



A Nanotecnologia para Detectar Agentes Neurotóxicos

TEN CEL MARK N. GOLTZ, *PHD, USAF*, REFORMADO
DR. DONG SHIK KIM
MAJ LEEANN RACZ, *PHD, USAF**

ANANOTECNOLOGIA oferece ampla oportunidade para possíveis impactos em áreas completamente diversas, como a Medicina e produtos de consumo geral. Em colaboração com pesquisadores da Universidade de Toledo (*UT*), os cientistas do Instituto de Tecnologia da Força Aérea [*Air Force Institute of Technology – AFIT*] exploram a possibilidade de empregar matriz orgânica nanoescala para detectar agentes neurotóxicos organofosforados [*organophosphate – OP*]. As técnicas atuais para detectar compostos *OP* são caras e consomem demasiado tempo. O desenvolvimento de sensor de matriz orgânica nanoescala permitiria seu uso em campo. O resultado das medidas seria instantâneo. O artigo descreve a ciência responsável por tal sensor e seus possíveis empregos.

Os sensores de alto desempenho são necessários para proteger os Militares e civis de ataque. Atualmente, a doutrina requer que os destacamentos da Força Aérea estejam a postos dentro de duas horas após ataque químico ou biológico.¹ É a diferença entre a aniquilação e a vitória. Entretanto, a capacidade de detecção que possuímos é limitada. Requer muito tempo e é de difícil operação. Esse período de recuperação (duas horas) é praticamente impossível.

Em caso de ataque químico, os militares devem possuir os meios mais exatos e rápidos à disposição para detectar e quantificar as concentrações de agentes químicos. O *VX* [*etil S-2-diisopropilaminoetilmetilfosfonotiolato*], por exemplo, um dos agentes mais letais e tenazes, causa a morte de 50 por cento da população em concentrações de 1,2 miligramas por metro cúbico (mg/m^3), aproximadamente, após exposição de 10 minutos.² Tal concentração é, mais ou menos, o equivalente a uma colherinha de chá do agente liberado em coluna de ar de um metro de altura, cobrindo a área de um campo de futebol americano. Nessa concentração, o equipamento existente consegue detectá-lo com facilidade. Após três horas, o *VX* em concentração de cerca de $0,08 \text{ mg}/\text{m}^3$ (15 vezes mais baixa) ainda assim causa morte. Infelizmente, essas pequenas concentrações estão abaixo do limite de detecção do equipamento convencional. Cinquenta por cento da população experimentará efeitos não-letais, mas mesmo assim incapacitantes, tais como extrema contração da pupila, náusea ou vômito com $0,01 \text{ mg}/\text{m}^3$ após exposição de 10 minutos.³ Esta concentração é equivalente a uma colherinha de chá do agente, liberado em coluna de ar de um metro de altura, abrangendo uma área de 100 campos de futebol. Se o pessoal for incapaz

*O Dr. Goltz e o Major Racz são membros do corpo docente no Departamento de Gerenciamento de Engenharia e Sistemas [*Department of Systems and Engineering Management*] do Instituto de Tecnologia da Força Aérea [*Air Force Institute of Technology*], Base Aérea Wright-Patterson, Ohio. O Dr. Kim é Catedrático no Departamento de Engenharia Química e Ambiental [*Department of Chemical and Environmental Engineering*] na Universidade de Toledo.

de detectar com confiabilidade a contaminação de VX nessas baixas concentrações, o pessoal essencial à missão ficará fora de ação. Os comandantes podem ordenar que o pessoal coloque o equipamento protetor individual [Individual Protective Equipment – IPE], como medida de precaução, quando se desconheça a concentração. Embora tal equipamento proteja, reduz a eficácia. Assim, a monitoria de, até mesmo, traços de agentes químicos no ambiente, permitiria que o pessoal removesse o IPE, quando apropriado, evitando o estresse fisiológico causado pela proteção completa.⁴ Além do mais, a população civil inclui crianças e idosos, mais sensíveis aos efeitos de agentes em baixa concentração. É necessário o aperfeiçoamento de sensores, em caso de ataque terrorista contra a população civil.

