

DETERMINACIÓN DEL CLORPIRIFOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA MEDIANTE EL USO DE BIOSENSORES ENZIMÁTICOS: UNA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

Jacqueline Betancur¹, Gustavo A. Peñuela²

¹ Ingeniera Biológica, Grupo diagnóstico y control de la contaminación (GDCON), Universidad de Antioquia. Sede de investigación universitaria (SIU), Medellín, Colombia. Correo electrónico: jabebu15@gmail.com

² Doctor en Química Ambiental, Grupo diagnóstico y control de la contaminación (GDCON), Universidad de Antioquia. Sede de investigación universitaria (SIU), Medellín, Colombia. Correo electrónico: jabebu15@gmail.com

^{1, 2} Grupo Diagnóstico y Control de la Contaminación (GDCON). Facultad de Ingeniería. Sede de Investigación Universitaria (SIU). Universidad de Antioquia, calle 70 No. 52-21. Medellín, Colombia

RESUMEN

La necesidad de monitorear en corto tiempo los pesticidas organofosforados en los alimentos, ha llevado a la investigación sobre el desarrollo de herramientas analíticas capaces de cuantificarlos de manera simple, *in situ* y en lo posible a bajo costo. De este modo, los alimentos que contengan residuos de plaguicidas a una concentración no permitida por la normatividad se descartarían rápidamente. En la industria alimentaria y especialmente en la producción de leche por su masivo consumo y recambio constante se requiere que la decisión de calidad de la materia prima sea tomada lo más pronto posible. Los biosensores enzimáticos basados en Colinesterasa han sido desarrollados para el análisis de plaguicidas organofosforados en aguas, y con otras matrices están haciéndose varias investigaciones. Para el mejoramiento de la sensibilidad en la cuantificación de los plaguicidas mediante los biosensores, se han estado estudiando técnicas de inmovilización enzimática, materiales y tipos de electrodos de trabajo.

Palabras claves: Colinesterasa, biosensor, plaguicidas, sustrato.

Recibido: 6 de abril de 2015.

Aceptado: 18 de junio de 2015.

Received: April 6th, 2015.

Accepted: June 18th, 2015.

DETERMINATION OF CHLORPYRIFOS USING ENZYMATIC BIOSENSORS: A REVIEW.

ABSTRACT

The need for monitoring organophosphate pesticides in food in a short time has led to research on the development of analytical tools capable of quantifying them simply, in situ, and at low cost. In this way, food with pesticide residues to concentration levels not allowed by normativity would be quickly discarded. In the food industry and especially in the production of milk for its mass consumption and constant turnover, it is required that the quality decision of the raw material is taken as soon as possible. The enzymatic biosensors based in cholinesterase have been developed for the analysis of organophosphorus pesticides in water, and there are reports that indicate their use in other arrays. To improve the sensitivity for quantification of pesticides using biosensors, enzyme immobilization techniques, materials and types of working electrodes have been studied.

Keywords: Cholinesterase, biosensor, pesticides, substrate.

1. INTRODUCCIÓN

La demanda de la alimentación a nivel mundial conlleva al uso más intensivo de plaguicidas para controlar las posibles pérdidas causadas por plagas de animales, patógenos de plantas y de malezas [1]. Los pesticidas organofosforados constituyen al grupo más usado para proteger a las plantas de enfermedades y de daño ocasionado por insectos [2]. Este grupo de plaguicidas son altamente tóxicos no sólo para los insectos, sino también para los animales mamíferos incluyendo el ser humano, los cuales puede ingresar a las personas por inhalación, absorción en la piel o ingestión [2][3]. La intoxicación ocurre por la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, produciendo acumulación del neurotransmisor acetilcolina, que causa contracción muscular, convulsiones, depresión respiratoria y en ocasiones muerte por asfixia [2][4]. Según la División de Insumos Agrícolas del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), del grupo de los organofosforados el de mayor participación porcentual en ventas en Colombia es el Clorpirifos, con un volumen aproximado de 372 toneladas y 243.000 litros al año [5].

Actualmente, el análisis de clorpirifos en la industria láctea se realiza más comúnmente mediante técnicas analíticas como la cromatografía de gases (GC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) [6][7]. Estas técnicas son costosas, se requiere de varias horas para la preparación de las muestras y el análisis no se realiza en tiempo real, lo que resulta siendo una gran desventaja en la industria de alimentos.

