

METODE ENZIMATICE DE DETERMINARE A UNOR METALE GRELE DE IMPORTANȚĂ CLINICĂ

A. Ciucu*, Carmela Negulescu**, C. Ciucu***, V. Magearu****

REZUMAT

În această lucrare se prezintă aplicațiile reacțiilor enzimatică bazate pe inhibiție pentru detecția metalelor grele. Determinarea metalelor grele se bazează pe reacția lor inhibitorie asupra a diferite enzime (ureaza, invertaza, xantin-oxidaza, peroxidaza, glucoz-oxidaza, butirilcolinesteraza și fosfataza alcalină). În acest scop au fost folosite diferite tehnici de determinare cum sunt: amperometrice, potențiometrice, spectrofotometrice, fluorimetrice sau calorimetrice.

Cuvinte cheie: metale grele, inhibiție, activitate enzimatică, clinic

ABSTRACT

Enzymatic methods for heavy metals detection with clinical relevance

The analytical application of inhibition of enzymatic reaction for heavy metals detection is reviewed. The determination of heavy metals is based on their inhibition action on various enzymes (urease, invertase, xanthine oxidase, peroxidase, glucose oxidase, butyrylcholinesterase and alkaline phosphatase). Numerous detection techniques were used, e.g., amperometry, potentiometry, spectrophotometry, fluorimetry or thermometry.

Key words: heavy metals, inhibition, enzymatic activity, clinical

INTRODUCERE

Metalele grele constituie o componentă foarte importantă în cadrul mediului, datorită implicării lor în multe procese naturale și industriale. Prezența metalelor grele în produsele chimice și reziduale ale societății moderne care sunt eliberate în mediu conduce la participarea lor în ciclul natural biogeochimic. Spre deosebire de compușii organici, metalele nu sunt biodegradabile, urmând un ciclu biogeochimic trecând prin stadiile terestru, acvatic și atmosferic, implicând desigur și organismele umane care preiau metalele în mod predominant din hrană și apă. O serie de metale, ca de exemplu Cu, Zn, Cr, Ni, Co, Se, într-o anumită concentrație sunt esențiale pentru om. Altele, cum ar fi As, Sb, Bi, Al, Tl nu prezintă o importanță biochimică dar, peste o anumită valoare de concentrație, pot genera efecte toxice marcante. Dintre cele mai răspândite și toxice metale se menționează Cd, Pb și Hg, elementele menționate fiind prezente și în alimente la valori de concentrații mici (mg/Kg-ng/Kg) [3-6]

Determinarea compușilor chimici toxici, care include și determinările ionilor metalelor grele, este de mare importanță pentru domeniile medicinei clinice, igienei industriale și al controlului sănătății publice, ca și în monitorizarea mediului înconjurător. Determinările se efectuează în medii complexe și de aceea sunt necesare metode selective și sensibile. Metoda cea mai utilizată pentru detecția metalelor o reprezintă spectrometria de absorbție atomică (AAS). Alte metode instrumentale utilizate în acest scop sunt metodele potențiometrice și voltametrice (în special voltametria de stripping anodic-ASV), metoda plasmei cuplate inductiv (ICP) și analiza activării prin neutroni (NAA); deasemenea metodele tandem ca de exemplu ICP-MS sunt tehnici care oferă avantaje analitice unice, fiind extrem de sensibile. Eliminarea interferențelor și îndepărtarea diferitelor efecte complexe

de matrice din cadrul probelor de mediu și biologice impun o serie de procedee de pretratere a probelor, așa cum este de exemplu preconcentrarea care este inevitabilă, date fiind concentrațiile scăzute ale majorității elementelor în probele naturale și biologice, ceea ce contribuie la dificultatea determinării și cuantificării lor directe prin tehnicile convenționale. Metalele pot fi îmbogățite în soluții apoase printr-o gamă largă de procedee [12].

METODE BAZATE PE ENZIME CA REACTIVI ANALITICI

Evaluarea caracteristicilor toxicității substanțelor trebuie să implice un sistem biochimic, a cărui activitate va descrește în timp ce toxicitatea crește. De aceea, atât enzimele cât și organismele vii pot fi folosite pentru determinarea toxicității, dovedindu-se că activitatea unor astfel de sisteme biologice poate fi utilizată în scopul menționat.

