

## **Estudo Prospectivo Relativo à Construção De Biossensores à Base da Enzima Acetilcolinesterase para Detecção de Pesticidas Organofosforados**

### **Prospective Study on the Biosensors Construction to Base Acetylcholinesterase for the Detection of Pesticides Organophosphorus**

Laiane Araújo da Silva Souto<sup>1</sup>; Gilvanda Silva Nunes<sup>2</sup>; Fernanda Gabrielle Soares da Silva<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Maranhão – UFMA

[laianesouto@gmail.com](mailto:laianesouto@gmail.com)

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência da Propriedade Intelectual- PPGPI

Universidade Federal do Maranhão – UFMA

[gilvanda.nunes@hotmail.com](mailto:gilvanda.nunes@hotmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal do Maranhão – UFMA

[fernandag.soares@hotmail.com](mailto:fernandag.soares@hotmail.com)

#### **Resumo:**

*Pesticidas organofosforados (OFs) são compostos muito tóxicos, intensivamente utilizados na agricultura. A presença de resíduos de OFs no ambiente tem sido considerada de elevada periculosidade para a saúde humana, já que tais substâncias inibem irreversivelmente locais ativos catalíticos da enzima acetilcolinesterase (AChE), essencial para os seres vivos, considerando que esta permite a transmissão de sinais elétricos no sistema nervoso central. Biossensores enzimáticos vêm se desenvolvendo muito nas últimas décadas, sobretudo como proposta técnica e economicamente viável para a detecção rápida de pesticidas OFs, não só em amostras ambientais como em alimentos. O presente estudo tem como finalidade realizar um levantamento das pesquisas já concluídas sobre a construção e utilização desses biossensores, e que deram origem não só a teses, dissertações e artigos, mas que também resultaram em tecnologias protegidas por patentes. Para tal, foram consultadas bases de artigos e de patentes, nacionais e internacionais, bem como as bibliotecas das principais universidades brasileiras. Os resultados obtidos oferecem informações importantes para a construção de biossensores os mais sensíveis e de baixo custo possível.*

**Palavras-chave:** Biossensores; Amperométricos; Acetilcolinesterase; Pesticidas; Organofosforados.

#### **Abstract**

*Organophosphorus pesticides (HAL levels) are very toxic compounds, extensively used in agriculture. The presence of HAL levels of waste on the environment has been considered high hazard to human*

*health, since these substances inhibit irreversibly local catalytic active enzyme acetylcholinesterase (AChE), which is essential to living things, as this allows the transmission of electrical signals in the central nervous system. Enzymatic biosensors have been developing over the last decades, mainly as a technical proposal and economically viable for rapid detection of pesticides HAL levels, not only in environmental samples as food. This study aims to survey the research already completed on the construction and use of such biosensors, and gave rise not only to theses, dissertations and articles, but also resulted in technologies protected by patents. For such bases were consulted articles and patents, national and international, as well as the libraries of major universities. The results provide important information for the construction of biosensors more sensitive and low cost.*

**Key-words:** Biosensors; amperometric; acetylcholinesterase; pesticides; Organophosphates.

## 1. Introdução

Agrotóxicos, defensivos agrícolas, pesticidas, praguicidas, remédios de planta ou veneno: são inúmeras as denominações relacionadas a um grupo de substâncias químicas utilizadas no controle de pragas e doenças de plantas (BRAIBANT E ZAPPE, 2012). Segundo Baird (2002), *pesticidas* são substâncias que podem matar diretamente um organismo indesejável ou controlá-lo de alguma maneira. Dividindo-se em classes, de acordo com os organismos que se pretende atingir, podem ser agrupados em acaricidas, inseticidas, herbicidas, fungicidas, entre outros. Os pesticidas ainda podem ser classificados segundo sua constituição, destacando-se os organoclorados, os organofosforados, os carbamatos e os piretróides.

