DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS UTILIZANDO BIOCENSORES À BASE DE ENZIMAS COLINESTERASES: UMA REVISÃO

GILVANDA SILVA NUNES*

Este artigo fornece uma breve revisão sobre o desenvolvimento de metodologias para análise de pesticidas carbamatos e organofosforados, empregando sensores à base de enzimas colinesterases, com especial ênfase aos biossensores eletroquímicos.

1 INTRODUÇÃO

Em estudos envolvendo controle de qualidade ambiental, cujos relatórios muitas vezes servem de base para tomada de decisões oficiais, especialmente no que concerne aos órgãos públicos que controlam índices de poluição ambiental, o desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis e rápidos é de fundamental importância. O variável número de amostras requer aplicação de métodos validados, sendo que o grande interesse na atualidade é exatamente a direta aplicação dos métodos analíticos no campo.

* Professora do Departamento de Tecnologia Química da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e Aluna de doutorado do Instituto de Química/UNESP, Araraquara - SP.

Numa primeira fase, alguns compostos potencialmente tóxicos podem ser detectados por meio de biossensores enzimáticos, e então futuramente analisados no laboratório por métodos já validados.

O interesse por técnicas baseadas em reações enzimáticas (imunoensaios) vem de muitas décadas. Mas somente nos últimos anos atenções têm sido voltadas para o desenvolvimento e o estabelecimento de métodos analíticos confiáveis e reprodutíveis para a detecção ou mesmo a quantificação de pesticidas em matrizes ambientais, através de biossensores enzimáticos (1). A grande vantagem dessa técnica é o fato de não necessitar de tratamento prévio (extração e purificação) das amostras, uma vez que o princípio de bio-reconhecimento enzimático possibilita a identificação de determinado composto ou, mais comumente, uma classe de compostos, sem o mínimo de interferências. A simplicidade da análise, aliada à seletividade das reações que envolvem as enzimas, tornam o uso dos biossensores bastante atrativo.

Um biossensor enzimático é, na realidade, a combinação de reagentes biológicos, como elementos de reconhecimento, mais um sensor químico clássico – o transdutor. As principais características dos biossensores enzimáticos podem ser assim resumidas: baixo custo; possibilidade de vir a serem portáteis; curto tempo de análise; treinamento rápido de pessoal; mínima preparação da amostra.

Uma vez que os sensores imunoquímicos utilizam o princípio da bioafinidade, a inibição da atividade biocatalítica das enzimas colinesterases (ChE) é comumente utilizada para a construção dos biossensores destinados às aplicações ambientais. Tais enzimas são o sítio-alvo para dois importantes grupos de inseticidas: os organofosforados e os carbamatos, largamente utilizados na agricultura. Atualmente, esses inseticidas têm sido os preferidos, devido à sua baixa persistência no ambiente, quando comparados, por exemplo, aos inseticidas organoclorados (2, 3). Por outro lado, alguns pesticidas das classes dos organofosforados e carbamatos apresentam elevada

toxicidade aguda, e o controle dos seus resíduos é fundamental para prevenir problemas de intoxicações.

O modo de ação dos inseticidas carbamatos e organofosforados, frente aos insetos, baseia-se na inibição das enzimas colinesterases, responsáveis em parte pela transmissão dos estímulos no Sistema Nervoso. A inibição dessas enzimas provoca o acúmulo de acetilcolina, substrato das enzimas ChE, que em condições normais é hidrolisado e convertido a ácido acético mais colina. A incapacidade das ChE em desdobrar a acetilcolina provoca resposta repetida e descontrolada das células nervosas estimuladas, caracterizada pelas sinápses (4, 5), que pode lesar seriamente os insetos e também os mamíferos, ou mesmo levá-los à morte. Esse mesmo princípio é válido nas determinações utilizando biossensores enzimáticos. Os mecanismos de ação e as reações envolvidas são hoje bem conhecidos, e foram recentemente elucidados por FROED e WILSON (6), ao investigarem o comportamento de enzimas colinesterases de diferentes fontes, quando em contato com agentes anti-colinesterases, como por exemplo os inseticidas carbamatos e organofosforados.