Os destacamentos de engenharia bioambiental da Força Aérea possuem sistemas de Poluentes Atmosféricos Perigosos [Hazardous Air Pollutants on Site – HAPSITE] que detectam, identificam e medem agentes químicos em concentrações bem baixas, dando ao pessoal a capacidade de avaliar o risco de exposição.⁵ O HAPSITE emprega cromatografia gasosa, que requer a coleta e, às vezes, o tratamento prévio da amostra de gás ou líquido, antes de injetá-la em coluna separada (fig. 1). Após passar por essa coluna, as moléculas alvo alcançam um detector que mede sua concentração. O sinal gerado é então transformado em sinal elétrico, passível de leitura no mostrador. Entretanto, com um peso de aproximadamente 31.752 kg [70 libras], o equipamento é desajeitado, requer

manutenção preventiva regular (semanal) e treinamento especializado. É, também, bastante caro (mais de \$100,000 dólares/dispositivo).⁶ Além do mais, pode levar mais de 30 minutos em operação para quantificar os agentes em suas concentrações mais baixas, uma situação não muito ideal em ambiente de combate que exige rápida reação. Assim, é urgente a melhoria em sensibilidade de detecção, quantificação, velocidade e precisão.

A nanotecnologia oferece os meios. Os nanosensores operam a nível molecular, onde a reação entre as moléculas alvo e os elementos sensores é direta e quase instantânea. A transferência dos resultados da reação aos dispositivos de detecção é quase imediata. Além disso, os nanosensores não requerem processo de separação para isolar as moléculas alvo. O sensor nanoescala (fig 2) possui afinidade específica para com as moléculas alvo. Esta sólida e específica afinidade elimina a necessidade de preparo especial da amostra, tratamento prévio ou processo de separação. A imobilização e orientação dos elementos sensores são projetadas com precisão para que os produtos derivados da reação entre as moléculas alvo e os elementos sensores sejam transferidos com rapidez e precisão ao micro eletrodo. Todo o sistema pode ser instalado em dispositivo de bolso ou tipo dosímetro, a preço bem mais baixo do que os cromatógrafos normais. Note-se, no entanto, que o sensor é químico específico. Assim, a identificação de agentes neurotóxicos desconhecidos necessitará a integração de várias matrizes nanossensíveis em um só dispositivo.

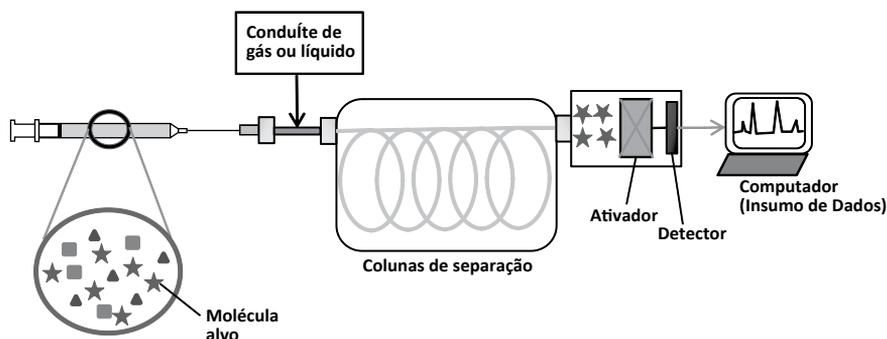


Figura 1. A descrição esquemática de sistema de detecção à cromatografia gasosa típico

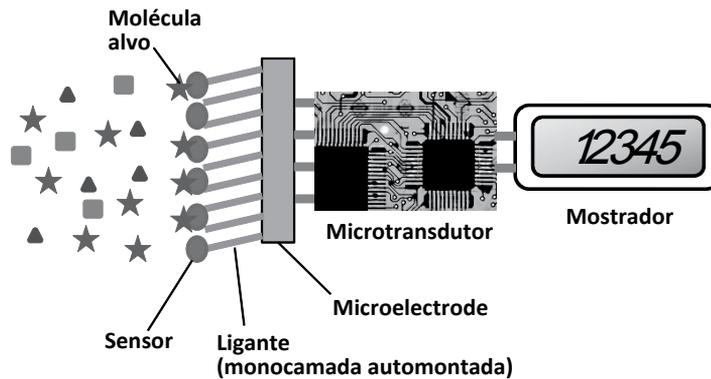


Figura 2. A descrição esquemática do sistema nanosensor em microprocessador

Os pesquisadores da Universidade de Toledo e do AFIT estão desenvolvendo uma enzima nanobiosensora, a fim de detectar compostos *OP*, tais como o componente do gás nervoso, dimetil-metilfosfonato [*dimethylmethylphosphonate* – *DMMP*], empregado na síntese do agente neurotóxico *Sarin*. O sensor é classificado de biosensor, porque utiliza uma enzima para detectar a molécula alvo. O *DMMP*, entre as substâncias mais tóxicas e cancerígenas em potencial, pode ser letal, quando inalado, tragado ou absorvido pela pele. Os compostos *OP* incapacitam e matam, ao inibir enzima essencial ao funcionamento do sistema neurológico central em seres humanos, interferindo com a atividade muscular, causando sintomas graves e, inevitavelmente, a morte.⁷

