



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 1015499-0 A2

(22) Data do Depósito: 23/12/2010

(43) Data da Publicação: 01/03/2016

(RPI 2356)



(54) Título: BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO ENZIMÁTICO FEITO DE GRAFITE MODIFICADO-FIBRAS DE CARBONO PARA DETECÇÃO DE AGENTES DE NERVOS: CONSTRUÇÃO E MODO DE USAR

(51) Int. Cl.: C12Q 1/46; G01N 27/327; C12M 1/40

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

(72) Inventor(es): GILVANDA SILVA NUNES, JEAN-LOUIS MARTY

(57) Resumo: BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO ENZIMÁTICO FEITO DE GRAFITE MODIFICADO-FIBRAS DE CARBONO PARA DETECÇÃO DE AGENTES DE NERVOS: CONSTRUÇÃO E MODO DE USAR. A presente invenção constitui-se de um biossensor amperométrico que serve para detectar, mediante ensaios de inibição enzimática, com precisão e elevada sensibilidade, concentrações de agentes de nervos em níveis de traços, seja em amostras ambientais ou biológicas. Os modos de preparo e uso do biossensor são extremamente simples, e a detecção dos agentes de nervos pode ser realizada tanto em laboratório como diretamente no campo. Para construção do biossensor, inicialmente um precipitado de MBRS foi preparado (1, 2, 3, 4) e, a este, acrescentado o mediador TCNq, pó de grafite (5) e, sequencialmente, HEC, parafina líquida, PBS (PH 7,5) e a enzima BSA (6). A enzima AChE, previamente imobilizada em PVA-SbQ (7), foi então adicionada à pasta de grafite modificada (8), e a mistura resultante foi utilizada para preencher um tubo de polietileno oco, contendo em seu interior fibras de carbono (9), que foram seladas termicamente nas extremidades (10). O contato elétrico foi feito com fio de platina(...)

“BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO ENZIMÁTICO FEITO DE GRAFITE MODIFICADO-FIBRAS DE CARBONO PARA DETECÇÃO DE AGENTES DOS NERVOS: CONSTRUÇÃO E MODO DE USAR”

5 A presente invenção constitui-se em um biossensor amperométrico, com corpo de polietileno preenchido com uma pasta de grafite modificada, contendo uma enzima imobilizada e fibras de carbono, de fácil construção, e elevadas precisão e sensibilidade na detecção, em laboratório ou *in loco*, de agentes dos nervos.

Os *agentes dos nervos* são utilizados como armas químicas.

10 Fisiologicamente, o efeito tóxico dos agentes dos nervos ocorre pela desativação da enzima acetilcolinesterase (AChE), que controla a transmissão dos impulsos nervosos, e sem esse controle as funções biológicas, como a respiração, param de operar. Quando aplicados em áreas onde se encontram os inimigos, tais agentes provocam sérios distúrbios no Sistema Nervoso Central (SNC), levando ao coma e posteriormente à
15 morte. Os agentes dos nervos pertencem ao grupo dos compostos organofosforados, como o tabun, o soman, o sarin e o vx.

 Quando a detecção dos agentes dos nervos se dá diretamente no campo, o biossensor deverá ser acoplado a um potenciostato de menor porte. Existem modelos portáteis no mercado, bastante sensíveis e reprodutíveis, que operam com bateria. Se a
20 amostra analisada for de água, a medida pode ser feita de forma direta, apenas inserindo a camada sensível do biossensor (que contém a enzima) na água. Se a água for proveniente de um corpo de água corrente, deve-se realizar uma coleta no local e proceder à medida diretamente no frasco de coleta, que deve ser preferencialmente de vidro. O mesmo deve ser feito se a amostra for de outro líquido, como sangue, urina ou
25 outro fluido biológico. Se a amostra for sólida, como por exemplo uma porção de solo ou mesmo parte de um órgão supostamente lesado (fígado, por exemplo), então deve-se proceder a uma extração prévia, simplesmente macerando-se a amostra com tampão citrato pH 8,0 e realizando-se em seguida a medida eletroquímica.

ESTADO DA TÉCNICA

Os agentes dos nervos são compostos que possuem em sua estrutura um átomo de fósforo central pentavalente, ligado a um átomo de oxigênio ou enxofre por uma dupla ligação. Além dos agentes dos nervos, muitos compostos com poder inseticida são também organofosforados, e possuem o mesmo modo de ação, tanto 5 frente aos mamíferos como frente aos insetos: sua toxicidade é baseada na inibição da enzima AChE, essencial para transmissão de impulsos nervosos.

Vários biossensores eletroquímicos para detecção de agentes anticolinesterase têm sido descritos em artigos científicos, a maioria dos quais 10 objetivando a análise de inseticidas organofosforados [1]. Em alguns casos, ao invés da enzima acetilcolinesterase (AChE), foi empregada a enzima butirilcolinesterase (BChE) como elemento de biorreconhecimento.

Algumas patentes de biossensores também têm surgido, como por exemplo a Patente CN101587092 (A), depositada no escritório de patentes chinês em 25/11/2009 15 [2], que descreve um biossensor serigrafado contendo dois eletrodos de trabalho e um eletrodo de referência compartilhado, sendo que, imobilizada à superfície dos eletrodos de trabalho, encontra-se uma enzima AChE comercial. Dois biossensores para organofosforados foram depositadas nos Estados Unidos: a Patente IL146193 (A) [3], depositada em 31/05/2010, que descreve procedimentos para preparo de biossensores à 20 base de enzimas AChE, imobilizadas covalentemente em superfícies porosas e não-porosas, e a Patente WO9829738 A(1) [4], depositada em 09/07/2008, que descreve um procedimento para preparo de um biossensor, tendo como enzimas imobilizadas, além da AChE, a peroxidase e a colina-oxidase.