2 AS ENZIMAS COLINESTERASES

Existem dois tipos básicos de enzimas colinesterases: acetilcolinesterases (AChE) e butirilcolinesterases (BChE), estas últimas também conhecidas como *pseudocolinesterases*. A hidrólise do seu substrato natural, a acetilcolina (ACh), processa-se através da formação do complexo enzima-substrato (EH.AX); a molécula de colina (HX) é liberada, e a enzima acetilada (EA) é formada, sendo rapidamente hidrolisada a ácido acético (AOH), e a enzima livre (EH) é liberada, segundo a reação abaixo:

(Equação 1)

A reação das colinesterases com inibidores organofosforados (PX) e carbamatos é similar àquela que ocorre com o substrato, mas a enzima fosforilada (EP) é completamente estável, resultando na inibição irreversível:

(Equação 2)

No caso dos inseticidas carbamatos, esta reação é reversível.

As estruturas químicas gerais das duas classes de inibidores são mostradas a seguir:

organofosforado

carbamato

Para os organofosforados, os substituintes podem ser: R: alquil, aril; R': alquil, aril, alquiloxi, ariloxi ou resíduos de aminas substituídas; Y: oxigênio ou enxofre; X: um grupo "de partida", por exemplo, p-nitrofenil, CN, F, diéster fosfato. Para os carbamatos, R e R': H, alquil, aril; X: novamente um grupo de partida, que pode ser um dos anteriormente citados. Na reação com a colinesterase, o grupo de partida é liberado, e o resíduo serina do centro ativo da enzima é substituído; deste modo, a enzima fosforilada (ou carbamilada) é formada, sendo daí cataliticamente inativada. Em condições normais, a enzima AChE é hidrolisada rapidamente ($k_3 = 6.10^5 \text{ min}^{-1}$); após inibição, a constante de hidrólise k_3 passa a ser $\sim 10^{-5} \text{ min}^{-1}$. Espontaneamente, a colinesterase carbamilada é fracamente hidrolisada ($k_3 = 0,012 \text{ min}^{-1}$ para o complexo $(CH_3)_2N-CO-O-AChE$) (7), de tal modo que a inibição é reversível.

Os valores das constantes de inibição k_i (ver Equação 2) são comumente usados para caracterização preliminar das propriedades de inibição dos biossensores desenvolvidos; diferenças nessas propriedades são resultantes de inúmeros processos de imobilização das enzimas. As medidas bioanalíticas, baseadas no decréscimo das atividades enzimáticas após incubação das enzimas com os pesticidas, têm sido comumente realizadas com enzimas acetilcolinesterases livres em solução (8 - 11).

Existem "kits" disponíveis comercialmente, que consistem em testes colorimétricos quantitativos (Cholinesterase Inhibition Test, Boehringer Mannheim, Cat. No. 1 293 460) ou versões qualitativas/semi-quantitativas baseadas em avaliações visuais (InQuest™ OP/Carbamate Screen, Ohmicron, Newtown, PA; EnzyTec Pesticides Detection Systems, EnzyTec, Inc., Kansas, Missouri, USA). As melhorias no manuseio e utilização dos biossensores foram uma consequência das técnicas de imobilização das enzimas sobre material de suporte apropriado, introduzidas no início da década de 80, e extensamente estudadas até o presente momento (12 - 16).

3 OS BIOSENSORES ENZIMÁTICOS

Dependendo do tipo de detecção empregada, os biossensores podem ser classificados em eletroquímicos, espectroquímicos e ópticos. Dos três, os biossensores eletroquímicos são os mais utilizados, pois a relativa facilidade de construção dos eletrodos (sensores), tem possibilitado o desenvolvimento de metodologias altamente sensíveis e específicas para detecção de compostos de interesse biológico. Os sensores ópticos, além de mais caros, necessitam de técnicas de construção mais complicadas, e portanto são menos utilizados e o desenvolvimento dos métodos de detecção mais lentos. Os biossensores espectroscópicos mais estudados baseiam-se no decréscimo da fluorescência na presença do inibidor. O grande inconveniente das técnicas de detecção espectroscópica e óptica, além do alto custo, é a dificuldade de adaptação da instrumentação aos trabalhos de campo, uma vez que, como já comentado anteriormente, a principal finalidade das investigações envolvendo biossensores é a sua aplicação direta em trabalhos visando o controle da qualidade ambiental.

