

Desenvolvimento de um sensor colorimétrico para detecção de doença de Alzheimer

Development of a colorimetric sensor for detecting Alzheimer's disease

RESUMO

David Lucas Zegolan Marcondes
davidlucasmrcondes@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil.

Adriano Lopes Romero
adrianoromero@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil.

Rafaele Bonzanini Romero
rbromero@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil.

O aumento da incidência de doenças neurodegenerativas, tal como a doença de Alzheimer, na população mundial tem motivado a busca por novos métodos de tratamento e detecção dessas doenças. Partindo deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a obtenção de um sensor capaz de detectar o neurotransmissor acetilcolina, que pode ser utilizado como marcador para a doença de Alzheimer. Para isso idealizou-se um sensor, capaz de determinações qualitativa e quantitativa, formado por esferas de quitosana adsorvidas com acetilcolinesterase (extraída de cabeças de baratas da espécie *Gromphadorhina portentosa*) e indicador de pH vermelho de fenol. A análise dos resultados obtidos indica que a imobilização de acetilcolinesterase ocorreu de forma eficiente, assim como a detecção de seu substrato - a acetilcolina. Os métodos utilizados no trabalho são simples e de baixo custo, fato que motiva a continuidade de estudos para a obtenção de sensores para determinação qualitativa e/ou quantitativa de acetilcolina. Um fator limitante do sensor desenvolvido é o limite de quantificação de acetilcolina (na ordem de 1.10^{-3} mol/L), que pode inviabilizar a produção de um sensor para determinação quantitativa de acetilcolina.

PALAVRAS-CHAVE: Acetilcolinesterase. Reação de complexação. Sensor.

ABSTRACT

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



The increase in the incidence of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease, in the world population has motivated the search for new methods of treatment and detection of these diseases. From this context, the present work aimed to obtain a sensor capable of detecting the neurotransmitter acetylcholine, which can be used as a marker for Alzheimer's disease. For this, a sensor was conceived, capable of qualitative and quantitative determinations, formed by spheres of chitosan adsorbed with acetylcholinesterase (extracted from the heads of cockroaches of the species *Gromphadorhina portentosa*) and red phenol. The analysis of the results obtained indicates that the immobilization of acetylcholinesterase occurred efficiently, as well as the detection of its substrate - acetylcholine. The methods used in the work are simple and low cost, a fact that motivates the continuity of studies for obtaining sensors for qualitative and/or quantitative determination of acetylcholine. A limiting factor of the developed sensor is the limit of quantification of acetylcholine (in the order of 1.10^{-3} mol/L), which can prevent the production of a sensor for quantitative determination of acetylcholine.

KEYWORDS: Bioactive substances. Controlled release. Polymeric microparticles.



INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), idoso é todo aquele tem 60 anos ou mais, no Brasil estimava-se que 28 milhões de pessoas estejam nesta faixa etária. O índice de envelhecimento, que é uma porcentagem entre idosos e jovens, possui uma tendência de aumentar, em 2018 era de 43,19% e existe uma projeção que no ano de 2060 subirá para 173,47%. Com a população ficando mais velha são necessárias políticas públicas que assegurem bem-estar - saúde mental, saúde física e lazer - contribuindo para o aumento da expectativa de vida, assegurando que todos possam aproveitar a velhice de uma forma saudável (IBGE, 2019).

Entre as patologias que mais atingem a população idosa estão as doenças neurodegenerativas que se caracterizam pela perda irreversível de neurônios. Entre essas doenças, na doença de Alzheimer (DA) inicialmente o paciente perde a memória de curto prazo, depois as memórias antigas até entrar em um estado de demência. Segundo o Instituto de Alzheimer Brasil, estima-se que a cada 3,2 segundo um novo caso de demência é descoberto e que há 46,8 milhões de pessoas com demência no mundo decorrente do Alzheimer. Estima-se, ainda, que a cada 20 anos o número de pessoas com demência irá dobrar e em 2030 seria cerca 75,6 milhões de pessoas com demência mental (INSTITUTO ALZHEIMER BRASIL, 2019).

Levando em consideração a projeção comentada acima, assim como a importância do desenvolvimento de técnicas de detecção para a doença de Alzheimer. Entre as possibilidades de técnicas de detecção destacam-se os sensores, principalmente os biossensores, que são dispositivos analíticos capazes de identificar/quantificar biomoléculas (marcadores) associados a doenças (BELLUZO, 2008).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo a obtenção de um sensor, para detecção de acetilcolina e/ou de um dos seus produtos de hidrólise, capaz de detectar a doença de Alzheimer. Para isso, idealizou-se um dispositivo, no qual enzimas acetilcolinesterase estão imobilizadas na superfície de esferas poliméricas, que possibilite, por meio colorimétrico, determinações qualitativas e quantitativas passíveis de inferir a respeito da doença de Alzheimer.