Spre deosebire de metodele chimice de determinare, metodele enzimatică par a fi mai simple și mai sensibile [12]. Totuși aceste metode suferă de lipsa unei specificități deoarece există mulți compuși care conduc la inhibarea activității enzimatică. După cum s-a menționat, lipsa de specificitate poate conduce totuși la evaluarea unui indice global de toxicitate.

Inhibiția ureazei a fost cea mai studiată reacție, ea având aplicații în determinarea metalelor prin diferite metode. Enzima este inhibată de ionii de mercur, cupru, argint, cadmiu, fier, nichel, cobalt, mangan, zinc și crom(VI).

Detecția electrochimică a stat la baza determinării ionilor metalelor grele care inhibă activitatea unor enzime, ca de exemplu: glucoz-oxidaza (Hg, Cu, Ag sau Cu și Mn), peroxidaza (Ni, Co, Mn), acetil- (Cu, Hg) sau butiril-ChE

* Prof. dr. Anton Ciucu, Catedra de Chimie Analitică, Facultatea de Chimie, Universitatea din București;

** Biochimist drd. Carmela Negulescu, Wyeth Whitehall, București

*** Cristian Ciucu, Facultatea de Fizică, Universitatea din București

**** Vasile Magearu, Facultatea de Chimie, Universitatea din București

(Hg, Pb, Cd sau Cu, Bi, Pb și Tl) și oxalat oxidaza (Cu).

Este cunoscut faptul că enzimele din clasa oxidazelor sunt inhibitate de ioni ai metalelor grele; enzimele din clasa oxidazelor catalizează următoarea reacție generală:



apa oxigenată produsă putând fi măsurată cu un senzor amperometric pentru H_2O_2 , ea fiind ulterior corelată cu cantitatea de enzimă din soluție, și/sau la o concentrație fixă de enzimă ea putând fi corelată cu concentrația de inhibitor (ion metallic) prezent în soluția probei de analizat. Senzorul amperometric cel mai adesea utilizat în acest scop este electrozodul pentru apă oxigenată, acesta prezentând o bună sensibilitate și reproductibilitate [1,2,7,8].

Prin metode enzimatiche au fost determinați ionii de Cd prin inhibiția D-aminoacid-oxidazei pe domeniul de concentrații 5-20 ppm, limita de detecție fiind de 2 ppm. Cu(II) a inhibat puternic alcool-oxidaza și poate fi determinat pe domeniul de concentrații cuprins între 1-7 ppm, cu o limită de detecție de 1 ppm. Enzima mai este inhibată și de ionii de V(V) și Hg(II), astfel că o determinare cantitativă a Cu(II) este posibilă doar în absența acestor doi ioni de metal. Limita de detecție pentru ionii de Hg(II) care inhibă activitatea glicerol-3-P-oxidazei imobilizate este de 0,02 ppm. Sarcosin-oxidaza este selectiv inhibată de Ni(II). Utilizând enzima în soluție, s-a obținut o curbă de calibrare pe domeniul 1-10 ppm, limita de detecție fiind de 1 ppm.

Trebuie menționat faptul că unele enzime conțin ioni metalici drept componenți ai centrului lor activ. După îndepărtarea ionului metallic, de exemplu prin tratare cu un agent complexant puternic, apoenzima obținută este inactivă; activitatea ei crește foarte repede prin adăugarea unor cantități în urme de ioni metalici fapt datorat reactivării enzimei. În acest fel s-au determinat Zn și Ca cu ajutorul apoenzimei alcalin-fosfatazei sau Zn cu aminopeptidaza din ficat de porc.

Trebuie menționat faptul că metodele electrometrice au fost mai puțin utilizate decât cele spectrometrice. În cadrul ultimelor metode de detecție cu excepția ureazei folosită pentru determinarea Hg, Ag, Cu, Zn, Pb, Cr(III) și Co, Cu, Cu și Hg sau Hg, Cu, Cr(VI), Zn, Cd și Fe(III) au fost folosite și alte enzime. Inhibiția alcalin-fosfatazei a fost utilizată pentru detecția Be și a altor ioni metalici Mg, Cd, Ca, Ba și Pb.