Atualmente, a construção dos biossensores se dá por imobilização das enzimas em uma camada biocatalítica, que é acoplada a um transdutor eletroquímico adequado. O conteúdo da enzima, presente na camada é um dos parâmetros mais importantes. Geralmente, a carga enzimática deve ser a menor possível, a fim de obter-se alta sensibilidade e baixos limites de detecção (14 - 16). Por outro lado, deve-se ter o cuidado com a eventual difusão de outras substâncias, que poderão comprometer a eficiência do biossensor, já que o sinal medido não refletirá somente o decréscimo da atividade enzimática.

Na prática, são possíveis dois modos de análises utilizando biossensores que operam com enzimas colinesterases. O primeiro (e mais simples) é semelhante aos ensaios com enzimas em solução, e baseia-se na pré-incubação da enzima, sob condições apropriadas de temperatura e

de pH, em presença do substrato. Depois de certo tempo, o sinal inicial S_0 é medido. Após lavagem, segue-se à incubação com a amostra contendo o inibidor (pesticida) por um intervalo de tempo e, finalmente, à obtenção de um sinal S , depois de nova incubação com o substrato. O percentual de inibição é calculado pela seguinte fórmula:

$$I\% = 100 - S / S_0$$

Este método é somente apropriado para análise de amostras individuais. A dinâmica (cinética) de operação permite tanto a caracterização das enzimas quanto monitoramento contínuo. O biossensor funciona na presença do substrato, e um sinal contínuo corresponde à atividade atual da enzima contida na camada biocatalítica (17). Ocorrendo a inibição (devido à adição da amostra, ou à presença de substâncias inibidoras no ambiente de trabalho), isto resultará no decréscimo da atividade, representado pelo decréscimo do sinal. A razão do decréscimo (dS/dT) é proporcional à concentração do(s) inibidor(es).

Melhores resultados têm sido obtidos quando se emprega o segundo modo de análise, no qual se calcula a inibição relativa, RI (18), que é determinada como a razão absoluta corrigida em relação ao sinal inicial:

$$RI = (dS / dT) / S$$

A inibição relativa agora não depende da configuração dos biossensores, e pode ser convenientemente utilizada para comparar as sensibilidades.

Uma ampla variedade de projetos de biossensores à base de colinesterases foram descritos. Esta revisão, discutirá brevemente o desenvolvimento e o funcionamento dos sensores eletroquímicos.

4 OS BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS

Por muito tempo, os sensores baseados em medidas de pH foram usados como transdutores. No Brasil, determinadas instituições, como por exemplo algumas Companhias de Águas e Esgotos, ainda utilizam esses tipos de sensores para detecção de agentes anticolinesterases em águas destinadas ao abastecimento público. Acetilcolina ou butirilcolina são usados como substratos e o ácido acético (ou butírico), liberado durante a hidrólise da enzima, causa o decréscimo do pH, segundo a reação abaixo:

ChE

O primeiro método enzimático para determinação de organofosforados, baseado no decréscimo de pH, foi descrito em 1951 por GIANG e HALL (8). Os principais inconvenientes do método eram a falta de reprodutibilidade e a necessidade de tempo muito elevado na incubação da enzima com o pesticida.

O desenvolvimento da instrumentação analítica veio resolver, com o tempo, grande parte dos problemas, especialmente com relação à resistência mecânica dos eletrodos. Em 1958, ZWEIG e ARCHER (19) descreveram um método potenciométrico mais rápido para detecção de inseticida carbamato em vinho. Neste mesmo trabalho, os autores introduziram a cromatografia em papel para confirmação da presença do pesticida. Até então, os bioensaios eram ainda deficientes, em termos de sensibilidade e reprodutibilidade.

Normalmente são utilizados eletrodos de vidro, nas superfícies dos quais as enzimas são imobilizadas por meio de ligações com glutaraldeído e albumina (20). Por exemplo, no bulbo (parte final arredondada) de um simples eletrodo de pH poderia, então ser fixada uma membrana

