

# Biossensores à Base de Acetilcolinesterase para Detecção de Pesticidas organofosforados: Tendências e Perspectivas

## *Biosensors Based on Acetylcholinesterase for the Detection of Pesticides organophosphates: Trends and Perspectives*

Andressa R. C. Costa,<sup>a</sup>  Eliane B. Ribeiro,<sup>b</sup> Danilo B. Ribeiro,<sup>a</sup> Rodrigo V. Blasques,<sup>c</sup> Paulo Roberto B. O. Maques,<sup>a</sup> Marcelo Targa,<sup>d</sup> Gilvanda S. Nunes<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Química, CEP 65080-805, São Luís-MA, Brasil.

<sup>b</sup> Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia legal, Rede BIONORTE, CEP 65080-805, São Luís-MA, Brasil.

<sup>c</sup> Universidade Federal de São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Materiais, CEP 13600-970, Araras-SP, Brasil.

<sup>d</sup> Universidade de Taubaté, Programa Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Departamento de Ciências Agrárias, CEP 12081-010, Taubaté-SP, Brasil.

\*E-mail: [gilvanda.nunes@ufma.br](mailto:gilvanda.nunes@ufma.br)

Recebido em: 2 de Março de 2021

Aceito em: 9 de Julho de 2021

Publicado online: 10 de Fevereiro de 2022

Organophosphate (OPs) insecticides are capable of combating pests in food cultivation, acting through inhibition of the acetylcholinesterase enzyme (AChE), which catalyzes the hydrolysis of acetylcholine (ACh), a neurotransmitter fundamental for the functioning of the autonomic nervous system. The consumption of contaminated food and water can cause neurological diseases, therefore is a need for methods of rapid and reliable detection of these compounds, and here we highlight methods based on enzymatic biosensors. This work presents a wide discussion about the advances in the development of AChE-based biosensors for the detection of OPs, as well as suggestions for new investigations that may contribute to the area.

**Keywords:** Pesticides Organophosphates; AChE-based Biosensors; residue monitoring.

## 1. Introdução

Pesticidas têm sido amplamente aplicados para proteger as culturas agrícolas e são uma das poucas substâncias tóxicas liberadas deliberadamente no ambiente para exterminar organismos vivos. O uso disseminado de pesticidas, ao longo dos anos, tem gerado benefícios, mediante controle de populações de pragas que reduzem a produtividade agrícola, mas também tem causado muitos problemas tanto para a saúde humana como para o ambiente.<sup>1-3</sup> O termo pesticida é aplicável não só a inseticidas (agrícolas ou domissanitários), mas também a herbicidas, fungicidas e várias outras substâncias usadas para controlar pragas. Na fabricação desses produtos, ingredientes químicos ativos são combinados com água, solventes e emulsificantes, além de outros ingredientes químicos e não químicos, de forma a repelir, matar e controlar pragas nos diversos ambientes, tais como agrícolas, jardins, empresas, hospitais e domicílios.<sup>2,3</sup>

Em relação aos inseticidas, sua eficácia geralmente depende de quando e onde uma praga se encontra; contudo, muitos inseticidas afetam outras espécies e têm impactos negativos sobre o ambiente e a saúde humana.<sup>2-4</sup> A exposição humana a inseticidas pode resultar em uma série de efeitos prejudiciais. Por exemplo, a exposição a inseticidas organofosforados (OFs) pode resultar em distúrbios nervosos, sendo que os sintomas da intoxicação aguda e subaguda têm sido associados à cefaleia, salivação excessiva, lacrimejo, náusea, diarreia, insuficiência respiratória, visão embaçada, convulsão e perda de consciência.<sup>4</sup> Alguns desses compostos podem bioacumular-se, sendo então transportados e ampliados ao longo da cadeia alimentar.<sup>3,4</sup> Mesmo em menores concentrações, em relação à exposição humana, tais compostos podem ocasionar efeitos crônicos na maioria das vezes irreversíveis.<sup>5-7</sup> Devido essa problemática, torna-se indispensável o monitoramento constante de resíduos desses pesticidas em amostras de alimentos e ambientais.

Os métodos de análise dos inseticidas organofosforados inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) são ainda baseados em técnicas cromatográficas.<sup>8</sup> Métodos como a Cromatografia Gasosa (CG) e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), são amplamente utilizados para determinação de OFs, que embora sejam bastante sensíveis e confiáveis, possuem elevado custo de operação e necessita de elevado grau de pureza dos reagentes; pois, demandam de preparo, extração ou purificação da amostra a ser analisada, a fim de eliminar interferentes, bem como demais etapas posteriores.<sup>9-11</sup> Além disso, há a inviabilidade da utilização destes equipamentos em estudos de monitoramento *in loco*, motivo pelo qual a portabilidade é essencial para que se possam ter respostas rápidas e, conseqüentemente, imediatas

tomadas de decisão, em caso de contaminação e suspeita de intoxicação em massa. Dessa forma, os biossensores enzimáticos tornam-se aliados e comparativamente eficientes, em relação às técnicas analíticas existentes, para a detecção de resíduos de pesticidas.<sup>12</sup>

Nesse sentido, a partir dos anos 1990, diversos métodos baseados na espectrofotometria, a partir de técnicas imunológicas, principalmente aqueles que envolvem ELISA (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*), foram propostos para a detecção de resíduos de compostos inibidores da enzima AChE.<sup>13,14</sup> Mediante uso de métodos baseados em ELISA, foram detectados resíduos dos inseticidas endossulfan (OF) em diversas amostras de hortaliças e frutas; e, também, fenitrotrion (OF) em arroz e alface.<sup>15,16</sup>

Apesar das inúmeras vantagens, em especial a possibilidade de se analisar dezenas de amostras ao mesmo tempo, os métodos imunológicos, por serem baseados em ligações específicas do tipo antígeno-anticorpo, torna-se necessário o uso de cobaias para produção dos anticorpos específicos, o que tem esbarrado em problemas éticos. Além disso, a produção desses biorreagentes é de elevado custo, a aplicação de um imunoenensaio requer um prévio tratamento das amostras, e o equipamento para leitura normalmente não é portátil, o que impede seu uso *in loco*.<sup>13, 14-17</sup>

Como alternativa, ainda nos anos 1980 surgiram os biossensores, na sua maioria eletroquímicos, sensíveis aos inseticidas organofosforados (OFs). O princípio de ação explorado para desenvolvimento desses biossensores é a inibição da atividade enzimática, causada pela presença desses pesticidas na amostra de alimento ou de água.<sup>18,19</sup> Indubitavelmente, os biossensores baseados na enzima AChE têm sido os mais utilizados para análise de resíduos de pesticidas e em trabalhos de monitoramento ambiental, controle de qualidade e segurança alimentar, devido à sua ultra-sensibilidade, baixo custo operacional e resultados rápidos.<sup>11,20-21</sup>

No presente trabalho pretende-se discutir brevemente o desenvolvimento e a aplicabilidade desses biossensores, estabelecer uma comparação entre os sistemas de detecção

mais antigos e os atuais, e apresentar os desafios relacionados aos protótipos, no que tange à sua portabilidade e automação.