Studii spectrometrice legate de inhibiția fosfatazei alcaline au fost bazate pe determinarea para-nitrofenolului ($\lambda = 400-405$ nm) format prin descompunerea catalitică a p-nitrofenil fosfatului. Metoda a fost aplicată pentru determinarea Be în FIA, enzima fiind imobilizată pe CPG, domeniul de aplicabilitate fiind cuprins între $1,5 \times 10^5$ și $1,5 \times 10^4$ mol/l, cât și pentru determinarea altor ioni metalici (Cu, Zn, Cd, Al, Fe(III), Ni și Co) sau Be și Zn în domeniul 18-90 ng și respectiv 0,6 – 6 g. În cazul studiilor fluorimetrice legate de inhibiția fosfatazei alcaline prin ioni metalici, drept substrat al reacției enzimantice s-a folosit umbeliferon-fosfatul. Inhibiția prin Be și Bi (fără o incubare prealabilă) permite detecția lor pe domeniul cuprins între 12-130 ppb, cu o eroare medie de 1,5% și respectiv 3-63 ppm cu eroarea medie de $\pm 1,3\%$.

Xantin-oxidaza este inhibată de Ag, Hg, Cu, Cr(VI), V(V), Au(III), Tl(I) iar glucoz-oxidaza de Ag, Hg, Pb sau As(III), în timp ce unele dehidrogenaze cum sunt izocitrat- sau lactat-dehidrogenaza sunt inhibitate de cantități micromolare de Zn, Mg, Cu, Cd, Ni și Co și respectiv de Hg, Cu, Zn și Cd. S-a studiat spectrometric efectul ionilor metalici asupra reacției

de transformare a xantinei în acid uric, în prezența xantin-oxidazei, determinându-se astfel Ag și Hg ($10^9 - 10^8$ mol/l) și Cu și Cr(VI) ($10^7 - 10^6$ mol/l) cu o RSD=2,5% și o eroare relativă de 4%.

Detecția fluorimetrică s-a folosit în determinarea Hg și Ag, bazată pe inhibiția activității ureazei cât și pentru determinarea Bi și Be (inhibiția alcalin-fosfatazei). S-a realizat determinarea fluorimetrică a Hg bazată pe inhibiția activității enzimantice a ureazei imobilizate pe sticlă cu pori controlați și folosind un sistem de analiză în flux. Domeniul de linearitate al metodei a fost cuprins între 0,5 și 100 ppb. Activitatea enzimei imobilizate a fost regenerată cu ajutorul L-cisteinei. În cadrul metodei Cu interferă puternic. Prin folosirea unor condiții identice (ureaza imobilizată într-un reactor pe bază de sticlă cu pori controlați și analiză în flux), dar utilizând o detecție termometrică Cu a fost determinat pe domeniul $5 \times 10^6 - 1 \times 10^4$ mol/l, cu o eroare standard de 2%. Avantajele principale ale metodei sunt: o sensibilitate de 20 de ori mai mare a ureazei acide față de Cu comparativ cu ureaza folosită în mod uzual pentru determinarea metalului, regenerarea enzimei nu necesită un agent de chelatare, nu este observată nici o scădere a activității enzimantice datorită inhibiției ireversibile.

S-a descris o metodă de detecție a Hg în urme folosind un sistem în flux având la bază inhibiția ureazei și detecție prin fluorescență. Enzima a fost introdusă în soluție în flux, curbele de calibrare fiind liniare până la concentrații de 20 ppb, limita de detecție fiind de 0,2 ppb. Hg a fost determinat în probe de sol, cu rezultate comparabile cu tehnica AAS cu vapori reci.

Oxidarea o-dianisidinei de către H_2O_2 , reacție catalizată de POD și inhibată prin ioni de Hg, a stat la baza determinării acestui metal până la concentrații de 3×10^7 mg/ml. Produsul de oxidare a fost monitorizat spectrofotometric la 460 nm. Inhibiția fosfatazei alcaline a stat la baza determinării Mg ($10^3 - 10^1$ mg/ml), Cd ($10^3 - 10^2$ mg/ml) sau Ca și Ba în prezența Sr. Pb poate fi determinat până la valori de concentrații de 6×10^4 mg/ml. Aceași reacție (oxidarea o-dianisidinei de către H_2O_2) a fost folosită pentru măsurarea spectrofotometrică a inhibiției Gox prin ioni metalici. În acest caz H_2O_2 care oxidează o-dianisidina, rezultă ca produs al reacției de oxidare catalitică a glucozei în prezența Gox. Metoda a fost folosită pentru determinarea Ag în domeniul $2 \times 10^6 - 1 \times 10^5$ mol/l; Hg poate fi determinat în domeniul 0,1 – 0,4 mg, cu o deviație standard de 8ng și o eroare mai mică de 34% [9,10].