Biossensores à base de enzima acetilcolinesterase (AChE) são baseados na 25 inibição enzimática pelo agente tóxico, que pode ser um inseticida ou uma arma química (agente do nervo). Quando a enzima AChE é imobilizada na superfície do eletrodo de trabalho, há interação com o substrato, produzindo uma espécie eletroativa. Nessa estratégia, acetiltiocolina (ATCh) pode substituir o substrato original da AChE, a acetilcolina. Assim, esse novo substrato (ATCh) é hidrolisado da mesma forma como o 30 substrato original, produzindo tiocolina (TCh) e o ácido carboxílico correspondente (ácido acético, HA, no caso). Os elétrons gerados durante a reação eletroquímica são coletados no potenciostato, e a corrente final é a medida quantitativa da atividade da enzima [5].

Os biossensores reportados foram construídos a partir de eletrodos de diferentes materiais, tais como: tubos de vidro ou de plástico, membranas maleáveis de celofane, impregnadas com a enzima e ligadas a um eletrodo metálico conveniente, e eletrodos serigrafados contendo dois eletrodos (de referência e de trabalho) ou três
5 eletrodos (de referência, de trabalho e auxiliar), nos quais a enzima AChE estava imobilizada. As bases para serigrafia variaram desde cerâmica até PVC transparente e maleável.

Na escolha do material do eletrodo de trabalho deve-se considerar que as respostas obtidas estão relacionadas com as reações redox que ocorrem em sua
10 superfície ou na interface eletrodo-solução. Desta forma, o analito de interesse pode interagir com a superfície eletródica e tal interação resultar na transferência de elétrons. Eletrodos sólidos como os de platina, ouro, carbono, níquel, ferro e cobre, que apresentam janela de potencial positiva, têm considerável aplicabilidade em construção de biossensores. Outro tipo de eletrodo sólido que vêm sendo usado com esse mesmo
15 fim é o de diamante dopado com boro (DDB), devido às suas propriedades particulares (extensa janela eletroquímica, grande resistência a vários meios agressivos e baixas correntes capacitivas).

Para facilitar o transporte dos elétrons gerados durante a reação da enzima AChE com o substrato (ATCh), da superfície do eletrodo de trabalho até o
20 potenciostato, normalmente são empregados mediadores eletroquímicos. Estes mediadores são considerados os principais modificadores de eletrodos e têm permitido a realização de medidas amperométricas a um potencial de trabalho (fixo) mais baixo, diminuindo assim as interferências eletroquímicas provocadas pelos componentes eletroativos que possam estar presentes na amostra, ou mesmo por pequenas flutuações
25 externas de voltagens (ruído) do instrumento de medição. Como o analito irá interagir diretamente com o agente modificante, os eletrodos quimicamente modificados são mais seletivos e mais sensíveis que os eletrodos-base. Entre os mediadores mais empregados na construção de biossensores de agentes anticolinesterase, destacam-se os corantes Azul da Prússia e ftalocianina de cobalto, (Co-PC) e o composto 7,7,8,8-
30 tetracianoquinodimetano (TCNQ). A finalidade desses mediadores pode ser perfeitamente compreendida, por exemplo, se prepararmos uma pasta de grafite misturada a um agente aderente (hidroxietilcelulose, gel de ágar, etc.) mais a enzima AChE, e esta pasta preencher um tubo qualquer, no qual no seu interior está inserido um

fio de platina, este artefato pode ser considerado um eletrodo de trabalho sensível a compostos organofosforados. Como este eletrodo não contém nenhum mediador eletroquímico, ao ser acoplado a um eletrodo de referência (por exemplo, Ag/AgCl), as medidas de corrente serão tomadas provavelmente a um potencial fixo superior a 800 mV. Contudo, se a esta pasta sensível de grafite for adicionado um pouco do corante Co-PC, então o potencial de trabalho cai para 350 mV [6], e se adicionarmos o mediador TCNQ, o valor de potencial de trabalho chega a 150 mV, resultando em uma extrema vantagem, do ponto de vista analítico [7].

Biossensores à base da enzima aldeído desidrogenase (AldHE) foram descritos, tendo como mediador eletroquímico uma combinação de Meldola's Blue com Sal de Reinecke (MBRS). O biossensor foi empregado na detecção de fungicidas ditiocarbamatos, inibidores da AldHE, tendo operado com valor de potencial de zero volts, apresentado elevada estabilidade, porém ainda baixa sensibilidade para análises de traços [8]. Fibras de carbono são filamentos longos e finos (diâmetros entre 5 e 10 µm), compostos em grande parte por átomos de carbono, e têm sido empregadas, com o objetivo de facilitar a transferência de elétrons, em biossensores amperométricos [9].

A técnica de fixação da enzima AChE na superfície do eletrodo de trabalho tem grande influência sobre o desempenho do biossensor, e varia desde procedimentos físicos até químicos. Dos procedimentos físicos, destacam-se: adsorção em esferas de sílica, em membranas (nylon, nitrato de celulose, acetato de celulose) ou em resinas epóxi, e microencapsulação em géis de poliacrilamida ou de álcool polivinílico contendo grupamentos estirilpiridínicos (PVA-SbQ). Entre os procedimentos químicos, destacam-se a reação cruzada com glutaraldeído e a ligação covalente com resinas, agarose e celulose modificadas e PVC [10].

