



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102013020661-0

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102013020661-0

(22) Data do Depósito: 18/07/2013

(43) Data da Publicação Nacional: 21/11/2017

(51) Classificação Internacional: G01N 27/26; C12Q 1/25.

(54) Título: PROCESSO PARA CONSTRUÇÃO DE ELETRODOS MODIFICADOS E SISTEMA DE MEDAÇÃO DO ÍNDICE DE CONCENTRAÇÃO DO PESTICIDA METAMIDOFÓS

(73) Titular: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO. CGC/CPF: 33004540000100. Endereço: AV. FERNANDO CORRÊA DA COSTA, S/N CIDADE UNIVERSITÁRIA, MT, BRASIL(BR), 78060-900; USP - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Endereço: AV. TRABALHADOR SÃO-CARLENSE, 400, ARNOLDO SCHIMIDT, SÃO CARLOS, SP, BRASIL(BR), 13566-590

(72) Inventor: ROMILDO JERÔNIMO RAMOS; AILTON JOSÉ TEREZO; FRANCISCO EDUARDO GONTIJO GUIMARÃES; IZABELA GUTIERREZ DE ARRUDA; NIRTON CRISTI SILVA VIEIRA.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 18/07/2013, observadas as condições legais

Expedida em: 10/08/2021

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

RELATÓRIO DESCRIPTIVO

PROCESSO PARA CONSTRUÇÃO DE ELETRODOS MODIFICADOS E SISTEMA DE MEDIÇÃO DO ÍNDICE DE CONCENTRAÇÃO DO PESTICIDA METAMIDOFÓS

[001] A presente patente de invenção trata de um processo para construção de eletrodos modificados com nanopartículas de dióxido de silício e acetilcolinesterase, além do respectivo sistema para a detecção potenciométrica do pesticida metamidoфós constituindo, assim, um biossensor para identificar a contaminação de alimentos (para humanos e para animais) por tal agente.

[002] Sabe-se que os avanços na produção agrícola do Brasil têm origem, dentre outras tantas técnicas, na aplicação de pesticidas nas diversas culturas, entre elas a da soja, algodão, trigo, feijão etc. O uso desses pesticidas, a despeito de todas as normas já existentes, pode se dar de forma descontrolada e abusiva, com vias a buscar melhores resultados na produção. Contudo, tal uso desenfreado pode fazer com que os alimentos assim produzidos sejam contaminados pelo pesticida, tornando-o inadequado para o consumo humano e animal. Além disso, o uso desses agrotóxicos pode causar severos danos ambientais.

[003] Dentre os diversos pesticidas utilizados pelos agricultores brasileiros, destaca-se um extremamente tóxico (classe 1) da classe dos organofosforados, o metamidoфós.

[004] O uso de tal produto químico tem sido motivo de diversos debates e controvérsias. Tanto que a ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária determinou o seu banimento e o fim da sua comercialização até meados de 2012. Contudo, a Justiça suspendeu a resolução da ANVISA em virtude de um dos fabricantes ter entrado na Justiça contestando tal decisão. Assim, a produção e comercialização do inseticida continuam. O metamidoфós já foi banido da China e do Japão, porém, muitos países ainda o utilizam em suas culturas.

[005] Os argumentos contrários ao uso de tal produto são vários, tais como a alegação de que o mesmo causa malefícios aos sistemas neurológico, imunológico, reprodutor e endócrino, tornando patente a necessidade de medição dos níveis de contaminação dos produtos agrícolas.

[006] Classicamente, a detecção do nível de contaminação por pesticidas é realizada por cromatografia e/ou espectroscopia. Esses métodos, apesar de eficazes, requerem o treinamento de pessoal qualificado bem como o uso de equipamentos de grande porte, complexos, de custo elevado e de resposta demorada; problema que pode ser facilmente contornado com a utilização de dispositivos biossensores como o aqui proposto.

[007] Ciente de que o debate sobre a proibição ou não de tal pesticida pode ainda durar por vários anos, até que sejam comprovados e acatados os argumentos de um dos lados da disputa, é que foi desenvolvida a presente invenção, que permitirá a aferição *in loco* dos níveis de presença deste pesticida nos alimentos, fazendo com que a fiscalização considere determinada produção como estando dentro de padrões aceitáveis de contaminação. Além disso, tal invenção permitirá que os produtos de origem orgânica, isto é, livre de agrotóxicos, possam ser certificados com mais rapidez e confiabilidade.

