

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***DESARROLLO DE UN BIOSENSOR
ELECTROQUÍMICO BASADO EN MoS_2
(MOLIBDENITA) PARA LA DETECCIÓN DE
PESTICIDAS.***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Magíster en Bioquímica área de Especialización Ambiental y
Memoria para optar al Título de Bioquímico por:**

BÁRBARA BELÉN GUTIÉRREZ LEYTON

Directores de tesis: Dra. Soledad Bollo Dragnic
Dr. Diego Venegas Yazigi

**Santiago, Chile
Enero 2021**

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

BÁRBARA BELÉN GUTIÉRREZ LEYTON

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica ambiental y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día _____

Director de Tesis:

Dra. Soledad Bollo

Director de Tesis:

Dr. Diego Venegas

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Davor Cotoras

Dra. Claudia Yañez

Dra. Verónica Arancibia

A mis padres, mis pilares hoy y siempre

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto de tesis marca el fin del largo camino recorrido que comencé hace ya varios años, el cual estuvo lleno de desafíos, crecimiento personal, buenos y malos momentos. Es por esto que quiero agradecer a las personas que siempre estuvieron a mi lado, a quienes aparecieron en el camino y a quienes hoy en día siguen dándome apoyo y amor.

Primero, quiero agradecer a mi familia por estar siempre a mi lado, dándome ánimo cuando todo se veía gris, disfrutando mis logros y siempre creyendo en mi, en que soy capaz de esto y mucho más. A mis padres, Luis Gutiérrez y Carmen Leyton por ser los pilares fundamentales en mi vida, por la paciencia, el amor y el apoyo siempre, gracias a ustedes soy lo que soy hoy en día. A mi hermana Karol, mi mejor amiga, mi compañera, mi todo. Gracias por estar a toda hora, por apoyarme y calmarme cuando lo necesité, sin duda fuiste, eres y serás siempre mi gran apoyo y estaré eternamente agradecida de ti y de ustedes.

En segundo lugar, a MagMol USACH por haberme abierto sus puertas y por haber creído en mi. Al profesor Diego Venegas, por aceptar ser mi tutor, por la paciencia y las ganas de verme crecer en este mundo. A la profesora Marlén Gutiérrez por siempre haberme ayudado y apoyado, hasta en lo más mínimo. A mis amigos, Nicolás, Bárbara, Valentina, Francisca e Ignacio, por hacer mis días más felices en el laboratorio y por apoyarme siempre. A CIPREX UCH por también permitir integrarme a su grupo y por haber contado con ustedes siempre, especialmente a mi tutora de tesis, Profesora Soledad Bollo, por siempre tener el tiempo de ayudarme, por enseñarme y haber confiado en mi y en mis capacidades. Sin ustedes tampoco podría haber llegado hasta acá.

Por último, agradecer a Vicente H, que llegó en el mejor momento a llenarme de amor, apoyo y contención. Gracias por creer en mi y en mis capacidades, gracias por acompañarme en este camino y por haber vivido todo esto juntos, a la par, siempre mirando hacia adelante como los compañeros que somos.

TABLA DE CONTENIDOS

<i>ÍNDICE DE TABLAS</i>	<i>viii</i>
<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i>	<i>ix</i>
<i>LISTA DE ABREVIATURAS</i>	<i>xiv</i>
<i>RESUMEN</i>	<i>xvi</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>xviii</i>
I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS DE TRABAJO	12
III. OBJETIVOS	12
III.1 OBJETIVO GENERAL	12
III.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	13
IV.1 Reactivos	13
IV.2 Exfoliación de disulfuro de molibdeno (MoS₂) para la obtención de nanoestructuras de molibdenita	13
IV.3 Obtención del nanomaterial híbrido de MoS₂/OGr	13
IV.4 Métodos y técnicas de caracterización	14
IV.4.1 Dispersión dinámica de luz (DLS).....	14
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
V.1 Caracterización de nanoestructuras MoS₂, OGr y MoS₂/OGr	24
V.1.1 Dispersión dinámica de luz (DLS)	24
V.1.2 Difracción de rayos X de polvo (DRX-P).....	26
V.1.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM) y análisis de espectroscopia de dispersión de energía (EDS).....	29
V.2 Caracterización de electrodos modificados	32
V.2.1 Voltametría cíclica (VC) de ferroceno metanol (FcOH)	32

V.2.2 Respuesta electroquímica de tiocolina	33
V.5 Funcionalización de electrodos modificados	36
VI. DISCUSIÓN	38
VII. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO.....	42
VII.1 Sistemas utilizados en cada artículo:	42
VII.1.1 Retención física.....	44
VII.1.2 Retención química.....	45
VII.2 Caracterización de electrodos modificados	48
VII.2.1 Voltametría Cíclica	48
VII.2.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	50
VII.2.3 Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS)	50
VII.3 OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES EXPERIMENTALES	52
VII.3.1 Efecto del pH	53
VII.3.2 Concentración de material	55
VII.3.3 Concentración de enzima	56
VII.3.4 Tiempo incubación con el pesticida en estudio.....	57
VII.4 Respuesta amperométrica del biosensor	58
VII.5 Parámetros enzimáticos	59
VII.6 Pesticidas	60
VII.7 Estudio de pesticidas	62
VII.8 Repetibilidad, reproducibilidad, estabilidad y estudio de interferentes.....	65
VII.8.1 Repetibilidad	66
VII.8.2 Reproducibilidad.....	66
VII.8.3 Estudio de interferentes	66
VII.8.4 Estabilidad	67
VII.9 Reactivación del biosensor	68
VIII. CONCLUSIONES DEL ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO.....	70

IX. BIBLIOGRAFÍA ***71***

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tamaño promedio de las nanoestructuras laminares de disulfuro de molibdenita.	24
Tabla 2. Tamaño promedio de las nanoestructuras laminares de disulfuro de molibdeno exfoliadas.....	25
Tabla 3. Tamaño promedio de las nanoestructuras híbridas de disulfuro de molibdeno y óxido de grafeno exfoliadas.....	26
Tabla 4. Tamaño de cristales promedios en nanómetros (nm) de los materiales utilizados calculados a partir de la ecuación Debye-Scherrer.....	28
Tabla 5. Diferencia entre potencial de pico de oxidación y de reducción (ΔE_p) y potenciales de oxidación para cada electrodo utilizado.....	33
Tabla 6. Concentración y % de conversión obtenida luego de 30, 60 y 120 minutos.	34
Tabla 7. Electrodo de trabajo modificados con distintos materiales que utilizan inmovilización física con quitosano (CS).....	44
Tabla 8. Electrodo de trabajo con su respectivo método de inmovilización química.....	46
Tabla 9. Pesticidas utilizados en cada estudio. O: organofosforado y C: carbamatos.....	61
Tabla 10. Comparación de los biosensores estudiados en la determinación de pesticidas..	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura general de pesticidas organofosforados.	2
Figura 2. Esquema del proceso de sinapsis en donde participa la enzima acetilcolinesterasa degradando la acetilcolina en colina y acetato.	3
Figura 3. Esquema del proceso de hidrólisis de acetilcolina en el sitio activo de la enzima acetilcolinesterasa.	4
Figura 4. Esquema de los componentes de un biosensor.	6
Figura 5. Métodos de síntesis de nanomateriales.	7
Figura 6. Clasificación de nanomateriales según su dimensión.	8
Figura 7. Estructuras politépicas del disulfuro de molibdeno.	8
Figura 8. Estructura del óxido de grafeno reducido.	9
Figura 9. Esquema de medición por dispersión dinámica de luz.	14
Figura 10. Esquema del diámetro hidrodinámico y su comparación con el diámetro obtenido por microscopía electrónica de transmisión (TEM).	15
Figura 11. Ley de Bragg. Difracción de rayos X en un cristal.	16
Figura 12. Esquema de microscopio electrónico de barrido (SEM).	18
Figura 13. Región UV-vis-NIR del espectro electromagnético.	19
Figura 14. Esquema del método drop-casting para la modificación de electrodos.	21
Figura 15. Electrodos utilizados en electroquímica. ER: Electrodo de referencia, ET: Electrodo de trabajo y EA: electrodo auxiliar.	22
Figura 16. Histograma de la distribución de tamaños del MoS ₂ <i>bulk</i> comercial.	24
Figura 17. Histograma de la distribución de tamaños del MoS ₂ exfoliado por ultrasonido.	25
Figura 18. Histograma de la distribución de tamaños del MoS ₂ /OGr híbrido por ultrasonido.	26
Figura 19. Análisis de fases de DRX de: a) Disulfuro de molibdeno exfoliado (rosado, círculo) y disulfuro de molibdeno <i>bulk</i> comercial (negro, cuadrado) b) Óxido de grafeno reducido (anaranjado).	27
Figura 20. Análisis de fases de DRX del material híbrido (MoS ₂ /OGr). Planos de difracción de MoS ₂ exfoliado (círculos negros) y OGr (rombos anaranjados).	27

Figura 21. Micrografías SEM de disulfuro de molibdeno exfoliado a 500 μm (izquierda) y 1 μm (derecha).	29
Figura 22. Micrografías SEM de óxido de grafeno reducido a 500 μm (izquierda) y 1 μm (derecha).	29
Figura 23. Micrografías SEM del material híbrido MoS_2/OGr a 500 μm (izquierda) y 1 μm (derecha).	30
Figura 24. Micrografía SEM del material híbrido donde se realizó el análisis EDS en 2 puntos: punto 1 (zona rugosa) y punto 2 (zona lisa).....	30
Figura 25. Espectro EDS realizado en el punto 1.....	31
Figura 26. Espectro EDS realizado en el punto 2.....	31
Figura 27. VC con electrodos: GCE sin modificar (curva negra, A), GCE/ MoS_2 (curva anaranjada, B), GCE/OGr (curva morada, C) y GCE/ MoS_2/OGr (curva rosada, D) en presencia de 1 mM de ferroceno metanol (FcOH). Velocidad de barrido 0,100 V/s, 0,1 M PBS pH 7,4.	32
Figura 28. Reacción de hidrólisis de acetiltiocolina a tiocolina, y oxidación de tiocolina en el electrodo.	33
Figura 29. Representación gráfica de la conversión de acetiltiocolina a tiocolina a los 30, 60 y 120 minutos. Solución de partida: acetiltiocolina 6,0 mM.....	35
Figura 30. VC con electrodo GCE sin modificar en presencia de 1,2 mM de tiocolina. Velocidad de barrido 0,100 V/s, 0,1 M PBS pH 7,4.	35
Figura 31. VC con electrodos: GCE sin modificar, a) rosado GCE/ MoS_2/OGr , b) GCE/OGr, c) GCE/ MoS_2 y en presencia de 1,2 mM de Tiocolina. Velocidad de barrido 0,100 V/s, PBS pH 7,4.	36
Figura 32. VC con diferentes electrodos: GCE sin modificar (curva negra, A), GCE/ MoS_2/OGr sin funcionalizar (curva morada, B), GCE/ $\text{MoS}_2/\text{OGr}/\text{L-Cys}$ 30 min (curva anaranjada, C) y GCE/ $\text{MoS}_2/\text{OGr}/\text{L-Cys}$ 60 min (curva rosada, D) en presencia de 1,2 mM de tiocolina. Velocidad de barrido 0,100 V/s, 0,1 M PBS pH 7,4.....	37
Figura 33. Ilustración del ángulo de contacto formado por gotas de líquido sobre una superficie sólida, lisa y homogénea. Fig. recuperada de Ref. 58.	40
Figura 34. En a) voltamograma cíclico utilizando electrodo AChE/AuNPs- MoS_2 -rGO/PI en ausencia (curva a, negro) y presencia (curva b, rojo) de 90 mg/mL de acetiltiocolina en una	

solución 0,1 M PBS pH 7,4. En **b**) voltamograma cíclico de GCE (a, azul), AChE/CPBA/AuNPs/OGr-CS/GCE (c, celeste) en PBS 0,1 M, pH 7,0; y CPBA/AuNPs/OGr-CS/GCE (b, rojo), AChE/CPBA/AuNPs/OGr-CS/GCE (h, negro) en 0,1 M PBS pH 7,0 que contiene 1,0 mM acetiltiocolina. En **c**) GCE/Ti₃C₂T_x-CS PBS pH 8,0. Velocidad barrido 0,100/0,200 V/s (Figura extraída de referencias 50, 52, 56). En **c**) voltamograma cíclico utilizando GCE (a, azul), CS-Ti₃C₂T_x/GCE (b, rojo) y AChE/CS-Ti₃C₂T_x/GCE (negro) en una solución 0,1 M PBS pH 8,0 y 1,0 mM acetiltiocolina. Figura recuperada de Ref. 59, 61, 66. 49