O procedimento de detecção dos agentes dos nervos se dá pelo monitoramento da corrente gerada pela reação entre a AChE e seu substrato, antes e após inibição enzimática. A inibição ocorre mediante incubação do biossensor em uma solução contendo o inibidor, ou mesmo através do contato deste com uma amostra qualquer, supostamente contaminada com o inibidor. A inibição da enzima por esses compostos tóxicos pode ser calculada em termos percentuais, pela redução da corrente gerada durante a reação enzimática, após inibição. Assim, a inibição é proporcional à concentração do agente do nervo presente, e pode ser efetuada em amostras líquidas

(água, sangue, urina), como também pastosas (alimentos, vegetais, etc.), onde o biossensor pode ser mergulhado.

PONTOS DEFICIENTES DO ESTADO DA TÉCNICA

- 5 Podemos destacar, como inconvenientes analíticos da maior parte dos biossensores enzimáticos, a falta de reprodutibilidade, seja pela perda da atividade da AChE ao longo do tempo de armazenagem, seja pelo processo de imobilização da enzima na superfície do eletrodo. Na prática, verifica-se que ocorrem modificações na camada enzimática do biossensor, e isto está diretamente relacionado ao processo de
- 10 imobilização da AChE e à seleção do mediador eletroquímico. Além disso, a sensibilidade dos biossensores citados na literatura, e mesmo os patenteados até hoje, é ainda é muito baixa para análises de traços.

OBJETIVOS E ATIVIDADE INVENTIVA DO BIOSENSOR

- 15 O biossensor apresentado é construído à base da enzima AChE, que pode ser tanto comercial quanto geneticamente modificada, imobilizada em um eletrodo de grafite modificado com uma mistura de TCNQ e Meldola's Blue Sal de Reinecke (MBRS). A pasta sensível serve para preencher um tubo de polietileno, já contendo fibras de carbono, e este tubo se constituiu em um eletrodo de trabalho de grafite
- 20 modificado-fibra de carbono. O procedimento diferenciado de imobilização enzimática se constitui em uma novidade no campo dos biossensores, pois combina o microencapsulamento da AChE em PVA-SbQ e a dispersão desta matriz polimérica sensível em torno de microfibras de carbono. Também, a combinação TCNQ-MBRS permite se trabalhar com valores de potencial de trabalho bem baixos, o que é desejável
- 25 eletroquimicamente. O objetivo final foi melhorar a estabilidade e a sensibilidade dos biossensores para detecção dos agentes de nervo em níveis de sub-partes por bilhão.

- Em relação às características eletroquímicas do biossensor, este operou em valor de potencial de trabalho bastante baixo (cerca de 60 mV), e apresentou excelente reprodutibilidade, com valor médio de corrente, obtida durante as medidas
- 30 cronoamperométricas da reação enzimática entre a AChE e solução de ATCh 1,0 mmol/L, em torno de 152 nA. As medidas cronoamperométricas (medida da corrente gerada ao longo do tempo) foram realizadas em célula de vidro de 10 mL de

capacidade, onde nesta estava mergulhado o eletrodo de trabalho e o de referência. O coeficiente de variação foi de 6,3% (n=12), para eletrodos recém-preparados.

Os ensaios de inibição com os biossensores foram realizados mediante medida inicial da corrente gerada conforme acima, seguida de incubação do eletrodo em uma solução do agente de nervo Sarin (um conhecido organofosfato extremamente tóxico de nome metilfosfonofluoridrato de orto-isopropila, CAS 107-44-8). Em seguida, procedeu-se a nova medida de corrente e cálculo do percentual de inibição relativa. O ensaio de inibição foi realizado em concentrações crescentes do agente de nervo. A resposta inibitória foi linear entre $1,0 \times 10^{-9}$ mol/L e $3,5 \times 10^{-6}$ mol/L de Sarin (n = 11, r = 0,9976), que equivale a uma faixa de 0,14 a 490 µg/L do agente do nervo. O limite de detecção, considerando uma inibição relativa de 10% em presença do agente de nervo Sarin, foi de $1,9 \times 10^{-8}$ mol/L (ou 2,7 µg/L).

Em relação à estabilidade dos biossensores, estes puderam ser armazenados em geladeira (4°C), em recipiente fechado e livre de umidade, por cerca de 3 meses, com perda de apenas 13% aproximadamente da atividade enzimática.

O biossensor aqui descrito é altamente reprodutível, devido à facilidade no preparo em macroescala e ao fato de operar em condições eletroquímicas favoráveis (baixíssimo potencial de trabalho, ausência de ruídos detectáveis). Manteve-se também estável, por um período de armazenamento relativamente longo (3 meses), sem perda considerável da atividade enzimática. Além disso, sua sensibilidade bastante elevada, aliada à capacidade de ser portátil, desde que acoplado a um potenciostato pequeno, lhe confere atributos para detecção dos agentes dos nervos em níveis de traços, diretamente no campo. Esta pode vir a se constituir em uma potencial ferramenta, em casos de invasões por países inimigos, pois as armas químicas são, para grupos de terroristas e indivíduos isolados, uma alternativa viável às armas convencionais. Com esse biossensor, é possível detectar em poucos minutos a presença dos agentes dos nervos e tomar as decisões cabíveis.

PROCEDIMENTO DE PREPARO DO BIOSSENSOR

A invenção passará a ser descrita a seguir, com referência a todos os passos para obtenção e uso do biossensor, bem como alternativas para a sua construção, e também com referência aos desenhos apensos, nos quais:

A Figura 1 ilustra as etapas de preparo da pasta de grafite modificada simultaneamente com dois mediadores eletroquímicos, e contendo a enzima AChE.

A Figura 2 ilustra o preparo do eletrodo de carbono, construído a partir da fixação de fibras de carbono na pasta de grafite modificado, dentro de um tubo cilíndrico de polietileno.