[008] Os biossensores são dispositivos compactos e práticos, que têm sido utilizados para a determinação de pesticidas. Nesses dispositivos, os pesticidas podem ser quantificados direta ou indiretamente. Mais especificamente, segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), um biosensor é definido como: “um dispositivo integrado transdutor-receptor, que é capaz de fornecer informação analítica específica quantitativa ou semiquantitativa, utilizando um elemento de reconhecimento biológico.

[009] Biossensores eletroquímicos constituem a classe de biossensores mais antiga utilizada, por oferecerem alta especificidade, baixo limite de detecção e baixo custo. Dentre as classes de biossensores eletroquímicos, destaca-se a subclasse dos biossensores

potenciométricos, onde uma alteração do potencial elétrico do meio reacional modula o sinal de saída do dispositivo. Esse conceito de biossensor pode ser aplicado para a determinação de pesticidas em tempo real.

[010] A enzima AChE atua na degradação do neurotransmissor acetilcolina, gerando como um subproduto, íons H⁺. A presença desses íons altera o potencial do meio reacional, que pode ser facilmente medido por dispositivos biossensores potenciométricos. Porém, a enzima tem sua ação inibida na presença de pesticidas carbamatos ou organofosforados. Esses pesticidas podem então ser quantificados em porcentagem de inibição enzimática, utilizando o conceito de potenciometria.

[011] A Figura 1 apresenta o esquema utilizado na confecção do eletrodo modificado.

[012] A Figura 2 apresenta o eletrodo modificado tendo immobilizado covalentemente a enzima AChE.

[013] A Figura 3 apresenta o sistema utilizado na detecção do neurotransmissor acetilcolina e do pesticida metamidofós.

[014] Para a construção do dito eletrodo modificado (6) Mono camadas de SiO₂-Np (1) e poli(alilamina hidroclorada) (PAH) (2) (ambos adquiridos comercialmente) foram combinadas por meio da técnica de automontagem camada por camada (LbL) em substratos de vidro (3) recobertos com ouro (Au) (4). O sistema PAH/SiO₂-Np foi adsorvido nos substratos através da imersão alternada dos mesmos; primeiramente na solução de PAH (1) e em seguida na solução/dispersão de SiO₂-Np (2), resultando assim em uma bicamada PAH/SiO₂-Np. O número desejável de bicamadas PAH/SiO₂-Np pode ser facilmente alcançado com a repetição do ciclo descrito acima e ilustrado na Figura 1. A adsorção do PAH/SiO₂-Np foi monitorada por espectroscopia de absorção ultravioleta - visível (UV-Vis), utilizando-se de substratos transparentes (vidro) (3).

[015] Conforme apresentado na Fig. 3, o esquema utilizado na detecção do neurotransmissor acetilcolina e do pesticida metamidofós constitui-se do eletrodo modificado (6) conectado ao terminal de entrada de um amplificador operacional (9), que pode ser facilmente encontrado no mercado. Em seguida aterra-se um outro eletrodo, chamado eletrodo de referência (7). O circuito elétrico é fechado na solução eletrolítica (8), que nesse caso é uma solução tampão de baixa força iônica.

[016] Após a estabilização do potencial de saída do amplificador operacional (9), medido com a ajuda de um multímetro, adiciona-se uma alíquota de cloreto de acetilcolina à solução (8), que resulta no sinal característico do sistema. Observa-se um aumento do potencial elétrico entre o eletrodo de referência (7) e o eletrodo modificado (6) em virtude da reação enzimática descrita na literatura gerando um sinal característico do sistema. Vale a ressalva, que a medida da tensão entre os dois eletrodos, pode ser realizada em qualquer dispositivo de alta impedância, como um potenciómetro ou amplificador de instrumentação.

[017] O eletrodo modificado (6) é retirado do sistema e incubado numa solução contendo uma concentração conhecida do pesticida metamidofós. Nova medida é então realizada para a mesma alíquota de cloreto de acetilcolina. Devido à inibição causada pelo metamidofós, um decaimento no sinal (tensão de saída) é observado. Assim, um gráfico é construído em porcentagem de inibição, quantificando a concentração de metamidofós. Na presente invenção conseguimos detectar uma faixa de concentração 0 a 100 mg.L⁻¹ de metamidofós. Considerando que a concentração letal do metamidofós (LC50) é de 25-51 mg.L⁻¹, o invento se mostra promissor para tal finalidade. O resultado se encontra na Fig. 4, construído em porcentagem de inibição enzimática que quantifica a concentração do pesticida metamidofós, onde se destaca que o eletrodo conseguiu detectar a dose letal desse pesticida em ratos e até abaixo dela (● Dose letal (LC50) oral do produto formulado em ratos).

