gerando um voltamograma característico que a diferencia das catecolaminas e outras substâncias. (ROBERTS, James G. e SOMBERS, Leslie A., 2018)

Portanto, analisando os dados de um voltamograma (picos de oxidação característicos, taxa de varrimento, entre outros) podemos detectar e selecionar facilmente uma substância, dando assim importante relevância a esta técnica para o estudo e monitorização de neurotransmissores e neuromoduladores.

6. Considerações Finais

Outrora, grande parte das doenças relacionadas com o SNC eram difíceis de compreender porque não existiam metodologias bioanalíticas capazes de as correlacionar com as moléculas presentes no fluido extracelular. A descoberta das propriedades eletroativas em algumas dessas moléculas permitiu que emergissem finalmente algumas técnicas eletroquímicas capazes de as detetar e monitorizar.

A evolução dos sensores para os microssensores, dada a suas vantagens, permitiu que os neurotransmissores e neuromoduladores fossem analisados em tempo real mais eficazmente e com elevada resolução espacial. Certos estados comportamentais de um organismo puderam ser assim relacionados com a desregulação de alguns neurotransmissores e, deste modo, aumentou a compreensão de certos estados de doença e como os controlar ou minimizar. Entre as técnicas mais usadas para este estudo analítico, estão a amperometria e a voltametria cíclica de varrimento rápido, dadas as vantagens que apresentam.

O conhecimento atual acerca das dinâmicas da neurotransmissão e da neuromodulação ainda é um longo caminho a percorrer, mas irá seguramente contribuir cada vez mais no futuro para a compreensão dos mecanismos envolvidos nos distúrbios psicóticos e nas doenças neurodegenerativas que afetam um número crescente de seres humanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, Rui M.; LOURENÇO, Cátia F.; SANTOS, Ricardo M.; POMERLEAU, Francois; HUETTL, Peter; GERHARDT, Greg A.; LARANJINHA, João – ***In Vivo Real-Time Measurement of Nitric Oxide in Anesthetized Rat Brain***. *Methods in Enzymology*. 441:8 (2008), p. 351-367.
- BUCHER, Elizabeth S.; WIGHTMAN, R. Mark – ***Electrochemical Analysis of Neurotransmitters***. *Annual Review of Analytical Chemistry*. 8:1 (2015), p. 239-261.
- BUCUR, Bogdan – ***Technological Barriers in the Use of Electrochemical Microsensors and Microbiosensors for in vivo Analysis of Neurological Relevant Substances***. *Current Neuropharmacology*. 10:3 (2012), p. 197-211.
- CARVALHO, Arsélio Pato – ***Como comunicam as células nervosas***. (1963), p. 43-57.
- DALE, Nicholas; HATZ, Sonja; TIAN, Faming; LLAUDET, Enrique – ***Listening to the brain: microelectrode biosensors for neurochemicals***. *Trends in Biotechnology*. 23:8 (2005), p. 420-428.
- FATHALI, Hoda; CANS, Ann-Sofie – ***Amperometry methods for monitoring vesicular quantal size and regulation of exocytosis release***. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. 470:1 (2018), p. 125-134.
- FERREIRA, Nuno R.; LEDO, Ana; LARANJINHA, João; GERHARDT, Greg A.; BARBOSA, Rui M. – ***Simultaneous measurements of ascorbate and glutamate in vivo in the rat brain using carbon fiber nanocomposite sensors and microbiosensor arrays***. *Bioelectrochemistry*. 121 (2018), p. 142-150.
- HASCUP, Kevin N.; HASCUP, Erin R.; – ***Electrochemical Techniques for Subsecond Neurotransmitter Detection in Live Rodents***. *Comparative Medicine*. 64:4 (2014), p. 249-255.
- HERMANS, Andre; KEITHLEY, Richard B.; KITA, Justin M.; SOMBERS, Leslie A.; WIGHTMAN, R. Mark – ***Dopamine Detection with Fast-Scan Cyclic Voltammetry Used with Analog Background Subtraction***. *Analytical Chemistry*. 80:11 (2008), p. 4040-4048.
- IVERSEN, Susan D.; IVERSEN, Leslie L. – ***Dopamine: 50 years in perspective***. *Trends in Neurosciences*. 30:5 (2007), p. 188-193.
- KARUNAKARAN, Chandran; BHARGAVA, Kalpana; ROBSON, Benjamin – ***Biosensors and Bioelectronics***. 1ªEd. Elsevier, 2015. ISBN 978-0-12-803100-1.