MATERIAL E MÉTODOS

OBTENÇÃO DE EXTRATO DE ACETILCOLINESTERASE (ACHE)

Uma cultura de baratas da espécie *Gromphadorhia pontentosa* foi adquirida, em 2019, do criador Ozorio Gonçalves Junior do município de São Paulo. As baratas foram criadas até chegarem à vida adulta, período que levou em média seis meses, para serem utilizadas como fonte de acetilcolinesterase.

Para extração da enzima (AChE) utilizou-se o método adaptado de Nogueira (2015). Para isso, as baratas ficaram no congelador por 1h30 min., na sequência separou-se as cabeças (parte do corpo no qual a concentração de AChE é maior). Cada cabeça foi macerada utilizando 5 mL de solução tampão Tris-HCl 0,5 M (pH 7,5). Posteriormente, o macerado foi colocado em um tubo falcon e adicionou-se mais 15 mL de solução Tris-HCl 0,5 M resultando em um total de 20 mL de solução por

cabeça. A mistura resultante foi centrifugada por 40 minutos a 4000 rpm. Após esse processo, o sobrenadante (extrato de AChE) foi pipetado para tubos de Eppendorf, que foram protegidos da luz com papel alumínio e mantidos em congelador até o momento de uso nos testes in vitro.

PRODUÇÃO DO SENSOR

Etapa 1. Obtenção de esferas de quitosana: 20 mL de uma solução de quitosana (Sigma Aldrich) 40 mg/mL (em solução de ácido acético a 5%) foi gotejada, utilizando uma seringa, em 250 mL de solução de hidróxido de sódio NaOH 1 mol/L. A mistura resultante ficou sob agitação por 24 horas, posteriormente as esferas obtidas foram lavadas com água destilada e secadas a temperatura ambiente.

Etapa 2. Adsorção de indicador de pH nas esferas de quitosana: As esferas de quitosana foram mantidas, por 1 hora, em uma solução aquosa contendo 10 gramas do indicador de pH vermelho de fenol. Depois desse período, as esferas foram filtradas, lavadas e utilizadas.

Etapa 3. Imobilização de AChE em esferas de quitosana: As esferas de quitosana obtidas da etapa 2 foram mantidas, por um período de 12 horas, submersas em uma solução de extrato de AChE diluída em um fator de 1:50. Após esse período, as esferas foram filtradas e utilizadas nos testes in vitro.

AVALIAÇÃO QUALITATIVA DO SENSOR PRODUZIDO

O uso do sensor para fins qualitativos foi avaliado utilizando uma solução aquosa de acetilcolina ($1 \cdot 10^{-4}$ mol/L). Uma alíquota da solução de acetilcolina foi introduzida no capilar e observou-se o tempo necessário para mudança de cor das esferas presentes no sensor.

AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DO SENSOR PRODUZIDO

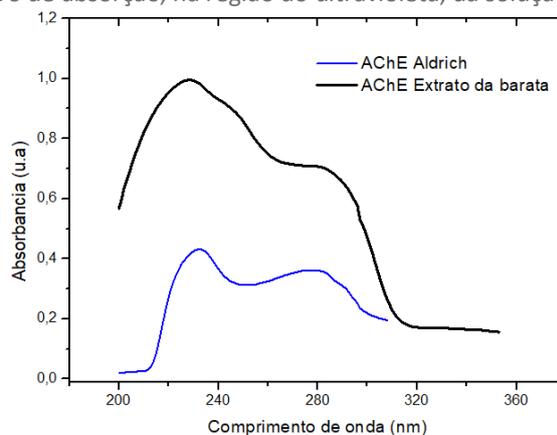
O uso do sensor para fins de quantificação foi baseado na determinação de ACh pelo método colorimétrico de Hestrin (1949), tendo como princípio a complexação da ACh não hidrolisada. Inicialmente, em um tubo de ensaio adicionou-se 500 μ L de solução aquosa de NaOH 3,5 mol/L, 500 μ L de solução aquosa de hidroxilamina 2 mol/L e 500 μ L da amostra. Após 5 minutos em contato, adicionou-se 500 μ L de solução aquosa de HCl (1:2 v/v) e 500 μ L de solução aquosa de cloreto férrico 0,37 mol/L. Como padrão utilizou-se uma solução aquosa de cloreto de acetilcolina 0,001 mol/L. Para a construção da curva de calibração foram utilizadas diversas concentrações: 4, 3, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,4, 0,2 e $0,1 \cdot 10^{-2}$ 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.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizando a equação da lei de Beer determinou-se que a concentração de acetilcolinesterase da Sigma-Aldrich é $2,00 \cdot 10^{-2}$ mg/mL, já a concentração de acetilcolinesterase presente no extrato produzido com uma cabeça de barata é igual a $5,54 \cdot 10^{-2}$ mg/mL. Desta forma, pode-se observar que o uso da barata *Gromphadorhia pontentosa*, como fonte de acetilcolinesterase, é uma promissora alternativa para obtenção de extrato de AChE. O espectro de absorção na região do ultravioleta do extrato de AChE e da solução padrão de AChE da Sigma-Aldrich é apresentado na Figura 1.