Pesticidas organofosforados (OFs) apresentam efeitos inibitórios sobre as enzimas colinesterases, que são essenciais para o bom funcionamento do sistema nervoso dos vertebrados e insetos. A ação tóxica desses compostos surge, portanto, a partir da inibição da atividade da acetilcolinesterase (AChE), levando ao acúmulo de acetilcolina (ACh) nas terminações nervosas e, conseqüentemente, causando superestimulação colinérgica. Esse efeito tóxico acarreta conseqüências graves em seres humanos, incluindo câimbras abdominais, tremor muscular, hipotensão, dificuldade em respirar, diarreia, batimentos cardíacos desaceleração (bradicardia), fasciculação muscular, paralisia, coma e até a morte, dependendo do grau de intoxicação (KAVRUK, ÖZALP e ÖKTEM, 2013; WILSON, 2005).

Técnicas amperométricas utilizando biossensores à base da enzima acetilcolinesterase (AChE) têm emergido, nas últimas décadas, como sendo promissoras para investigações de toxicidade, monitoramento ambiental, controle de qualidade de alimentos e investigações militares (MENDONÇA et al., 2012). Assim, muitos são os artigos detalhando aspectos relacionados com a construção, a caracterização e o uso desses protótipos. Alguns *reviews* têm sido também publicados, mas ainda se verifica um número muito reduzido de trabalhos envolvendo prospecção de patentes na área de

biossensores. Contudo, tais levantamentos são altamente necessários, haja vista que permitem conhecer as tecnologias já desenvolvidas, no tempo e no espaço, evitando assim retrabalhos e propondo novas configurações para protótipos ainda mais precisos e sensíveis.

O presente trabalho vem preencher, pelo menos na atualidade, essa lacuna, especificamente em relação aos biossensores amperométricos à base da enzima AChE, desenvolvidos para detecção de pesticidas OFs.

## **2. Metodologia e Escopo da Busca**

Foi feita uma prospecção tecnológica de conteúdo de patentes mediante consultas na base de patentes dos seguintes sítios: Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), Escritório Europeu de Patentes (EPO), Organização Mundial de Propriedade Intelectual (WIPO) e Escritório Americano de Patentes e Marcas (USPTO). Para a busca de teses e dissertações, utilizou-se o banco de Teses da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); já para a pesquisa de artigos científicos, foram utilizadas as bases de periódicos da CAPES, do *Google Acadêmico* e do *Science Direct*.

Durante as buscas, foram utilizadas palavras-chaves e as diversas combinações destas, com a finalidade de ampliar e refinar a busca nas bases de patentes, teses, dissertações e artigos. Os cruzamentos foram feitos com as mesmas expressões e combinações em todas as bases, porém utilizou-se a língua inglesa ao realizar a busca em bases internacionais. As palavras chave utilizadas foram: “biossensores”, “amperométricos”, “acetilcolinesterase”, “pesticidas” e “organofosforados”. Estratégias de truncamento com asterisco (\*) e utilização dos operadores booleanos AND, OR e AND NOT foram utilizadas em todas as pesquisas que envolveram combinação de termos. Os resultados obtidos foram analisados e apresentados na forma de gráficos e tabelas, tendo sido para isso utilizado o Programa Excel®.

## **3. Resultados e Discussão**

Ao realizar a análise da tabela que apresenta o escopo da busca (Tabela 1), observou-se que a base de patentes que forneceu numericamente mais resultados foi a do USPTO, porém na base de dados EPO foram recuperados maiores números de patentes, ao serem empregadas as seguintes combinações de palavras: “biossensor AND acetylcholinesterase AND organophosphate” e “biossensor AND

acetylcholinesterase AND amperometric”. Vale mencionar que o uso dos operadores OR e AND NOT não forneceu resultados consistentes nessa busca.

Uma vez que as combinações mostradas na Tabela 1 representaram, pelo menos a princípio, o objetivo da busca, os resultados preliminares foram de fundamental importância, uma vez que nortearam todo o refinamento da mesma.