polimérica, como redes de nylon, contendo as enzimas imobilizadas por meio de ligações cruzadas com reagentes específicos. Membranas muito finas (50 µm) para imobilização foram preparadas por TRAN-MINH *et al.* (21), usando pré-polímeros à base de acrilamida. A partir de técnica utilizando a enzima AChE ligada por meio de glutaraldeído em forma de aerosol, KUMARAN e TRAN-MINN (22) cobriram a superfície de um eletrodo de vidro, e conseguiram camadas com espessura de 2 µm, que resultaram em respostas mais rápidas. Diversos outros métodos de imobilização foram comparados, sendo que a técnica mais fácil e prática é aquela baseada no preparo de membranas por ligação das enzimas sobre suporte apropriado (redes de nylon ou membranas imobilizantes). Essas membranas cobrem o eletrodo de vidro, podendo ser reutilizadas várias vezes (23). KUMARAN e TRAN-MINH (22) prepararam também uma camada de enzima por meio de imobilização covalente da AChE sobre membranas de poliamida pré-ativadas. Esses mesmos autores testaram a combinação de um eletrodo de vidro com um reator de enzima, construído de pérolas de vidro cobertas com enzimas AChE (24). A imobilização das enzimas diretamente sobre o eletrodo de pH (vidro) é considerada menos conveniente, pois a camada do biossensor deverá ser reativada ou substituída, após várias inibições.

Diversos sensores potenciométricos à base de enzimas ChE utilizam medidas de potencial redox da tiocolina (25), que é gerado pela hidrólise da enzima, durante o desdobramento tanto da acetiltiocolina, quanto da butiriltiocolina, segundo a reação:

ChE

O potencial dos eletrodos combinados é dado pelo par redox tiocolina (0,2 V). Após inibição da enzima ChE, menos tiocolina é produzida, e o potencial é então determinado pelo par I^- / I_2 (0,44 V). Este

princípio foi usado para a construção do *Continuous Aqueous Monitor* (CAM, Midwest Research Institute, Kansas, USA) para a detecção de organofosforados. BAUMAN *et al.* (26) conseguiram imobilizar a enzima butirilcolinesterase em amido, inserido em espuma de poliuretano (27). Grande melhora na estabilidade das medidas foi conseguida, mais tarde, com o emprego das técnicas de adsorção sobre o gel de hidróxido de alumínio (28). Este sistema foi adotado para a construção do detector NAIED (Nerve Agent Immobilized Enzyme Detector, Thorn EMI Simtec, Nottingham, UK), destinado às aplicações militares.

Na última década, os biossensores amperométricos surgiram, resultando em arranjos analíticos mais simplificados para detecção dos agentes anticolinesterases. Existem duas possibilidades de construção dos biossensores amperométricos. Uma é utilizando a enzima colina oxidase (ChOD), responsável pela oxidação da colina produzida na reação com a enzima ChE. A reação envolvendo a enzima ChOD é representada abaixo:

ChOD

O consumo de oxigênio poderá ser medido usando-se o eletrodo de oxigênio CLARK (29). Outros métodos são baseados no monitoramento da formação da água oxigenada, por meio de eletrodos de platina (0,65 V), e todos os potenciais têm como eletrodo de referência o eletrodo de Ag/AgCl (29, 30). Tanto a enzima ChE quanto a ChOD podem ser imobilizadas sobre uma mesma camada de polivinilálcool, feita sobre membrana que atua como suporte (29, 30), ou sobre a superfície de fibra de carbono (31). O último sistema requer potencial de operação bem maior (1,2 V) para a oxidação do peróxido de hidrogênio sobre o carbono.

WOLLENBERGER *et al.* (32) conduziram a co-imobilização da enzima em gelatina; CAMPANELLA *et al.* (33, 34), em camadas de

acetilcelulose, mediante simples imobilização direta na superfície do eletrodo, e protegidas por uma membrana de diálise.

Biossensores do tipo ChE/ChOD foram também construídos usando o sal orgânico condutivo tetracianoquinodimetano de tetratíalfulvaleno (TTF⁺TCNQ⁻) (35), cuja finalidade era permitir a diminuição do potencial de operação para 0,15 V. Biossensores fixos foram produzidos utilizando a técnica de impressão em tela ("print screen") para obtenção de eletrodos de grafite rutenizados (36).

Os biossensores amperométricos podem operar com as enzimas ChE; quando ésteres de tiocolina são usados como substratos para as enzimas, a tiocolina produzida pode, por via direta, ser oxidada eletroquimicamente:

anodo

Como eletrodos apropriados, foram propostos o de platina (0,4 V) (37), de grafite (38) ou de um compósito grafite/epóxido (0,7 V) (39), com a enzima AChE inclusa (18, 21). Os eletrodos compósitos de carbono, modificados com os reagentes ftalocianina de cobalto (18) e tetracianoquinodimetano (36) foram preparados mediante a técnica de impressão em tela, de modo a possibilitar a oxidação da tiocolina a potenciais mais baixos.