El cumplimiento de las normas que garanticen el bienestar de los consumidores y la inocuidad en los productos alimenticios ha llevado a la industria a pensar en el desarrollo de tecnologías prácticas, económicas e innovadoras. Los biosensores son herramientas apropiadas para el análisis de residuos tóxicos de los alimentos en tiempo real [8]. Los biosensores tienen un elemento biológico de reconocimiento, asociado a un electrodo que garantiza la detección e interpretación de la variación de propiedades ópticas, fisicoquímicas, eléctricas, entre otras, obtenida de la interacción entre el analito y el dispositivo analítico [9].

Los biosensores amperométricos son basados en la medida de la corriente eléctrica generada por procesos electroquímicos de oxidación/reducción en el biomedador. Para esto, el elemento biológico

debe estar expuesto a un apropiado potencial de oxido-reducción [10]. El diseño de este tipo de sensores requiere una serie de elementos, los cuales se enuncian a continuación: A) Proceso de extracción enzimática: Proceso por medio del cual se obtiene el biomedador a partir de un organismo biológico [10]. El biomedador para la mayoría de los plaguicidas organofosforados como el clorpirifos es la enzima acetilcolinesterasa [11][9] B) Sistema de electrodos: Permite la conducción de la corriente generada por el mediador y la aplicación de un potencial adecuado para garantizar las reacciones de oxido-reducción [10] Para las medidas amperométricas en biosensores, normalmente se utiliza la configuración de tres electrodos, denotados como: electrodo de trabajo (Working Electrode WE), contra electrodo (Counter Electrode CE) y electrodo de referencia (Reference Electrode RE) [12]. C) Proceso de inmovilización enzimática: Tiene como objetivo garantizar adherencia mecánica y contacto eléctrico entre el biomedador y los electrodos [12]. La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica permitiendo que la enzima pueda ser reutilizada repetidamente [13]. Las características del método de inmovilización empleado afectarán el desempeño del sensor, incluyendo su sensibilidad, nivel de ruido y tiempo de vida [12]. D) Hardware de transducción y acondicionamiento de señal: Consiste en una serie de circuitos electrónicos que se conectaran al sistema de electrodos y acondicionarán la señal de medida.

En este artículo se realiza una contextualización sobre el uso y avance en el desarrollo de biosensores enzimáticos basados en Acetilcolinesterasa, los cuales son utilizados para determinar pesticidas organofosforados como el clorpirifos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo de revisión utilizado para la búsqueda de información se basó en primera instancia en definir el aspecto a investigar el cual fue determinar los avances en el uso de biosensores para la detección de plaguicidas, seguido a esto se realizó una estrategia de búsqueda de tres maneras:

i) Búsqueda mediante palabras clave en las principales bases de datos (SCOPUS y

ScienceDirect). Dicho tipo de búsqueda permitió identificar los principales estudios publicados. La cadena de búsqueda utilizada fue:

("biosensors" OR "enzymatic amperometric biosensor" OR "Acetylcholinesterase biosensor")

AND (Experiment OR study OR review OR evaluation)

ii) Búsqueda oportunista, utilizando únicamente los términos:

"biosensor"; "enzymatic amperometric biosensor"; "Acetylcholinesterase biosensor"; "pesticides and biosensors".

iii) Revisión de las referencias bibliográficas citadas en los artículos seleccionados. Este tipo de búsqueda, aunque extremadamente tediosa, permitió identificar estudios antiguos, no indexados en bases de datos y/o con títulos muy poco precisos.

El criterio de selección de la información estuvo basado principalmente en artículos de trabajos que aportaban información enfocada y relacionada al objetivo del actual escrito.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Desarrollo de los biosensores enzimáticos basados en colinesterasa.

3.1.1 Acetilcolinesterasa. La acetilcolinesterasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de la acetilcolina, uno de los más importantes neurotransmisores que juega un rol vital en el sistema nervioso central [14][15]. Es responsable de la transmisión de los impulsos nerviosos a las sinápsis colinérgicas y se piensa que su función también esta relacionada con la memoria humana y la enfermedad del Alzheimer [16]. La actividad de la acetilcolinesterasa consiste en degradar aproximadamente 25,000 moléculas de acetilcolina por segundo en colina y ácido acético. La colina producida es transportada al interior de las terminaciones nerviosas y usada para la síntesis de nuevas moléculas de acetilcolina [17]. El sitio activo de la acetilcolinesterasa se caracteriza por la triada catalítica constituida por: histidina, serina y ácido aspártico [18] [19]. Bajo condiciones normales la actividad catalítica comienza a llevarse a cabo cuando el grupo hidroxilo de la serina del sitio activo de la enzima es atraído por el grupo amonio cuaternario de la acetilcolina. En presencia de pesticidas organofosforados como el clorpirifos, el grupo hidroxilo de la serina del sitio activo de la enzima interacciona con el grupo fosfato del

pesticida, produciendo un intermediario de la enzima fosforilada que bloquea la actividad enzimática [20]. Para el uso en biosensores, la enzima es extraída de la *Drosophila melanogaster* y la *Electric Eel* [16].