Figura 35. Micrografías SEM de óxido de grafeno reducido (izquierda) y óxido de grafeno reducido/acetilcolinesterasa. Figura recuperada de Ref. 63. 50

Figura 36. EIS de electrodos **a**) GCE (negro), **b**) GCE/OGr-Cu-TEPA (celeste) y **c**) GCE/OGr-TEPA-Cu-AChE-CS (rojo) en una solución 0,1 M KCl con 5,0 mM [Fe (CN)₆]^{3-/4-}. Figura recuperada de Ref. 65. 51

Figura 37. Respuesta típica en VPD. 53

Figura 38. En **a**) efecto del pH del PBS en el pico de corriente anódica para la oxidación de tiocolina a partir de la respuesta VPD utilizando AChE/CNTs-NH₂/Ag NPs-N-F-MoS₂/GCE en una solución con 4,0 mM acetiltiocolina y distintos valores de pH de PBS. En **b**) efecto del pH del PBS en el pico de corriente anódica para la oxidación de tiocolina a partir de la respuesta VPD utilizando AChE/OGr/GCE en una solución 0,2 M PBS pH 7,0 y 40 μM de acetiltiocolina. Figura recuperada de Ref. 60, 63. 54

Figura 39. En **a**) Optimización de la concentración de nanocomposito PdNi NHs/m-MoS₂ para la modificación de AChE-Chit/PdNi NHs/m-MoS₂/GCE utilizando VPD en una solución 0,1 M PBS pH 7,4 en presencia de 3,0 mM de acetiltiocolina. En **b**) Optimización de la concentración de OGr para la modificación de GC/OGr/AChE utilizando VPD en una solución 0,2 M PBS pH 7,0 en presencia de 40 μM de acetiltiocolina. Figura recuperada de Ref. 25, 63. 55

Figura 40. En **a**) efecto de la concentración de enzima utilizada en la modificación del electrodo obtenida a partir de la respuesta VPD de AChE/CNTs-NH₂/Ag NPs-N-F-MoS₂/GCE a distintas U de enzima. En **b**) efecto de la concentración de enzima utilizada en la modificación del electrodo obtenida a partir de la respuesta VPD de poli(FBThF)/Ag-

OGr-NH ₂ /AChE/GCE with 1 mM ATCl in 50 mM PBS. Figura recuperada de Ref. 60, 64.	56
Figura 41. En a) Efecto de la inhibición de madatión (a), malatión (b) y clorpirifos (c) obtenida a partir de voltametría cíclica de NA/Ag@rOG-NH ₂ /AChE/GCE en una solución 0,1 M PBS pH 8,0. En b) efecto de la inhibición de clorpirifos obtenida a partir de la respuesta VPD de AChE/CNTs-NH ₂ /Ag NPs-N-F-MoS ₂ /GCE a distintos tiempos de incubación con pesticida. Figura recuperada de Ref. 60, 62.	57
Figura 42. Respuesta amperometrica de AChE/CNTs-NH ₂ /Ag NPs-N-F-MoS ₂ /GCE de distintas concentraciones de acetiltiocolina en una solución 0,1 M PBS, con agitación. Figura recuperada de Ref. 25.	58
Figura 43. Curva de calibración obtenida a partir de la respuesta amperometrica de AChE/CNTs-NH ₂ /Ag NPs-N-F-MoS ₂ /GCE de distintas concentraciones de acetiltiocolina en una solución 0,1 M PBS. Figura recuperada de Ref. 25.	59
Figura 44. En a) respuesta cronoamperométrica de AChE/CPBA/AuNPs/OGr-CS/GCE en 0,1 M PBS pH 7,0 y acetiltiocolina 0,15 mM luego de incubar con diferentes concentraciones de pesticidas. Figura recuperada de Ref. 60. En b) Respuesta VPD obtenida de AChE-CS/3DG-CuONFs/GCE en solución 0,1 M PBS pH 7,4 y 0,5 mM de acetiltiocolina luego de incubar el electrodo modificado con diferentes concentraciones de pesticida. Figura recuperada de Ref. 71.	62
Figura 45. Curva de calibración obtenida a partir de voltametría del electrodo PSi/AChE en una solución de 0,3 mM acetiltiocolinam pH 6,8 PBS a diferentes concentraciones de pesticidas. Figura recuperada de Ref. 71.	63
Figura 46. Curva de calibración obtenida a partir de VPD de AChE/CNTs-NH ₂ /Ag NPs-N-F-MoS ₂ /GCE en una solución con 0,1 M PBS, pH 7,4 y 4,0 mM acetiltiocolina incubada a diferentes concentraciones de pesticida por 15 minutos. Figura recuperada de Ref. 60.	65
Figura 47. Respuesta VPD DE AChE-CS/OGr-TEPA-Cu NHs/GCE en 10 ng/mL de malatión (mal), 2 mM de acetiltiocolina y 1 mM CO ₃ ²⁻ , 1 mM Cu ²⁺ , 1 mM PO ₄ ³⁻ , 1 mM glucosa, 1 mM dopamina, 1 mM NO ₃ ⁻ , 1 mM ácido úrico (interferentes). Figura recuperada de Ref. 65.	67

Figura 48. Tiempo de estabilidad del biosensor GCE/OGr/AChE evaluado a través de VPD en presencia de $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ de acetiltiocolina. Los electrodos se mantuvieron en 0,2 M PBS pH 7,0 at 4 °C. Figura recuperada de Ref. 63..... 68

Figura 49. Histograma del % de reactivación del biosensor a partir de la respuesta DPV de AChE/CS/TiO₂-CS/Gra/AgNHs/GC luego de la inhibición con diclorvos 63 uM y la reactivación con PBS. Figura recuperada de Ref. 64. 69

LISTA DE ABREVIATURAS

0D Cero dimensiones

1D Una dimensión

2D Dos dimensiones

3D Tres dimensiones

OGr Óxido de grafeno reducido

AChE Acetilcolinesterasa

DRX Difracción de rayos X

DLS Dispersión dinámica de luz

SEM Microscopía electrónica de barrido

VC Voltametría cíclica

EIS Espectroscopia de impedancia electroquímica

PBS Buffer fosfato

HPLC-MS Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

GC/MS Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas

ADN Ácido desoxirribonucleico

TMDs Calcogenuros de metales de transición

SAG Servicio Agrícola y Ganadero

IPA Isopropanol

TEM Microscopía electrónica de transmisión

FWHM Ancho a media altura de la línea de difracción hkl

EDS Espectroscopia de dispersión de energía

UV/Vis Ultravioleta/Visible

IR Infrarrojo

GCE Electrodo de carbono vítreo

ER Electrodo de referencia

ET Electrodo de trabajo

EA Electrodo auxiliar

L-Cys L-Cisteína

FcOH Ferroceno metanol

ΔE_p Diferencia entre potencial de pico de oxidación y reducción

CS Quitosano

AgNPs Nanopartículas de plata

AuNPs Nanopartículas de oro

CNTs Nanotubos de carbono

CPBA 3-Carboxifenilborónico

GA Glutaraldehído

NA Nafión

TEPA Tetraetilen-pentamina

AuNRs Nanobarras de oro

Gra Grafeno

AgNHs Nanohilos de plata

PSiE Electrodo poroso de silicio

CuONfs Nanoflores de óxido de cobre

VPD Voltametría de pulso diferencial

U Unidades de enzima

K_m Constante de Michaelis-Menten

O Organofosforados

C Carbamatos

RSD Desviación estándar relativa

PAM Piralidoxima

pM Picomolar

RESUMEN

Los biosensores son sistemas analíticos que contienen un elemento biológico sensible al analito el cual está anclado a una superficie transductora lo que permite una detección rápida, precisa y proporcional a la concentración del analito en estudio. Por otro lado, los nanomateriales en dos dimensiones (2D) han mostrado un gran potencial dado que presentan una mayor área efectiva y son susceptibles de ser funcionalizados, mejorando así las propiedades fisicoquímicas y la sensibilidad del biosensor.

El principal objetivo de esta tesis fue el estudio y desarrollo de un biosensor electroquímico para la detección con alta sensibilidad de clorpirifos utilizando una superficie nanoestructurada de disulfuro de molibdeno (MoS_2 – Molibdenita) y óxido de grafeno reducido (OGr) funcionalizada con L-cisteína y el posterior anclaje de la enzima acetilcolinesterasa (AChE). Para esto, se modificaron electrodos de carbono vítreo con nanoestructuras de MoS_2 y OGr obtenidas a través de exfoliación química utilizando ultrasonido en medio de iso-propanol lo cual fue caracterizado a través de difracción de rayos X de polvo (DRX-Polvo), dispersión dinámica de luz (DLS) y microscopía electrónica de barrido (SEM). La posterior funcionalización con L-cisteína se caracterizó a través de DRX-Polvo y SEM. Los electrodos modificados también fueron caracterizados electroquímicamente a través de voltametría cíclica (VC) utilizando ferroceno metanol (FcOH) como mediador redox y tiocolina para estudiar la respuesta electroquímica frente al producto enzimático de la detección de clorpirifos. Se obtuvieron nanoestructuras del material híbrido MoS_2 /OGr de 136 ± 4 nm y un tamaño de cristalita de 2 nm. Los resultados obtenidos por VC indicaron que los materiales utilizados interaccionan entre sí y generaron un proceso sinérgico en la respuesta analítica. Además, por SEM se observó que el material permanece en la superficie del electrodo a pesar de haber estado sumergido a distintos tiempos en el proceso de funcionalización, y por VC se evidenció que la inmersión no interfirió en el proceso de oxidación de tiocolina.

Posteriormente, se realizó un estudio bibliográfico de biosensores, similares a los propuestos en esta tesis, reportados durante los años 2016-2020, seleccionándose 15 artículos basados en la enzima acetilcolinesterasa.

Para el anclaje de la enzima, se reportan métodos químicos y físicos, como técnicas de caracterización de los electrodos en esta etapa utilizaron VC, SEM y espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS). En todos los casos la señal de corriente producto de la oxidación de tiocolina generada por hidrólisis enzimática de acetiltiocolina permitió caracterizar la actividad enzimática.

Luego, con el objetivo de obtener una metodología sensible y selectiva, los investigadores optimizaron parámetros como: pH del buffer fosfato, T° del medio de reacción, concentración de material para modificar el electrodo y concentración de enzima. Utilizando la técnica voltametría de pulso diferencial para el análisis de los pesticidas los investigadores determinaron parámetros analíticos como sensibilidad, límite de detección, reproducibilidad y repetibilidad. Posteriormente, realizaron estudios de interferencias y estabilidad, reportando en algunos casos que a los 30 días los biosensores estudiados aún tienen más del 90% de actividad.

Teniendo optimizadas las condiciones experimentales y obtenido el método analítico, diferentes pesticidas fueron analizados con cada biosensor, por ejemplo, en el grupo de los organofosforados: Ometoato, Paraoxón, Clorpirifos, Malatión, Triclorfón, entre otros y en el grupo de los carbamatos: Carbofurán, Isoprocarb y Carbaril. Para su detección, evaluaron el cambio en la actividad enzimática que experimente la AChE por la presencia del pesticida a través de amperometría y VC. La respuesta analítica exhibida en cada estudio disminuía en presencia del pesticida ya que este inhibió la enzima acetilcolinesterasa y, por ende, la producción de tiocolina. La reactivación de la enzima se llevó a cabo con buffer fosfato (PBS) y pralidoxima donde se obtuvo una reactivación de más del 90% en todos los casos estudiados. Los parámetros mencionados anteriormente dependieron del nanomaterial utilizado para construir cada biosensor por lo que los valores varían dependiendo de cada sistema. La respuesta electroquímica obtenida luego de exponer el biosensor con el pesticida exhibe el mismo comportamiento para todos los artículos estudiados. La señal analítica del biosensor disminuye cuando está en presencia del pesticida ya que éste forma un enlace covalente o no covalente con el sitio activo de la enzima, impidiendo la generación de tiocolina y por ende su oxidación.

ABSTRACT

Biosensors are analytical systems which contain biological elements that react in the presence of an analyte and are attached to a transducer surface allowing the detection to be fast, precise and proportional to the concentration of the analyte. Besides, two dimensional nanomaterials (2D) have shown a high potential as active surfaces for biosensors as a result of their larger effective area and they can be functionalized to ensure the interaction between the surface and the biological element.