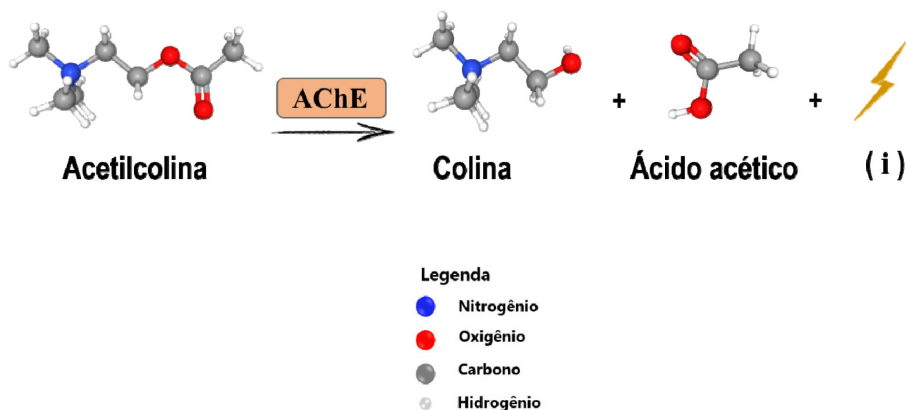
## 2. Os Biossensores Baseados na Enzima AChE: História e Funcionamento

A maior parte dos biossensores voltados à detecção de compostos OFs está na classe dos biossensores eletroquímicos. Um biossensor eletroquímico é um dispositivo autônomo integrado, o qual é capaz de fornecer informação, quantitativa ou semi-quantitativa, específica e analítica, usando um elemento de reconhecimento biológico que é mantido em contato direto com um elemento transdutor eletroquímico.<sup>11,20,22</sup> Os sensores assim formados, em geral, são compostos de sistemas de três canais, com eletrodos de trabalho, auxiliar e de referência, porém alguns protótipos operaram no passado com dois eletrodos, de trabalho e de referência.<sup>22</sup>

O elemento de biorreconhecimento pode ser uma enzima, um anticorpo, uma célula, uma organela, o DNA, um oligonucleotídeo, enfim, qualquer espécie bioquímica, organismo ou parte dele, que seja sensível à presença da substância que está sendo detectada (analito). A maioria dos biossensores até o momento desenvolvidos para detecção de substâncias anticolinesterásicas opera com as enzimas acetilcolinesterase, AChE, e butirilcolinesterase, BChE, estas últimas chamadas de *pseudocolinesterases*.<sup>19,23</sup>

O princípio de detecção desses biossensores baseia-se na reação de hidrólise da acetilcolina (ACh), o substrato natural da AChE, convertendo-a em acetato e colina (Figura 1).<sup>22,23</sup> Inicialmente, ocorre a hidrólise da acetilcolina, formando o complexo enzima substrato, produzindo posteriormente a molécula de colina e a enzima acetilada, que é hidrolisada rapidamente a ácido acético (AOH), liberando então a enzima livre.

Assim, a acetilcolina (ACh) foi o substrato inicialmente explorado no desenvolvimento dos primeiros biossensores eletroquímicos. Um exemplo disso foi o sensor bioenzimático baseado em colinesterase (ChE) e colina



**Figura 1.** Reação de hidrólise da acetilcolina (ACh), em presença da enzima acetilcolinesterase (AChE), produzindo corrente elétrica. Fonte: Autor (2021)

oxidase (ChO), no qual se monitorava, ao final das reações bioquímicas, a quantidade do peróxido de hidrogênio formado, em um potencial fixo de 650 mV, e se controlava a quantidade de oxigênio a ser suprido, num eletrodo de Clark (Figura 2). Esses eletrodos deram origem aos biossensores de primeira geração para detecção de agentes anticolinesterásicos.<sup>20,23</sup>

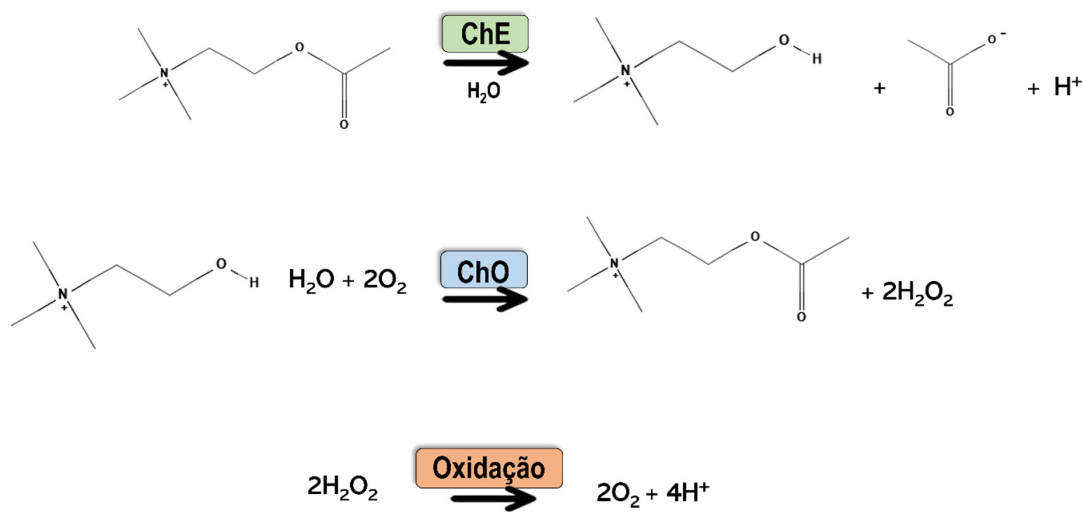
A hidrólise da ACh gera corrente elétrica e, com o intuito de melhorar a resposta do biossensor, optou-se por substituir a acetilcolina (ACh) por acetiltiocolina (ATCh), como substrato, que ao ser hidrolisado forma a tiocolina, que por sua vez dimeriza-se na superfície do eletrodo de trabalho, gerando uma intensidade de corrente duas vezes maior (Figura 3), caracterizando, assim, os biossensores de segunda geração.<sup>20,22,24</sup>

Os sensores eram constituídos de eletrodos de vidro, porém, com o passar do tempo, vieram os sensores tubulares, os sensores produzidos em larga escala pela técnica de

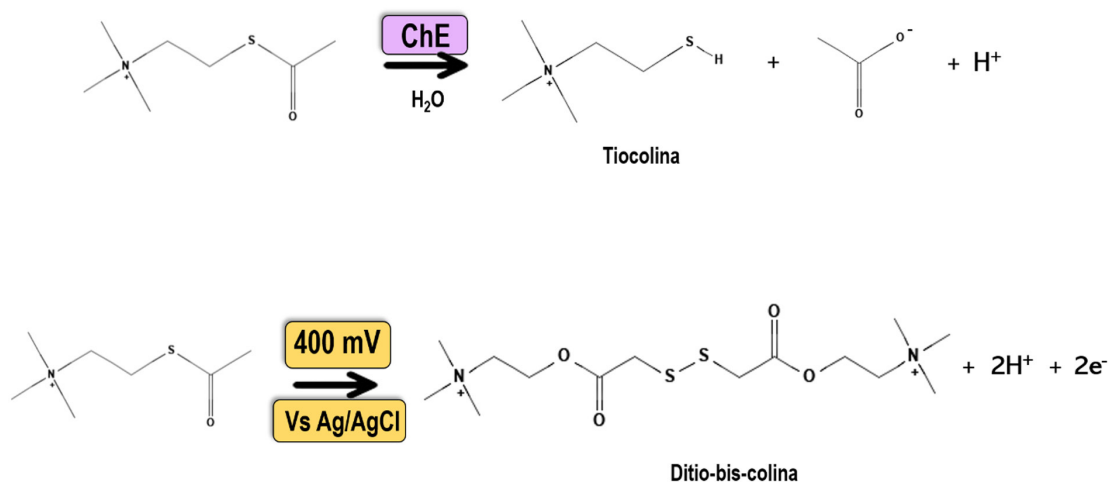
serigrafia e, mais recentemente, os eletrodos à base de nanotubos de carbono.<sup>25-29</sup>

Com o crescente conhecimento dos processos de transferência de elétrons, do meio reacional até o transdutor, foram desenvolvidos sensores mais eficientes e mais sensíveis, mediante incorporação, no eletrodo de trabalho, de mediadores eletroquímicos, substâncias que facilitam o processo de condução eletrônica. O uso de mediadores eletroquímicos levou a um melhoramento significativo na versatilidade de construção destes sistemas, visto que o potencial de trabalho passou então a ser função deste mediador e não mais dos substratos empregados ou dos reagentes gerados no meio reacional.<sup>30-32</sup>

Os mediadores participam do processo de geração de corrente elétrica, uma vez que, no decorrer da hidrólise enzimática do substrato, o produto da reação (a colina ou tiocolina) é reduzido, enquanto o mediador é oxidado, gerando corrente elétrica, que é transportada e detectada no



**Figura 2.** Reações de hidrólise que se processam em sensores bienzimáticos, à base de colinesterase (ChE) e colina oxidase (ChO), com geração de corrente elétrica (sensores de primeira geração). Fonte: Autor (2021)



**Figura 3.** Reação de hidrólise da acetiltiocolina, catalisada pela enzima colinesterase (ChE), seguida da dimerização da tiocolina, com geração de corrente elétrica mais intensa (sensores de segunda geração). Fonte: Autor (2021)

potenciostato (Figura 4).