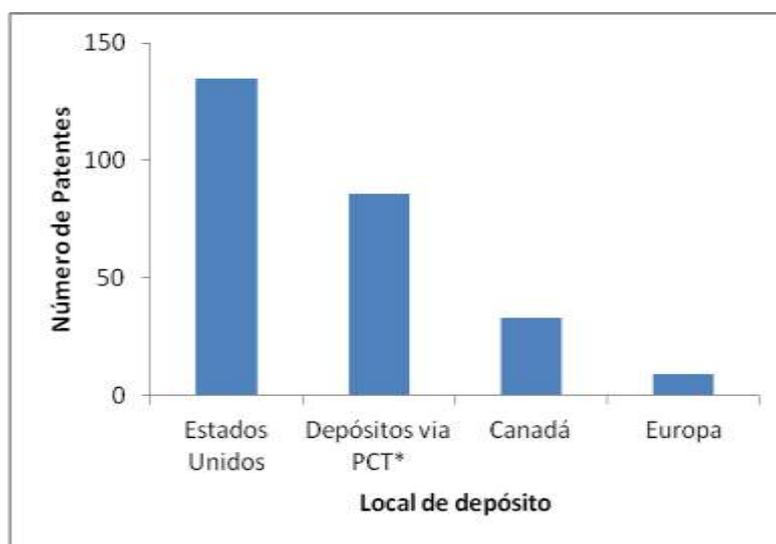
Tabela 1 – Número de patentes por palavras-chaves e agrupamentos destas, recuperadas nas bases consultadas

Palavras-Chaves	INPI Título e resumo	WIPO Todos os campos	USPTO Todos os campos	EPO Título e resumo
Biosensor	20	10224	14035	317
Biosensor AND Enzyme	2	1227	9833	45
Biosensor AND Cholinesterase	0	3311	700	1
Biosensor AND Pesticide	0	31	253	40
Biosensor AND Acetylcholinesterase	0	3323	26	0
Biosensor AND Amperometric	0	152	50	15
Biosensor AND Organophosphate	0	3	201	0
Biosensor AND Acetylcholinesterase AND Organophosphate	0	260	0	0
Biosensor AND Acetylcholinesterase AND Pesticide	0	1	0	0
Biosensor AND Acetylcholinesterase AND amperometric	0	263	0	0
Total	22	8571	25098	418

Fonte: Autoria própria, 2016

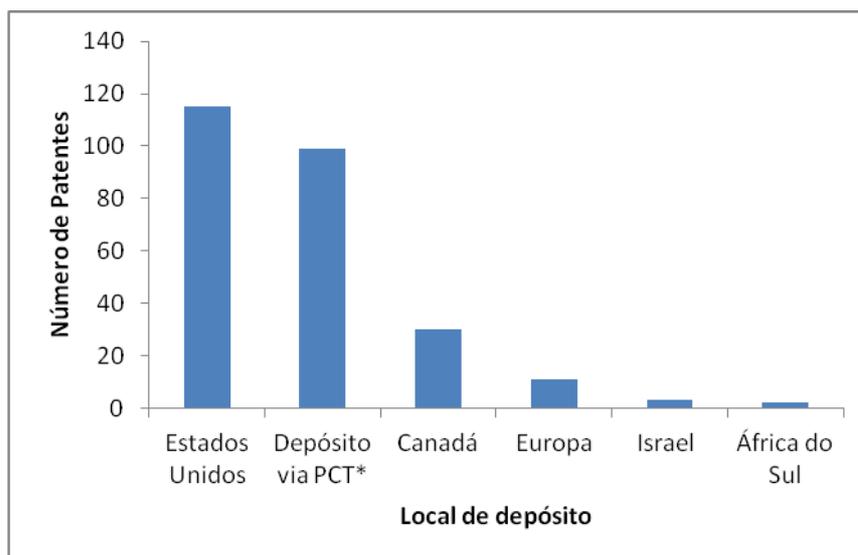
Em uma análise mais detalhada acerca dos dados obtidos empregando-se as combinações “biosensor AND acetylcholinesterase AND organophosphate” e “biosensor AND acetylcholinesterase AND amperometric” na base de patentes WIPO, foram extraídas as informações constantes nas Figuras 1e 2.