The main objective of this thesis was to develop and study an electrochemical biosensor for a high sensitivity detection of chlorpyrifos using a nanostructured surface of molybdenum disulphide (MoS_2 - Molybdenite) and reduced graphene oxide (OGr) functionalized with L-cysteine. This modification allowed to attach the acetylcholinesterase enzyme to the nanostructure. To make this possible, glassy carbon electrodes (GCE) were modified with the MoS_2 /OGr nanocomposites obtained through exfoliation using ultrasound in isopropanol media. GCE were characterized through X-Ray powder diffraction (DRX-Powder), dynamic light scattering (DLS) and Scanning Electron Microscopic (SEM). The modified electrodes were functionalized with L-Cysteine by immersion. The functionalized system was characterized by Powder-XRD and SEM. Modified electrodes were also electrochemically characterized by cyclic voltammetry (CV), using ferrocenemethanol (FcOH) as a redox probe and acetylthiocholine to study the electrochemical response in a solution that contains the redox. Hydrodynamic diameter of 136 ± 4 nm (from DLS) and 2 nm (size of the crystallite from Debye-Scherrer equation) of MoS_2 /OGr were obtained, and the results of the Powder-XRD and CV showed that the materials utilized interacted and generated a synergistic effect of the analyte response. In addition, SEM micrograph showed that the material was still anchored to the electrode surface despite the fact that it had been immersed during different periods of time during the functionalization process. The voltammogram indicated that it didn't interfere in the oxidation process of the acetylthiocholine.

A bibliographic research about biosensors was carried out, these articles were similar to the articles proposed in this thesis from year 2016 to 2020. 15 articles were chosen based in acetylcholinesterase enzyme.

For enzyme immobilization, investigators used physical and chemical methods. To characterized this, CV, EIS and SEM were used. In all cases, the current signal created by the thiocholine oxidation generated by enzymatic hydrolysis, allowed the characterization of the enzymatic activity.

Subsequently, to obtain a sensitive and selective method, experimental conditions were optimized: pH of buffer phosphate, T° of reaction medium, concentration of nanomaterial to electrode modification and concentration of enzyme. Using differential pulse voltammetry, investigators determined analytic parameters like sensitivity, low detection limit, reproducibility and repeatability. Then, they did interferences and stability studies reporting that after 30 days the biosensors retained 90% of activity.

Besides, once the analytic method was obtained, several pesticides were tested in every article, as omethoate, paraoxon, chlorpyrifos, malathion, trichlorfon (organophosphorus pesticides) and carbophuran, isoprocarb and carbaryl (carbamate pesticides). For the pesticide detection, changes in enzymatic activity of the AChE in the presence of them was evaluated through Amperometry and CV. The analytic response decreased when the pesticide was detected due to the inhibition of the acetylcholinesterase enzyme, thus thiocholine production. The enzyme reactivation occurred with a Phosphate Buffer (PBS) and pralidoxime, every paper showed over a 90% of reactivation.

Parameters that were mentioned depend on the nanomaterial used to build each biosensor, which is why their values varied depending on the system. The electrochemical obtained response after exposing the biosensor to the pesticide shows the same behaviour in every published study. The analytic signal of the biosensor decreased when the pesticide was detected because of the covalent or non-covalent bond in the active site of the enzyme, avoiding the production of thiocholine, thus its oxidation

I. INTRODUCCIÓN

Con el incremento de la población mundial de manera apresurada, se hace necesario agrandar el volumen productivo de los suelos con la finalidad de adquirir la cantidad adecuada de alimentos para suplir la demanda alimenticia. Para conservar la producción agrícola en el mundo actual, y alcanzar a aumentar los rendimientos, es necesario utilizar pesticidas lo que puede afectar directa o indirectamente al medio ambiente (1).

Pesticidas

Un pesticida es cualquier sustancia elaborada para controlar, matar o repeler a una plaga. Tal plaga puede ser cualquier organismo vivo que provoque daño o pérdidas económicas o que transmita o produzca alguna enfermedad (2). Estos compuestos son el resultado de un proceso industrial de síntesis química y se han convertido en la forma dominante del combate a las plagas, después de la Segunda Guerra Mundial, gracias al desarrollo de la industria química y al tipo de agricultura dependiente de estos insumos. La mayor parte de los pesticidas son empleados principalmente en la agricultura y en la horticultura; o bien, en programas de salud pública para combatir vectores de transmisión (insectos que portan enfermedades) (3).

Estos se pueden clasificar según su actividad biológica (insecticidas, acaricidas, nematocidas, fungicidas, herbicidas, etc.), por su ruta de ingreso (ingestión, contacto e inhalación), por su naturaleza química (inorgánicos, orgánicos), por su formulación (gránulos, pellets, líquidos, etc.) y por su toxicidad (extremada, alta, moderada o ligeramente tóxico) (4).

La exposición a estos productos químicos puede afectar la salud de diversas formas produciendo (5):

- a) Efectos de deterioro de tipo funcional.

- b) Lesiones patológicas que afectan el funcionamiento del organismo y reducen su capacidad de respuesta a factores de riesgo o estrés.

De acuerdo con el tiempo de exposición para que se llegue a manifestar el efecto tóxico o de la duración de éste, puede ser de tipo agudo o crónico. Las intoxicaciones de tipo aguda se caracterizan por cambios fisiológicos en el sistema nervioso. Generalmente no producen una degeneración celular y el daño se debe a una dosis única muy grande, como en el intento suicida o cuando hay una intoxicación accidental, la cual puede en ocasiones ser rápidamente reversible. En cambio, la intoxicación crónica es la más conocida, la cual, a dosis moderadas pero repetidas (como en los casos de intoxicación ambiental), pueden producir lesiones patológicas neurocelulares que solo son reversibles si no hay necrosis celular (5).

De acuerdo con la información recopilada por el Centro para el Control de Envenenamientos de la Asociación Americana, los pesticidas más comúnmente implicados en envenenamientos, lesiones y enfermedades son principalmente los organofosforados (6).

Pesticidas Organofosforados:

Casi todos estos pesticidas son muy tóxicos y, por ende, su uso es peligroso para el trabajador agrícola. Los compuestos organofosforados, que son principalmente ésteres del ácido fosfórico (figura 1) (4), se descomponen con mayor facilidad que otros tipos de pesticidas. La vida media de los organofosforados y sus productos biotransformadores es relativamente corta (de horas a días). Se biotransforman mediante enzimas oxidasas, hidrolasas y transferasas, principalmente hepáticas. Se eliminan por la orina y en menor cantidad por heces y aire expelido (4).

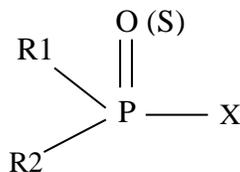


Figura 1. Estructura general de pesticidas organofosforados.

Todos los derivados fosfóricos presentan un modo de acción primario semejante, definido de modo general, puede decirse que en los pesticidas organofosforados la acción tóxica específica tiene lugar a nivel sináptico (7), fosforilando la enzima acetilcolinesterasa, inhibiéndola (4).

Acetilcolinesterasa (AChE)

La neurotransmisión mediada por acetilcolina es fundamental para la función del sistema nervioso. Su bloqueo es letal y está asociada con el deterioro de la función cognitiva, autonómica y neuromuscular. La enzima AChE hidroliza e inactiva la acetilcolina, regulando su concentración en la transmisión sináptica. La terminación de la activación es normalmente dependiente de la disociación de la acetilcolina de su receptor y su subsecuente difusión e hidrólisis (figura 2) (8).

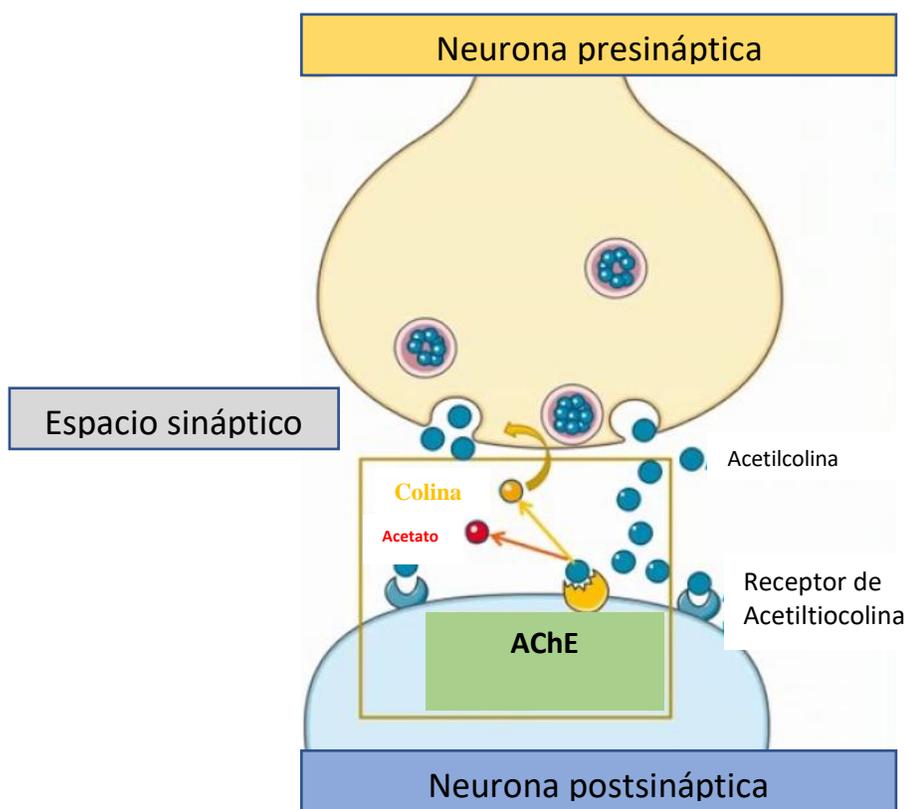


Figura 2. Esquema del proceso de sinapsis en donde participa la enzima acetilcolinesterasa degradando la acetilcolina en colina y acetato.

Existen varias formas oligoméricas de la AChE en diferentes organismos como, por ejemplo, la anguila eléctrica, *Electrophorus* y *Torpedo*, que son estructuralmente similares a la AChE en vertebrados y son ampliamente utilizadas por los investigadores en sus estudios (9).

La enzima puede ser clasificada de distintas formas. Mecánísticamente, es una hidrolasa de serina. Su sitio catalítico contiene una triada catalítica (Serina, Histidina y residuos acídicos, el glutamato). La naturaleza nucleofílica del carboxilato es transferida a través del anillo imidazol de la histidina al grupo hidroxilo de la serina, permitiendo el desplazamiento de la colina del sustrato, formando el intermediario enzima-acetilada. Posteriormente una hidrólisis libera el grupo acetato (figura 3) (8).

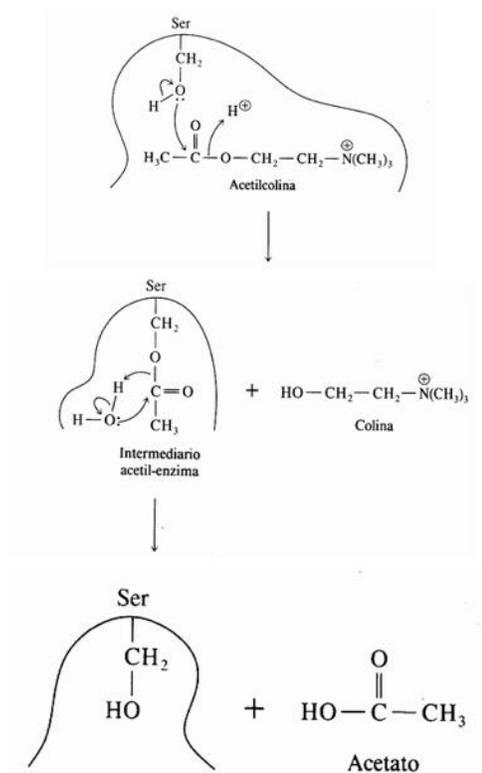


Figura 3. Esquema del proceso de hidrólisis de acetilcolina en el sitio activo de la enzima acetilcolinesterasa.

Su inhibición por fosforilación del sitio activo (residuo de serina) genera una esterasa neurotóxica, responsable de la neuropatía retardada. Esta esterasa es biodegradable y no se acumula en el organismo. Esta enzima presenta problemas especiales debido a que cuando hay combinación entre algunos organofosforados, se producen diversos efectos, entre otros, sinergia, potenciación e inhibición de la detoxificación (3).