Os sistemas que incorporam mediadores no eletrodo de trabalho são considerados biossensores de terceira geração.<sup>33</sup> A Figura 5 apresenta estruturas dos mediadores eletroquímicos que têm sido mais empregados como modificadores do eletrodo de trabalho, por ocasião da construção de biossensores à base de enzimas AChE's.

Um dos fatores cruciais na preparação de biossensores enzimáticos é o mecanismo de incorporação da enzima ao eletrodo de trabalho. Dependendo do procedimento de imobilização enzimática, a sensibilidade e a estabilidade do biossensor podem ser modificadas.<sup>26,33</sup> Diversos mecanismos de imobilização da enzima têm sido explorados na produção de biossensores eletroquímicos, desde os mais antigos, como a sua fixação em membranas de nylon e os processos adsorptivos, como os mais atuais, baseados em ligação cruzada com glutaraldeído, fotopolimerização em rede polimérica, como as formadas de grupamentos polivinílicos, entre outros.<sup>34-40</sup>

Patel e colaboradores, 2019<sup>41</sup>, desenvolveram um biossensor à base de AChE construído com nanotubos de carbono, no qual a enzima foi imobilizada em BSA, conferindo melhores condições ao microambiente e melhor atividade da AChE. Independentemente do processo de imobilização, a atividade da enzima AChE, após preparo

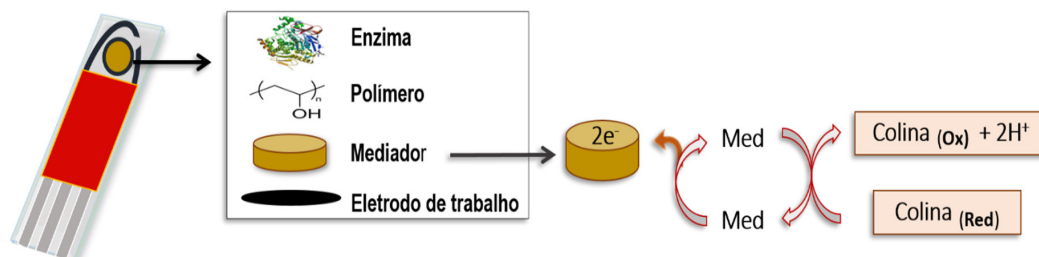
do biossensor, deve ser capaz de produzir uma corrente em um nível que possa ser monitorada ao longo do tempo de reação, por intermédio de um potenciostato, processo conhecido como *cronoamperometria*.<sup>42</sup>

### 3. Princípio Bioquímico da Inibição Enzimática

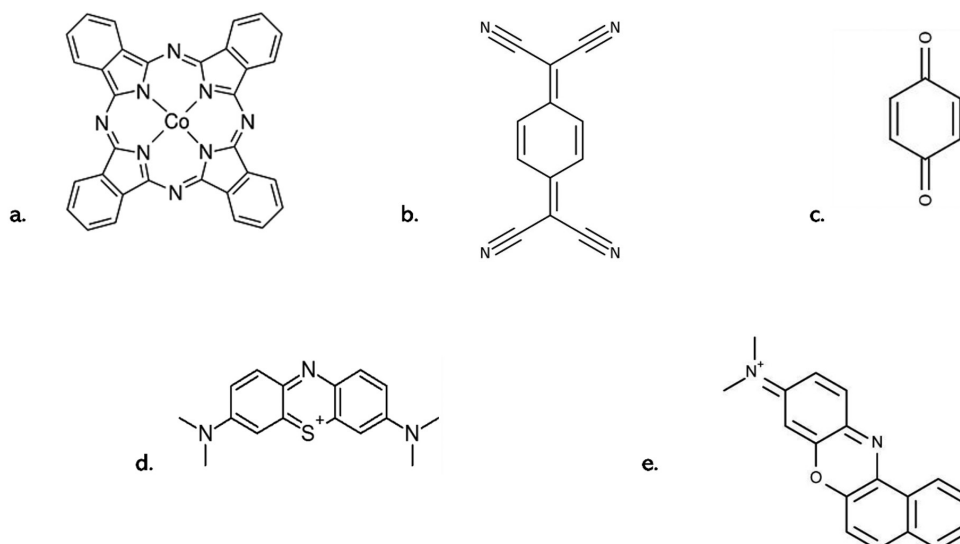
#### 3.1. Organofosforados e a atividade enzimática

Os compostos anticolinesterásicos em geral, são aqueles que quando em contato com a enzima AChE, causam sua inibição reversível ou irreversível, mais precisamente os organofosforados provocam inibição irreversível.<sup>22,43</sup> Atualmente, há a tendência em determinar inibidores enzimáticos de diferentes classes de substâncias tóxicas, incluindo inseticidas, devido à persistência no ambiente, que tais compostos apresentam, além da possibilidade de bioacumulação e seus efeitos nocivos aos seres vivos.<sup>44-46</sup>

A enzima AChE está intrinsecamente ligada às reações sinápticas no sistema nervoso, e sua inibição reflete no bloqueio da neurotransmissão, gerando paralisias nos organismos afetados.<sup>46</sup> O mecanismo de detecção dos OFs é baseado na inibição dessa enzima. No processo de inibição,



**Figura 4.** Papel dos mediadores eletroquímicos como facilitadores da geração e transferência de elétrons, durante a hidrólise enzimática da acetilcolina, catalisada pela enzima AChE, nos biossensores de terceira geração. Fonte: Autor (2021)



**Figura 5.** Mediadores eletroquímicos mais usados na construção de biossensores à base da enzima AChE. (a) Ftalocianina de cobalto; (b) Tetracianoquinodimetano (TCNQ); (c) p-benzoquinona; (d) Azul de metileno; (e) Azul de Meldola.

o grupo hidroxilado serina é bloqueado por átomo de fósforo ligado ao composto organofosforado (Figura 6) ou carbono carbonílico para carbamatos. Por isso, OFs são capazes de ligar-se covalentemente à AChE, de maneira não reversível, diferenciando-se, por exemplo, do processo inibitório promovido por CBMs, que formam complexos menos estáveis com a enzima e podem sofrer descarbamilação.<sup>22,33,46</sup>

A inibição irreversível por OFs causada na enzima, garante o funcionamento de dispositivos que monitorem as concentrações destes pesticidas. Na prática, o monitoramento da inibição enzimática através do uso de biossensores à base de AChE, é realizado mediante registro da intensidade de

corrente elétrica gerada ( $I_0$ ); em seguida, empregando-se o mesmo biossensor realiza-se a medida, sob mesmas condições (mesmo potencial de trabalho, pH do meio, concentração do substrato, potencial de trabalho, etc), porém com o biossensor tendo sido submetido à inibição mediante imersão do mesmo na amostra supostamente contaminada com o inibidor (pesticida) por um determinado período de tempo, e então registra-se o novo valor de corrente ( $I$ ) por reação com o substrato (Figura 7). A diferença percentual entre a primeira medida e a segunda (menor) fornece o grau de inibição relativa percentual ( $IR\%$ ), sendo esta proporcional à concentração do inibidor.<sup>11,40,46</sup>