A detecção eficaz do *DMMP* envolve o uso de hidrólise organofosforada da enzima [*organophosphorus hydrolase* – *OPH*] como elemento sensor, devido a sua alta afinidade para com o *DMMP*. Uma vez que a enzima é químico orgânico, pode entrar em degradação e perder a eficácia, devido ao fenômeno denominado desativação. Assim, em primeiro lugar, a enzima é colocada dentro de nanotubo peptídico protetor [*protective peptide nanotube* – *PNT*]. Os pesquisadores usam *PNTs* para tal propósito, porque são de simples sintetização e possuem alta estabilidade termoquímica, boa condutividade, excelente biocompatibilidade e flexibilidade prática.⁸ Em provas preliminares, a enzima *OPH* dentro da *PNT* manteve-se

quatro vezes mais estável do que as enzimas livres. Pode-se aderir *OPH*, prontamente, à parede interna de uma *PNT*. A seguir é aderida a ligante especialmente preparado, denominado monocamada automontada [*monolayer self-assembled*] para formar matriz de sensor em elétrodo (ver fig 2). Os biosensores baseados em *OPH* são eficazes para monitorar e medir diretamente vários *OPs*, de pesticidas e inseticidas baseados em *OP* a agentes químicos de guerra, como o *Sarin*.⁹ O limite de detecção para o biosensor está na faixa de 0.005–0.01 mg/m³ de *DMMP* na atmosfera.¹⁰ Assim, o biosensor – de duas a quatro vezes mais sensível do que o equipamento de detecção convencional – consegue detectar concentrações extremamente baixas que resultam em efeitos não-letais, mas significativos em seres humanos. Além do mais, o biosensor produz resultados mais rápidos (3 vezes mais) do que os detectores convencionais. O tamanho reduzido de biosensores e o aumento em sensibilidade seriam ideais para instalação em aeronaves remotamente pilotadas – um emprego militar extremamente útil, uma vez que essas aeronaves tornam-se cada vez mais importantes em campo de batalha e em missões de reconhecimento. Este tipo de emprego permitiria a detecção remota de químicos na atmosfera, facilitando amostragem mais segura e eficiente. Embora em fase abstrata, possui grande potencial. Uma vez que o nanosensor sob desenvolvimento é específico ao composto, reagiria somente com a molécula

alvo e não seria suscetível à interferência de outros compostos.

Juntamente com os *PNTs* empregados para proteger a enzima *OPH*, a pesquisa também mantém enfoque no ligante da monocamada automontada, que desempenha função importante na matriz nanosensora, porque controla a taxa de transferência do elétron do *OPH* ao sensor. Os pesquisadores investigam várias combinações de moléculas de ligante e seus tamanhos, a fim de aproveitar, ao máximo, o desempenho do sensor. Os pesquisadores do *AFIT* e da UT estão testando a taxa de transferência do elétron e precisão do sinal para diferentes combinações de curtos e longos ligantes. Por um lado, os curtos ligantes aumentam a velocidade dessa taxa (possuem sensibilidade), mas a capacitância da camada do ligante curto não é suficientemente baixa para suprimir o ruído que advém de outros eletrólitos (assim, os ligantes curtos não são precisos). Por outro lado, os longos reduzem o ruído (são precisos). Entretanto, a transferência do elétron é lenta. Por conseguinte, a ótima sensibilidade e o desempenho preciso resultam da combinação apropriada de moléculas de ligante curtas e longas.

Como acima exposto, surgem dois problemas essenciais em sensores de enzima: a desativação da enzima; e a sensibilidade/precisão reduzida. Os pesquisadores da UT e do *AFIT* estudam esses problemas (1) usando *PNTs* para proteger a enzima e aumentar o ciclo de vida útil e (2) especialmente projetando moléculas ligantes para aumentar, ao máximo, tanto a sensibilidade, quanto a precisão.

O potencial da nanotecnologia em manufatura de sensores *OP* precisos, rápidos e portáteis [de bolso] é grande. A fabricação de sensor pequeno, mas ainda assim de grande