La estructura química de cada pesticida organofosforado tiene importancia en su efecto sobre la enzima al aumentar o disminuir la competencia con el sustrato, es decir, influye sobre su toxicidad. Cuando la enzima es inhibida en forma irreversible por un organofosforado, la restauración de la actividad enzimática dependerá exclusivamente de la síntesis de nuevas moléculas de enzima (3). Experimentalmente *in vitro*, la reactivación de la enzima se puede llevar a cabo con buffer fosfato 0,1 M a pH 7,4 por 20 minutos (10) o utilizando oximas por 20 minutos (11).

Dentro de los métodos más utilizados para la detección de pesticidas se encuentran las cromatografías líquida o gaseosa acopladas a espectrometría de masas (HPLC-MS, GC-MS), esto dada su alta sensibilidad y confiabilidad. El problema que presentan es que requieren una preparación meticulosa de la muestra, técnicos altamente calificados y son de elevado costo. En contraste, aparecen los biosensores electroquímicos como una alternativa muy atractiva por su simple desarrollo, bajo costo, que no necesita pretratamiento de la muestra ni tampoco técnicos calificados, ya que se puede diseñar como un dispositivo capaz de monitorear de forma rápida e *in situ* pesticidas en distintos tipos de matrices (12).

Biosensores

Un biosensor es un dispositivo de análisis conformado por un elemento biológico de reconocimiento (enzima, ADN, anticuerpo, etc.) asociado a un mecanismo que garantiza la detección e interpretación de la variación de propiedades fisicoquímicas, eléctricas, ópticas, entre otras, obtenida de la interacción entre el analito y el dispositivo analítico (figura 4) (13). El objetivo de un biosensor es proporcionar una señal continua o discreta que sea proporcional a la cantidad de analito presente en una muestra, pero que no se vea afectada

por la presencia del resto de componentes de la misma. Es decir, que genere una respuesta rápida y específica (14), además de producir métodos analíticos precisos, baratos con la ventaja de que son fácilmente ensamblados e integrados con los componentes electrónicos (15).

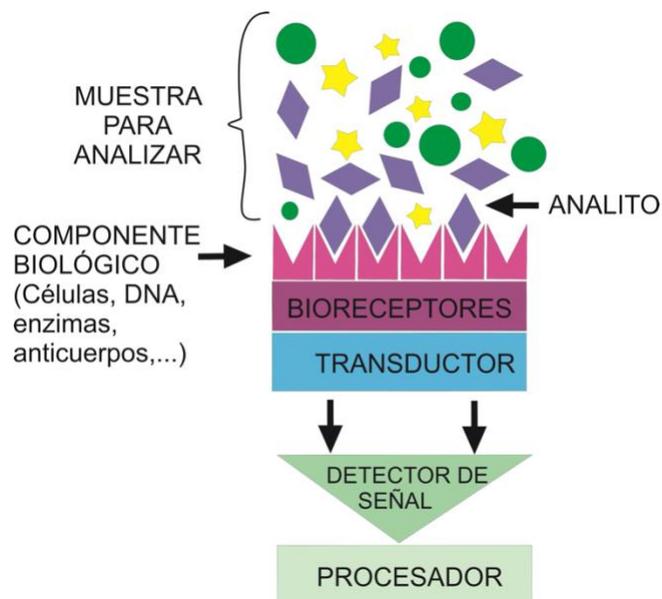


Figura 4. Esquema de los componentes de un biosensor.

Los biosensores electroquímicos se caracterizan por su capacidad de convertir la señal obtenida en una señal eléctrica y son ampliamente utilizados en sistemas de reconocimiento biocatalíticos. Los más utilizados son los de tipo conductimétrico, potenciométrico y amperométrico (13).

Para anclar el componente biológico del biosensor se utiliza la técnica de funcionalización química con el fin de inmovilizar la parte biológica a la superficie. Esto es adherir a la superficie diferentes moléculas que tengan grupos funcionales capaces de aumentar la reactividad superficial para así unir proteínas, células, etc. (16).

Para diseñar una nueva generación de dispositivos bioelectroquímicos que exhiban funciones mejoradas, se ha utilizado las propiedades únicas que los materiales a nano-escala ofrecen entre éstas, gran área superficial, excelentes perspectivas para interactuar con los elementos de reconocimiento biológico y rápida transducción de las señales eléctricas (17).

Nanomateriales

Desde que la nanotecnología fue introducida por el premio Nobel Richard P. Feynman en 1959, ha habido un desarrollo revolucionario en el mundo de la física, química y biología, demostrándose la idea de Feynman de poder manipular la materia a una escala extremadamente pequeña, la nano-escala (18).

El objetivo de la nanotecnología incorpora la característica estructural de los materiales con tamaños menores a 100 nm, llamados nanoestructuras, nanocompositos y agregados nanoparticulados. Su característica principal es su función y propiedades dependientes del tamaño que se dan gracias a su excepcional actividad superficial y eléctrica, propiedades ópticas y magnéticas y sus morfologías en tamaños a nano-escala (19).

Su síntesis puede ser realizada de acuerdo con dos técnicas (figura 5)

- (a) técnicas de arriba hacia abajo (*Top-down*)
- (b) técnicas de abajo hacia arriba (*Bottom-up*).

La primera, trata de diseñar y miniaturizar estructuras macroscópicas para obtener materiales a nano-escala y la segunda se centra en la construcción de estructuras más grandes a partir de sus componentes atómicos y moleculares, lo que permite que la materia pueda controlarse de manera extremadamente precisa (20).

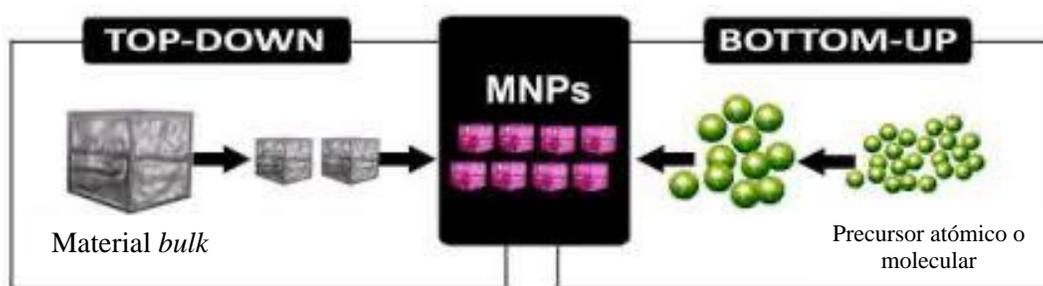


Figura 5. Métodos de síntesis de nanomateriales.

Una de las clasificaciones propuestas para los nanomateriales es en base a sus dimensiones nanométricas. Se establecen así cuatro categorías: cero dimensiones (0D), una dimensión (1D), dos dimensiones (2D) y tres dimensiones (3D), indicándose con esta

nomenclatura cuántas de las dimensiones de la nanoestructura superan el rango de los 100 nm. Los materiales 3D sólo se incluyen en esta clasificación de tener su estructura interna nanoestructurada (figura 6) (21).

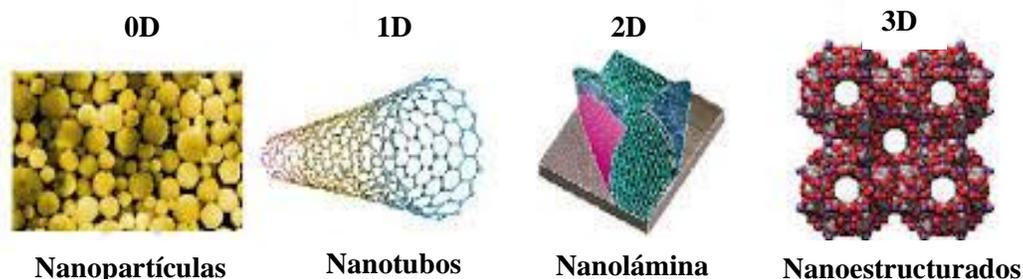


Figura 6. Clasificación de nanomateriales según su dimensión.

Desde que se descubrió el grafeno en el año 2004, los nanomateriales inorgánicos 2D han recibido gran atención debido a que nuevas áreas de estudio han sido desarrolladas en torno a sus estructuras y propiedades fascinantes. Hay una numerosa lista de materiales 2D sintetizados satisfactoriamente, entre ellos, calcogenuros de metales de transición 2D (2D-TMDs), siliceno, germanano, hidróxidos y óxidos laminados, entre otros (22).

2D-TMD: Sulfuro de molibdeno (IV) (MoS_2): Este nanomaterial posee 3 estructuras politípicas incluyendo: 2H (coordinación prismática trigonal), 1T (configuración simétrica octaédrica) y 1T' (1T distorsionado), como se observa a continuación (figura 7) (23):

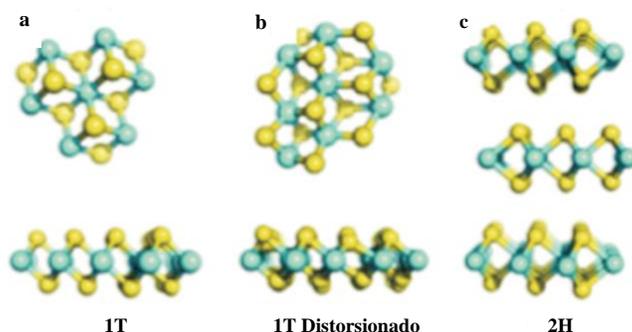


Figura 7. Estructuras politípicas del disulfuro de molibdeno.

De éstos, la fase 2H es la más estudiada en los recientes años (24). Es un material semiconductor que exhibe propiedades únicas debido al tamaño cuántico conectado con su estructura ultradelgada. La lámina de MoS₂ tiene un ancho de 6,5 Å, es centrosimétrico y está formado por láminas compuestas por 3 átomos de molibdeno (Mo) entre láminas compuestas por 2 átomos de azufre (S) (6). Los átomos están enlazados entre sí a través de enlaces covalentes mientras que las láminas están unidas entre sí por fuerzas débiles (Fuerzas de van der Waals) (24).

Este material posee gran área superficial, biocompatibilidad excepcional ya que no destruyen el ambiente con el cual co-existen, actividad electroquímica y una fácil funcionalización. Por esta razón, el 2D MoS₂ es un excelente material de soporte para fabricar biosensores electroquímicos sensibles (25).

Derivados de Grafeno: Óxido de grafeno reducido (OGr): el óxido de grafeno reducido es un material 2D derivado del grafito. Las láminas de OGr comprenden dominios de grafeno intercalados con grupos residuales oxigenados y posee una relación C:O que van desde $\approx 10:1$ a $\approx 5:1$. En la figura 8, se exhibe la estructura del óxido de grafeno reducido (26).

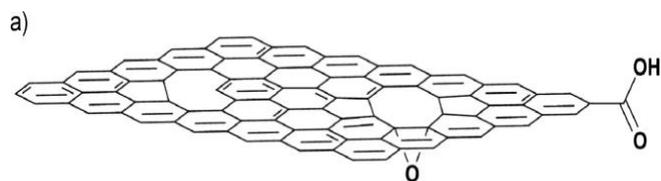


Figura 8. Estructura del óxido de grafeno reducido.

Este material exhibe propiedades electrónicas, térmicas y mecánicas únicas, es conductor y, al tener sitios con defectos químicamente activos, lo convierten en un candidato prometedor para el desarrollo de biosensores (27). Además, debido a su estructura plana bidimensional provee una plataforma para incluir otros materiales nanoparticulados, ofreciendo un nuevo camino para desarrollar materiales híbridos catalíticos ya que usualmente exhiben un efecto sinérgico en aplicaciones electrocatalíticas (11).

Diferentes sistemas han sido creados en base a estos nanomateriales, por ejemplo, Liu et al. (11) construyó un biosensor para sensar clorpirifos (pesticida organofosforado) utilizando óxido de grafeno reducido y nanocompositos de oro funcionalizados con ácido 3-carboxifenilborónico para anclar la enzima acetilcolinesterasa, en donde detecta clorpirifos en un rango lineal de 0,50 a 10,0 ppb y de 10,0 a 100 ppb y un límite de detección de 0,1 ppb (11). Zhou et al. (28) desarrollaron un dispositivo utilizando nanopartículas de SnO₂, grafeno carboxílico y nafión modificado con la enzima acetilcolinesterasa, la cual detecta metilparatión en un rango lineal desde 1x10⁻¹³ a 1x10⁻¹⁰ M y desde 1x10⁻¹² hasta 1x10⁻¹⁰ M con un límite de detección de 5x10⁻¹⁴ M. Dan Du et al. (29) por su parte prepararon un biosensor modificado con la enzima acetilcolinesterasa basado en nanotubos de carbono y una matriz de quitosano para sensar triazofos, obteniendo para la detección del pesticida dos rangos lineales, desde 0,03 a 7,80 µM y 7,80 a 32,0 µM con un límite de detección de 0,01 µM.