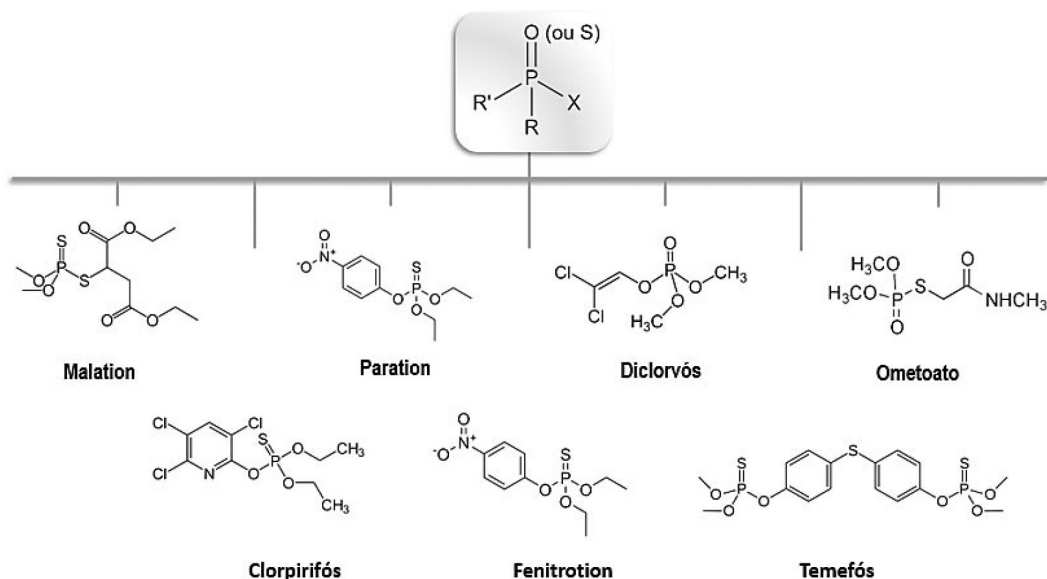


Figura 6. Fórmula geral da classe dos pesticidas organofosforados e estruturas de algumas substâncias. Fonte: Autor (2021)

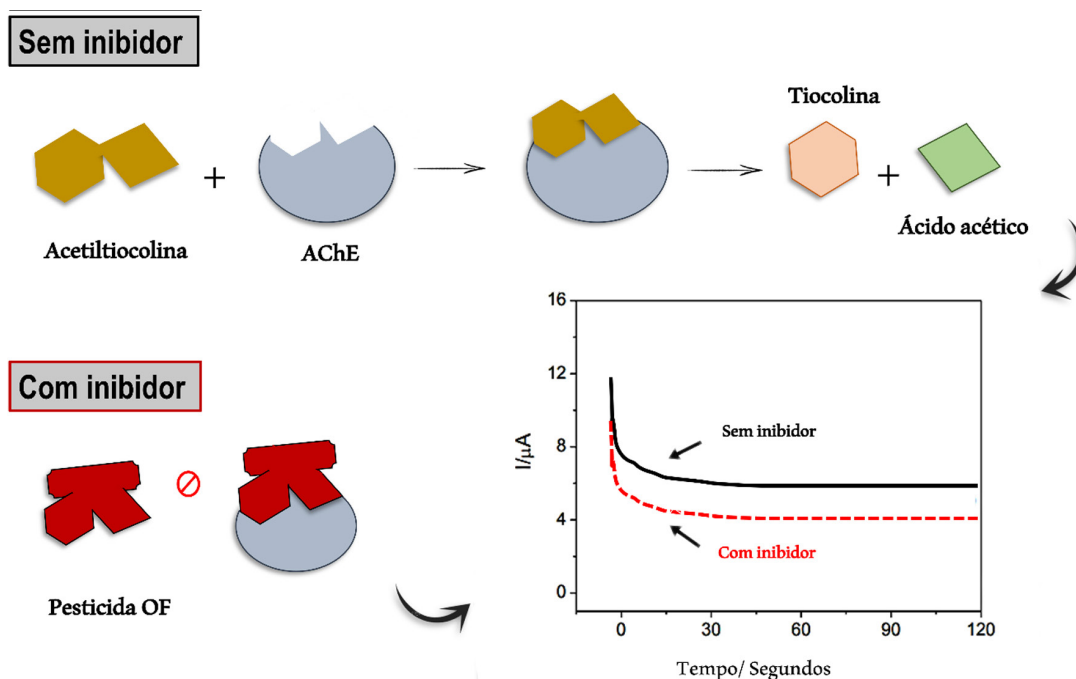


Figura 7. Esquema de inibição da enzima AChE, mediante monitoramento da corrente gerada, antes e após incubação do biossensor na solução ou amostra contendo o pesticida (inibidor). Fonte: Autor (2021)

O princípio dos biossensores está no reconhecimento biológico capacitado por receptores-transdutores, que fornecem um sinal analítico, em geral eletroquímico. A montagem do biossensor depende do direcionamento biológico, das especificidades de detecção de espécies tóxicas e interações. Baseiam-se, pois, na reprodução assistida a partir da atividade inibitória da enzima em contato com inseticidas. Nos protótipos mais modernos e eficazes, tem sido cada vez mais atestada a eficiência da AChE como elemento de bioreconhecimento, pela sua elevada sensibilidade aos pesticidas OFs e CBMs.<sup>22,30,46</sup>

### 3.2. O processo de detecção

Mediante a atividade inibitória exercida pelos pesticidas, são descritas uma variedade de montagens e processos para a elaboração de biossensores. Um dos exemplos é o trabalho que explorou a capacidade de complexação e interação entre grupos hidroxil e amina, conforme a cadeia polimérica de carbono-quitosana mesoporosa (OMC-CS), aliada com óxido de cério a partir das propriedades redox e boa taxa de transferência eletrônica.<sup>45</sup> Esse arranjo propiciou um microambiente favorável à imobilização da enzima AChE em um eletrodo serigrafado, possibilitando a detecção

do inseticida OF clorpirifós. O mesmo biossensor ainda apresentou desvio padrão relativo (DPR) de 4,5% para a repetibilidade no método e estabilidade em relação à corrente inicial variou de 98% a 91,2% a partir do nono ao trigésimo dia de utilização.<sup>45</sup>

Ainda, foi desenvolvido um biossensor para detecção do composto diclorvós, composto de em eletrodo de diamante dopado com boro (BDD).<sup>46</sup> A partir do carbono poroso similar ao favo de mel, e combinando-se nanotubos do tipo AuNPs com líquidos iônicos (ILs), foi produzida uma matriz de imobilização capaz de exercer um efeito sinérgico, impulsionando assim o desempenho do biossensor na adsorção da mistura AChE - soroalbumina bovina (BSA), arranjo este que favoreceu o aumento da resposta eletroquímica. O protótipo apresentou elevada sensibilidade, com limite de detecção de ~ 0,3 nM para o OF, com percentual de 95,42% em relação à corrente inicial após trinta dias de armazenamento, indicando boa estabilidade.

Trabalhos mais recentes têm dado enfoque para a aplicação de nanomateriais, evidenciando a necessidade de padronização dos procedimentos de imobilização enzimática. A Tabela 1 exemplifica alguns sistemas biossensores empregados, bem como os analitos alvos.

**Tabela 1.** Sistemas de biossensores à base de acetilcolinesterase empregados para detecção de OFs e outros agentes anticolinérgicos

Eletrodo	Procedimento de Imobilização Enzimática	Mediador Eletroquímico	Potencial de Trabalho (V)	Limite de detecção (nM)	Analito(s)	Refs.
GCE	Gluteraldeído/SWCNTs	–	+ 0,62	$3,75 \times 10^{-2}$	Metil paration	[29]
SPE	Gluteraldeído/BSA	Tetratiafulvaleno (TTF)	+0,25	200	Codeína	[30]
GCE	BSA	AuNPs	+0,54	0,39	Dimetoato	[33]
SPCE*	CS	CeO <sub>2</sub> - CS/OMS-CS	+0,7	$2,8 \times 10^{-2}$	Clorpirifós	[45]
CGE	Gluteraldeído	TTP	+0,83	17,5	Malation	[47]
GCE	Náfion	AuNPs / GO	+0,57	$8,24 \times 10^{-5}$	Metil malation	[48]
GCE	–	IL / MWCNTs	+0,6	$3,3 \times 10^{-2}$	Monocrotofos	[49]
GCE	Quitosana	TiO <sub>2</sub>	+0,65	0,29	Diclorvós	[50]
GCE	Quitosana	Azul da prússia	+0,32	3,0	Carbaril	[51]
SPE	Quitosana/ MWCNTs	DCHP	+0,85	0,142	Clorpirifós	[52]
SPE	Álcool polivinílico	Sílica mesocelular (MSF)	+0,68	0,2	Monocrotofos	[53]
SPE	Quitosana	Carbon Black	+ 0,3	50	Paraoxon	[54]
SPE	BSA /Náfion	Carbon Black/ CoPC	+0,4	0,7	Paraoxon	[55]
Au-SPE	Cisteamina/ Gluteraldeído	–	+0,4	7,22	Paraoxon	[56]
SPE	–	Azul da prússia/ MWCNTs	+0,2	0,22	Pirimicarb	[57]
SPSE*	BSA	–	0,0	7,13	Clorpirifós	[58]
CGE	–	rGO	0,15	1,9	Carbaril	[59]
CGE	CLDH	GN- AuNPs	0,58	0,14	Clorpirifós	[60]
CGE	–	MWCNTs/ GONPs	+0,7	1,7	Carbaril	[61]
CGE	–	Cl /MWCNTs	+0,6	$2,8 \times 10^{-3}$	Monocrotofos	[62]