3.1.2 Biosensores enzimáticos basados en Colinesterasas. Para la fabricación de biosensores han sido usados dos tipos de Colinesterasas: La acetilcolinesterasa (AChE) y la butirilcolinesterasa (BuChE), la primera mucho más usada que la segunda [16]. Estructuralmente ambas biomoléculas son similares, la diferencia más característica se encuentra en el sustrato que hidrolizan, de este modo BuChE hidroliza butirilcolina y AChE hidroliza acetilcolina [21]. Además de los sustratos naturales, las colinesterasas son capaces de hidrolizar ester de tiocolina tales como: acetiltiocolina, butiriltiocolina, propioniltiocolina, acetil- β -metiltio-colina, de las cuales los más usados para el diseño de biosensores han sido la butiriltiocolina y la acetiltiocolina [21]. El primer biosensor enzimático basado en colinesterasa se reportó en 1980, cuya enzima usada fue la butirilcolinesterasa [22]. Luego de esto se ha desarrollado lo que se conoce como las generaciones de biosensores basados en colinesterasa.

3.2 Primera generación

3.2.1 Biosensor amperométrico bi-enzimático. Representada por un biosensor amperométrico bi-enzimático, cuyas enzimas usadas fueron la colinesterasa y la colina oxidasa. En este sistema la colinesterasa hidroliza sustrato natural (acetilcolina para AChE y butirilcolina para BuChE) a colina y acetato. La Colina no es electroquímicamente activa por tal motivo, la segunda enzima colina oxidasa es usada para producir peróxido de hidrogeno que puede ser amperométricamente detectado a aproximadamente +650mV. Esta detección indirecta de la actividad de la colinesterasa implica que el sensor sea susceptible a interferencias de otras especies electroactivas presentes en el medio de reacción [23]. Ambas enzimas son inmovilizadas sobre el electrodo de trabajo en igual o diferente matriz de inmovilización [24] [25] [26] o una puede ser inmovilizada y la otra adicionada en solución [27] [28].

3.2.2 Biosensor potenciométrico mono-enzimático. La detección potenciométrica de la actividad de la enzima AChE se basa en la medida

del cambio de pH y/o en el potencial redox en la capa de la enzima. El cambio de pH se debe a la producción de ácido acético por la hidrólisis de la acetilcolina llevado a cabo por la actividad enzimática [16]. En los primeros biosensores potenciométricos construidos, la enzima fue inmovilizada sobre el electrodo de trabajo (medidor de pH) mediante atrapamiento físico [29] [30]. Luego se desarrollaron sensores para la medición de pH como transductores de ion-selectivo [30]. [31] o sensores potenciométricos luz- direccionable [32] conocidos como ISFET y LAPS.

3.3 Segunda Generación

3.3.1. *Biosensores de colinesterasa mono-enzimáticos*. Se utilizan sustratos no naturales como acetiltiocolina para la AChE y butiriltiocolina para la BuChE. Este sistema está basado en la detección amperométrica directa de tiocolina, producto de la reacción catalizada por la enzima. El uso de una sola enzima simplifica el diseño del sensor y la detección potenciométrica ocurre a +410mV [16]. En el electrodo de trabajo se utilizan mediadores electrónicos para determinar la actividad de la enzima mediante el potencial de oxidación del mediador. Se conoce que los sensores con mediadores son menos susceptibles a compuestos que pueden actuar como interferencias debido a su bajo voltaje utilizado [16]. Los mediadores son generalmente inmovilizados sobre la superficie del electrodo de trabajo. Dicho proceso puede llevarse a cabo en la misma matriz de inmovilización de la enzima o en otra separada [33]. La enzima es inmovilizada en el electrodo de trabajo mediante la técnica de entrecruzamiento o cross-linking mediante el uso de reactivos bifuncionales como el glutaraldehído [34] [35].