Figura 1 – Distribuição dos locais de depósitos das patentes, utilizando a combinação de palavras “biosensor AND acetylcholinesterase AND organophosphate” (pesquisa na base da WIPO)



Fonte: Autoria própria, 2016

Figura 2 – Distribuição dos locais de depósitos das patentes, utilizando a combinação de palavras “biosensor AND acetylcholinesterase AND amperometric” (pesquisa na base da WIPO)



Fonte: Autoria própria, 2016

Observamos que, para as duas combinações de palavras-chaves apresentadas nas Figuras 1 e 2, os EUA mostrou maior número de registros de patentes, seguido dos depósitos via Tratado de Cooperação de Patentes (PCT), e depois o Canadá. Apesar do Brasil ser um dos países signatários do PCT, a sua contribuição em termos de proteção das tecnologias de biossensores por patentes é ainda reduzida.

Ao utilizar-se a opção de truncamento (\*) das palavras-chaves, foi possível recuperar patentes que tinham em seu resumo algumas palavras derivadas destas originais. Desta forma, foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Número de patentes por palavras-chaves “truncadas”, recuperadas nas bases de patentes consultadas

Palavras-Chave	INPI	WIPO	USPTO	EPO
Biosen*AND Enzym*	14	40	0	70
Biosens* AND Acetyl*	3	900	781	45
Biosens* AND Acetyl* AND Enzym*	3	80	80	20
Biosens* AND Acetyl * AND amperométric *	1	30	20	2
Biosens* AND acetyl* AND organop*	1	8	9	7
Biosens* AND Enzym* AND organop*	1	2	0	42
Biosen* AND Organop*	0	1	0	50

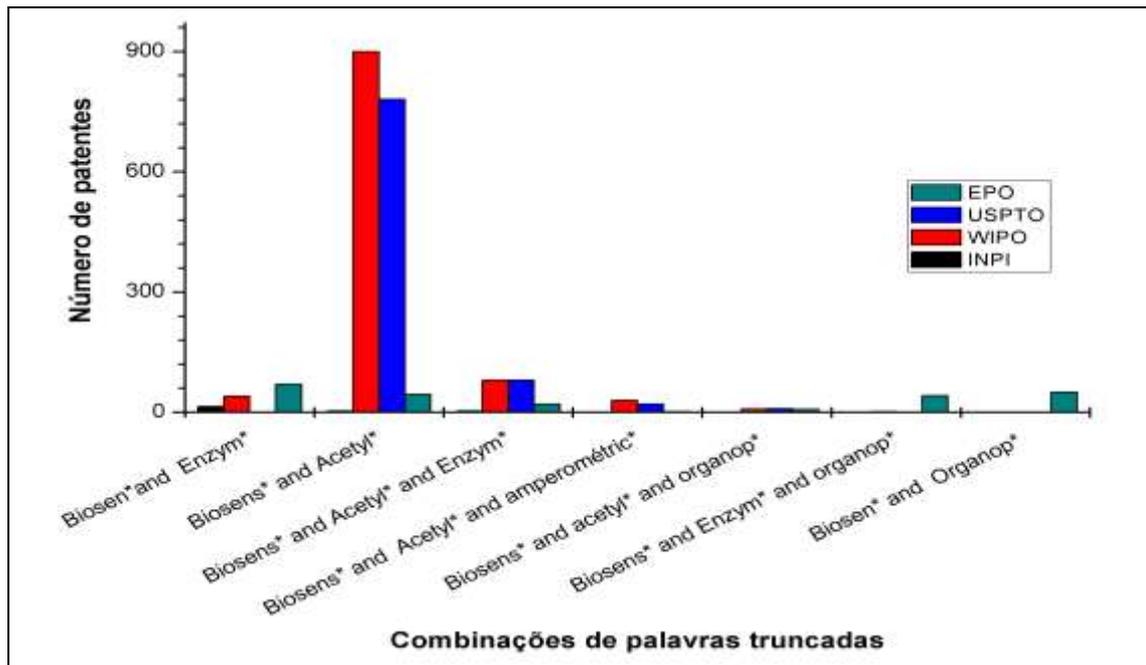
Fonte: Autoria própria, 2016

Observamos que ao usar a opção “truncagem” das palavras, os dados obtidos nas mesmas bases estrangeiras anteriormente citadas (WIPO, USPTO e EPO) apresentaram-se mais uniformes e mais reduzidos. Já na base de patentes nacional (INPI), houve um pequeno aumento no número de

documentos de patentes recuperados, quando se utilizou tal estratégia; a base do USPTO permaneceu liderando em termos de número de registros.