Legenda: - Não houve menção no trabalho; \* (Eletrodo de Prata Serigrafado); CGE (Eletrodo de Carbono Vítreo); SPE (Eletrodo Serigrafado); BSA (Albumina de Soro bovino); rGO (óxido de grafeno); CS (Quitosana); OMS (Quitosana mesoporosa); CoPC (Ftalocianina de Cobalto); SWCNTs (Nanotubo de carbono de parede única); AuNPs (Nanopartículas de ouro); MWCNTs (Nanotubos de carbono com paredes múltiplas); IL (Líquido Iônico); CLDH (Hidróxido duplo em camadas calcindas Cu-Mg-Al); GONPs (Nanopartículas de óxido de grafeno); TTP (Poli [2,2,5,5]-Tertiofeno- 3-carbaldeído); DCHP (Diciclohexil ftalato).



#### 4. Estratégias Atuais para Análise de Enzimas: AChE

Dentre os procedimentos envolvendo o monitoramento de atividade inibitória de inseticidas na AChE, destacam-se análises *in vitro*, através de método cromatográfico, espectrofotométrico, e com enfoque nos métodos electroanalíticos descritos aqui, através de biossensores amperométricos.

Nos últimos anos, o uso da nanotecnologia tem sido altamente promissor na melhoria das respostas dos sistemas eletroquímicos. Produzir nanomateriais, investigando determinados parâmetros, tais como quiralidade, metalicidade, comprimento e diâmetro, tem sido também objetivo de vários trabalhos.<sup>19,42,47</sup> Assim, o desenvolvimento de biossensores que incorporam nanomateriais em sua matriz sensível tem possibilitado potencializar a sensibilidade e o tempo de resposta dos protótipos.<sup>47-50</sup>

Géis à base de óxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) normalmente apresentam desvantagens para o aprisionamento de enzimas a eletrodos, devida à baixa adesão e alta fragilidade, resultando em perda de estabilidade do sensor.<sup>51</sup> Entretanto, a partir da combinação deste gel com o biopolímero quitosana foi possível obter nanocompósitos, apresentando uma estratégia eficaz para reforçar a resistência da AChE no sensor, promovendo alto limite de detecção para o inseticida OF diclorvós.

Por isso, tem se tornado cada vez mais comum aliar a peculiaridade dos diversos nanomateriais que apresentam atividade eletroanalítica a superfícies específicas, como por exemplos matrizes poliméricas. Polímeros conjugados (CPs) sintetizados são atrativos para tal aplicabilidade, devido à sua excelente condutividade.<sup>50-56</sup>

Essa estratégia relativamente recente tem possibilitado melhorar a sensibilidade dos biossensores para detecção de agentes anticolinérgicos.<sup>60-62</sup> Por exemplo, para a detecção do inseticida OF paration metílico em amostras de água, foi desenvolvido um sensor do tipo nanotubo contendo, no eletrodo de trabalho, uma pasta composta de nanopartículas sintetizadas de SnO<sub>2</sub> e nanotubo de carbono com paredes múltiplas (MWCNTs), tendo sido o contato elétrico feito por um fio de cobre e a enzima AChE imobilizada mediante ligação cruzada com glutaraldeído. Com detecção amperométrica em potencial de trabalho de + 0,8 V, e baseando-se na inibição provocada pelo inseticida, foi obtido um limite de detecção de 0,1 µM.<sup>63</sup>

Em outro trabalho, um biossensor foi produzido à base da enzima organofosforado hidrolase (OPH), purificada e extraída a partir das células da bactéria *Brevundimonas diminuta* e imobilizada com glutaraldeído em uma célula eletroquímica de PVC. O eletrodo de trabalho consistiu em uma pasta de nanotubo de carbono e fio de Ag, e as medidas amperométricas foram realizadas fixando-se o potencial de trabalho a + 0,8 V. A faixa linear obtida para o inseticida paration metílico foi de 0,1-200µM, e o biossensor foi comprovadamente seletivo e estável.<sup>64</sup>

Recentes estratégias, incluindo modelagem computacional, têm sido empregadas de modo preliminar aos estudos envolvendo enzimas em geral, incluindo a AChE e anticolinérgicos. Assim, ressalta-se o uso de análises *in silico*, mais especificamente a docagem molecular para avaliação de ligantes e macromoléculas.

Desse modo, a docagem molecular propicia uma avaliação das estruturas alvo referentes às interações moleculares nos sítios ativos da enzima durante o processo de catálise enzimática, bem como acerca de qualquer inibição enzimática, seja por fármacos ou pesticidas.<sup>65-67</sup> A docagem molecular indica a natureza das interações entre as moléculas e a enzima acetilcolinesterase, tal ferramenta computacional promove por simulação o detalhamento de reações bioquímicas a nível atômico, como também faz a previsão quanto ao sítio ativo que haverá melhor interação com substrato, e qual será mais afetado quando em presença de um possível inibidor.<sup>68,70</sup>

Dessa forma, Ali *et al.*, (2018) descreveram em estrutura 3D a modelagem molecular da AChE, tanto em presença de substrato, quanto posteriormente, a influência dos pesticidas OPs malation, carbaril, metomil e carbofuran-3-hidroxil no sítio ativo da enzima. Foi comprovado que a macromolécula da enzima possui 604 aminoácidos, e que o sítio ativo constituinte de grupo hidroxila fenólico apresentou melhor afinidade com o substrato, correspondendo também à maior sensibilidade da AChE em relação aos inibidores, comprovada pelos escores e energia de ligação.<sup>69</sup>

Zhang *et al.*, 2019<sup>71</sup>, desenvolveram um sensor a base de grafeno e modificado com AChE, a fim de avaliar a quiralidade dos compostos (+)/(-)- metamidofós e quando monitorado com o dispositivo, confrontando com a avaliação de interação molecular desses compostos em relação ao grafeno e a acetilcolinesterase. A docagem molecular determinou que houve interação do grafeno e AChE com os respectivos enantiômeros, que propiciou a detecção simultânea pelo dispositivo dos dois compostos, com seletividade de 0,34 µg/L e 0,32 µg/L para (+)/(-)- metamidofós, respectivamente.

Além disso, há simulações por métodos matemáticos capazes de estabelecerem as melhores condições operacionais, a fim de potencializar as reações envolvendo enzimas imobilizadas em diversas plataformas; interação enzima- substrato, quando em presença ou não de inibidor. Também, diversos parâmetros são investigados e estabelecidos durante a produção de biossensores, como por exemplo, a etapa crucial de imobilização enzimática.<sup>72-74</sup>

A aplicação de algoritmos quimiométricos para fabricação de biossensores, viabiliza a produção em massa de tais dispositivos, intensificando a reprodutibilidade destes. Quanto a otimização de preparo de biossensores é possível estabelecer por métodos de transferências de calibração multivariada a partir de conjuntos não idênticos.<sup>74</sup> Essa ferramenta determina uma série de condições preliminares que otimizam a produção de biossensores a base de AChE, cuja tendência é minimizar

erros experimentais, otimizar o tempo durante o preparo destes dispositivos, e conseqüentemente, diminuir custos durante a produção.