3.4 Otros biosensores de colinesterasa reportados

La Rosa *et al.* 1994 [36] y Andreescu, *et al.*, 2002 [37], reportan la construcción de biosensores en donde usan 4-aminofenil acetato como sustrato. El producto de la reacción catalizada por la enzima con este sustrato es 4-aminofenol, el cual puede ser detectado amperométricamente. Este sistema presenta varias ventajas dentro de las que se destaca el no uso de mediadores electrónicos, además el sustrato es soluble en solventes orgánicos, lo cual es conveniente para la detección del analito en un medio orgánico [37].

Otro ejemplo de biosensor es el elaborado por Ghindilis *et al.* (1996) [30] el cual consiste en un biosensor tri-enzimático amperométrico, en donde las tres enzimas fueron co-inmovilizadas sobre la superficie del electrodo de trabajo mediante cross-linking con glutaraldehído en la misma matriz de inmovilización.

3.5 Inmovilización de la enzima Colinesterasa

Según lo descrito en la literatura la inmovilización de la enzima sobre el electrodo de trabajo o también llamado transductor es el paso más importante en el desarrollo de un biosensor enzimático. Las interacciones que ocurren entre la enzima y el material del electrodo son indispensables para el biosensor en términos de sensibilidad, estabilidad, tiempo de respuesta y reproducibilidad.

Existe una gran variedad de métodos mediante los cuales la enzima puede ser inmovilizada sobre el transductor:

3.5.1. *Adsorción física*. Consiste en la deposición sencilla de la enzima sobre el material del electrodo unida a este mediante fuerzas débiles, tales como Van der Waals e interacciones electrostáticas. Dentro de las ventajas de esta técnica se resalta que es simple y barata, no hay daño a la enzima, no hay cambio químico del soporte y es reversible para permitir la regeneración de la enzima libre. Las desventajas se asocian a que se puede presentar fuga de la enzima, un tiempo de respuesta corto, los biosensores generalmente sufren de una pobre estabilidad operacional y de almacenamiento, sensibilidad a los cambios de pH, temperatura y fuerza iónica [38].

3.5.2. *Atrapamiento físico*. La inmovilización se realiza mediante el atrapamiento de la enzima en una matriz constituida por un gel sólido, polímero o membrana. Como ventajas de la técnica se tiene que el procedimiento se realiza en una etapa a temperatura ambiente, no hay daños a la enzima, la inmovilización es simple y económica, no se presenta ningún cambio químico del soporte. Dentro de las desventajas se encuentra fuga de la enzima, inmovilización inestable, gran variedad y número de polímeros biocompatibles, problemas de reproducibilidad y finalmente se puede encontrar dificultades con la difusión del sustrato debido al tamaño de poro [37] [39] [40].

3.5.3. Acoplamiento covalente. Este es el procedimiento más utilizado para la inmovilización de la colinesterasa. AChE, uniéndose covalentemente a las superficies de un transductor. Típicamente, el procedimiento implica la modificación del transductor con un agente de reticulación bifuncional tal como glutaraldehído, carbodiimida / succinimida o aminopropyltriethoxysilanes. Esta técnica presenta ausencia de barreras de difusión, tiempo de respuesta corto, ninguna fuga de la enzima, y una amplia gama de opciones para la selección de material de soporte (haciendo el método flexible con propiedades químicas y físicas específicas) [41] [42] [43] [44]. Para este tipo de inmovilización se requiere alta cantidad de enzima, además se puede presentar una posible desnaturalización y los procedimientos suelen ser costosos y complicados [45] [46].

3.5.4. Monocapa autoensamblada (SAM). Es una capa organizada de moléculas anfifílicas en el que un extremo de la molécula muestra una actividad específica reversible por el sustrato. Este tipo de inmovilización se usa cuando la superficie del transductor esta hecha de metal (particularmente oro). Este método garantiza la orientación y el control espacial de las enzimas en el proceso de inmovilización y la ausencia de barreras de difusión, pero el posible ensuciamiento del electrodo y la estratificación reproducible de biomoléculas sigue siendo una limitación importante [47][48].

3.5.5. Inmovilización orientada. La mayor limitación en la inmovilización de enzimas es asegurar el control espacial de la biomolécula y minimizar la pérdida de actividad enzimática durante dicho procedimiento. La inmovilización orientada de AChE se realiza a través de grupos funcionales específicos localizados en su superficie, así los sitios activos pueden ser afrontados hacia los analitos de interés presentes en la muestra, y los sustratos y los productos pueden difundirse libremente en la capa biológica [49]. Se ha utilizado la AChE de la *Drosophyla melanogaster* la cual ha sido manipulada mediante ingeniería genética, realizándose la adición de residuos de histidina al grupo carboxilo terminal de la enzima. Los biosensores desarrollados de esta manera mostraron un aumento de la sensibilidad y límite de detección más bajo, pero tiene una operatividad y estabilidad de almacenamiento reducido con respecto a los procedimientos de atrapamiento

físico [37] [39]. Un aspecto positivo es la baja cantidad de enzima requerida y la reutilización de la misma. El requerimiento de la presencia de grupos específicos en el bioreceptor y el proceso de adición de dichos grupo puede ser engorroso.