Preparo da Pasta Enzimática misturada a Grafite Modificado (Figura 1)

1. **Preparo do compósito MBRS:** dissolveu-se, separadamente, entre 0,5 e 1,0 mmol do sal de Reinecke em um volume de água deionizada entre 40 e 80 mL, e entre 0,5 e 1,0 mmol de MB em um volume de água deionizada entre 40 e 80 mL. Em seguida, as duas soluções foram misturadas, e o precipitado MBRS foi mantido em contato com a solução-mãe durante 5 dias para envelhecimento (1). Após filtração a vácuo em funil de Büchner (2) e repetidas lavagens com água deionizada, o precipitado negro foi seco em estufa por 12 h em uma temperatura entre 50 e 60 °C (3). Em seguida, foi finamente pulverizado em gral de ágata e guardado ao abrigo da luz por 2 a 3 meses (4).
2. **Preparo da Pasta de Grafite Modificado:** Pesou-se uma massa de 0,5 g de grafite em pó, finamente pulverizado (passando 100% na peneira de malha de 0,15 mm). Separadamente, adicionou-se o compósito MBRS ao TCNQ (proporção 1:1), e em seguida juntou-se essa mistura ao grafite (proporção grafite:MBRS/TCNQ de 20:80). Macerou-se em gral de ágata, homogeneizando-se bem a mistura de pós (5). Em seguida, transferiu-se a mistura para um béquer de 5mL e adicionou-se, sequencialmente, 250µL de uma solução de hidroxietilcelulose (HEC) a 3% (m/v), 250 µL de parafina líquida ultrapura, 500 µL de solução tampão fosfato (PBS, pH 7,5) e 250 µL de solução da enzima soroalbumina bovina (BSA) 0,3% (m/v) (6). Homogeneizou-se bem a pasta e deixou-se repousar, em vidro âmbar fechado, por cerca de 3 horas.
3. **Preparo da Pasta Enzimática:** Preparou-se uma mistura de solução da enzima AChE com um gel de álcool polivinílico contendo grupamentos estirilpiridínicos (PVA-SbQ), na proporção AChE-PVA-SbQ de 20:80 (m/m) (7). Partiu-se de uma solução estoque entre 200 e 300 U/mL, sendo esta atividade relativa monitorada pelo método espectrofotométrico descrito na literatura [8]. A pasta pode ser armazenada por no máximo 3 horas em geladeira, antes do uso na

construção dos biossensores, com perda máxima da atividade enzimática de 8 a 10%. Imediatamente antes do preparo do eletrodo, a pasta de grafite modificado foi misturada à pasta enzimática, na proporção 2:1 (8).

5 **Preparo do Biossensor (Figura 2)**

4. **Preparo do biossensor:** O eletrodo foi construído com 30 fibras de carbono (de marca japonesa Toray T-700), que foram inseridas dentro de um tubo de polietileno oco de 6 mm de diâmetro interno e 3 cm de comprimento, com fundo tampado. Os espaços entre as fibras de carbono foram preenchidos com a pasta enzimática, até que todo o tubo estivesse preenchido (9). Deixou-se cerca de 5 mm de fibras de carbono expostas, selando-se em seguida a junção por aquecimento (10). O contato elétrico foi feito com fio de platina inserido no centro do eletrodo (11). A parte superior do eletrodo foi em seguida polida cuidadosamente com auxílio de papel sulfite, em movimentos manuais circulares (12), tratado eletroquimicamente em potencial fixo de + 800 mV por 20 segundos e imerso em solução tampão fosfato (pH 7,5) por aproximadamente 20 minutos, antes do uso. Em cada biossensor, a atividade relativa ideal esteve na faixa de 1,0 a 2,0 mU/eletrodo.
5. **Acoplamento do Biossensor ao Potenciostato:** Foi feita mediante uso de um conector comum (13), interligando o eletrodo de trabalho acima descrito e o eletrodo de referência (no caso, optou-se por um eletrodo de Ag/AgCl) ao potenciostato, ambos inseridos em uma mesma célula de 10 mL de capacidade (14). Dependendo das dimensões do potenciostato/galvanostato, o biossensor é facilmente transportado para o campo, permitindo análises *in loco*. Assim, o biossensor constituir-se-á de um dispositivo eletrônico portátil e de baixo custo.

MODO DE USO DO BIOSSENSOR

1. **Armazenamento:** os biossensores podem ser armazenados em geladeira, em recipiente livre da umidade e ao abrigo da luz.
2. **Medidas Eletroquímicas e Ensaios de Inibição:** Para obtenção da corrente inicial, o potencial de trabalho foi fixado em 60 mV. O eletrodo de trabalho de grafite modificado-fibras de grafite, contendo a enzima AChE, foi acoplado ao potenciostato, juntamente com o eletrodo de referência, tendo sido ambos

- imersos em uma célula de trabalho contendo a solução do substrato (cloreto de acetiltiocolina, ATChCl, 1,0 mmol/L), sob agitação constante. A corrente gerada foi estabilizada (o tempo total para estabilização foi de 30 segundos) e o valor (em nA) registrado. Esta medida foi denominada de I_0 . Em seguida, o
- 5 potenciostato foi desligado e o eletrodo foi lavado com PBS, pH 7,5, (com cuidado, para não molhar os contatos elétricos), e logo em seguida, imersa a base sensível do eletrodo na solução ou amostra contendo o agente de nervo. Seguiu-se à incubação da enzima com o inibidor por 12 minutos e, findo esse tempo, procedeu-se a uma nova lavagem do sensor com PBS, pH 7,5. O
- 10 potenciostato foi novamente ligado, e então nova medida de corrente foi registrada, após imersão da parte inferior sensível do eletrodo na solução do substrato (ATChCl 1,0 mmol/L). Esta nova medida foi denominada de I . Pode-se observar um decréscimo da corrente, após inibição, e a inibição relativa (IR %) é, portanto, proporcional à concentração do agente de nervo.
- 15 **3. Análise Qualitativa:** a presença de um inibidor da enzima AChE pode ser evidenciada pelo decréscimo da corrente observada no ensaio de inibição anteriormente descrito.
- 4. Análise Quantitativa:** Desde que se tenha uma indicação do composto que está causando a inibição, o teor exato deste poderá ser determinado através da
- 20 extrapolação do valor de IR% encontrado, em uma curva padrão construída a partir dos valores de inibição obtidos em crescentes concentrações do inibidor.