Como se mencionó anteriormente, para el desarrollo de biosensores con propiedades excepcionales (17), el uso de nanomateriales ha sido clave para diferentes áreas, como, por ejemplo, en el estudio de pesticidas.

En nuestro país el organismo que tiene la facultad para fiscalizar la fabricación, importación, distribución, venta y aplicación de pesticidas, además de fijar procedimientos y sanciones, es el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) que se rige bajo El Decreto Ley N° 3.557 (30).

En este último tiempo han aparecido diferentes noticias acerca del mal uso de estos químicos en Chile. En el 2019, niños de la comuna de Río Claro, Región del Maule, resultaron intoxicados tras inhalar los gases emanados de un producto agro-frutícola en un fundo dedicado a la producción de manzanas, generando náuseas, dolor de cabeza, malestares estomacales, entre otros. Intoxicaciones similares tuvieron lugar en Chépica años antes afectando a unas 80 personas. Pero, lo más grave se reflejaba en el nuevo estudio realizado por la Universidad Católica del Norte, en Coquimbo, en donde postularon que la exposición a plaguicidas está produciendo alteraciones neurocognitivas en menores en contacto directo

con los agrotóxicos (31). Por otro lado, investigadores de la Universidad Católica del Maule encontraron la presencia de metabolitos del paratión en la orina de niños que viven en zonas rurales de la región, dicho pesticida está prohibido en Chile hace más de 18 años debido a los efectos perjudiciales que tienen tanto para el medio ambiente como para la salud de las personas, siendo un químico posiblemente cancerígeno en seres humanos (32).

En consideración a los antecedentes mencionados, en esta tesis se trabajó en la obtención de un material híbrido basado en MoS₂/OGr, el cual fue caracterizado estructural y electroquímicamente y se hicieron las pruebas de respuesta electroquímica frente a tiocolina. Luego de esto, y en virtud del cierre de los recintos Universitarios por la pandemia del Covid-19, se realizó un estudio bibliográfico, el cual incluye los aspectos analíticos del trabajo inicialmente propuesto.

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La incorporación de molibdenita y óxido de grafeno reducido, y su posterior modificación con L-cisteína permitirá por un lado realizar una inmovilización efectiva de la enzima acetilcolinesterasa y por otro, realizar una determinación sensible de pesticidas organofosforados (como por ejemplo, clorpirifos) en muestras contaminadas.

III. OBJETIVOS

III.1 OBJETIVO GENERAL

Generar un biosensor electroquímico para la detección sensible de pesticidas basado en óxido de grafeno reducido y nanoestructuras de molibdenita funcionalizada con L-cisteína como molécula ancla de la enzima acetilcolinesterasa a la superficie de las nanoestructuras.

III.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Obtener nanoestructuras híbridas de disulfuro de molibdeno (Molibdenita) y óxido de grafeno reducido (OGr), caracterizarlas para su posterior funcionalización.
- 2) Generar electrodos modificados y su posterior modificación con la enzima acetilcolinesterasa.
- 3) Desarrollar el método analítico para la determinación del clorpirifos.
- 4) Aplicar el método analítico en la determinación de clorpirifos en matrices complejas.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1 Reactivos

Sulfuro de molibdeno (IV) (MoS_2 , Aldrich), Óxido de grafeno reducido comercial (OGr, Graphenea), iso-propanol (IPA) ($(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$, Merck), ferroceno metanol ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{FeO}$, Aldrich), cloruro de acetilcolina ($(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOCH}_3\text{Cl}^-$, Merck), acetilcolinesterasa tipo VI-S de anguila eléctrica (AChE *electric eel*, Merck), L-cisteína para fines bioquímicos ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$, Merck), N-hidroxisuccinimida (NHS) ($\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3$, Merck), hidrocloreto de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) ($\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3 \cdot \text{HCl}$, Merck), 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) ($[\text{-SC}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)\text{CO}_2\text{H}]_2$, Merck), 1-mercaptoetanol para síntesis ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, Merck), agua milli-Q ($\rho = 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$).

IV.2 Exfoliación de disulfuro de molibdeno (MoS_2) para la obtención de nanoestructuras de molibdenita

Basándose en la metodología de X. Chen et al. (33), se obtuvieron las nanoestructuras de molibdenita. Para esto, 4 g de MoS_2 comercial fueron dispersados en 200 mL de iso-propanol para ser sometidos a ultrasonido. La sonicación se llevó a cabo por 1 hora a máxima potencia (400 watt) con 3 pulsos *on* y 3 pulsos *off* en baño de hielo. Luego se centrifugó a 5000 rpm a 5°C por 1 hora. El sobrenadante que contenía impurezas se descartó y el sedimento fue redispersado con 200 mL de IPA. Se aplicó ultrasonido nuevamente por 4 horas bajo los mismos parámetros utilizados anteriormente. La muestra fue nuevamente centrifugada a 1500 rpm a 5°C por 1 hora para remover el material no exfoliado. Finalmente, el sedimento fue descartado y el sobrenadante fue utilizado para su posterior caracterización y pruebas electroquímicas.

IV.3 Obtención del nanomaterial híbrido de MoS_2/OGr

Para la obtención del material híbrido se utilizó 80 mL de la suspensión obtenida anteriormente de MoS_2 y 6,7 mg de óxido de grafeno reducido comercial (OGr) y se sometió la nueva suspensión que contenía ambos materiales a sonicación por 4 horas 3 pulsos *on* 3

pulsos *off* en baño de hielo a máxima potencia. La suspensión fue utilizada para su posterior caracterización y pruebas electroquímicas.

IV.4 Métodos y técnicas de caracterización

La sonicación de las muestras se realizó con el sonicador Omni Ruptor 4000 Ultrasonic Homogenizer de 240 V con una punta de procesamiento de $\frac{1}{2}$ ".

IV.4.1 Dispersión dinámica de luz (DLS)

La dispersión dinámica de luz DLS (Por sus siglas en inglés “*Dynamic light Scattering*”) es una técnica fisicoquímica empleada para la determinación de la distribución de tamaños de partículas en suspensión o macromoléculas en solución tales como proteínas o polímeros (34). En la figura 9 se presenta un esquema de dicha técnica:

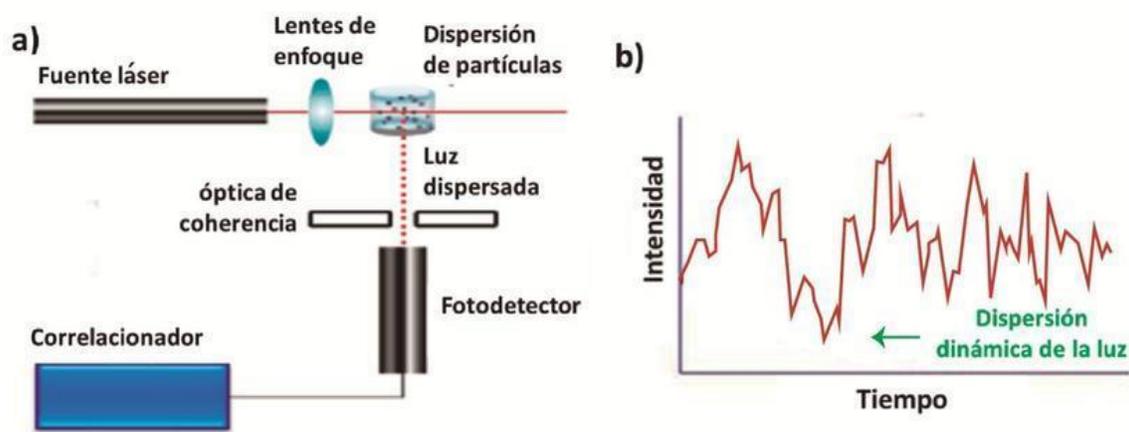


Figura 9. Esquema de medición por dispersión dinámica de luz.

La luz láser al alcanzar las numerosas partículas que hay en una suspensión, se dispersa en todas las direcciones posibles. Si se separa en una dirección, los haces de luz dispersados por distintas partículas interfieren entre sí y se obtiene una intensidad de dispersión determinada (34).

Como consecuencia del movimiento Browniano, las posiciones relativas de las partículas varían constantemente entre sí provocando cambios en las condiciones de interferencia y en la propia intensidad de dispersión. La suspensión de la muestra se encuentra en reposo y sólo vibran las partículas que componen la suspensión (figura 9).

IV.4.1.1 Diámetro hidrodinámico

El tamaño hidrodinámico (figura 10) medido por esta técnica se define como el “tamaño de una esfera rígida hipotética que se disemina del mismo modo que la partícula que se mide”. Sin embargo, en la práctica, las partículas en solución son no esféricas, dinámicas y solvatadas. Debido a esto, el diámetro calculado a partir de las propiedades difusionales de la partícula indica el tamaño real de la partícula dinámica hidratada y solvatada (35).

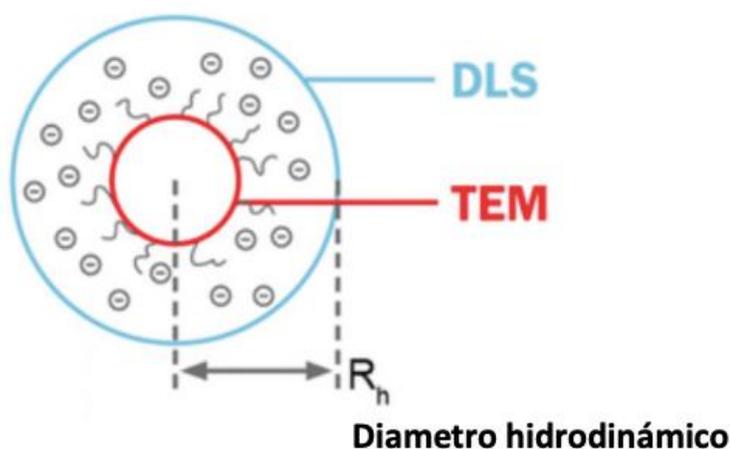


Figura 10. Esquema del diámetro hidrodinámico y su comparación con el diámetro obtenido por microscopía electrónica de transmisión (TEM).

La distribución de tamaños de las nanoestructuras se obtuvo mediante dispersión dinámica de luz utilizando el equipo *Zetasizer Nano ZS* de la marca Malvern, equipado con un láser de He-Ne con una potencia de 3 mW, utilizando celdas de poliestireno.

IV.4.1.2 Difracción de rayos X de polvo (DRX-P)

La difracción de rayos X de polvo proporciona información detallada sobre la estructura cristalina de cualquier sólido (36).

Los rayos X son radiación electromagnética que al ser difractados por el entorno ordenado y periódico de un cristal salen de éste formando un ángulo *theta* (θ) con la superficie (36). Las ondas difractadas producirán intensidad máxima si ambos llegan en fase al detector, es decir, si la diferencia entre las trayectorias de los rayos es un número entero de veces la longitud de onda de los rayos X empleados, $n\lambda$, donde n es un número entero. La figura 11 muestra cómo puede derivarse la condición necesaria para obtener una intensidad difractada máxima. Se observa que la diferencia del recorrido de las dos ondas es $2d\text{sen}(\theta)$ donde d es la distancia entre los dos planos de las familias con índices de Miller (hkl);

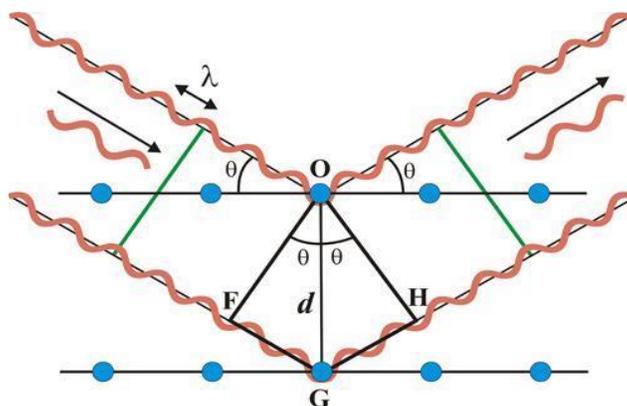


Figura 11. Ley de Bragg. Difracción de rayos X en un cristal.