A produção da tiocolina pelas enzimas ChE foi também determinada voltametricamente, usando-se eletrodo de mercúrio coberto com Ag, sendo a versão amperométrica desenvolvida mais tarde (40, 41).

A maioria dos estudos envolvendo biossensores enzimáticos utilizam ainda soluções, e bem poucos são os trabalhos que empregam a detecção de pesticidas em amostras reais. Entretanto, pode-se destacar alguns trabalhos de aplicação das técnicas discutidas nesta revisão, em diferente matrizes: águas do mar e águas superficiais (42 - 47), alimentos

diferente matrizes: águas do mar e águas superficiais (42 - 47), alimentos (52) e água potável (44, 47-49), frutos e verduras (47), solos e sedimentos (50-51).

Atualmente, alguns grupos de pesquisa estão conduzindo estudos tendo em vista a construção de sistemas que possibilitem a discriminação entre organofosforados e carbamatos. Por enquanto, isto ainda não é uma realidade. O comportamento cinético para as enzimas ChE é diferente para esses dois grupos de inibidores (53); a inibição de diferentes enzimas ChE, entretanto, poderá fornecer mais modelos de respostas específicas.

A inibição das enzimas ChE deve-se à presença de pesticidas, mas se a amostra contiver metais pesados, estes poderão também contribuir para a elevação das respostas, isto é, os metais pesados são também inibidores das enzimas colinesterases, embora não potenciais (54, 55). O efeito dos metais pesados poderá ser suprimido se a análise dos pesticidas for conduzida em fase orgânica (56).

5 CONCLUSÃO

Uma das vantagens do uso dos biossensores enzimáticos à base de enzimas colinesterases é que um amplo grupo de compostos similares pode ser detectado com simples instrumento de medida.

A extração dos pesticidas das amostras por solventes orgânicos é usualmente a etapa inicial de uma análise instrumental. O extrato assim obtido poderá ser destinado à análise utilizando um biossensor enzimático, de modo a melhorar os limites de detecção, como resultado da pré-concentração efetuada.

Nem sempre é possível obter-se informações quantitativas diretas, pois normalmente a composição da amostra é desconhecida e, conseqüentemente, o sinal medido não poderá ser usado para a determinação da concentração absoluta do composto tóxico. Para resolver

tal problema, a concentração correspondente de um pesticida "de referência" (usualmente o paraoxon) deverá ser calculada.

A comparação de resultados obtidos por diferentes grupos de pesquisa é algo difícil, ou quase impossível, pois muitas modificações em relação aos detalhes de preparo (diferentes tipos e fontes das enzimas ChE, procedimentos de imobilização, cinética e medidas de pré-incubação) e manuseios dos sensores levam a conclusões bastante controversas.

Os biossensores enzimáticos são especialmente úteis na análise prévia de variado número de amostras. Por exemplo, em caso positivo de identificação, um método mais laborioso poderá ser utilizado para validação da metodologia empregando o sensor enzimático.

Abstract

This paper provides a brief review about the development of methodologies utilizing cholinesterase enzymes-based sensors for analysis of carbamate and organophosphates pesticides, with special emphasis to the electrochemical biosensors.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 SHERRY, J. P. Environmental chemistry: the immunoassay option. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, v. 23, n. 4, p. 217-300, 1992.
- 2 CREMLYN, R. **Pesticides**: preparation and mode of action. Chicester, USA : Wiley & Sons, 1970. 320 p.
- 3 HASSAL, K. A. **The chemistry of pesticides**: their metabolism, mode of action and uses in crop protections. New York, USA : McMillan Press, 1983. 372 p.
- 4 MURPHY, S. D. Pesticides. In: **TOXICOLOGY: the basic science of poisons**. 2. ed. New York, USA : MacMillan Press, 1980. p.110-126.