3.6 Electrodo: tipos y materiales

Comúnmente la enzima se deposita sobre la superficie del electrodo de trabajo y la actividad de la enzima se mide añadiendo el sustrato a la solución. Inicialmente los biosensores basados en Colinesterasa utilizaron electrodos tipo Clark, que usaba un electrodo de oxígeno para la detección amperométrica y un electrodo sensible al pH para la detección potenciométrica. En ambos casos, la enzima es inmovilizada mediante atrapamiento físico sobre la superficie del electrodo de oxígeno o mediante el uso de membranas sensibles al pH. Posteriormente se utilizaron electrodos sólidos tales como platino, oro, carbono vítreo y los electrodos de pasta de carbono [50]. En algunos casos estos electrodos son químicamente y/o electroquímicamente activados para añadir grupos funcionales en su superficie con el objetivo de la posterior fijación de la enzima.

El uso de electrodos sólidos ofrece un buen rendimiento analítico para la determinación de la actividad de la colinesterasa pero presenta varias limitaciones importantes para las mediciones de inhibición. Debido a la inactivación de la enzima por el inhibidor, para utilizar nuevamente el biosensor requiere la regeneración y/o sustitución de la capa de enzima. Por lo tanto, un nuevo electrodo tiene que estar preparado para cada medición, incluyendo la calibración del sensor y la determinación de muestras desconocidas. Dependiendo del material del electrodo, los pasos de preparación pueden incluir el pulido mecánico, la activación de la superficie del electrodo, la unión de los mediadores electrónicos y, en algunos casos, la cobertura con capas adicionales para aumentar la estabilidad de la enzima. Además, estos electrodos son costosos y su producción por grandes cantidades es casi imposible. Debido a estas limitaciones y a la naturaleza de las mediciones de inhibición, a finales de 1990, la mayoría de los electrodos sólidos para biosensores de AChE fueron reemplazados por los electrodos producidos por serigrafía [33] [51] [52] [53].

Otra tendencia más reciente en la fabricación de biosensores basados en la colinesterasa es utilizar materiales nanoestructurados y nanocompuestos para obtener una gran área superficial y una mayor

sensibilidad [54]. Un ejemplo es el uso de nanotubos de carbono. En este caso, el biosensor se fabrica por la deposición de nanotubos sobre la superficie del electrodo de trabajo de un electrodo serigrafiado, seguido de secado y simple deposición de AChE en solución [55][23]. El sensor se caracteriza por una elevada área superficial que mejora la actividad electrocatalítica hacia la tiocolina, lo que facilita el funcionamiento a bajo potencial sin el uso de mediadores electrónicos. El uso de nanomateriales y nanocompuestos en biosensores basados en Colinesterasa es relativamente inexplorado y representa una línea de investigación importante para futuros avances.

4. CONCLUSIONES

Los biosensores basados en colinesterasa prometen ser una herramienta analítica de alto potencial para la determinación de clorpirifos en alimentos por su alta sensibilidad y selectividad y por la cuantificación del analito *in situ*.

La utilización e implementación de estas herramientas en la industria alimentaria contribuyen al cumplimiento de la normatividad existente para la calidad de los alimentos, lo que garantiza seguridad para el consumidor.

La optimización de los biosensores enzimáticos no se basa solo en su alta selectividad y sensibilidad, si no también, en hacer de estos un instrumento económico, con rápida velocidad de respuesta y fácil de transportar.

5. AGRADECIMIENTOS

Para el grupo diagnóstico y control de la contaminación (GDCON), al departamento de investigación de la Universidad de Antioquia y a Colciencias por la financiación del proyecto.

6. REFERENCIAS

[1] Schreinemachers, P., Tipraqsa, P. Agricultural pesticides and land use intensification in high, middle and low income countries. *Food Policy*, 37(6), 616–626. 2012.
 [2] Ferri, D., Gaviña, P., Costero, A. M., Parra, M., Vivancos, J.-L., Martínez-Máñez, R. Detection and discrimination of organophosphorus pesticides in water by using a colorimetric probe array. *Sensors*

and Actuators B: Chemical, 202(2014), 727–731. 2014.