Detecția spectrometrică a fost de asemenea utilizată pentru determinarea Hg, folosind b-fructofuranozidaza (invertaza); în cazul acestei enzime modificarea rotației optice a fost folosită pentru determinarea activității enzimei și inhibiția acesteia de către Ag precum și de Hg.

Efectul diferitelor metale asupra reacției enzimantice de transformare a acidului izocitric în a-cetoglutarat a fost studiat în prezența nucleotidei trifosfopiridină. Mn, Mg și Co sunt activatori ai reacției în timp ce multe alte metale (Be, Ca, In(III), Sr, Ba, Al, Ce(III), Fe(III), Ni, Cu, Ag, Cd, Hg, Pb) sunt inhibitori ai aceeași reacții. Zn activează enzima la concentrații mici și o inhibă la concentrații mai mari decât 10^4 mol/l [11].

Limitele de detecție pentru determinarea metalelor grele prin metode bazate pe inhibiția enzimatică sunt prezentate în tabelul 1.

METODE BAZATE PE BIOSENZORI

În construcția biosenzorilor amperometrici cel mai adesea s-au folosit enzimele din clasa oxido-reductazelor, deoarece ele catalizează reacții redox în care se formează specii electrochimic active (ex. H_2O_2). Producții acestor reacții enzimatice pot fi determinați amperometric. Inhibitorii potențiali precum metalele grele duc la scăderea vitezei de formare a produșilor redox și deci semnalul amperometric scade proporțional cu concentrația inhibitorului.

Butirilcolinesteraza, care catalizează hidroliza esterilor colinei, aparține grupului de enzime inhibate de metalele grele. În prezența colin-oxidazei produsul final al reacției este apa oxigenată formată în urma oxidării colinei eliberate. Un amestec constând din cele două enzime a fost imobilizat pe suprafața unor membrane de nylon și fixat astfel pe suprafața unui senzor amperometric comercial pentru apa oxigenată, rezultând un biosenzor. S-a studiat inhibiția BuChE prin ionii de Hg, Pb, Cd, determinându-se în final concentrația minimă pentru fiecare metal în parte, de la care apare o scădere a semnalului analitic 30, 10 și respectiv 60 mmoli/l [13-15].

Un alt tip de biosenzor bazat pe imobilizarea de BuChE pe membrane de nitroceluloză a condus la scăderea semnalului amperometric datorat oxidării produsului de hidroliză (tiocolina), datorat metalelor grele, biosenzorul fiind utilizat pentru determinarea Cu și Pb în domeniul cuprins între $1 \times 10^9 - 1 \times 10^5$ și respectiv $5 \times 10^6 - 1 \times 10^3$ moli/l. Reactivarea enzimei s-a efectuat prin folosirea soluțiilor de EDTA sau de hidroxilamină 0,01 moli/l. Enzima a fost inhibată și de Tl(I), Cd și Bi.

S-a studiat deasemenea și efectul inhibitor a 16 ioni metalici asupra Gox imobilizată pe membrane de nylon și fixate pe suprafața unui electrod de Pt. Doar Cu, Hg și Ag au generat o inhibiție semnificativă. Electrocul enzimatice poate fi reactivat prin intermediul EDTA-ului, reactivarea cea mai bună fiind obținută în cazul Cu. Posibilitatea refacerii activității enzimei în urma inhibării cu ioni de Cu, precum și răspunsul liniar al electrodului pe domeniul cuprins între $2,5 \times 10^{-4}$ și 5×10^{-3} moli/l sunt factori care fac posibilă utilizarea acestuia în cadrul unui sistem de analiză în flux pentru determinarea inhibitorilor acestei enzime.