[018] É preciso deixar claro que o referido sistema aqui apresentado pode ser utilizado para a detecção da contaminação pelo metamidofós em qualquer tipo de alimento, bastando que o alimento a ser avaliado seja agregado a algum diluente.

[019] É claro, ainda, que pode se aplicar o referido sistema das mais variadas formas, sendo muitas as possibilidades de construção de um biossensor.

REIVINDICAÇÕES

PROCESSO PARA CONSTRUÇÃO DE ELETRODOS MODIFICADOS PARA VERIFICAÇÃO DO ÍNDICE DE CONCENTRAÇÃO DO PESTICIDA METAMIDOFÓS

1. Processo para construção de eletrodos modificados para verificação do índice de concentração do pesticida metamidofós, com nanopartículas de dióxido de silício e acetilcolinesterase, caracterizado pelo uso da técnica de automontagem camada por camada(lbl).
2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela conexão do eletrodo modificado ao terminal de saída de um amplificador operacional.
3. Processo de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo fechamento do circuito elétrico entre o eletrodo modificado e um eletrodo de referência (aterrado) em uma solução eletrolítica.
4. Processo de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizado pela adição de uma alíquota de cloreto de acetilcolina à solução eletrolítica.
5. Processo de acordo com as reivindicações 1 a 4, caracterizado pela medição da diferença de potencial elétrico entre o eletrodo modificado e o eletrodo de referência após a adição do cloreto de acetilcolina.
6. Processo de acordo com as reivindicações 1 a 5, caracterizado pela incubação do eletrodo modificado na solução, a fim de quantificar ou medir a concentração do pesticida metamidofós que, após a adição da mesma alíquota de cloreto de acetilcolina, apresentará um decaimento do sinal (tensão de saída).
7. Processo de acordo com as reivindicações 1 a 6, caracterizado pela construção de uma curva analítica baseada na porcentagem da inibição causada pelo metamidofós utilizando os eletrodos propostos.