- 5 ETO, M. **Organophosphorus pesticides: organic and biological chemistry**. Cleveland, USA : CRC Press, 1974. 215 p.
- 6 FROED, H. C., WILSON, I. B. Acetylcholinesterase. In: **THE ENZYMES**. New York, USA : Academic Press, 1971. v. 5, p. 87-97.
- 7 MAIN, A. R., IVERSON, F. Measurement of the affinity and phosphorylation constants governing irreversible inhibition of cholinesterases by di-isopropyl phosphoro-fluoridate. **Biochem. J.**, v. 100, n. 1, p. 525-531, 1966.
- 8 GIANG, P. A., HALL, S. A. Enzymatic determination of organic phosphorus insecticides. **Anal. Chem.**, v. 32, n. 13, p. 1830-1834, 1951.
- 9 OTT, D. E., GÜNTHER, F. A. Rapid screening for the some anticholinesterase insecticide residues by automated analysis. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 49, n. 3, p. 662-669, 1966.
- 10 SADAR, M. H., KUAN, S. S., GUILBAULT, G. G. Trace analysis of pesticides using cholinesterase from Human serum, rat liver, electric eel, bean leaf beetle, and white fringe beetle. **Anal. Chem.** v. 42, n. 14, p. 1770-1774, 1970.
- 11 BHASKAR, S. U., KUMAR, N. V. N. An enzymatic method for TLC detection and determination of fenitrothion in water. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 65, n. 6, p. 1297-1281, 1982.
- 12 KIELY, J. S., MOSS, W. H., PAVIA, M. R., SCHWARZ, R. D., WOODARD, G. L. A silica gel plate-based quantitative assay for acetylcholinesterase activities: a mass method to screen for potencial inhibition. **Anal. Biochem.**, v. 196, n. 2, p. 439-442, 1991.
- 13 MASCINI, M., IANNELLO, M., PALLESCHI, G. Enzyme electrodos with improved mechanical and analytical characteristics obtained by binding enzymes to nylon nets. **Anal. Chim. Acta**, v. 146, n. 1, p. 135-148, 1983.
- 14 TRAN-MINH, C., YAMANI, H. E. Enzyme sensors for determination of toxic chemicals in environmental samples. In: JÜNTER electrochemical detection techniques in applied biosciences. Sec. 1.3. New York, USA : Ellis Horwood, 1988. p. 131-141.
- 15 LEON-GONZÁLEZ, M. F., TOWNSHEND, A. Flow-injection determination of paraoxon by inhibition of immobilized acetylcholinesterase. **Anal. Chim. Acta**, v. 236, n. 2, p. 267-272, 1990.
- 16 SKLÁDAL, P., MASCINI, M. Sensitive detection of pesticides using amperometric sensors based on cobalt phthalocyanine-modified composite electrodes and immobilized cholinesterases. **Biosens. Bioelectron.**, v. 7, n. 1, p. 335-343, 1992.
- 17 GUILBAULT, G. G., SADAR, M. H., KUAN, S. S., CASEY, D. Trace analysis of various pesticides with insect cholinesterases. **Anal. Chim. Acta**, v. 52, n. 1, p. 75-82, 1970.
- 18 SKLÁDAL, P. Determination of organophosphate and carbamate pesticides using a cobalt phthalocyanine-modified carbon paste electrode and a cholinesterase enzyme membrane. **Anal. Chim. Acta**, v. 252, n. 1-2, p. 11-15, 1991.
- 19 ZWEIG, G., ARCHER, T. E. Residue determination of sevin (1-naphthyl N-methylcarbamate) in wine by cholinesterase inhibition and paper chromatography. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 6, n. 12, p. 910-913, 1958.
- 20 KUMARAN, S., MEIER, H., DANNA, A. M., TRAN-MINH, C. Immobilization of thin enzyme membranes to construct glass enzyme electrodes. **Anal. Chem.**, v. 63, n. 18, p. 1914-1918, 1991.
- 21 TRAN-MINH, C., PANDEY, P. C., KUMARAN, S. Studies on acetylcholine sensor and its analytical application based on the inhibition of cholinesterase. **Biosens. Bioelectron.**, v. 5, n. 6, p. 461-471, 1990.
- 22 KUMARAN, S., TRAN-MINH, C. Insecticide determination with enzyme electrodes using different enzyme immobilization techniques. **Electroanalysis**, v. 4, n. 10, p. 949-954, 1992.
- 23 STEIN, K., SCHWEDT, G. Comparison of immobilization methods for the development of an acetylcholinesterase biosensor. **Anal. Chim. Acta**, v. 272, n. 1, p. 73-81, 1993.
- 24 KUMARAN, S., TRAN-MINH, C. Determination of organophosphorus and carbamate insecticides by flow-injection analysis. **Anal. Biochem.**, v. 200, n. 1, p. 187-194, 1992.
- 25 GUILBAULT, G. G. **Analytical uses of immobilized enzymes**. New York, USA : M. Dekker, 1984. p. 12-25.
- 26 BAUMAN, E. K., GOODSON, L. H., GUILBAULT, G. G., KRAMER, D. N. Preparation of immobilized cholinesterase for use in analytical chemistry. **Anal. Chem.**, v. 37, n. 11, p. 1378-1381, 1965.