[3] Wang, Y., Kruzik, P., Helsberg, A., Helsberg, I., Rausch, W.-D. Pesticide poisoning in domestic animals and livestock in Austria: a 6 year's retrospective study. *Forensic Sci. Int.* 169, 157–160. 2007.

[4] Morales, C., Rodríguez, N., Restrepo, L. F., López, C. Relación entre residuos de clorpirifos en leche y sangre de vacas Holstein y niveles séricos de estradiol y tiroxina. *Revista electrónica de Veterinaria*, 11(1). 2010.

[5] Loaiza, A., Jaramillo, J. A., León, F. Incidencia de factores sociales, económicos, culturales y técnicos en el uso de agroquímicos por pequeños productores del departamento de Antioquia (p. 174). 2000.

[6] Rekha, K., Gouda, Thakur, Karanth, N.G. Ascorbate oxidase based amperometric biosensor for organophosphorous pesticide monitoring. *Biosensors & Bioelectronics*, 15(9-10), 499–502. 2000.

[7] Vallecilla, C., Rodríguez, N., Restrepo, L. F., López, C. Relación entre residuos de clorpirifos en leche y sangre de vacas Holstein y niveles séricos de estradiol y tiroxina - Chlorpyrifos residues in milk and blood in Holstein cows and their relation to estradiol and thyroxin serum levels. *Revista Electrónica de Veterinaria. REDVET*, 11(1), 1–22. 2010.

[8] Jiménez, C., León, D. Biosensores: Aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimenticios. *Revista de la facultad de química farmaceutica.*, 16(1), 144-154. 2009.

[9] Rodríguez, D.C., Carvajal, S., Peñuela, G. Effect of chlorpyrifos on the inhibition of the enzyme acetylcholinesterase by cross-linking in water-supply samples and milk from dairy cattle. *Talanta*, 111, 1-7. 2013.

[10] Borgmann, S., Schulte, A., Neugebauer, S., & Schuhmann, W. Amperometric Biosensors. *En Advances in Electrochemical Science and Engineering.* (págs. 1-84). Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011.

[11] Environmental Protection Agency. Human health risk an assessment. Chlorpyrifos. Obtenido de Environmental Protection Agency, Office of pesticide programs: http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2008/september/hed_ra.pdf [Consultado el 04 de noviembre de 2014].