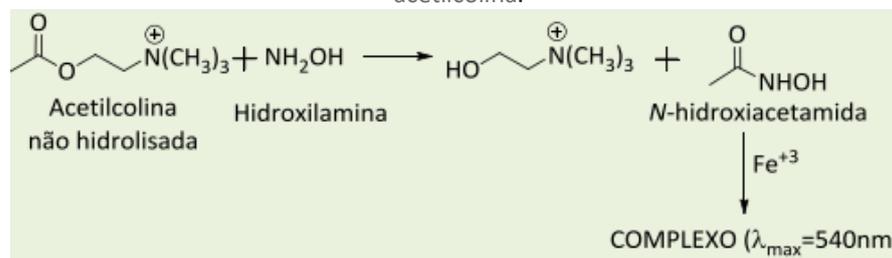
Figura 1 - Espectro de absorção, na região do ultravioleta, da solução aquosa de AChE.



Fonte: Autoria própria.

O método colorimétrico utilizado para determinação da concentração de acetilcolina presente em solução aquosa (tal como ocorre em um fluido biológico), baseia-se na variação da intensidade de coloração do complexo formado com acetilcolina não hidrolisada (Figura 2).

Figura 2 - Reação de complexação utilizada para quantificação espectrofotométrica de acetilcolina.



Fonte: Autoria própria.

Para construção da curva de calibração utilizou-se 11 concentrações de acetilcolina. Pode-se observar visualmente que a intensidade da cor é proporcional à concentração de ACh (Figura 3).

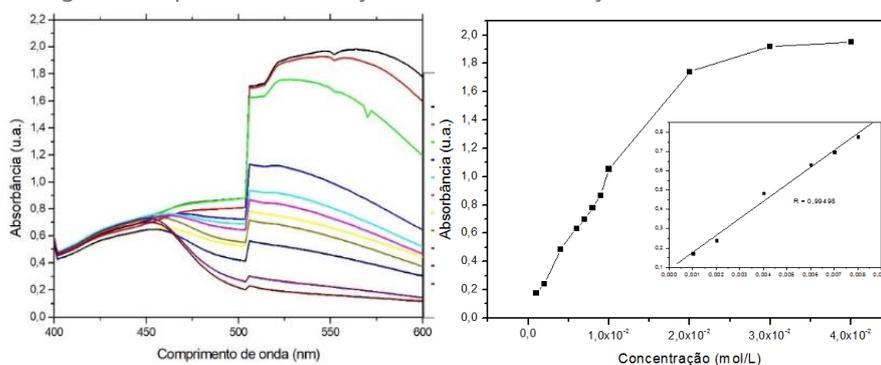
Figura 3 - Aspecto visual final das diferentes soluções de acetilcolina submetidas ao teste colorimétrico para construção da curva de calibração.



Fonte: Autoria própria.

Ao analisar o perfil dos espectros obtidos para as diferentes concentrações de acetilcolina avaliadas (Figura 4), pode-se observar que a faixa de detecção ideal de acetilcolina livre é 0,01 a $0,9 \cdot 10^{-2}$ mol/L, cujo coeficiente de linearidade é igual a $R = 0,99498$.

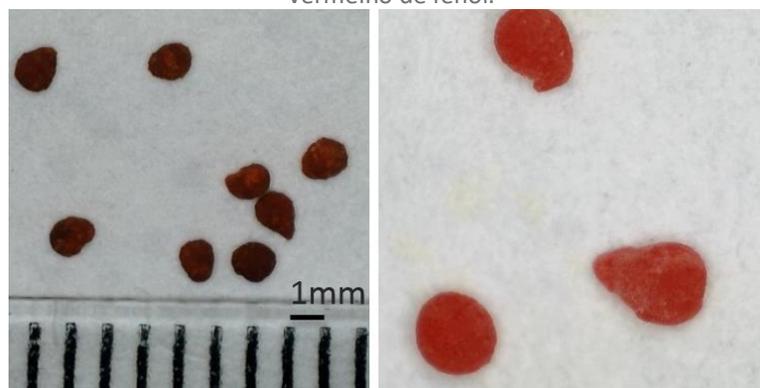
Figura 4 - Espectros de absorção e curva de calibração de acetilcolina.