Khadem *et al.*, 2020, estabeleceram método de detecção eletroquímica de pesticidas através de sensores voltamétricos com abordagem estatística multivariada, quando otimizadas as condições operacionais de voltametria de onda quadrada. Foi efetuado um planejamento fatorial fracionário para averiguar os efeitos das variáveis na resposta do sensor, que possibilitou limites de detecção de 27 nM e 41 nM para diazinon e dicloran, respectivamente.<sup>75</sup>

Ademais, o estudo estabelecido por Ribeiro *et al.*, 2021, descreveu um levantamento acerca da prospecção tecnológica quanto ao desenvolvimento de biossensores enzimáticos para detecção de pesticidas. Foi estipulado que majoritariamente entre os anos de 1991-2020, o maior quantitativo de publicações (em forma de artigos - encabeçando 89,3%), tiveram foco no desenvolvimento de biossensores a base das Colinesterases, a saber, Acetilcolinesterase (AChE), seguido de Glutathione-S-Transferase, entre outras enzimas.<sup>76</sup>

## 5. Avanços e Perspectivas

Acredita-se que com os avanços dos biossensores de terceira geração, a incorporação de um mediador eletroquímico que facilite o processo de transferência de elétrons, há uma tendência para o desenvolvimento de materiais cada vez mais compatíveis com o ambiente natural e propício para atividade da acetilcolinesterase. A produção de biossensores sensíveis tende a ter um enfoque em aspectos como a avaliação química, morfológica e eletroquímica de tais materiais.

Além disso, aliar avaliação *in silico*, como a docagem molecular, evidencia uma abordagem cada vez mais precisa quanto às interações de diversos inibidores da enzima. Também, a utilização de métodos matemáticos, que definam os parâmetros fundamentais nas etapas de produção de biossensores sensíveis na detecção desses inibidores, com enfoque nos pesticidas OFs, para minimizar cada vez mais os efeitos nocivos dessas substâncias.

Acerca da sensibilidade dos biossensores a base de AChE é indubitável que, devido a reação irreversível provocada por inibidores, este fator também está intrinsecamente relacionado à alta sensibilidade da enzima em questão, como os discutidos no presente trabalho. Quanto a detecção de pesticidas por biossensores enzimáticos, apesar da dependência do detector, nesse caso o potenciostato/galvanostato, quando comparado a demais técnicas, como por exemplo a cromatográfica, os biossensores enzimáticos são capazes de fornecerem alta sensibilidade, por menores custos operacionais.

Há uma série de possibilidades para a determinação e o monitoramento destes pesticidas, podendo ser realizadas análises diretamente *in loco* ou na matriz de suspeita de

contaminação, seja em rios, alimentos, amostras biológicas, abrindo precedentes também para monitoramento atmosférico, uma vez que os biossensores são facilmente transportados e, portanto, acopláveis a suportes que viabilizem tais análises, como por exemplo, os drones.

## Referências Bibliográficas

1. Grung, M.; Lin Y.; Zhang, H.; Steen, A.O.; Huang, J.; Zhang, G.; Larssen, T.; Pesticide levels and environmental risk in aquatic environments in China—A review. *Environment International* **2015**, *81*, 87. [Crossref] [PubMed]
2. Kim, K. H.; Kabir, E.; Jahan, S. A.; Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the Total Environment* **2017**, *575*, 525. [Crossref] [PubMed]
3. Bolzonella, C.; Lucchetta, M.; Teo, G.; Boatto, V.; Zanella, A.; Is there a way to rate insecticides that is less detrimental to human and environmental health? *Global Ecology and Conservation* **2019**, *20*, 1. [Crossref]
4. Sankoh, A. I.; Whittle, R.; Semple, K. T.; Jones, K. C.; Sweetman, A. J.; An assessment of the impacts of pesticide use on the environment and health of rice farmers in Sierra Leone. *Environment International* **2016**, *94*, 458. [Crossref]
5. Lozowicka, B.; Health risk for children and adults consuming apples with pesticide residue. *Science of the Total Environment* **2015**, *502*, 184. [Crossref]
6. García-garcía, C. R.; Parrón, T.; Requena, M.; Alarcón, R.; Tsatsakis, A. M.; Hernández, A. F.; Occupational pesticide exposure and adverse health effects at the clinical, hematological and biochemical level. *Life Sciences* **2016**, *145*, 274. [Crossref] [PubMed]
7. Huang, Q.; Wang, Y.; Li, L.; Xu, Z.; Zhang, W.; Photoelectrochemical biosensor for acetylcholinesterase activity study based on metal oxide semiconductor nanocomposites. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2016**, *781*, 377. [Crossref]
8. Silva, R. A. G.; Faria, A. M.; Determinação de multiresíduos de agrotóxicos em méis produzidos na região do triângulo mineiro por UHPLC-MS/MS. *Química Nova* **2020**, *43*, 307. [Crossref]
9. Shamagsumova, R. V.; Shurpik, D. N.; Padnya P. L.; Stoikov I. I.; Evtugyn G. A.; Acetylcholinesterase biosensor for inhibitor measurements based on glassy carbon electrode modified with carbon black and pillar [5] arene. *Talanta* **2015**, *144*, 559. [Crossref]
10. Yusa, V.; Millet, M.; Coscolla, C.; Roca, M.; Analytical methods for human biomonitoring of pesticides. A review. *Analytica Chimica Acta* **2015**, *891*, 15. [Crossref]
11. Araújo, C. R. M.; Santos, V. L. A.; Gonsalves, A. A.; Acetilcolinesterase-AChE: uma enzima de interesse farmacológico. *Revista Virtual de Química* **2016**, *8*, 1818. [Crossref]
12. Zamora-Sequeira, R.; Starbird-Pérez, R.; Rojas-Carillo, O.; Vargar-Villalobos, S.; What are the main sensor methods for quantifying pesticides in agricultural activities? A review. *Molecules* **2019**, *24*, 2659. [Crossref] [PubMed]