- [12] Domínguez, J., Gossas, T., Villaverde, C., Danielson, H., & Sussman, F.. Experimental and 'in silico' analysis of the effect of pH on HIV-1 protease inhibitor affinity: Implications for the charge state of the protein ionogenic groups. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20, 4838–4847. 2012.
- [13] Arroyo, M. Inmovilización de enzimas. *Fundamentos, métodos y aplicaciones Immobilized. Ars Pharmaceutica*, 39(2), 23–39. 1998.
- [14] Norouzi, P., Pirali-Hamedani, M., Ganjali, M.R., Faridbod, F.A. A novel acetyl cholinesterase biosensor based on chitosan–gold nanoparticles film for determination of monocrotophos using FFT continuous cyclic voltammetry, *Int. J. Electrochem. Sci.* 5, 1434–1446. 2010.
- [15] Di Tuoro, D., Portaccio, M., Lepore, M., Arduini, F., Moscone, D., Bencivenga, U., Mita, D. G. An acetylcholinesterase biosensor for determination of low concentrations of Paraoxon and Dichlorvos. *New Biotechnology*, 29(1), 132–8. 2011.
- [16] Andreescu, S., Marty, J.-L. Twenty years research in cholinesterase biosensors: from basic research to practical applications. *Biomolecular Engineering*, 23(1), 1–15. 2006.
- [17] Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., LaMantia, A.S., McNamara, J.O., White, L.E. *Neuroscience*, fourth ed., Sinauer Associates, Sunderland, MA. 2008.
- [18] Krasinski, A., Radic, Z., Manetsch, R., Raushel, J., Taylor, P., Sharpless, K.B., Kolb, H.C. In situ selection of lead compounds by click chemistry: target-guided optimization of acetylcholinesterase inhibitors, *J. Am. Chem. Soc.* 127, 6686–6692. 2005.
- [19] Manetsch, R., Krasinski, A., Radic, Z., Raushel, J., Taylor, P., Sharpless, K.B., Kolb H.C. In situ click chemistry: enzyme inhibitors made to their own specifications, *J. Am. Chem. Soc.* 126, 12809–12818. 2004.
- [20] Lin, G., Lee, Y.R., Liu, Y.C., Wu, Y.G. Ortho effect for inhibition mechanisms of butyrylcholinesterase by o-substitute phenyl L-butyl carbamates and comparison with acetylcholinesterase, cholesterol esterase, and phenol, *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1124–1131. 2005.
- [21] Hosea, N.A., Berman, H.A., Taylor, P. Specificity and orientation of trigonal carboxi esters and tetrahedral alkylphosphonyl esters in cholinesterases. *Biochemistry* 34, 11528–11536. 1995.
- [22] Pohanka, M. Musilek, K. Kuca, K. Progress of biosensors based on cholinesterase inhibition, *Curr. Med. Chem.* 16, 1790–1798. 2009.
- [23] Lin, Y.H., Lu, F., Wang, J., Disposable carbon nanotube modified screen- printed biosensor for amperometric detection of organophosphorus pesticides and nerve agents. *Electroanalysis* 16, 145–149. 2004.
- [24] Cremisini, C., Di Sario, S., Mela, J., Pilloton, R., Palleschi, G., Evaluation of the use of free and immobilised acetylcholinesterase for paraoxon detection with an amperometric choline oxidase based biosensor. *Anal. Chim. Acta* 311, 273–280. 1995.
- [25] Marty, J.-L., Sode, K., Karube, I. Biosensor for detection of organophosphate and carbamate insecticides. *Electroanalysis* 4, 249–252. 1992.
- [26] Rouillon, R., Mionetto, N., Marty, J.-L., Acetylcholine biosensor involving entrapment of two enzymes. Optimization of operational and storage conditions. *Anal. Chim. Acta* 268, 347–350. 1992.
- [27] Bernabei, M., Cremisini, C., Mascini, M., Palleschi, G. Determination of organophosphorus and carbamic pesticides with a choline and acetylcholine electrochemical biosensor. *Anal. Lett.* 24, 1317–1331. 1991.
- [28] Palleschi, G., Bernabei, M., Cremisini, C., Mascini, M. Determination of organophosphorus insecticides with a choline electrochemical biosensor. *Sens. Actuators B* 7, 513–517. 1992.
- [29] Kumaran, S., Morita, M., Application of a cholinesterase biosensor to screen for organophosphorus pesticides extracted from soil. *Talanta* 4, 649–655. 1995.
- [30] Ghindilis, A.L., Morzunova, T.G., Barmin, A.V., Kurochin, I.N., Potentiometric biosensors for cholinesterase inhibitor analysis based on mediatorless bioelectrocatalysis. *Biosens. Bioelectron.* 11, 873–880. 1996.
- [31] Imato, T., Ishibashi, N., Potentiometric butyrylcholine sensor for organophosphate pesticides. *Biosens. Bioelectron.* 10, 435–441. 1995.
- [32] Fernando, J.F., Rogers, K.R., Anis, N.A., Valdes, J.J., Thompson, R.G., Eldefrawi, A.T., Eldefrawi, M.E., Rapid detection of anticholinesterase insecticides by a reusable light addressable potentiometric biosensor. *J. Agric. Food Chem.* 41, 511–516. 1993.
- [33] Nunes, G.S., Barcelo, D., Grabaric, B.S., Diaz-Cruz, J.M., Ribeiro, M.L., Evaluation of highly sensitive amperometric biosensor with low cholinesterase charge immobilized on a chemically modified carbon paste electrode for trace determination of carbamates in fruit, vegetable and water samples. *Anal. Chim. Acta* 399, 37–49. 1999.