- 27 GOODSON, L. H., JACOBS, W. B., DAVIS, A. W. Immobilized cholinesterase product for use in the rapid detection of enzyme inhibition in air or water. **Anal. Biochem.**, v. 51, n. 2, p. 362-367, 1973.
- 28 MIZUTANI, F., TSUDA, K. Amperometric determination of cholinesterase with use of an immobilized enzyme electrode. **Anal. Chim. Acta**, v. 139, n.1, p. 359-362, 1982.
- 29 YAO, T. Flow injection analysis for cholinesterase in blood serum for use of a choline-sensitive electrode as an amperometric detector. **Anal. Chim. Acta**, v. 153, n. 1, p. 169-174, 1983.
- 30 MARTY, J. L., SODE, K., KARUBE, I. Amperometric determination of choline and acetylcholine with enzymes immobilized in a photocross-linkable polymer. **Anal. Chim. Acta**, v. 228, n. 1, p. 49-53, 1989.
- 31 NAVERA, E. N., SODE, K., TAMIYA, E., KARUBE, I. Development of acetylcholine sensor using carbon-fiber (amperometric determination). **Anal. Chim. Acta**, v. 6, n. 8, p. 675-680, 1991.
- 32 WOLLENBERGER, U., SETZ, K., SCHELLER, F. W., LÖFFLER, U., GÖPEL, W., GRUSS, R. Biosensor for choline, choline esters and inhibitors of choline esterase. **Sens. Actuators**, v. B 4, n. 3-4, p. 257-260, 1991.
- 33 CAMPANELLA, L., ACHILLI, M., SAMMARTINO, M. P., TOMASSETTI, M. Butyrylcholine enzyme sensor for determining organophosphorus inhibitors. **Bioelectrochem. Bioenerg.**, v. 26, n. 2, p. 237-249, 1991.
- 34 CAMPANELLA, L., COCCO, R., SAMMARTINO, M. P., TOMASSETTI, M. A new enzyme inhibitor sensor for organophosphorus pesticides analysis. **Sci. Tot. Environ.**, v. 123, p. 1-16, Aug. 1992.
- 35 PANDEY, P. C., TRAN-MINH, C., LANTREIBECQ, F. Electrochemical studies on tetratriafulvalene-tetracyanoquinodimethane modified acetylcholine chlorine sensor. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 31, n. 2, p. 145-158, 1991.
- 36 CAGNINI, A., PALCHETTI, I., LIONTI, I., MASCINI, M., TURNER, A. P. F. Disposable ruthenized screen-printed biosensors for pesticides monitoring. **Sens. Actuators**, v. B 24, n. 1-3, p. 85-89, 1995.