Así tenemos:

$$n\lambda = 2d\text{sen}(\theta) \quad \text{(ecuación 1)}$$

Para la condición que debe cumplirse a fin de obtener un máximo de intensidad difractada. Ésta se conoce como la ecuación de Bragg. Así, al representar la intensidad de radiación que llega al detector, frente al ángulo θ , aparecerá un pico cuando se cumpla la condición de Bragg. Dicha representación se denomina difractograma o diagrama de

difracción (37). La interacción de los rayos X con los átomos del material produce un diagrama de difracción, el cual es característico de dicho material. Esta característica hace que el diagrama de difracción de polvo se considere como la huella dactilar de la fase cristalina que lo ha producido, pudiendo ser usado para su identificación (38).

A partir de los patrones de difracción es posible obtener los valores de las cristalitas del material, ya que se relaciona con el ancho a media altura (FWHM) de la línea de difracción hkl mediante la fórmula de Scherrer (ecuación 2) (39):

$$\beta_L = \frac{K \lambda}{L \cos(\theta)} \quad \text{(Ecuación 2)}$$

Donde \mathbf{d} es el tamaño promedio de la cristalita, \mathbf{k} es el factor de forma del cristal (0,89), λ la longitud de onda de la radiación utilizada o rayo incidente (λ_{Cu} : 1,5406 Å), θ es la posición del pico de difracción (ángulo entre el haz incidente y el plano del cristal) y β es el ancho de la línea de difracción medida a la mitad de la intensidad máxima.

Las medidas de difracción de rayos X se midieron en un difractómetro de monocristal Bruker Smart APEX CCD, provisto de tubos de rayos-x con ánodo de molibdeno y equipo para medir a bajas temperaturas.

IV.4.1.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM) y análisis de espectroscopia de dispersión de energía (EDS)

La microscopía electrónica de barrido es una técnica de análisis topográfico, estructural y composicional. En términos generales, un equipo de SEM toma una “imagen” de la muestra, aunque lo que se detecta realmente es la respuesta del material al impacto de un haz de electrones (electrones primarios), lo cual genera una serie de señales que son registradas en los diferentes detectores del equipo (40).

El equipo SEM (figura 12) puede tener diferentes detectores, uno de ellos es el EDS. El detector EDS recibe los rayos X procedentes de cada uno de los puntos de la superficie sobre los que pasa el haz de electrones. Como la energía dispersada de los rayos X es característica de cada elemento químico, proporciona información analítica cualitativa y cuantitativa de puntos, líneas o áreas seleccionadas en la superficie de la muestra (41).

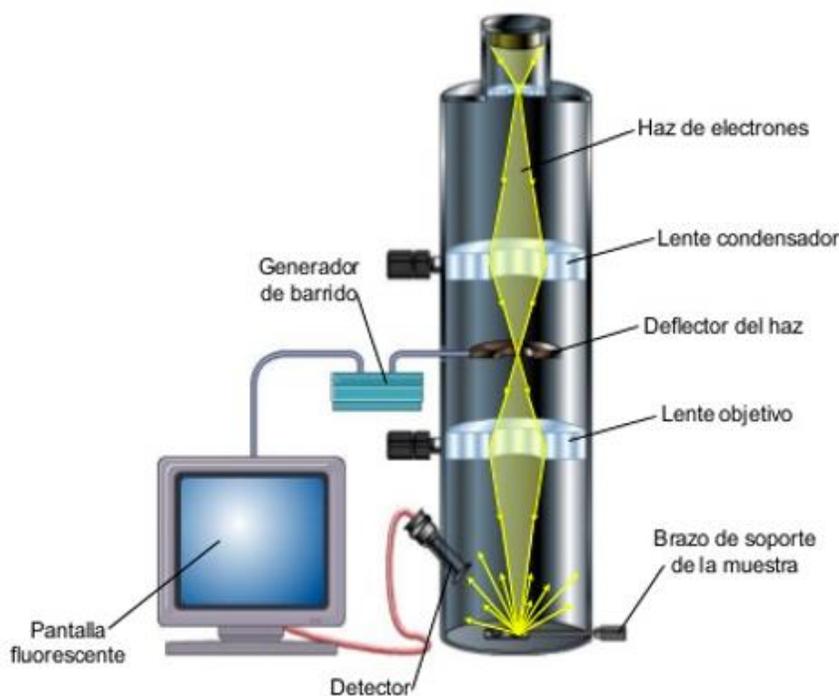


Figura 12. Esquema de microscopio electrónico de barrido (SEM).

En esta tesis, la morfología de la superficie se obtuvo mediante el microscopio de barrido electrónico (TESCAN, modelo Vega 3) utilizando voltajes de 10 y 20 kV. El estudio de la composición para el material híbrido (MoS_2/OGr) se realizó mediante el análisis de espectroscopia de dispersión de energía (EDS) utilizando una sonda Bruker (modelo QUANTAX 400a series) y aplicando un voltaje de 10 kV.

IV.4.1.4 Espectrofotometría UV/Vis

Técnica analítica sencilla y accesible que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones dentro del espectro UV-Visible. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula

puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica).

Cuando la luz (energía) es absorbida por una molécula se origina un cambio desde un estado energético basal o fundamental, E1, a un estado de mayor energía, estado excitado E2, y sólo se absorberá la energía que permita este cambio. Cada molécula tiene una serie de estados excitados que la distinguen del resto de las moléculas. Como resultado, la absorción que a distintas longitudes de onda presenta una molécula (su espectro de absorción) constituye una señal de identidad. Finalmente, la molécula excitada libera la energía que absorbió hasta el estado energético fundamental en la mayoría de las veces de manera no radiativa y el decaimiento es a través de sus estados vibracionales (42).

En espectroscopia, no sólo se aplica a la forma visible de la radiación electromagnética, sino también a las formas UV e IR, que son invisibles al ojo humano. En espectrofotometría de absorbancia se utilizan las regiones del ultravioleta (UV cercano, de 195-400 nm) y visible (400-780 nm).

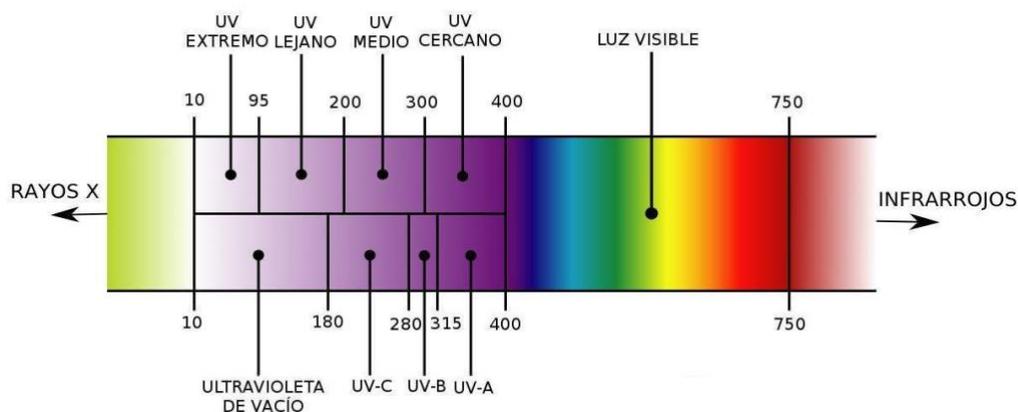


Figura 13. Región UV-vis-NIR del espectro electromagnético.

Lo que apreciamos es el color visible de una solución, la cual corresponde a las longitudes de onda de luz que transmite, que no absorbe. Este color observado corresponde al color complementario al color absorbido utilizando la rosa cromática. Por lo que para

realizar mediciones de absorción es necesario utilizar la longitud de onda en la que absorbe luz la solución coloreada (43).

Transmitancia: La fracción de la radiación incidente transmitida por la solución:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad \text{(Ecuación 3)}$$

Que se expresa a menudo como porcentaje:

$$T = \frac{I}{I_0} \times 100 \quad \text{(Ecuación 4)}$$

Absorbancia: Cantidad de luz absorbida por la muestra y se define:

$$A = \log\left(\frac{1}{T}\right) \quad \text{(Ecuación 5)}$$

Ley Lambert-Beer

La absorbancia está relacionada con la concentración de la sustancia, **c**, por la ley de Lambert-Beer, que se resume con la ecuación:

$$A = \varepsilon * b * c \quad \text{(Ecuación 6)}$$

La cantidad de luz absorbida dependerá de la distancia que atraviesa la luz a través de la solución del cromóforo y de la concentración de este (42).

Donde **c** se expresa en mol/L, **b** es la longitud del camino óptico (ancho de la celda que contiene la disolución de la sustancia) que se expresa en cm y **E** es la absorptividad molar, propiedad que es característica de cada sustancia correspondiente a la cantidad de radiación

que absorbe a una longitud de onda determinada por unidad de concentración, siendo sus unidades $\frac{L}{mol*cm}$ (44).

La cuantificación de la tiocolina se realizó con un espectrofotómetro Agilent 8453 con detector de arreglo de diodos utilizando celdas de cuarzo 1 cm.

IV.4.1.5 Electroquímica

Para la preparación del electrodo modificado se utilizó el método *drop-casting*, en el cual se deposita una gota que contiene el material de estudio previamente dispersado en el solvente (isopropanol) sobre la superficie del sistema. Se dejó secar durante el tiempo necesario para evaporar el solvente y finalmente obtener el material en estudio fijado a la superficie del sistema (figura 14) (45).



Figura 14. Esquema del método *drop-casting* para la modificación de electrodos.

Se utilizan electrodos conductores que permiten mantener en contacto el sistema de medida con el electrolito (figura 15).

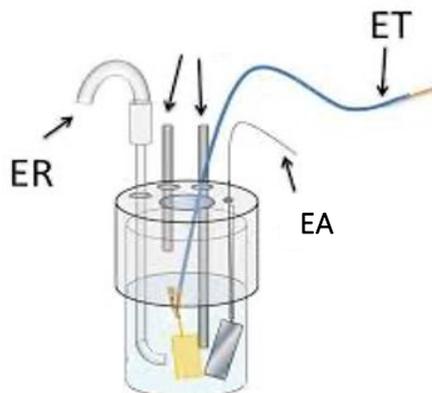


Figura 15. Electrodo utilizado en electroquímica. ER: Electrodo de referencia, ET: Electrodo de trabajo y EA: electrodo auxiliar.

Electrodo de trabajo: en el cual se produce la reacción electroquímica que se está estudiando.

Electrodo de referencia: aquel que su potencial permanece constante e invariable, independiente del electrolito. Se conoce su potencial respecto del electrodo patrón de hidrógeno y contra el cual se pueden medir los potenciales de electrodo no conocido.

Electrodo auxiliar: por el cual pasa toda la corriente necesaria para equilibrar la corriente observada en el electrodo de trabajo. Generalmente es un alambre de platino (46).

Voltametría Cíclica

A través de esta técnica es posible obtener información cualitativa de los procesos de transferencia de electrones. También se puede estudiar el grado de reversibilidad o irreversibilidad de un proceso redox, así como también determinar el número de electrones transferidos en una oxidación o reducción. Se realiza un barrido de potencial de forma cíclica; además el proceso electroquímico está dominado por la difusión de las especies a la superficie del electrodo (47).

Los electrodos de trabajo de carbono vítreo (GCE, CH Instruments) fueron pulidos con alúmina de 0,05 y 0,3 μm y lavados con agua desionizada. Luego fueron modificados con 19 μL MoS₂/L-cys, 21 μL OGr/L-cys 25 μL MoS₂/OGr/L-cys (concentración: 1 mg/mL cada uno) a través del método *drop casting* e inmersión. Las medidas electroquímicas se

realizaron en una celda de tres electrodos. Como electrodo de referencia se utilizó Ag/AgCl, 3,0 M KCl (CH Instruments) y como electrodo auxiliar se utilizó alambre de platino. Para la caracterización inicial de los sistemas, se realizó VC de ferroceno metanol (FcOH) 1 mM, se aplicó un barrido de potencial inicial de 0,000 V y un barrido de potencial final de 0,500 V. Para la voltametría cíclica de tiocolina se aplicó un potencial inicial 0,000 V, un potencial final 1,000 V y una velocidad de barrido de 0,100 V/s

Funcionalización de electrodos modificados

La funcionalización es la modificación de propiedades por átomos o moléculas en las paredes interiores o exteriores del nanomaterial. Estas modificaciones se realizan con el fin de obtener nuevas propiedades diseñadas para ciertas aplicaciones. La funcionalización implica entonces la unión de una o más moléculas a través de las paredes o extremos del material, los cuales podrán ser utilizados para anclar otras especies químicas como polímeros, nanopartículas, entre otros (48).