- KEHR, Jan; YOSHITAKE, Takashi – **Monitoring molecules in neuroscience: historical overview and current advancements.** *Frontiers in Bioscience*. 5 (2013) p. 947-954.
- KITA, Justin M.; WIGHTMAN, R. Mark – **Microelectrodes for studying neurobiology.** *Current Opinion in Chemical Biology*. (2008), p. 491-496.
- LAMA, Rinchen D.; CHARLSON, Karl; ANANTHRAM, Arun; HASHEMI, Parastoo – **Ultrafast Detection and Quantification of Brain Signaling Molecules with Carbon Fiber Microelectrodes.** *Analytical Chemistry*. 84:19 (2012), p. 8096-8101.
- LEDO, Ana; BARBOSA, Rui M.; GERHARDT, Greg A.; CADENAS, Enrique; LARANJINHA, João – **Concentration dynamics of nitric oxide in rat hippocampal subregions evoked by stimulation of the NMDA glutamate receptor.** *PNAS*. 102:48 (2005), p. 17483-17488.
- LEDO, Ana; LOURENÇO, Cátia F.; LARANJINHA, João; BRETT, Christopher M.A.; GERHARDT, Greg A.; BARBOSA, Rui M. – **Ceramic-Based Multisite Platinum Microelectrode Arrays: Morphological Characteristics and Electrochemical Performance for Extracellular Oxygen Measurements in Brain Tissue.** *Analytical chemistry*. 89 (2017), p. 1674-1683.
- LEDO, Ana; LOURENÇO, Cátia F.; LARANJINHA, João; GERHARDT, Greg A.; BARBOSA, Rui M. – **Combined *In Vivo* Amperometric Oximetry and Electrophysiology in a Single Sensor: A Tool for Epilepsy Research.** *Analytical chemistry*. 89 (2017), p. 12383-12390.
- LEDO, Ana; LOURENÇO, Cátia F.; LARANJINHA, João; GERHARDT, Greg A.; BARBOSA, Rui M. – **Concurrent measurements of neurochemical and electrophysiological activity with microelectrode arrays: New perspectives for constant potential amperometry.** *Current Opinion in Electrochemistry*. 12 (2018), p. 129-140.
- LOURENÇO, Cátia F.; LEDO, Ana; GERHARDT, Greg A.; LARANJINHA, João; BARBOSA, Rui M. – **Neurometabolic and electrophysiological changes during cortical spreading depolarization: multimodal approach based on a lactate-glucose dual microbiosensor arrays.** *Scientific Reports*. 7:1 (2017), p. 1-12.
- NIELSEN, Anne Kathrine; MÖLLER, Ingvar R.; WANG, Yong; RASMUSSEN, Soren G. F.; LINDORFF-LARSEN, Kresten; RAND, Kasper D.; LOLAND, Claus J. – **Substrate-induced conformational dynamics of the dopamine transporter.** *Nature Communications*. 10: 2714 (2019).

- PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V.G.K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. – **Voltamétrias: Uma breve revisão sobre os conceitos**. Revista Virtual de Química. 5:4 (2013), p. 516-537.
- ROBERTS, James G.; SOMBERS, Leslie A. – **Fast-Scan Cyclic Voltammetry: Chemical Sensing in the Brain and Beyond**. Analytical Chemistry. 90:1 (2018), p. 490-504.
- ROBINSON, Donita L.; HERMANS, Andre.; SEIPEL, Andrew T.; WIGHTMAN, R. Mark – **Monitoring Rapid Chemical Communication in the Brain**. Chemical Reviews. 108:7 (2008), p. 2554-2584.
- SANTOS, Ricardo M.; LOURENÇO, Cátia F.; PIEDADE, Ana P.; ANDREWS, Rodney; POMERLEAU, François; HUETTL, Peter; GERHARDT, Greg A.; LARANJINHA, João; BARBOSA, Rui M. – **A comparative study of carbon fiber-based microelectrodes for the measurement of nitric oxide in brain tissue**. Biosensors and Bioelectronics. 24 (2008), p. 704-709.
- SCHWARTZ, James H. – **Neurotransmitters**. Encyclopedia of life sciences. Nature Publishing Group, (2001), p. 1-9.
- SEELEY, Rod R; TATE, Philip; STEPHENS, Trent D. – **Anatomia e Fisiologia**. 8º Ed. Lusociência, 2011. ISBN 9789728930622.
- SOUZA, Cheylla Fabricia M.; ALMEIDA, Helayne Carolyne P.; SOUSA, Jomário Batista; COSTA, Pedro Henrique; SILVEIRA, Yonara Sonaly S.; BEZERRA, João Carlos L. – **A Doença de Parkinson e o Processo de Envelhecimento Motor**. Literature Review. 19:4 (2011), p. 718-723.
- STUART, Jeffrey N.; HUMMON, Amanda B.; SWEEDLER, Jonathan V. – **The Chemistry of Thought: Neurotransmitters in the Brain**. Analytical chemistry. (2004), p.121-128.
- TABER, Katherine H.; D., Ph.; HURLEY, Robin A.; D., M. – **Volume Transmission in the Brain: Beyond the Synapse**. Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences. 26:1 (2014), p. 1-4.
- TOLEDO JR., Jose Carlos; AUGUSTO, Ohara – **Connecting the Chemical and Biological Properties of Nitric Oxide**. Chemical Research in Toxicology. 25 (2012), p. 975-989.
- VASYLIEVA, Natalia – **Implantable microelectrode biosensors for neurochemical monitoring of brain functioning**. INSA de Lyon. (2012)

- WIGHTMAN, R. Mark – **Probing Cellular Chemistry in Biological Systems with Microelectrodes**. Science. 311 (2006), p. 1570-1574.