- 37 GRUSS, R., SCHELLER, F., SHAO, M. J., LIU, C. C. Electrochemical determination of cholinesterase activity an indication of its inhibition using a tick film metalized platinum electrode. **Anal. Lett.**, v. 22, n. 5, p. 1159-1169, 1989.
- 38 STOYTICHEVA, M. Acetylcholinesterase based amperometric sensor: inhibitor detection. **Electroanalysis**, v. 7, n. 4, p. 560-566, 1995.
- 39 MARTORELL, D., CÉSPEDES, F., MARTÍNEZ-FRÀBEGAS, E., ALEGRET, S. Amperometric determination of pesticides using a biosensor based on a polishable graphite-epoxi biocomposite. **Anal. Chim. Acta**, v. 290, n. 3, p. 343-348, 1994.
- 40 KULYS, J., D'COSTA, E. J. Printed amperometric sensor based on TCNQ and cholinesterase. **Biosens. Bioelectron.**, v. 6, n. 2, p. 109-115, 1991.
- 41 BUDNIKOV, H. C., MEDYANTSEVA, E. P., BABKINA, S.S. An enzyme amperometric sensor for toxicant determination. **J. Electroanal. Chem. Interf. Electrochem.**, v. 310, n. 1-2, p. 49-55, 1991.
- 42 GÜNTHER, A., BILITEWSKI, U. Characterization of inhibitors of acetylcholinesterase by an automated amperometric flow-injection system. **Anal. Chim. Acta**, v. 300, n. 1-3, p. 117-125, 1995.
- 43 SAKAI, H., KANEKI, N., HARA, H. Analytical application for chemicals using an enzyme sensor-based on an insfet. **Sens. Actuators**, v. B 14, n. 1-3, p. 578-580, 1993.
- 44 BERNABEI, M., CHIAVARINI, S., CREMISINI, C., PALLESCHI, G. Anticholinesterase activity measurement by a choline biosensor: application in water analysis. **Biosens. Bioelectron.**, v. 8, n. 5, p. 265-271, 1993.
- 45 PALLESCHI, G., BERNABEI, M., CREMISINI, C., MASCINI, M. Determination of organophosphorus insecticides with a choline electrochemical biosensor. **Sens. Actuators**, v. B 7, n. 1-3, p. 513-517, 1992.
- 46 LA ROSA, C., PARIENTE, F., HERNÁNDEZ, L., LORENZO, E. Amperometric flow-through biosensors for the determination of pesticides. **Anal. Chim. Acta**, v. 308, n. 1-3, p. 129-136, 1995.

- 47 KINDERVATER, R., KÜNECKE, W., SCHMID, R. D. Exchangeable immobilized enzyme reactor for enzyme inhibition tests in flow injection analysis using a magnetic device: determination of pesticides in drinking water. *Anal. Chim. Acta*, v. 234, n. 1, p. 113-117, 1990.
- 48 WOLFBEIS, O. S. Optochemical sensors (optrodes) and their applications. *Kontakte (Darmstadt)*, v. 2, p. 30-34, 1989.
- 49 SALAMOUN, J., REMIEN, J. Detection of anticholinesterase agents in drinking-water by use of tandem packed-bed reactors with human red-blood-cell acetylcholinesterase and choline oxidase in a switching flow system. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, v. 57, n. 2, p. 163-175, 1994.
- 50 SKLÁDAL, P., PAVLÍK, M., FIALA, M. Pesticide biosensor based on coimmobilized acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Anal. Lett.*, n. 1, v. 27, p. 29-43, 1994.
- 51 KUMARAN, S., MORITA, M. Application of a cholinesterase biosensor to screen for organophosphorus pesticides extracted from soil. *Talanta*, v. 42, n. 4, p. 649-655, 1995.
- 52 ARGAUER, R. J., BROWN, R. T. Detection of carbofuran and other carbamates using cholinesterase inhibition with N-methylindoxyl acetate as substrate. *J. Agric. Food Chem.*, v. 42, n. 9, p. 1920-1924, 1994.
- 53 ROTENBERG, M., SHEFI, M., NANY, S., DORE, I., TIROSH, M., ALMOG, S. Differentiation between organophosphate and carbamate poisoning. *Clin. Chim. Acta*, v. 234, n. 1-2, p. 11-16, 1995.
- 54 MEDYANTSEVA, E. P., BUDNIKOV, G. K., BABKINA, S. S. The effect of metal ions on the catalytic activity of immobilized cholinesterase. *Zh. Anal. Khim.*, v. 44, n. 12, p. 2253-2257, 1990.
- 55 STOYTCHIEVA, M. Bioelectrocatalytic determination of some heavy metals and their influence on the catalytic activity of the immobilized acetylcholinesterase. *Bull. Soc. Chim. Belgs*, v. 103, n. 4, p. 147-149, 1994.
- 56 MIONETTO, N., MARTY, J. L., KARUBE, I. Acetylcholinesterase in organic-solvents for the detection of pesticides: biosensor application. *Biosens. Bioelectron.*, v. 9, n. 6, p. 463-470, 1994.