Tab. 1 Determinarea metalelor bazată pe inhibiție enzimatică

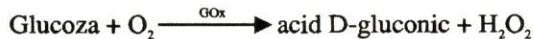
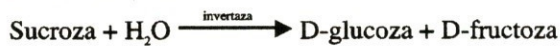
Metalul determinat	Enzima inhibată	Metoda de detecție	Limita de detecție moli/l
Hg	Ureaza	Potențiomtrică	$5 \times 10^{-9} - 2 \times 10^{-7}$
		Spectrometrică	$2,5 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-8}$
		Fluorimetrică	$2,5 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-8}$
	Invertaza	Spectrometrică	1×10^{-11}
		Polarimetrică	2×10^{-8}
		Amperometrică	3×10^{-5}
	BuChE	Xantin-oxidaza	Spectrometrică
Peroxidaza		Spectrometrică	5×10^{-6}
Glucoz-oxidaza		Amperometrică	1×10^{-5}
Cu	Ureaza	Spectrometrică	$1,5 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-8}$
		Potențiomtrică	$2 \times 10^{-6} - 3 \times 10^{-6}$
		Termometrică	1×10^{-6}
	BuChE	Amperometrică	1×10^{-9}
		Spectrometrică	$1,5 \times 10^{-5}$
		Spectrometrică	1×10^{-7}
		Amperometrică	5×10^{-5}
Ag	Invertaza	Spectrometrică	$8 \times 10^{-8} - 2 \times 10^{-7}$
		Polarimetrică	1×10^{-7}
	Ureaza	Fluorimetrică	9×10^{-10}
		Potențiomtrică	2×10^{-8}
		Amperometrică	1×10^{-4}
	Glucoz oxidaza	Spectrometrică	2×10^{-6}
Pb	BuChE	Amperometrică	$5 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-5}$
		Spectrometrică	5×10^{-8}
		Spectrometrică	3×10^{-9}
		Potențiomtrică	2×10^{-6}
Zn	Alcalin fosfataza	Spectrometrică	$1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-5}$
		Spectrometrică	2×10^{-6}
		Spectrometrică	8×10^{-4}
Cd	BuChE	Amperometrică	$5 \times 10^{-5} - 6 \times 10^{-5}$
		Spectrometrică	$9 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-4}$
		Spectrometrică	5×10^{-6}
Be	Alcalin fosfataza	Fluorimetrică	$1,3 \times 10^{-6}$
		Spectrometrică	$3 \times 10^{-7} - 1,5 \times 10^{-5}$
Bi	Alcalin fosfataza	Spectrometrică	1×10^{-6}
		Fluorimetrică	$1,4 \times 10^{-5}$
		Amperometrică	1×10^{-5}
Ni	Ureaza	Potențiomtrică	2×10^{-6}
		Spectrometrică	2×10^{-6}
Co	Ureaza	Potențiomtrică	2×10^{-6}
		Spectrometrică	$1,5 \times 10^{-5}$
Cr	Ureaza	Spectrometrică	$1,8 \times 10^{-4}$
		Xantin oxidaza	Spectrometrică

Într-o altă lucrare, Gox a fost imobilizată într-un polimer conductor pe bază de polianilină, detectorul rezultat fiind considerat un electrod chimic modificat. S-a studiat efectul inhibitor al 15 ioni metalici incluzând și metale grele ca: Zn, Cd, Cr, Cu, Mn, Fe, Co, Ni și Al. S-a constatat că doar Cu inhibă enzima, iar Mn în concentrații mici are un efect activator.

S-a demonstrat că o altă enzimă din clasa oxidoreductazelor POD a fost inhibată de unii ioni metalici. Enzima a fost imobilizată în pasta de cărbune, iar efectul inhibitor al Ni, Co și Mn a fost eliminat prin intermediul EDTA-ului care este de asemenea un component al pastei de cărbune.

Ionii de Cu inhibă oxalat oxidaza interferând în determinarea oxalatului. Efectul inhibitor este înlăturat prin folosirea EDTA-ului [18-20].

Compușii mercurului au fost determinați de asemenea datorită efectului lor inhibitor asupra invertazei ca urmare a detecției amperometrice indirecte a H_2O_2 formate în urma oxidării glucozei în prezența Gox, la suprafața unui electrod de Pt la +650 mV față de Ag/AgCl. Reacțiile care au loc sunt următoarele [16,17]:



în sistem observându-se o scădere a semnalului analitic în prezența inhibitorului invertazei. Metoda având la bază enzima imobilizată pe membrană de nylon și fixată pe electrod a fost folosită pentru determinarea compușilor mercurici MetHg și EtHg pe domeniul de concentrații cuprins între 1-50 ppb. Biosenzorul a fost reactivat prin introducerea lui într-o soluție 10 mM de cisteină, timp de 10 minute. Spre deosebire de enzima în soluție cea imobilizată nu este inhibată de Ag.