Fonte: Autoria própria.

As esferas de quitosana apresentaram formato irregular e dimensões da ordem 1 mm, assim como boa adsorção do indicador de pH vermelho de fenol (Figura 5).

Figura 5 – Aspecto visual das esferas de quitosana adsorvidas com indicador de pH vermelho de fenol.



Fonte: Autoria própria.

Vale ressaltar que o indicador vermelho de fenol possui $pK_a = 8,0$ a $20^\circ C$ e apresenta coloração amarela em pH abaixo de 6,6 e coloração vermelha em pH

acima de 8,0. Essas características fazem com que esse indicador seja uma alternativa para avaliar mudanças de pH em fluidos biológicos não tamponados, fato que limita seu uso, uma vez que a maioria dos fluídos corporais são tamponados. No entanto, como a mudança de pH ocorre próximo a superfície da esfera - local onde está localizado tanto a enzima que faz a degradação da acetilcolina, quanto o indicador capaz de mudar de cor devido ao aumento de pH resultante da produção de ácido acético - espera-se que o sensor idealizado seja capaz de identificar qualitativamente a presença de acetilcolina (Figura 6).

Figura 6 - Sensor desenvolvido para avaliar qualitativamente a presença de acetilcolina em fluido biológico.



Fonte: Autoria própria.

Ao avaliar a viabilidade de uso do sensor para detecção qualitativa de acetilcolina, observou-se que é possível detectar a presença de acetilcolina em uma solução aquosa no decorrer de 35 minutos (Figura 6). O aspecto visual final (lado direito) obtido no sensor, como pode ser observado na Figura 6, é bastante distinto do estágio inicial (lado esquerdo), característica importante para um sensor qualitativo.

A viabilidade de uso do sensor para detecção quantitativa de acetilcolina está em processo de avaliação. As análises preliminares, com soluções simuladas de acetilcolina, indicam que as esferas de quitosana com acetilcolinesterase podem ser utilizadas para quantificar acetilcolina em soluções aquosas. No entanto, o método parece ter um baixo limite de quantificação, na ordem de 1.10^{-3} mol/L de acetilcolina.

CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu a produção de extrato de AChE a partir de cabeças de baratas da espécie *Gromphadorhia pontentosa*, que são facilmente mantidas e reproduzidas em condições ambientes sem demandar muitos cuidados. O perfil espectroscópico do extrato obtido é semelhante a solução padrão produzida com a enzima adquirida da Sigma-Aldrich, mas a concentração da enzima é maior no extrato do que na solução padrão. Tais fatos indicam a viabilidade de uso da enzima extraída de *Gromphadorhia pontentosa* em testes in vitro para estudo de substâncias inibidoras de acetilcolinesterase, assim como para produção de biossensores para quantificação de acetilcolina, neurotransmissor que pode servir de marcador para detectar a doença de Alzheimer.

O dispositivo idealizado foi obtido de forma relativamente simples, observou-se a adequada adesão da enzima acetilcolinesterase, assim como do indicador de pH vermelho de fenol na superfície da esfera de quitosana. A análise dos resultados

obtidos indica que a imobilização da enzima acetilcolinesterase ocorreu de forma eficiente, assim como a detecção de seu substrato - a acetilcolina.

Os métodos que foram utilizados no trabalho ora relatado são simples e de baixo custo, fato que motiva a continuidade de estudos para a obtenção de sensores para determinação qualitativa e/ou quantitativa de acetilcolina. Um fator limitante do sensor desenvolvido, que precisa ser melhorado, é o limite de quantificação de **acetilcolina**, que pode inviabilizar a produção de um sensor para determinação quantitativa de acetilcolina.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPQ pela bolsa de Inovação

REFERÊNCIAS

BELLUZO, M. S.; RIBONE, M. E.; LAGIER, C. M. Montagem de biossensores amperométricos para diagnósticos clínicos. **Sensors**, v. 8, p. 1366-1399, 2008.

HESTRIN, S. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine and its analytical application. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 180, n. 1, p. 249-261, 1949.

IAB. Instituto de Alzheimer do Brasil. **Epidemiologia**. Disponível em: <http://www.institutoalzheimerbrasil.org.br/epidemiologia/> Acesso em: 08 ago. 2020.

IBGE. **Idosos indicam caminhos para uma melhor idade**. Disponível em: <https://censo2020.ibge.gov.br/2012-agencia-de-noticias/noticias/24036-idosos-indicam-caminhos-para-uma-melhor-idade.html>. Acessado em: 08 ago. 2020.

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

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