ALTERNATIVAS PARA CONSTRUÇÃO DO BIOSENSOR

1. **Corpo do Biossensor:** ao invés de ser de polietileno, poderá ser constituído de
- 25 um tubo de vidro ou de cobre. As dimensões do tubo de polietileno também podem ser variadas.
2. **Enzima AChE:** a enzima acetilcolinesterase a ser imobilizada no eletrodo de trabalho pode ser obtida comercialmente (proveniente de diferentes fontes, tais como enguia elétrica, eritrócito bovino, soro bovino, soro equino, sangue humano, etc.); pode ser geneticamente modificada (como é o caso das enzimas
- 30 AChE extraídas da mosca-das-frutas, *Drosophila melanogaster*, e posteriormente modificadas geneticamente em laboratório) [7], ou pode ser proveniente da extração direta a partir de encéfalos de ratos albinos adultos,

segundo metodologia previamente descrita [11]. De todas as formas, a atividade relativa (em U/mL) da solução de AChE a ser incorporada na pasta deverá ser controlada, de forma a manter sempre a mesma atividade de enzima, em cada eletrodo.

- 5 **3. Carga Enzimática no Eletrodo:** pode variar de 0,5 a 20 mU/eletrodo.
- 4. Fibra de carbono:** as fibras de carbono podem ser da marca Toray T-800H, em substituição à Toray T-700, do mesmo fabricante, sem grande modificação na resposta do sensor. Esta última é relativamente mais cara, por ter diâmetro mais fino.
- 10 **5. Contato elétrico:** pode-se substituir o fio de platina por fio de ouro (Au) ou de cobre (Cu), sendo que este último deverá ser recoberto com pasta de carbono condutora, de elevada rigidez (o fio de Cu revestido pode ser da marca *Leit-C conductive carbon cement*, do fabricante *Neubauer Chemikalien*, Münster, Alemanha).
- 15 **6. Eletrodo de referência:** o eletrodo de Ag/AgCl pode ser substituído pelo eletrodo de calomelano saturado (ECS).
- 7. Substrato Enzimático:** além da acetiltiocolina (ATCh), podem ser empregados outros substratos eletroativos, tais como acetilcolina (ACh), butirilcolina (BCh) e butiriltiocolina (BTCh), em variadas concentrações.

20

Referências Bibliográficas

- [1] MOHANTY, S.P.; KOUGIANOS, E. Biosensors: A tutorial review. ***Potentials, IEEE***, 25 (2)35-40, 2006.
- 25 [2] ZUO, SHAOHUA ; WU, XIANBO; ZUO, PENG. Portable electrochemical biosensor for fast detecting organophosphorus pesticide residue. ***Patent CN101587092***, China, 25/11/2009.
- [3] US ARMY MED RES MAT COMMAND [US]. Enzyme biosensor and method for analyzing samples for the presence of organophosphorus or organosulfur compounds and a method for making said biosensor. ***Patent IL146193 (A)***, Estados Unidos, 31/05/2010.
- 30

- [4] WILKINS, E. S.; GHINDILIS, A. L.; ATANASOV, P. B. Potentiometric electrode and measuring procedure for determination of organophosphorus compounds. *Patent WO9829738 A(1)*, Estados Unidos, 09/07/1998.
- 5 [5] NUNES, G. S.; JEANTY, G.; MARTY, J. L. Enzyme immobilization procedures on screen-printed electrodes used for the detection of anticholinesterase pesticides - comparative study. *Anal. Chim. Acta*, 523 (1) 107-115, 2004.
- [6] NUNES, G. S. ; SKLADAL, P. ; RIBEIRO, M. L. ; YAMANAKA, H. . Detection
10 of carbamate pesticides in vegetable samples using cholinesterase-based biosensors. *Electroanalysis*, 9 (14) 1083-108,1997.
- [7] NUNES, G. S. ; MONTESINOS, T. ; MARQUES, P. B. O. ; FOURNIER, D. ;
15 MARTY, Jean Louis . Acetylcholine enzyme sensor for determining methamidophos insecticide. Evaluation of some genetically modified acetylcholinesterases from *Drosophila melanogaster*. *Anal. Chim. Acta*, 434, p. 1-8, 2001.
- [8] LIMA, R S; NUNES, G. S.; NOGUER, T; MARTY, J.-L. Biossensor enzimático para detecção de fungicidas ditiocarbamatos. Estudo cinético da enzima aldeído
20 desidrogenase e otimização do biossensor. *Quim. Nova*, 30, p. 9-17, 2007.
- [9] KUBOTA, L.T.; OLIVEIRA NETO, G.; CARVALHO, R.M. Biossensor de alta sensibilidade para salicilato empregando fibras de carbono: Amplificação química de sinal. *PI 0000762-5*, INPI, fev/2000.
- [10] NUNES, G. S.; MARTY, J.-L. *Immobilization of enzymes on electrodes*. In:
25 Marty, J.-L. (Org.). *Methods in Biotechnology: Immobilization of cells and enzymes*. New York: Humana Press, 2004.
- [11] OLIVEIRA, C.C.M.F.; OLIVEIRA, K.C.; SILVA FILHO, M.V.; OLIVEIRA, M.M. Presença de pesticidas anticolinérgicos (organofosforados e carbamatos) em frutas e hortaliças no município de Cabo Frio, RJ. *Vértices*, 12 (3) p. 177-185, 2010.