Pentru determinarea metalelor grele prin inhibiție enzimatică au fost folosiți și senzori potențiometrici bazați pe enzime imobilizate, ureaza fiind utilizată în mod special. Ureaza catalizează hidroliza uree rezultând NH_3 și CO_2 . Ambii compuși modifică pH-ul astfel încât orice detector de pH, de exemplu electrozii de sticlă, oxid metalici, ISFET-pH sensibili, poate fi utilizat pentru măsurarea semnalului analitic. În studiile inițiale de detecție a ionilor metalelor grele, ureaza a fost utilizată în soluție. Detecția pH-metrică a fost utilizată pentru determinarea Ag ($2 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-7}$ și $2 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-6}$ moli/l), Hg ($2 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-6}$ moli/l), Cu, Cd, Co, Ni, Mn și Pb pe domeniul cuprins între $2 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-5}$ moli/l. Picograme până la nanograme din acești compuși au fost determinați în soluții apoase cu o eroare standard mai mică de 20%.

S-a folosit de asemenea ureaza în soluție sau imobilizată pentru detecția Hg în concentrații foarte mici de până la 5 nmoli/l; autorii au folosit un senzor de gaz-sensibil pentru amoniac bazat pe un semiconductor metal-oxid.

Folosindu-se membrane enzimatică fotolitografice conținând ureaza și depuse pe traductori miniaturizați pH-sensibili (ISFET), au determinat ionii de Cu. Un astfel de biosenzor a fost capabil să determine ionii de Cu(II) din apă, în domeniul ppm fără o preconcentrare prealabilă. Inhibiția ureazei imobilizate și introdusă într-un reactor enzimatic a fost utilizată pentru determinarea Hg, limita de detecție a metodei fiind 7 nmol. Amoniacul format în cadrul reacției enzimatică a fost detectat cu ajutorul unui electrod gaz-sensibil. Între determinări, activitatea enzimatică a fost regenerată cu ajutorul tioacetamidei și EDTA-ului. Hg a fost

puternic legat de urează, astfel încât metoda este utilă pentru determinarea atât a Hg liber precum și a complexilor ionici. În cadrul metodei numai Ag și Cu interferă.

Detecția potențiometrică bazată pe electrozii de pH, a acidului acetic format în urma reacției de hidroliză a ACh, reacție catalizată de AChE a fost utilizată pentru determinarea Cu și Hg, prin inhibiție, limita de detecție fiind de 1 mg/ml.

Studiile relative la inhibiția ureazei imobilizate pe sticlă cu pori controlați datorată ionilor metalici au stat la baza realizării unor biosenzori optici. Modificarea de pH rezultată ca urmare a hidrolizei ureei a fost comparată înainte și după introducerea ionilor metalici în soluție. În cazul ureazei, imobilizate cu ajutorul reactivilor de activare a suportului -clorocianul și glutaraldehida-, s-a constatat că enzima este puternic inhibată de Hg, Ag, Cu, Zn, Pb, Cr(III) și Co, în cazul Hg obținându-se o curbă de calibrare pe domeniul de concentrații cuprins între $1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-3}$ moli/l. Biosenzorul a fost reactivat cu o soluție de acid dietilentriaminopentaacetic (pH = 6,0). Ureaza imobilizată pe un suport polimeric (VA epoxi) și introdusă într-un reactor a fost inhibată de ionii de Cu. Concentrația de amoniac formată în cadrul reacției enzimatică a fost măsurată fotometric, metoda având la bază indofenolul. Metoda a fost utilizată pentru determinarea Cu din apa de suprafață și cea potabilă. EDTA-ul a fost utilizat pentru reactivarea enzimei.

Aceeași metodă spectrometrică, utilizând indofenolul și având la bază ureaza în soluție, a permis determinarea ionilor de Hg și a altor metale grele din extracte apoase din probe de sol (limita de detecție pentru Hg 10 ppb și pentru Cu 5 ppb), precum și în apa de suprafață, subterană și în probe de ape reziduale (limita de detecție pentru Hg fiind de 0,5 ppb).