13. Nunes, G. S.; Métodos imunquímicos para análise de contaminantes ambientais: conceitos, estado da arte e perspectivas. *Química Nova* **2005**, *28*, 462. [[Crossref](#)]
14. Morozova, V. S.; Levashova, A. I.; Eremin, S. A.; Determination of pesticides by enzyme immune assay. *Journal of Analytical Chemistry* **2005**, *60*, 202. [[Crossref](#)]
15. Deepak, T. S.; Rashmi, S.; Manonmani, H. K.; Comparison of colorimetric and chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of endosulfan in food samples. *Luminescence* **2015**, *30*, 1274. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
16. Tavares, T. C. F.; Soares, P. M.; Neves, J. H. F. F.; Soares, M. M.; Junior, A. F.; Souza, D. L. N.; Ávila, V. M. R.; Lima-Ribeiro, A. M. C.; Produção e purificação de imunoglobulinas Y policlonais anti-Leptospira spp. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **2013**, *33*, 1097. [[Crossref](#)]
17. Chen, G.; Jin, M.; Du, P.; Zhang, C.; Cui, X.; Zhang, Y.; She, Y.; Shao, H.; Jin, S.; Wang, S.; Zheng, L.; Wang, J.; A sensitive chemiluminescence enzyme immunoassay based on molecularly imprinted polymers solid-phase extraction of parathion. *Analytical Biochemistry* **2017**, *530*, 87. [[Crossref](#)]
18. Kim, Y. J.; Kim, Y. A.; Lee, Y. T.; Lee, H. S.; Enzyme-linked immunosorbent assays for the insecticide fenitrothion: influence of hapten conformation and sample matrix on assay performance. *Analytica Chimica Acta* **2007**, *591*, 183. [[Crossref](#)]
19. Pundir, C. S.; Chauhan, N.; Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. *Analytical Biochemistry* **2012**, *429*, 19. [[Crossref](#)]
20. Verma, N.; Bhardwaj, A.; Biosensor technology for pesticides—a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2015**, *175*, 3093. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
21. Stepurska, K. V.; Soldatkin, O. O.; Kucherenko I. S.; Arkhypova, V. M.; Dzyadevych, S. V.; Soldatkin, A. P.; Feasibility of application of conductometric biosensor based on acetylcholinesterase for the inhibitory analysis of toxic compounds of different nature, *Analytica Chimica Acta* **2015**, *854*, 161. [[Crossref](#)]
22. Thévenot, D. R.; Toth, K.; Durst, R. A.; Wilson, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry* **1999**, *71*, 2333. [[Crossref](#)]
23. Marques, P. R. B. O.; Yamanaka, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. *Química Nova* **2008**, *31*, 1791. [[Crossref](#)]
24. Nunes, G. S.; Determinação de pesticidas utilizando biossensores a base de enzimas colinesterases: Uma revisão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente* **1996**, *6*, 13. [[Crossref](#)]
25. Pereira, A. C.; Santos, A. S.; Kubota, L. T.; Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Química Nova* **2002**, *25*, 1012. [[Crossref](#)]
26. Taleat, Z.; Khoshroo, A.; Mazloum-ardakani, M. Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008–2013). *Microchimica Acta* **2014**, *181*, 865. [[Crossref](#)]
27. Uniyal, S.; Sharma, R. K.; Technological advancement in electrochemical biosensor based detection of organophosphate pesticide chlorpyrifos in the environment: A review of status and prospects. *Biosensors and Bioelectronics* **2018**, *116*, 37. [[Crossref](#)]
28. Nascimento, V. B.; Angnes, L.; Eletrodos fabricados por “silkscreen”. *Química Nova* **1998**, *21*, 614. [[Crossref](#)]
29. Kumar, T. H. V.; Sundramoorthy, A. K.; Electrochemical biosensor for methyl parathion based on single-walled carbon nanotube/glutaraldehyde crosslinked acetylcholinesterase-wrapped bovine serum albumin nanocomposites. *Analytica Chimica Acta* **2019**, *1074*, 131. [[Crossref](#)]
30. Asturias-arribas, L.; Alonso-Lomillo, A.; Domíguez-Renedo, M.; Arcos-Martínez, J.; Screen-printed biosensor based on the inhibition of the acetylcholinesterase activity for the determination of codeine. *Talanta* **2013**, *111*, 8. [[Crossref](#)]
31. Jiang, B.; Dong, P.; Zheng, J.; A novel amperometric biosensor based on covalently attached multilayer assemblies of gold nanoparticles, diazo-resins and acetylcholinesterase for the detection of organophosphorus pesticides. *Talanta* **2018**, *183*, 114. [[Crossref](#)]
32. Lang, Q.; Han, L.; Hou, C.; Wang, F.; Liu, A. A sensitive acetylcholinesterase biosensor based on gold nanorods modified electrode for detection of organophosphate pesticide. *Talanta* **2016**, *156*, 34. [[Crossref](#)]
33. Rueda, N.; Santos, J. C. S.; Ortiz, C.; Torre, R.; Barbosa, O.; Rodrigues, R. C.; Berenguer-Murcia, A.; Fernandez-Lafuente, R.; Chemical modification in the design of immobilized enzyme biocatalysts: Drawbacks and opportunities. *The Chemical Record* **2016**, *16*, 1436. [[Crossref](#)]
34. Raghu, P.; Reddy, T. M.; Swamy, B. E. K.; Chandrashekar, B. N.; Reddaiah, K.; Sreedhar, M.; Development of AChE biosensor for the determination of methyl parathion and monocrotophos in water and fruit samples: A cyclic voltammetric study. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2012**, *665*, 76. [[Crossref](#)]
35. Mohammed, S.; Lamoree, M.; Ansa-Asare, O. D.; Boer, J.; Review of the analysis of insecticide residues and their levels in different matrices in Ghana. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2019**, *171*, 361. [[Crossref](#)]
36. Albareda-sirvent, M.; Merkoci, A.; Alegret, S.; Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2000**, *69*, 153. [[Crossref](#)]
37. Karey, K. P.; Sirbasku, D. A. Glutaraldehyde fixation increases retention of low molecular weight proteins (growth factors) transferred to nylon membranes for western blot analysis. *Analytical Biochemistry* **1989**, *178*, 255. [[Crossref](#)]
38. Moyo, M.; Okonkwo, J. O.; Agyei, N. M.; Recent advances in polymeric materials used as electron mediators and immobilizing matrices in developing enzyme electrodes. *Sensors* **2012**, *12*, 923. [[Crossref](#)]
39. Yoon, Y. J.; Li, K. H. H.; Low, Y. Z.; Yoon, J.; Huan Ng, S.; Microfluidics biosensor chip with integrated screen-printed electrodes for amperometric detection of nerve agent. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2014**, *198*, 233. [[Crossref](#)]
40. Warner, J.; Andreescu, S.; An acetylcholinesterase (AChE) biosensor with enhanced solvent resistance based on chitosan for the detection of pesticides. *Talanta* **2016**, *146*, 279. [[Crossref](#)]