REIVINDICAÇÕES

1. Biossensor amperométrico enzimático feito de grafite modificado-fibras de carbono para detecção de agentes dos nervos: Construção e modo de usar, caracterizado por ser constituído de dois eletrodos, um de trabalho (grafite modificado-fibras de carbono) (9, 10) e outro de referência (de Ag/AgCl ou de calomelano) (14).

2. Biossensor amperométrico enzimático feito de grafite modificado-fibras de carbono para detecção de agentes dos nervos: Construção e modo de usar, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por possuir, como elemento de biorreconhecimento, no eletrodo de trabalho, a enzima AChE (7, 8), cuja carga enzimática final está na faixa de 0,5 a 20 mU/eletrodo.

3. Biossensor amperométrico enzimático feito de grafite modificado-fibras de carbono para detecção de agentes dos nervos: Construção e modo de usar, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por aceitar, como fonte da enzima AChE (7), tanto as enzimas comerciais (extraídas de diversas matrizes, tais como enguia elétrica, soro bovino, soro equino, sangue humano), como provenientes de extratos de encéfalos de ratos e da mosca-das-frutas (*Drosophila melanogaster*), podendo ser estas enzimas tanto originais como geneticamente modificadas.

4. Biossensor amperométrico enzimático feito de grafite modificado-fibras de carbono para detecção de agentes dos nervos: Construção e modo de usar, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato da enzima AChE se encontrar imobilizada em um gel polimérico de PVA-SbQ (7), sendo que a proporção solução de AChE-PVA-SbQ pode variar de 80:20 até 60:40.

5. Biossensor amperométrico enzimático feito de grafite modificado-fibras de carbono para detecção de agentes dos nervos: Construção e modo de usar, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por ser a matriz de carbono formada de grafite modificada com a mistura do precipitado Meldola's Blue-Sal de Reinecke (MBRS) (proporção 1:1) e um segundo mediador eletroquímico, o 7,7,8,8-tetracianoquinodimetano (TCNQ) (1, 2, 3, 4, 5).

6. Biossensor amperométrico enzimático feito de grafite modificado-fibras de carbono para detecção de agentes dos nervos: Construção e modo de usar, de acordo com as reivindicações 1 a 5, caracterizado por conter, no eletrodo formado da pasta de grafite modificada com MBRS-TCNQ, uma quantidade de hidroxietilcelulose e de parafina líquida, suficiente para fornecer o ponto de liga, uma certa quantidade da enzima soroalbumina bovina, suficiente para auxiliar na imobilização da AChE, e uma certa quantidade de solução tampão fosfato, para manter o pH em uma faixa de 7,5-8,0 (6).

7. Biossensor amperométrico enzimático feito de grafite modificado-fibras de carbono para detecção de agentes dos nervos: Construção e modo de usar, de acordo com as reivindicações 1 a 6, caracterizado por possuir, como eletrodo de trabalho, um tubo oco de polietileno, de dimensões variadas, com uma das extremidades fechadas, preenchido com a pasta de grafite modificada e fibras de carbono (9, 10), sendo que: a quantidade de fibras varia de 30 a 60, dependendo do diâmetro interno do tubo e da espessura da fibra).

8. Biossensor amperométrico enzimático feito de grafite modificado-fibras de carbono para detecção de agentes dos nervos: Construção e modo de usar, de acordo com as reivindicações 1 a 7, caracterizado por ser o eletrodo facilmente conectado a um sistema eletroquímico (potenciostato/galvanostato), mediante conexões elétricas metálicas simples, tais como um fio de platina, de cobre ou de ouro (11).

9. Biossensor amperométrico enzimático feito de grafite modificado-fibras de carbono para detecção de agentes dos nervos, de acordo com as reivindicações 1 a 8, caracterizado por ser o eletrodo de trabalho conectado ao sistema eletroquímico juntamente com um eletrodo de referência (13).

10. Biossensor amperométrico enzimático feito de grafite modificado-fibras de carbono para detecção de agentes dos nervos: Construção e modo de usar, de acordo com as reivindicações 1 a 9, caracterizado por permitir a conexão com qualquer tipo de eletrodo de referência, por exemplo Ag/AgCl e calomelano (14).

11. Biossensor amperométrico enzimático feito de grafite modificado-fibras de carbono para detecção de agentes dos nervos, de acordo com as reivindicações 1 a 10, caracterizado por operar mediante medidas cronoamperométricas (corrente formada em função do tempo), sendo que:

a corrente a ser monitorada é aquela gerada durante a reação entre a enzima AChE, contida no eletrodo de carbono-modificado-fibras de carbono (7, 8, 9), e o substrato enzimático, que pode ser acetilcolina (ACh), acetiltiocolina (ATCh), butirilcolina (BCh) e butiltiocolina (BTCh), em variadas concentrações; e que:

a solução do substrato se encontra dentro de uma célula eletroquímica (14), de tamanho que varia segundo a dimensão dos eletrodos; e que

os eletrodos, durante as medidas cronoamperométricas, encontram-se com suas camadas inferiores sensíveis imersas dentro da célula eletroquímica (14).