- [34] Hart, A.L., Collier, W.A., Janssen, D. The response of screen-printed electrodes containing cholinesterases to organo-phosphate in solution and from commercial formulation. *Biosens. Bioelectron.* 12, 645–654. 1997.
- [35] Scouten, W. H., Luong, J. H. T., Brown, R. S. Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design. *TIBTECH*, 13, 178–185. 1995.
- [36] La Rosa, C., Pariente, F., Hernandez, L., Lorenzo, E. Determination of organophosphorus and carbamic pesticides with an acetylcholinesterase amperometric biosensor using 4-aminophenyl acetate as substrate. *Anal. Chim. Acta* 295, 237–282. 1994.
- [37] Andreescu, S. Barthelmebs, L. Barthelmebs, J.-L., Immobilisation of AChE on screen-printed electrodes: comparative study between three immobilization methods applications to the detection of organophosphorus insecticides, *Anal. Chim. Acta* 464, 171–180. 2002.
- [38] Bonnet, C., Andreescu, S., Marty, J.-L., Adsorption: an easy and efficient immobilisation of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes. *Anal. Chim. Acta* 481, 209–211. 2003.
- [39] Andreescu, S., Noguier, T., Magearu, V., Marty, J.-L., Screen-printed electrode based on AChE for the detection of pesticides in presence of organic solvents. *Talanta* 57, 169–176. 2002.
- [40] Sotiropoulou, S. Chaniotakis, N.A. Tuning the sol-gel microenvironment for acetylcholinesterase encapsulation, *Biomaterials*. 26, 6771–6779. 2005.
- [41] Skladal, P. Biosensors based on cholinesterases for detection of pesticides. *Food Technol. Biotechnol.* 34, 43–49. 1996.
- [42] Skladal, P., Fiala, M., Krejci, J., Detection of pesticides in the environment using biosensors based on cholinesterases. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 65, 139–148. 1996.
- [43] Lee, H.S., Kim, Y.A., Chao, Y.A., Lee, Y.T., Oxidation of organophosphorus pesticides for the sensitive detection by a cholinesterase-based biosensor. *Chemosphere* 46, 571–576. 2002.
- [44] Li, Y.G., Zhou, Y.X., Feng, J.L., Jiang, Z.H., Ma, L.R., Immobilisation of enzyme on screen-printed electrode by exposure to glutaraldehyde vapour for the construction of amperometric acetylcholinesterase electrodes. *Anal. Chim. Acta* 382, 272–282, 1999.
- [45] Vakurov, A. Simpson, C.E. Daly, C.L. Gibson, T.D. Millner, P.A. Acetylcholinesterase based biosensor electrodes for organophosphate pesticide detection: I. Modification of carbon surface for immobilization of acetylcholinesterase, *Biosens. Bioelectron.* 20 1118–1125. 2004.
- [46] Upadhyay, S. Rao, G.R. Sharma, M.K. Bhattacharya, B.K. Rao, V.K. Vijayaraghavan, R. Immobilization of acetylcholinesterase–choline oxidase on a gold–platinum bimetallic nanoparticles modified glassy carbon electrode for the sensitive detection of organophosphate pesticides, carbamates, and nerve agents, *Biosens. Bioelectron.* 25 832–83. 2009.
- [47] Wink, T. Van Zuilen, S.J. Bult, A. Van Bennekorn, W.P. Self-assembled monolayers for biosensors, *Analyst* 122 43R–50R. 1997.
- [48] Gooding, J.J. Hibbert, D.B. The application of alkanethiols self-assembled monolayers to enzyme electrodes, *Trends Anal. Chem.* 18, 525–532. 1999.
- [49] Andreescu, S., Fournier, D., Marty, J.-L., Development of highly sensitive sensor based on bio-engineered acetylcholinesterase immobilized by affinity method. *Anal. Lett.* 39, 1865–1885. 2003.
- [50] Martorell, D., Cespedes, F., Martinez-Fabregas, E., Alegret, S. Determination of organophosphorus and carbamate pesticides using a biosensor based on polyshable 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane-modified graphite-epoxy biocomposite. *Anal. Chim. Acta* 337, 305–313. 1997.
- [51] Skladal, P., Nunes, G.S., Yamanaka, H., Ribeiro, M.L. Detection of carbamate pesticides in vegetable samples using cholinesterase-based biosensors. *Electroanalysis* 9, 1083–1087. 1997.
- [52] Hartley, I.C., Hart, H.P., Amperometric measurement of organophosphate pesticides using a screen-printed disposable sensor and biosensor based on cobalt phthalocyanine. *Analytical Proceedings Including Analytical Communications* 31, 333–337. 1994.
- [53] Noguier, T., Leca, B., Jeanty, G., Marty, J.-L., Biosensors based on enzyme inhibition. Detection of organophosphorus and carbamate insecticides and dithiocarbamate fungicides. *Field Anal. Chem. Technol.* 3, 171–178. 1999.
- [54] Andreescu, D., Andreescu, S., Sadik, O.A., New materials for biosensors, biochips and molecular bioelectronics. In: Gorton, L. (Ed.), *Biosensors and Modern Biospecific Analytical Techniques*. Elsevier, Amsterdam, pp. 285–329. 2005.
- [55] Joshi, K.A., Tang, J., Haddon, R., Wang, J., Chen, W., Mulchaldani, A., A disposable biosensors for organophosphorus nerve agents based on carbon nanotubes modified thick film strip electrodes. *Electroanalysis* 17, 54–58. 2005.