Fazendo uma análise mais detalhada, pode-se observar que a combinação de palavras “truncadas” que gerou um maior número de resultados foi “Biosens\* AND Acetyl\*”. Quando tais resultados foram representados em um gráfico (Figura 3), pôde-se observar que as bases USPTO e WIPO lideraram em termos de registros de patentes.

Figura 3 – Número de documentos de patentes recuperados, utilizando o recurso “truncamento” nas bases de patentes consultadas



Fonte: Autoria própria, 2016

Em relação aos artigos científicos, teses e dissertações publicados, versando sobre biossensores eletroquímicos à base da enzima AChE, quando as mesmas combinações de palavras-chaves constantes na Tabela 1 foram empregadas, números muitas vezes superiores foram encontrados, como pode ser visto na Tabela 3. Como esperado, ao se pesquisar somente o termo “Biosensor”, o número de documentos foi enorme, haja vista que cobriu todos os tipos de biossensores já desenvolvidos, incluindo os baseados na enzima AChE. As múltiplas combinações deste termo com os termos “cholinesterase”, “pesticide”, “organophosphate” e “amperometric” possibilitou um refino dessa busca preliminar.

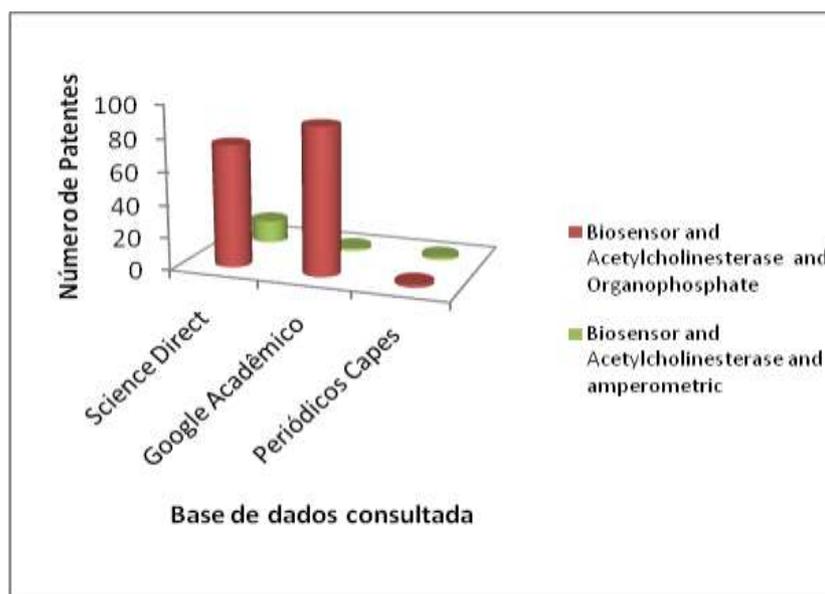
Tabela 3 – Número de artigos científicos, teses e dissertações, por palavras-chaves e agrupamentos destas, recuperadas nas bases consultadas

<b>Palavras-Chave</b>	<b>Science Direct</b>	<b>Google Acadêmico</b>	<b>Periódicos Capes</b>
Biosensor	64887	529000	45277
Biosensor AND Enzyme	32928	120000	14241
Biosensor AND Cholinesterase	931	18500	1500
Biosensor AND Pesticide	4253	9510	1199
Biosensor AND Acetylcholinesterase	23	6950	225
Biosensor AND Amperometric	49998	5560	4
Biosensor AND Organophosphate	5668	5140	2
Biosensor AND Acetylcholinesterase AND Pesticide	80	21700	444
Biosensor AND Acetylcholinesterase AND Organophosphate	75	90	2
Biosensor AND Acetylcholinesterase AND amperometric	14	2	2
<b>Total</b>	<b>158907</b>	<b>716452</b>	<b>62896</b>

Fonte: Autoria própria, 2016

Observamos que ao se combinar algumas palavras para refino da busca, o número de artigos publicados reduz consideravelmente, ou seja, ainda há um número reduzido de artigos publicados quando se combinam as três palavras-chaves: acetilcolinesterase, biosensores e organofosforados, objetivo da busca nessa pesquisa. A Figura 4 ilustra esse fato.