12. Biossensor amperométrico enzimático feito de grafite modificado-fibras de carbono para detecção de agentes dos nervos: Construção e modo de usar, de acordo com as reivindicações 1 a 11, caracterizado por ser capaz de detectar compostos organofosforados, mediante ensaios de inibição, por incubação do eletrodo de trabalho em solução do inibidor ou mesmo amostra contaminada, seguida de registro do decréscimo de corrente gerada durante reação enzima-substrato.

13. Biossensor amperométrico enzimático feito de grafite modificado-fibras de carbono para detecção de agentes dos nervos: Construção e modo de usar, caracterizado por permitir acoplamento em um potenciostato/galvanostato de pequeno porte (14), dando origem a uma ferramenta portátil, ideal para medidas em campo.

14. Biossensor amperométrico enzimático feito de grafite modificado-fibras de carbono para detecção de agentes dos nervos: Construção e modo de usar, de acordo com as reivindicações 1 a 13 caracterizado por permitir análises do tipo *screening* em amostras líquidas e sólidas, neste último caso procedendo-se uma prévia extração do analito.

15. Biossensor amperométrico enzimático feito de grafite modificado-fibras de carbono para detecção de agentes dos nervos: Construção e modo de usar, de acordo com as reivindicações 1 a 14, caracterizado por permitir análises qualitativas, mediante a inibição da AChE, sendo que:

as medidas cronoamperométricas podem ser realizadas no laboratório ou no campo;

as medidas de inibição devem ser realizadas tomando-se tempos de incubação da AChE com a amostra que supostamente contém o inibidor, de 10 a 15 minutos, dependendo do caso;

5 todos os ensaios de inibição obedecem o mesmo protocolo, tendo como fixos os seguintes parâmetros: tipo e concentração do substrato, carga enzimática em cada eletrodo, tempo de incubação enzima-inibidor, tempo esperado para estabilização do valor de corrente, potencial de trabalho aplicado.

10 16. Biossensor amperométrico enzimático feito de grafite modificado-fibras de carbono para detecção de agentes dos nervos: Construção e modo de usar, de acordo com as reivindicações 1 a 15, caracterizado por permitir análises quantitativas, desde que, tendo conhecimento prévio da natureza do agente de nervo empregado no local, se construa uma curva de inibição (do tipo concentração do inibidor *versus* inibição relativa).

15 17. Biossensor amperométrico enzimático feito de grafite modificado-fibras de carbono para detecção de agentes dos nervos: Construção e modo de usar, caracterizado por permitir a sua armazenagem por cerca de 3 meses em geladeira (a 4°C), com perda mínima (máximo 13%) da atividade enzimática.

20 18. Biossensor amperométrico enzimático feito de grafite modificado-fibras de carbono para detecção de agentes dos nervos: Construção e modo de usar, caracterizado por possuir elevada sensibilidade ($LD = 2,7 \mu\text{g/L}$ para o agente dos nervos Sarin) e reprodutibilidade ($CV = 6,3\%$, $n=12$), para eletrodos recém-preparados.

19. Biossensor amperométrico enzimático feito de grafite modificado-fibras de carbono para detecção de agentes dos nervos: Construção e modo de usar, caracterizado por permitir aplicação industrial, com produção em micro e macro escala.