41. Kumar, T. H. V.; Sundramoorthy, A. K.; Electrochemical biosensor for methyl parathion based on single-walled carbon nanotube/glutaraldehyde crosslinked acetylcholinesterase-wrapped bovine serum albumin nanocomposites. *Analytica Chimica Acta* **2019**, *1074*, 131. [[Crossref](#)]
42. Patel, H.; Rawtani, D.; Agrawal, Y. K.; A newly emerging trend of chitosan-based sensing platform for the organophosphate pesticide detection using Acetylcholinesterase-a review. *Trends in Food Science & Technology* **2019**, *85*, 78. [[Crossref](#)]
43. Crew, A.; Lonsdale, D.; Byrd, N.; Pittson, R.; Hart, J. P.; A screen-printed, amperometric biosensor array incorporated into a novel automated system for the simultaneous determination of organophosphate pesticides. *Biosensors and Bioelectronics* **2011**, *26*, 2847. [[Crossref](#)]
44. Yao, Y.; Wang, G.; Chu, G.; An, Z.; Gui, Y.; Sun, X.; The development of a novel biosensor based on gold nanocages/graphene oxide–chitosan modified acetylcholinesterase for organophosphorus pesticide detection. *New Journal of Chemistry* **2019**, *43*, 13816. [[Crossref](#)]
45. Fu, J.; Zhang, Q.; Shi, Z.; Guo, Y.; Li, F.; Zhang, Y.; Sun, X.; Sensitive Acetylcholinesterase Biosensor Based on Screen-Printed Carbon Electrode Modified with Cerium Oxide-Chitosan/Mesoporous Carbon–Chitosan for Organophosphorus Pesticide Residue Detection. *International Journal of Electrochemical Science* **2018**, *13*, 9231. [[Crossref](#)]
46. Wei, M.; Wang, J.; A novel acetylcholinesterase biosensor based on ionic liquids–AuNPs-porous carbon composite matrix for detection of organophosphate pesticides. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2015**, *211*, 290. [[Crossref](#)]
47. Guler, M.; Turkoglu, V.; Kivrak, A.; Electrochemical detection of malathion pesticide using acetylcholinesterase biosensor based on glassy carbon electrode modified with conducting polymer film. *Environmental Science and Pollution Research* **2016**, *23*, 12343. [[Crossref](#)]
48. Dong, P.; Jiang, B.; Zheng, J.; A novel acetylcholinesterase biosensor based on gold nanoparticles obtained by electroless plating on three-dimensional graphene for detecting organophosphorus pesticides in water and vegetable samples. *Analytical Methods* **2019**, *11*, 2428. [[Crossref](#)]
49. Bin, Z.; Yanhong, C.; Jiaojiao, X.; Jing, Y.; Acetylcholinesterase biosensor based on functionalized surface of carbon nanotubes for monocrotophos detection. *Analytical Biochemistry* **2018**, *560*, 12. [[Crossref](#)]
50. Cui, H.; Wu, W. W.; Li, M. M.; Song, X.; Lv, Y.; Zhang, T. T.; A highly stable acetylcholinesterase biosensor based on chitosan-TiO<sub>2</sub>-graphene nanocomposites for detection of organophosphate pesticides. *Biosensors and Bioelectronics* **2018**, *99*, 223. [[Crossref](#)]
51. Song, Y.; Zhang, M.; Wang, I.; Wan, L.; A novel biosensor based on acetylcholinesterase/prussianblue–chitosan modified electrode for detection of carbaryl pesticides. *Electrochimica Acta* **2011**, *56*, 7267. [[Crossref](#)]
52. Chen, D.; Liu, Z.; Fu, J.; Guo, Y.; Sun, X.; Yang, Q.; Wang, X.; Electrochemical acetylcholinesterase biosensor based on multi-walled carbon nanotubes/dicyclohexyl phthalate modified screen-printed electrode for detection of chlorpyrifos. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2017**, *801*, 185. [[Crossref](#)]
53. Wu, S.; Zhang, L.; Qi, L.; Tao, S.; Lan, X.; Liu, Z.; Meng, C.; Ultra-sensitive biosensor based on mesocellular silica foam for organophosphorous pesticide detection. *Biosensors and Bioelectronics* **2011**, *26*, 2864. [[Crossref](#)]
54. Talarico, D.; Arduini, F.; Amine, A.; Cacciotti, I.; Moscone, D.; Paleschi, G.; Screen-printed electrode modified with carbon black and chitosan: a novel platform for acetylcholinesterase biosensor development. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2016**, *408*, 7299. [[Crossref](#)]
55. Cinti, S.; Neagu, D.; Carbone, M.; Cacciotti, I.; Moscone, D.; Arduini, F. Novel carbon black-cobalt phthalocyanine nanocomposite as sensing platform to detect organophosphorus pollutants at screen-printed electrode. *Electrochimica Acta* **2016**, *188*, 574. [[Crossref](#)]
56. Arduini, F.; Guidone, S.; Amine, A.; Paleschi, G.; Moscone, D.; Acetylcholinesterase biosensor based on self-assembled monolayer-modified gold-screen printed electrodes for organophosphorus insecticide detection. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2013**, *179*, 201. [[Crossref](#)]
57. Chai, Y.; Niu, X.; Chen, C.; Zhao, H.; Lan, M.; Carbamate insecticide sensing based on acetylcholinesterase/Prussian blue-multi-walled carbon nanotubes/screen-printed electrodes. *Analytical Letters* **2013**, *46*, 803. [[Crossref](#)]
58. Tang, W.; Fan, Kai; Zhou, J.; Wu, J.; Ji, F.; Unmodified screen-printed silver electrode for facile detection of organophosphorus pesticide. *Ionics* **2015**, *21*, 587. [[Crossref](#)]
59. Silva, M. K. L.; Vanzela, H. C.; Defavari, L. M.; Cesarino, I.; Determination of carbamate pesticide in food using a biosensor based on reduced graphene oxide and acetylcholinesterase enzyme. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2018**, *277*, 555. [[Crossref](#)]
60. Zhai, C. Guo, Y.; Sun, X.; Zheng, Y.; Wang, X.; An acetylcholinesterase biosensor based on graphene–gold nanocomposite and calcined layered double hydroxide. *Enzyme and Microbial Technology* **2014**, *58*, 8. [[Crossref](#)]
61. Liu, Q.; Fei, A.; Huan, J.; Mao, H.; Wang, K.; Effective amperometric biosensor for carbaryl detection based on covalent immobilization acetylcholinesterase on multiwall carbon nanotubes/graphene oxide nanoribbons nanostructure. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2015**, *740*, 8. [[Crossref](#)]
62. Jiaojiao, X.; Bin, Z.; Pengyun, W.; Qing, L.; Xin, Shen.; Rui, J.; Acetylcholinesterase biosensors based on ionic liquid functionalized carbon nanotubes and horseradish peroxidase for monocrotophos determination. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **2019**, *43*, 1. [[Crossref](#)]
63. Dhull, V.; Fabrication of AChE/SnO<sub>2</sub>-cMWCNTs/Cu nanocomposite-based sensor electrode for detection of methyl parathion in water. *International Journal of Analytical Chemistry* **2018**, *2018*, 1. [[Crossref](#)]
64. Gothwal, A.; Beniwal, P.; Dhull, V.; Hooda, V.; Preparation of electrochemical biosensor for detection of organophosphorus pesticides. *International Journal of Analytical Chemistry* **2014**, *2014*, 1. [[Crossref](#)]
65. Lu, X.; Tao, L.; Song, D.; Li, Y.; Gao, F.; Bimetallic Pd@ Au nanorods based ultrasensitive acetylcholinesterase biosensor for determination of organophosphate pesticides. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2018**, *255*, 2575. [[Crossref](#)]

66. Zhang, P.; Sun, T.; Rong, S.; Zeng, D.; Yu, H.; Zhang, Z.; Chang, D.; Pan, H.; A sensitive amperometric AChE-biosensor for organophosphate pesticides detection based on conjugated polymer and Ag-rGO-NH<sub>2</sub> nanocomposite. *Bioelectrochemistry* **2019**, *127*, 163. [[Crossref](#)]
67. Özbek, H.; Güvenalp, Z.; Gülderen, Y.; Yerdelen, K. Ö.; Kazaz, C.; Demirezerm Ö. L.; *In vitro* anticholinesterase activity and molecular docking studies of coumarin derivatives isolated from roots of Heptapteracilicica. *Medicinal Chemistry Research* **2018**, *27*, 538. [[Crossref](#)]
68. Yar, M.; Arshad, M.; Farooq, A.; Gilani, M.A.; Ayub, K.; Ejaz, A.; Kumar, A.; Ninomiya, I.; Synthesis and DPPH scavenging assay of reserpine analogues, computational studies and in silico docking studies in AChE and BChE responsible for Alzheimer's disease. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2015**, *51*, 53. [[Crossref](#)]
69. Ali, R.; Sadoqi, M.; Moller, S.; Boutajangout, A.; Mezei, M.; Molecular dynamics and docking studies on Acetylcholinesterase (AChE) inhibitors. *Biophysical Journal* **2018**, *114*, 340a. [[Crossref](#)].
70. Malinak, D.; Nepovimova, E.; Jun, D.; Musilek, K.; Kuca, K.; Novel Group of AChE Reactivators—Synthesis, *In Vitro* Reactivation and Molecular Docking Study. *Molecules* **2018**, *23*, 1. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
71. Zhang, Y.; Lui, X.; Qiu, S.; Zhang, Q.; Tang, W.; Liu, H.; Guo, Y.; Ma, Y.; Guo, X.; Liu, Y.; A flexible acetylcholinesterase-modified graphene for chiral pesticide sensor. *Journal of the American Chemical Society* **2019**, *141*, 14643. [[Crossref](#)]
72. Kumar, V.; Saha, A.; Roy, K. In silico modeling for dual inhibition of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) enzymes in Alzheimer's disease. *Computational Biology and Chemistry* **2020**, *88*, 1. [[Crossref](#)]
73. Becker, M. M.; Ribeiro, E. B.; Marques, P. R. B. O.; Marty, J. L.; Nunes, G. S.; Catanante, G.; Development of a highly sensitive xanthine oxidase-based biosensor for the determination of antioxidant capacity in Amazonian fruit samples. *Talanta* **2019**, *204*, 626. [[Crossref](#)]
74. Martynko, E.; Kirsanov, D.; Application of Chemometrics in Biosensing: A Brief Review. *Biosensors* **2020**, *10*, 1. [[Crossref](#)]
75. Khadem, M.; Faridbod, F.; Foroushani, A. R.; Norouzi, P.; Ganjali, M. R.; Shahtaheri, S. J.; Yarahmadi, R.; A Multivariate Statistical Approach to Determine the Most Effective Factors for Biological Monitoring of Pesticides Using Voltammetric Sensors. *International Journal of Occupational Hygiene* **2020**, *12*, 24. [[Crossref](#)]
76. Ribeiro, E. B.; Ribeiro, D. B.; Costa, A. R. C.; Kano, R. S.; Blasques, R. V.; Marques, P. R. B. O.; Neta, R. N. F. C.; Nunes, G. S.; Biossensores enzimáticos para determinação de pesticidas. *Revista GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias* **2021**, *11*, 5835. [[Crossref](#)]