Funcionalización por inmersión: El electrodo modificado se introduce en la solución que contiene la molécula que va a modificar la superficie. Se deja por cierto tiempo y luego se lava 3 veces para asegurar que no queden moléculas libres de la solución modificadora.

Los electrodos modificados fueron funcionalizados con una solución de 5 mg/mL de L-Cisteína a través del método por inmersión a 30 y 60 minutos en un tubo *Eppendorf* y posteriormente fue lavado 3 veces con buffer fosfato para eliminar todo el aminoácido libre.

Luego de la funcionalización de los electrodos modificados, fueron aplicadas las técnicas electroquímicas mencionadas anteriormente.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1 Caracterización de nanoestructuras MoS₂, OGr y MoS₂/OGr

V.1.1 Dispersión dinámica de luz (DLS)

Para estudiar el tamaño hidrodinámico promedio de los materiales se utilizó la técnica DLS. En la figura 16 se presenta el histograma del MoS₂ *bulk* comercial en donde se puede apreciar que el tamaño promedio del material fue de 920 ± 14 nm (tabla 1).

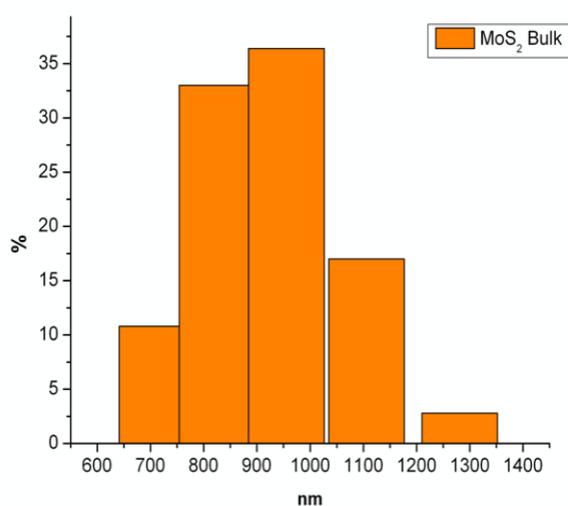


Figura 16. Histograma de la distribución de tamaños del MoS₂ *bulk* comercial.

Tabla 1. Tamaño promedio de las nanoestructuras laminares de disulfuro de molibdenita.

MoS ₂ <i>Bulk</i> comercial	
Promedio (nm)	Desviación estándar (nm)
920	14

El MoS₂ exfoliado presentó una distribución de tamaños mucho menor que el MoS₂ *bulk* comercial (figura 17), con un promedio de $43,0 \pm 0,4$ nm lo cual se explica debido al

tratamiento con ultrasonido realizado que fragmenta en nanoestructuras más pequeñas el material inicial.

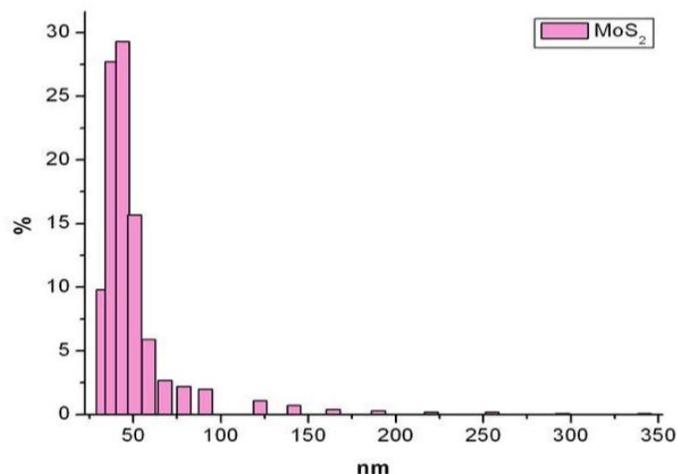


Figura 17. Histograma de la distribución de tamaños del MoS₂ exfoliado por ultrasonido.

Tabla 2. Tamaño promedio de las nanoestructuras laminares de disulfuro de molibdeno exfoliadas.

MoS₂ Exfoliado	
Promedio (nm)	Desviación estándar (nm)
43,0	0,4

Finalmente, como se muestra en la figura 18, el material híbrido (MoS₂/OGr) presenta un tamaño hidrodinámico promedio de 136±4 nm, tamaño más grande que los materiales individuales debido posiblemente a la interacción entre ambos materiales y también a su aglomeración.

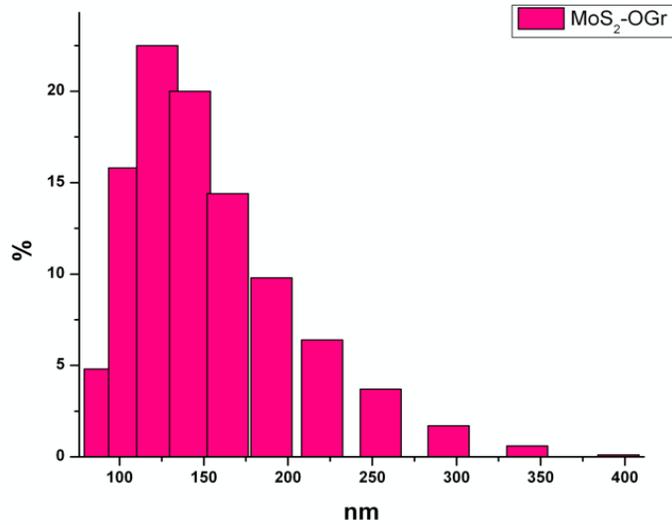


Figura 18. Histograma de la distribución de tamaños del MoS₂/OGr híbrido por ultrasonido.

Tabla 3. Tamaño promedio de las nanoestructuras híbridas de disulfuro de molibdeno y óxido de grafeno exfoliadas.

MoS ₂ /OGr Híbrido	
Promedio (nm)	Desviación estándar (nm)
136	4

V.1.2 Difracción de rayos X de polvo (DRX-P)

Para asegurar que el tratamiento con ultrasonido no afectaba la estructura del material, se realizó un análisis de fases de los distintos materiales.

En la figura 19 **a** se comparan los difractogramas de polvo del MoS₂ *bulk* y el MoS₂ exfoliado, este último posee los mismos planos de difracción que el material *bulk* por lo que se puede inferir que la estructura no cambia luego del tratamiento. No se observan picos extra de difracción que podrían ser atribuidos a contaminantes o a la formación de un nuevo material. El MoS₂ exfoliado presenta menor intensidad que el MoS₂ *bulk*, lo que se genera porque hay menos planos que difractan en ese ángulo 2θ , implicando la minimización de

tamaños de las estructuras difractadas. También se observa un leve ensanchamiento de las señales debido a que el material está disminuyendo su tamaño y perdiendo un poco de orden, sin dejar de ser un material cristalino. En la figura 19 **b**, se exhibe el difractograma del óxido de grafeno reducido en donde se observan los planos de difracción típicos de este nanomaterial.

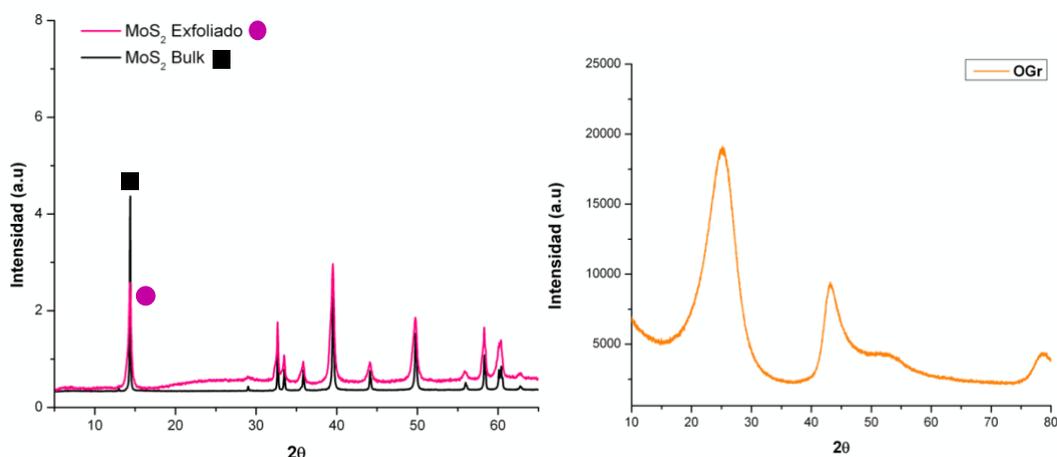


Figura 19. Análisis de fases de DRX de: **a)** Disulfuro de molibdeno exfoliado (rosado, círculo) y disulfuro de molibdeno *bulk* comercial (negro, cuadrado) **b)** Óxido de grafeno reducido (anaranjado).

En la figura 20, el híbrido MoS_2/OGr presenta ambos planos de difracción, tanto del disulfuro de molibdeno como el del óxido de grafeno reducido. Se obtiene una suma de ambos.

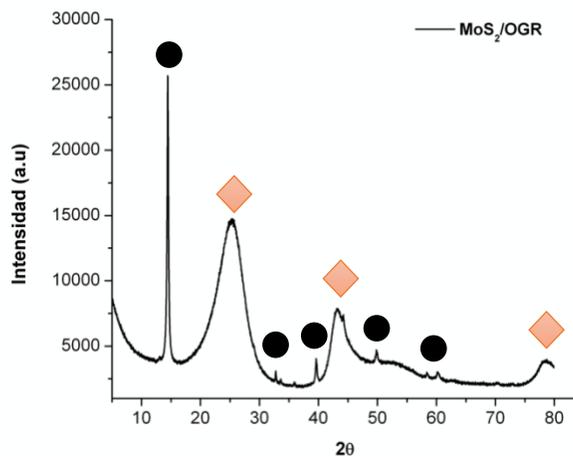


Figura 20. Análisis de fases de DRX del material híbrido (MoS_2/OGr). Planos de difracción de MoS_2 exfoliado (círculos negros) y OGr (rombos anaranjados).

V.1.2.1 Determinación del tamaño de cristalitas

A través de los patrones de difracción obtenidos y la ecuación de Debye-Scherrer (ecuación 2), se determinó el tamaño promedio de las cristalitas para los materiales en estudio (MoS₂ exfoliado, OGr y MoS₂/OGr).

Tabla 4. Tamaño de cristales promedios en nanómetros (nm) de los materiales utilizados calculados a partir de la ecuación Debye-Scherrer.

Muestra	Tamaño DLS (nm)	Tamaño cristalita (nm)
MoS ₂ <i>bulk</i>	920	65
MoS ₂ exfoliado	43	21
MoS ₂ -OGr	136	2

Utilizando la técnica de DLS se observa que el material exfoliado muestra una disminución de tamaño, respecto del material *bulk* (920 nm *bulk versus* 43 nm exfoliado). Respecto de los tamaños de las cristalitas, también hay una disminución en los tamaños obtenidos, lo cual indica que la utilización de ultrasonido para exfoliar produce que las cristalitas del *bulk* de 65 nm disminuyan a 21 nm en el material exfoliado.

En la formación del material híbrido, la técnica de DLS muestra un aumento de tamaño respecto de la MoS₂ exfoliada, lo que sería indicativo que la formación del material híbrido produce particulado de mayor tamaño entre el OGr y el MoS₂, es decir hay una formación de aglomeraciones entre ambos materiales. Por otro lado, el tamaño de cristalita disminuye a 2 nm mostrando que la utilización extra de ultrasonido (energía) produce una mayor ruptura y genera cristalitas con tamaños menores, como ha ido ocurriendo en todos los procesos donde se ha utilizado el ultrasonido.

V.1.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM) y análisis de espectroscopia de dispersión de energía (EDS)

Para determinar la morfología de los materiales MoS₂ exfoliado, OGr comercial y MoS₂/OGr se realizaron micrografías SEM.

En la figura 21 se presentan las micrografías correspondientes al MoS₂, donde se observan partículas con una morfología en forma de hojuelas con una textura lisa.