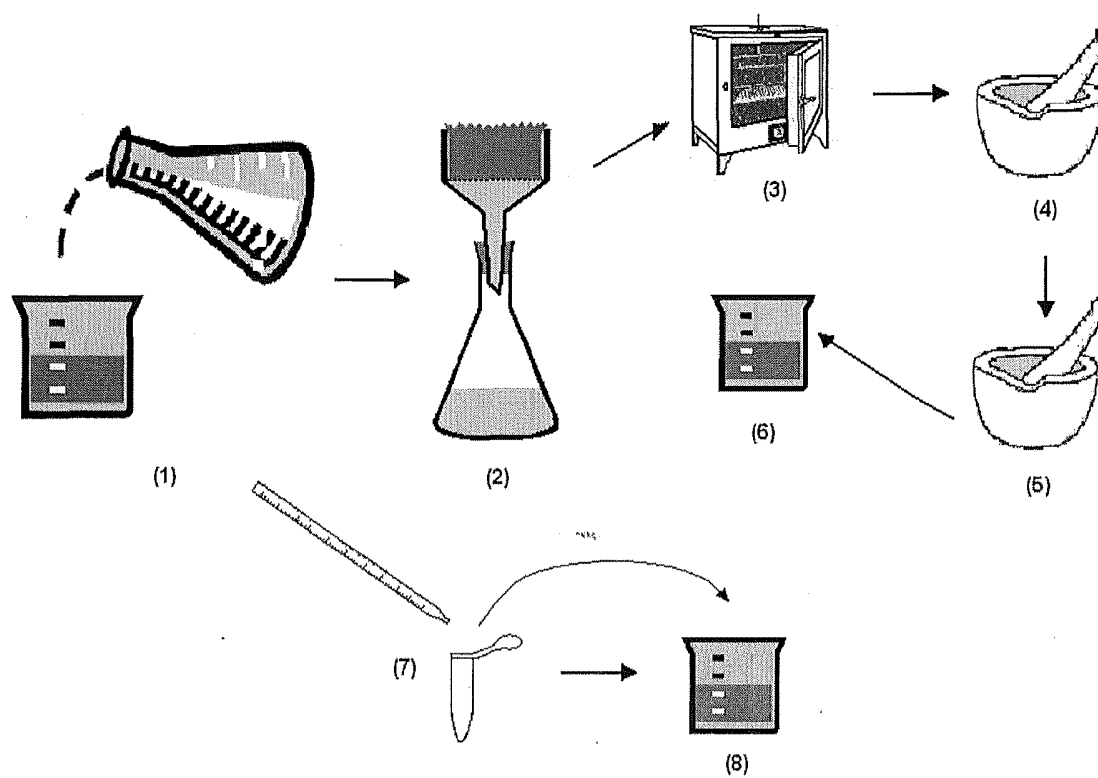


Fig. 1

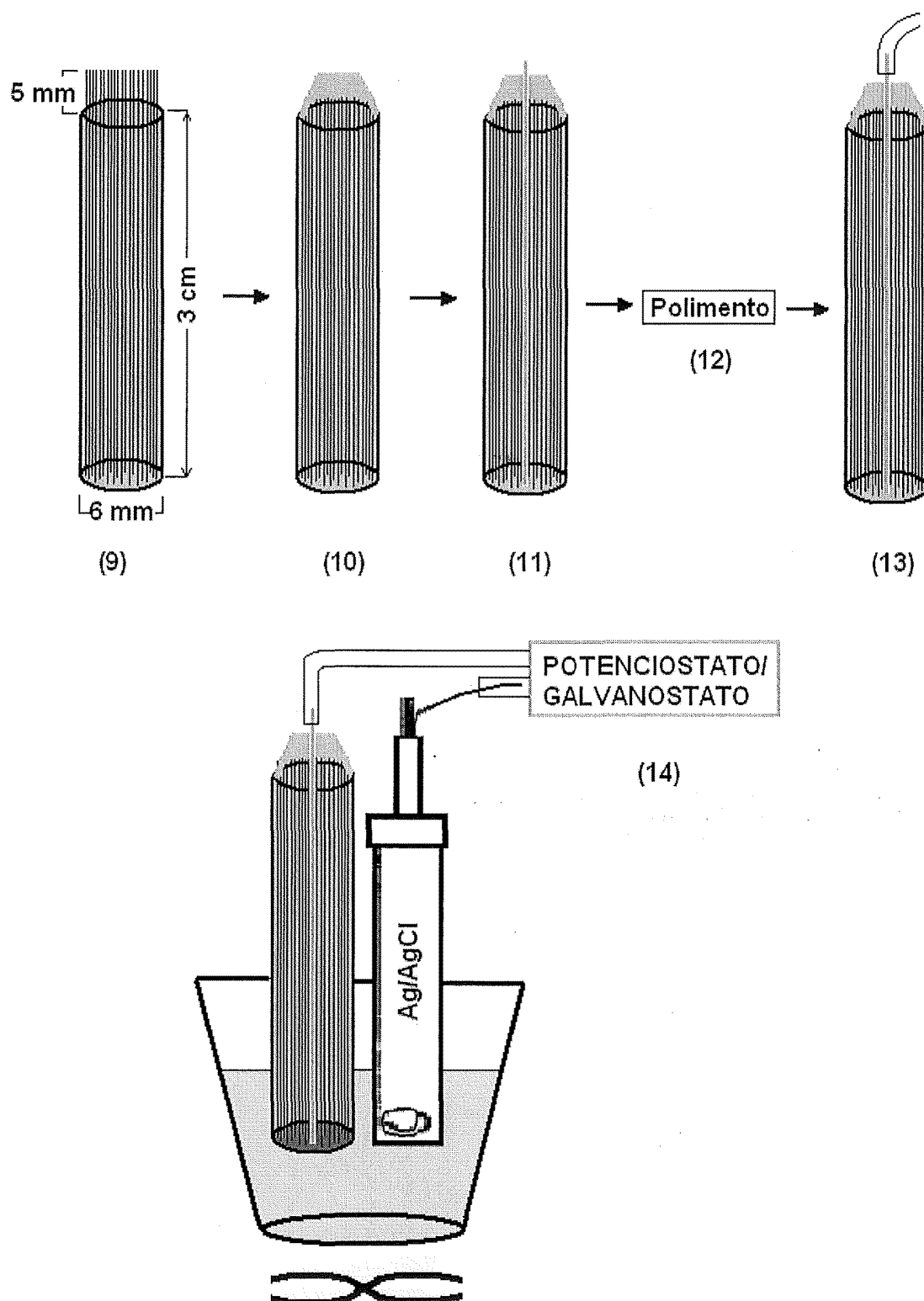


Fig. 2

RESUMO

Patente de Invenção “BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO ENZIMÁTICO FEITO DE GRAFITE MODIFICADO-FIBRAS DE CARBONO PARA DETECÇÃO DE AGENTES DOS NERVOS: CONSTRUÇÃO E MODO DE USAR”.

A presente invenção constitui-se de um biossensor amperométrico que serve para detectar, mediante ensaios de inibição enzimática, com precisão e elevada sensibilidade, níveis de agentes dos nervos em níveis de traços, seja em amostras ambientais ou biológicas. Os modos de preparo e uso do biossensor são extremamente simples, e a detecção dos agentes dos nervos pode ser realizada tanto em laboratório como diretamente no campo. Para construção do biossensor, inicialmente um precipitado de MBRS foi preparado (1, 2, 3, 4) e, a este, acrescentado o mediador TCNQ, pó de grafite(5) e, seqüencialmente, HEC, parafina líquida, PBS (PH 7,5) e a enzima BSA (6). A enzima AChE, previamente imobilizada em PVA-SbQ (7), foi então adicionada à pasta de grafite modificada (8), e a mistura resultante foi utilizada para preencher um tubo de polietileno oco, contendo em seu interior fibras de carbono (9), que foram seladas termicamente nas extremidades (10). O contato elétrico foi feito com fio de platina (11) e a extremidade superior do eletrodo polida com papel sulfite (12), antes de ser conectado a um potenciostato (13), juntamente com o eletrodo de referencia (Ag/AgCl), tendo sido ambos os eletrodos imersos em uma célula eletroquímica (14), na qual foram realizadas as medidas cronoamperométricas.