De asemenea, inhibiția ureazei imobilizate și depuse pe suprafața unui termistor sau a unui detector impedimetric a fost utilizată pentru determinarea Hg până la valori de concentrație de 10^{-9} moli/l și respectiv 10^{-7} moli/l. Ultima metodă a fost utilizată cu succes pentru determinarea Hg în ape reziduale, rezultatele fiind în bună concordanță cu metoda de absorbție atomică. Termistori enzimatici reprezintă o alternativă bună relativă la traductorii convenționali.

BIBLIOGRAFIE

1. Bertocchi P.; Ciranni E.; Compagnone D.; Magearu V.; Palleschi G.; Pîrvoțoiu S.; Valvo L.; *Flow injection analysis of mercury(II) in pharmaceuticals based on enzyme inhibition and biosensor detection*, J. Pharm. Biomed. Anal. (1999) 20, 263-269.
2. Ciucu A.; Magearu V.; Luca C.; «Enzyme Electrode for Hydrogen Peroxide», Anal. Lett. (1985) 18, 299-313
3. Ciucu A.; «*Biochimie Analitică - Partea I-a*», Editura Universității din București, 2000.
4. Ciucu A.; «*Biosensori-Partea I-a*», Editura Ars Docendi, București, 2000.
5. Ciucu A.; «*Aplicațiile Analitice ale Biosenzorilor în Controlul Poluării Mediului*», Editura Ars Docendi, București, 2001.
6. Ciucu A.; «*Biosensors for Environmental Monitoring. A Practical Guide for Students*», Editura Ars Docendi, București, 2000.
7. Compagnone D.; Palleschi G.; Imperiali P.; Varallo G.; *Enzyme inhibition based detection of heavy metals using H_2O_2 electrochemical probes.*, Artif. Nat. Percept., Proc. Ital. Conf. Sens. Microsyst. (1997) 74-78.
8. Compagnone D.; Lupu A.S.; Ciucu A.; Magearu

- V.; **Cremsini C.**; **Palleschi G.**; *Fast Amperometric FIA Procedure for Heavy Metal. Detection Using Enzyme Inhibition* Anal. Lett. (2001) **34**, 17-27.
9. **Danielsson B.**; **Mosbach K.**; in *Biosensors: Fundamentals and Application*. Turner A.P.F.; Karube I.; Wilson G.S., Eds., Oxford University Press, Oxford, 1987, pp. 572.
10. **Dolmanova I.F.**; **Shekhovtsova T.N.**; *Assay of the enzyme effectors*, Talanta (1987) **34**, 201-205.
11. **Drash G.A.**; in *Handbook on Metals in Clinical and Analytical Chemistry*, Seiler H.G.; Siegel A.; Sigel H., Eds., Marcel Dekker New York, 1994, pp. 479-493
12. **Guilbault G.**; **Eds.**; in *Analytical Uses of Immobilized Enzymes*. Marcel Dekker INC.: New York, 1984, pp. 24-38.
13. **MacGregor J.T.**; **Clarkson T. W.**; in *Protein-Metal Interactions*. Friedman M., Eds.: Plenum Press: New York, 1974, pp. 463-503
14. **Merian E.**; **Eds.**; *Metals and Their Compounds in the Environment: Occurrence, Analysis and Biological Relevance*. VHC; Weinheim: New York, Basel, Cambridge, 1991.
15. **Nriagu J.O.**; **Eds.**; *Changing Metals and Human Health*. Springer-Verlag, Berlin, 1984.
16. **Pirvutoiu S.**; **Dey S. E.**; **Surugiu I.**; **Ciucu A.**; **Magearu V.**; **Danielsson B.**; *Flow Injection Analysis of Mercury(II) Based on Enzyme Inhibition and Thermometric Detection*, The Analyst 2001, acceptat spre publicare.
17. **Pirvutoiu S.**, **Surugiu I.**, **Ciucu A.**, **Danielsson B.**, *Application of Enzyme Thermistor for Determination of Mercury and other Heavy Metals Using Free and Immobilised Alcohol-oxidase*, Anal. Chim. Acta, 2001, acceptat spre publicare.
18. **Roberts D.V.**; in Cambridge Chemical exts. *Enzyme Kinetics*. Elmore D.T.; Leadbetter A.J.; Schofield K.; Eds.: Cambridge University Press: Cambridge, 1997, pp. 49-59.
19. **Webb J. L.**; *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, Academic Press: New York, 1966, vol 2, pp. 729-986.
20. **Webb J.L.**; *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, Academic Press: New York, 1966, vol 2, pp. 635-653.