DESENHOS

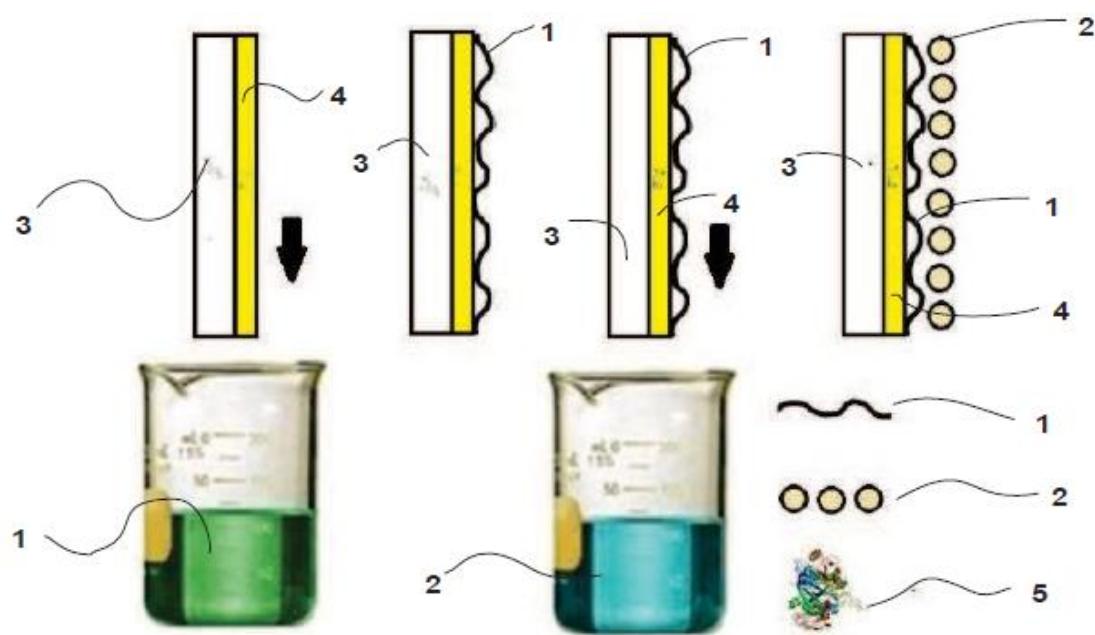


Figura 1

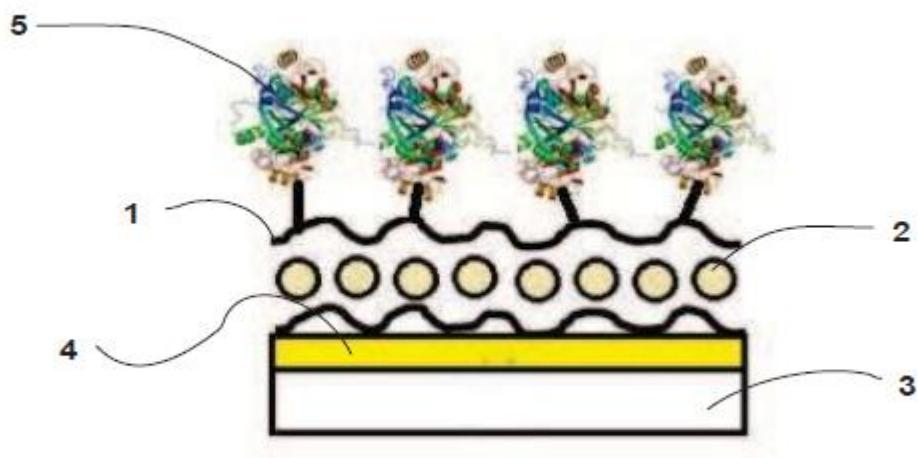


Figura 2

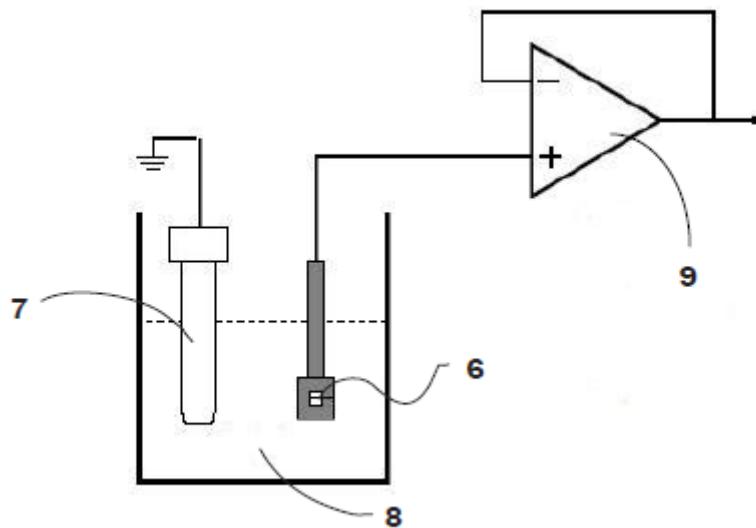


Figura 3

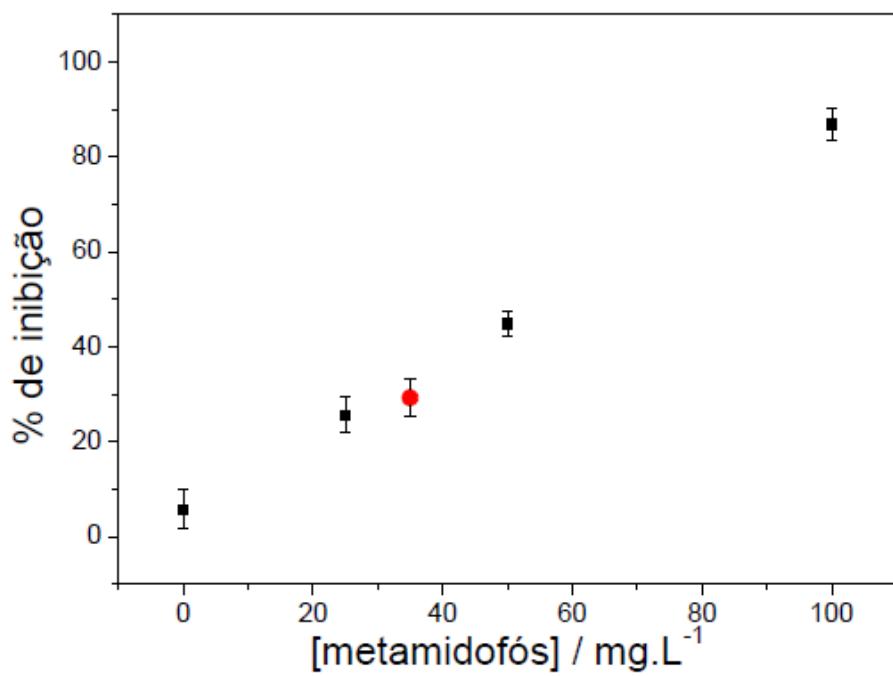


Figura 4