sensibilidade e precisão para instalação em aeronaves remotamente pilotadas teria grande valor militar. Do mesmo modo, os sensores de bolso possuem empregos notáveis e são úteis em combate e defesa do território nacional. Os detectores rápidos, precisos e a preço razoável seriam distribuídos para dar aos centros urbanos e instalações militares aviso prévio de iminente ataque químico. Após o ataque, pode ser que a equipe de reconhecimento necessite tomar amostras de vários locais, antes de determinar o requisito apropriado de proteção para o pessoal das Bases. Mesmo se os biosensores reduzirem a quantidade de tempo de amostragem típica a métodos convencionais em poucos minutos, a acumulação de tempo economizado seria grande. Além disso, o aperfeiçoamento em sensibilidade de detecção inspiraria maior confiança, durante a fase de determinação de risco, em áreas de baixa concentração de contaminação química. Se o pessoal conseguir reduzir o período de tempo gasto com *IPE*, após ataque, a eficácia da missão aumentaria. Do mesmo modo, se existem concentrações de agentes *OP*, não-letais, mas prejudiciais à missão, os comandantes ordenariam que o pessoal colocasse a *IPE*. Essa tecnologia de biosensores oferece melhor método de detecção, a baixo custo, para satisfazer ameaças atuais e futuras. O *PNT* é material novo que aperfeiçoa a atividade da enzima *OPH*, bem como sua vida útil, essencial aos biosensores nanoescala. Sem dúvida, a Força Aérea faria bem em apoiar o desenvolvimento e a comercialização de tais dispositivos. □

Wright-Patterson AFB, Ohio
University of Toledo

Notas

1. Air Force Manual 10-2602, *Nuclear, Biological, Chemical, and Conventional (NBCC) Defense Operations and Standards*, 29 May 2003, 9, <http://www.e-publishing.af.mil/shared/media/epubs/AFMAN10-2602.pdf>.

2. Air Force Medical Operations Agency, Environmental and Occupational Health Division; e Air Force Institute for ESOH [Environment, Safety, and Occupational Health] Risk Analysis, Industrial Hygiene Branch,

“Chemical War <https://afkm.wpafb.af.mil/ASPs/docman/DOCMain.asp?Tab=0&FolderID=OO-SG-AF-06-3-7-2&Filter=OO-SG-AF-06>.

3. *Ibid.*

4. Graham S. Pearson, “Chemical and Biological Warfare,” *Journal of Naval Engineering* 32, no. 2 (1990): 198.

5. “CENTAF Inficon HAPSITE Gas Chromatograph /Mass Spectrometer Concept of Operations and Execution,” 14 January 2003, 1–2.

6. Air Force Medical Support Agency/SG3PB FY11-FY15 886H, "Homeland Security Medical Response Spend Plan, 2011-15," <https://afkm.wpa.fb.af.mil/ASPs/docman/DOCMain.asp?Tab=0&FolderID=OO-SG-AF-06-55-2-7&Filter=OO-SG-AF-06>.

7. Asja Bartling et al., "Enzyme-Kinetic Investigation of Different Sarin Analogues Reacting with Human Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase," *Toxicology* 233 (2007):166-72; Kai Tuovinen et al., "Phosphotriesterase—a Promising Candidate for Use in Detoxification of Organophosphates," *Fundamental Applied Toxicology* 23, no. 4 (November 1994): 578-84; e William J. Donarski et al., "Structure-Activity Relationships in the Hydrolysis of Substrates by the Phosphotriesterase from *Pseudomonas Diminuta*," *Biochemistry* 28, no. 11 (1989): 4650-55.

8. Shuguang Zhang, Fabrizio Gelain e Xiaojun Zhao, "Designer Self-Assembling Peptide Nanofiber Scaffolds for 3D Tissue Cell Cultures," *fare Agent Health Risk Assessment Guidance Document*, 61, 2 April 2003, *Seminars in Cancer Biology* 15, no. 5 (2005): 413-20; e Manoj Nahar et al., "Functional Polymeric Nanoparticles: An

Efficient and Promising Tool for Active Delivery of Bioactives," *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 23, no. 4 (2006): 259-318.

9. Thanaporn Laothanachareon et al., "Cross-Linked Enzyme Crystals of Organophosphate Hydrolase for Electrochemical Detection of Organophosphorus Compounds," *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, no. 12 (2008): 3049-55; e Jeffrey S. Karns et al., "Biotechnology in Agricultural Chemistry," *American Chemical Society Symposium Series* 334 (1987): 157-70.

10. Alan R. Hopkins e Nathan S. Lewis, "Detection and Classification Characteristics of Arrays of Carbon Black/Organic Polymer Composite Chemiresistive Vapor Detectors for the Nerve Agent Simulants Dimethylmethylphosphonate and Diisopropylmethylphosphonate," *Analytical Chemistry* 73, no. 5 (2001): 884; e Chelsea N. Monty, Ilwhan Oh e Richard I. Masel, "Enzyme-Based Electrochemical Multiphase Microreactor for Detection of Trace Toxic Vapors," *IEEE [Institute of Electrical and Electronics Engineers] Sensors Journal* 8, no. 5 (May 2008): 584.