Figura 4 – Número de artigos científicos, teses e dissertações, recuperados nas bases consultadas



Fonte: Autoria própria, 2016

É perceptível como ainda é maior o interesse em se publicar artigos, teses ou dissertações do que

proteger uma nova invenção mediante o registro de uma patente.

#### 4. Conclusões

O desenvolvimento de biossensores capazes de detectar, no laboratório ou *in situ*, a presença de pesticidas em amostras ambientais ou de alimentos, com um nível de sensibilidade e rapidez suficiente para que os resultados sirvam de base par tomadas de decisões oficiais, é já uma realidade. A prova disso é o elevado número de artigos e teses sobre o assunto.

Por meio da análise dos dados apresentados nesse trabalho, verificamos que, apesar do alto índice de publicação de artigos científicos relacionados à construção de biossensores amperométricos a base de acetilcolinesterase para detecção de pesticidas OFs, ainda há um número reduzido de patentes depositadas em banco de dados, sobretudo no Brasil. Dada a sua importância, do ponto de vista ambiental e de saúde pública, torna-se necessário e urgente um maior incentivo para o desenvolvimento desses protótipos, bem como a sua proteção na forma de patentes, dentro e fora do País. As informações aqui levantadas mostraram-se, pois, essenciais ao desenvolvimento de pesquisas relacionadas às inovações tecnológicas nesse campo do conhecimento.

#### Referências

- BAIRD, C. Química Ambiental. 2 ed. **Bookman**. Porto Alegre – RS, 2002.
- BRAIBANTE, M.E; ZAPPE, J.A. A Química dos Agrotóxicos. Química Nova na Escola, Vol. 34, n 1, p. 10-15, Fevereiro 2012.
- EPO. Espacenet Patent Search. Disponível em: <<http://worldwide.espacenet.gov>>. Acesso em: 5 jan 2016.
- KAVRUK, M.; ÖZALP, V. C.; ÖKTEM, H. A. Portable Bioactive Paper-Based Sensor for Quantification of Pesticides. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v.2013, p. 8, 2013
- INPI. Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Disponível: <<http://www.inpi.gov.br>>. Acesso em: 2 nov. 2015.
- MARTINEZ, M. T. Desenvolvimento de biossensores de pasta de carbono e de nanotubos de carbono modificados com a enzima acetilcolinesterase para detecção de pesticidas da classe de carbamatos. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.
- MENDONÇA, C. D.; VERBINNEN, R. T.; MARQUES, P. R. B. O.; NUNES, G. S. Construção de biossensores amperométricos à base da enzima acetilcolinesterase contendo macroalga de ambiente estuarino para a detecção do agente anticolinesterase paration metílico. **Caderno de Pesquisa**, v. 19, p. 128-137, 2012.
- PERIÓDICOS CAPES. Disponível em: <<http://www.periodicos.capes.gov.br/>>. Acesso em: jul. 2014.

SCIENCE DIRECT. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/>>. Acesso em: jan 2016.

SCOPUS. Disponível em: <<http://www.scopus.com/home.url>>. Acesso em: jul. 2014.

USPTO. United States Patent and Trademark Office. Disponível: <<http://www.uspto.gov>>. Acesso em: 4 jan. 2016.

VAN DYK, J.S.; PLETSCHE, B. Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment. **Chemosphere**, v. 82, p. 291–307, 2011

WANG, K.; LIU, Q.; DAI, L.; YAN, J.; JU, C.; QIU, B.; WU, X. A highly sensitive and rapid organophosphate biosensor based on enhancement of CdS– decorated graphene nanocomposite. **Analytica Chimica Acta**, v.695, p. 84–88, 2011.

WIPO. World Intellectual Property Organization. Disponível em: <<http://www.wipo.int/patentscope/en/>>. Acesso em: 9 jan. 2016.

Recebido em: 16/05/2016

Aprovado em: 17/03/2020