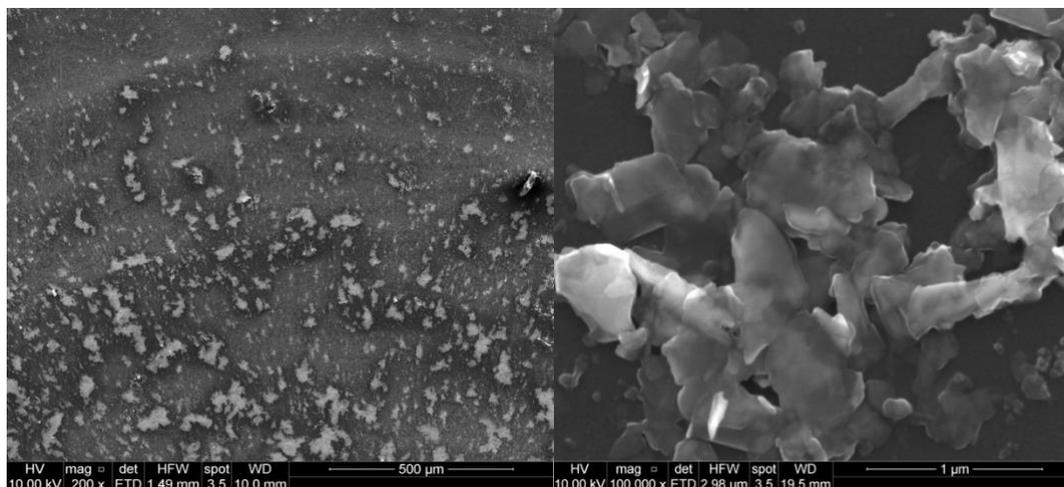


Figura 21. Micrografías SEM de disulfuro de molibdeno exfoliado a 500 µm (izquierda) y 1 µm (derecha).

Por otro lado, en la figura 22 se presentan las micrografías correspondientes a OGr, observándose partículas sin forma definida con una textura más bien rugosa.

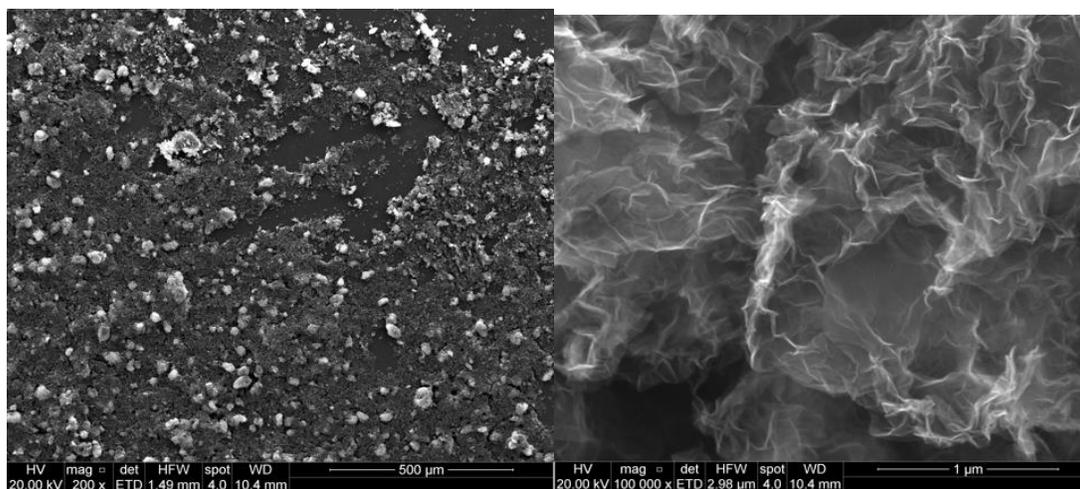


Figura 22. Micrografías SEM de óxido de grafeno reducido a 500 µm (izquierda) y 1 µm (derecha).

Finalmente, en la figura 23 se observan las micrografías del material híbrido en el cual se presentan partículas de morfología variada, es decir, hojuelas con textura lisa y material con una textura rugosa, lo cual da indicios de la presencia de ambos materiales.

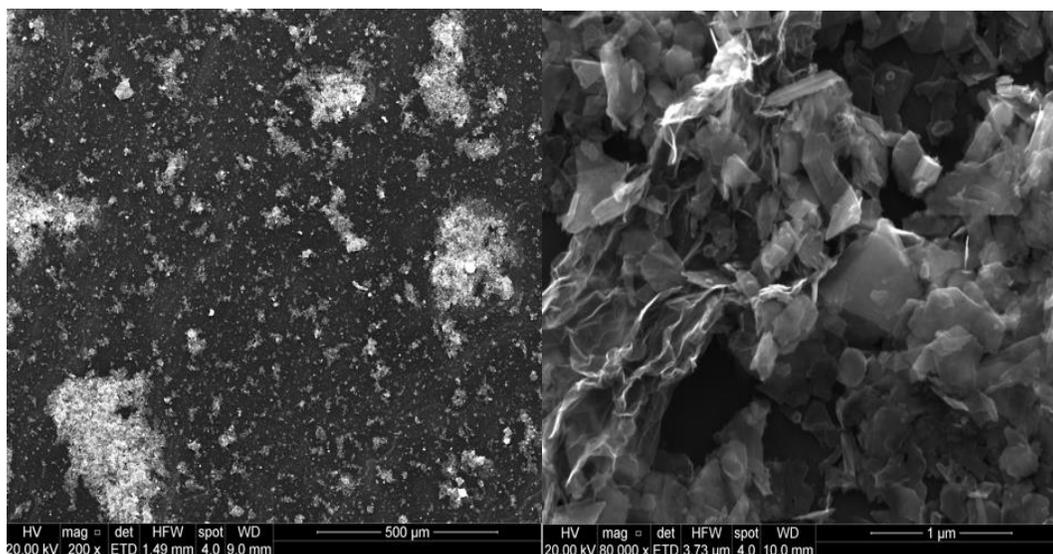


Figura 23. Micrografías SEM del material híbrido MoS₂/OGr a 500 µm (izquierda) y 1 µm (derecha).

Para asegurar esto último, se realizó un análisis EDS en dos puntos (figura 24) para corroborar la presencia de ambos materiales en la muestra.

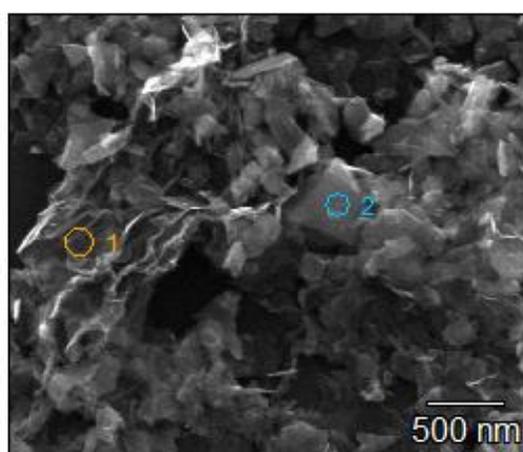


Figura 24. Micrografía SEM del material híbrido donde se realizó el análisis EDS en 2 puntos: punto 1 (zona rugosa) y punto 2 (zona lisa).

En el punto 1, correspondiente a la zona con una textura rugosa, se halló presencia de átomos de carbono y oxígeno (figura 25), lo que demuestra que en esa zona no hay nanoestructuras MoS₂. Basándose en la morfología, podría corresponder a OGr.

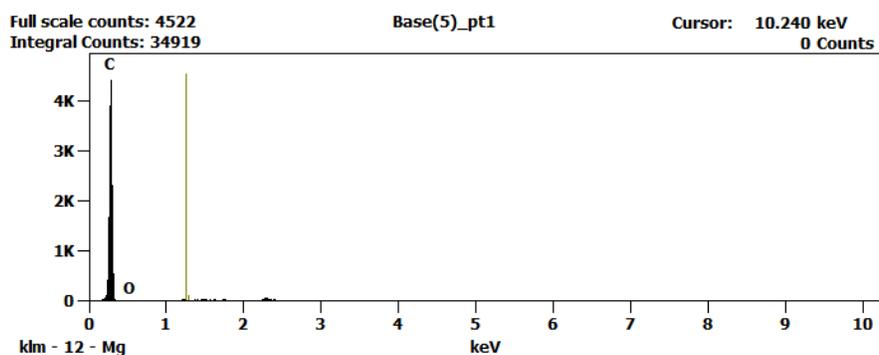


Figura 25. Espectro EDS realizado en el punto 1.

En el punto 2 se halló presencia de átomos de molibdeno, azufre y carbono (figura 26), lo que se debe a que en esta zona hay nanoestructuras laminares de MoS₂. Cabe destacar que las micrografías fueron tomadas en un disco de carbono por lo que la presencia de átomos de carbono siempre será visible, por eso en el punto 2 hay presencia de este elemento.

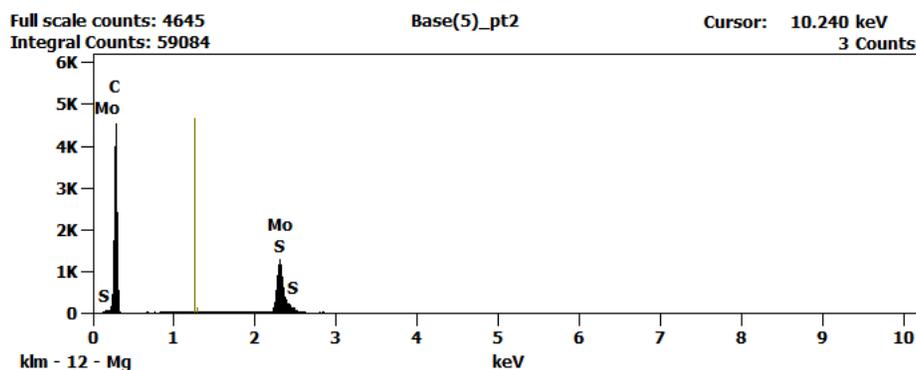


Figura 26. Espectro EDS realizado en el punto 2.

Claramente estas micrografías muestran que el material híbrido no es homogéneo en su morfología, y que tal como se observó por DLS, se forman agregados de mayor tamaño entre ambos materiales, que mediante el análisis puntual de EDS pueden ser claramente diferenciados.

V.2 Caracterización de electrodos modificados

V.2.1 Voltametría cíclica (VC) de ferroceno metanol (FcOH)

Para la caracterización inicial de los sistemas se realizó VC de ferroceno metanol (FcOH) 1 mM para los distintos electrodos: GCE sin modificar, GCE/MoS₂, GCE/MoS₂/OGr y GCE/OGr. En la figura 27 se observan los voltamogramas comparados para cada sistema en estudio. El electrodo de carbono vítreo sin modificar (GCE, curva negra, (A)) presenta un voltamograma típico para FcOH. Los valores de potencial de pico y la diferencia de potencial ΔE_p , se resumen en la tabla 5. El electrodo modificado con MoS₂ en anaranjado (curva (B)) muestra el mismo voltamograma que el GCE sin modificar con los mismos parámetros electroquímicos (tabla 5), por lo que el MoS₂ no estaría afectando el proceso de oxidación-reducción del FcOH. En morado, el electrodo modificado con OGr (curva morada, (C)) da una mayor corriente en comparación a los dos sistemas anteriores debido a su gran área superficial y por la incorporación de un material conductor como lo es el OGr. Finalmente, la curva rosada, D, se muestra el voltamograma del electrodo modificado con el híbrido (MoS₂/OGr) y se observa un gran aumento de corriente en comparación a los sistemas anteriores debido a la presencia de ambos materiales nanoestructurados; MoS₂ y OGr.

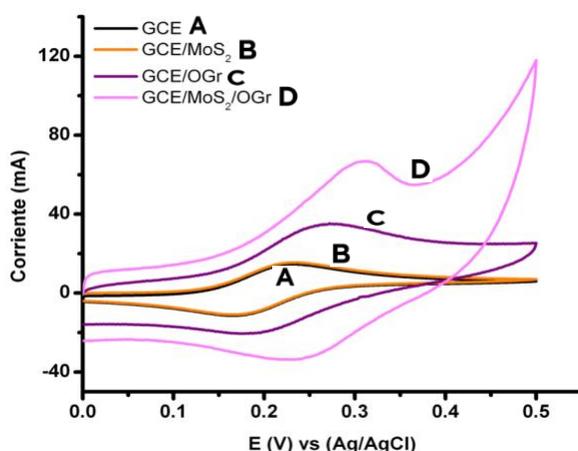


Figura 27. VC con electrodos: GCE sin modificar (curva negra, A), GCE/MoS₂ (curva anaranjada, B), GCE/OGr (curva morada, C) y GCE/MoS₂/OGr (curva rosada, D) en presencia de 1 mM de ferroceno metanol (FcOH). Velocidad de barrido 0,100 V/s, 0,1 M PBS pH 7,4.

De los datos de la tabla 5, se observa que con los dos últimos sistemas (OGr y MoS₂/OGr) se obtuvieron valores de ΔEp y potenciales de oxidación mayores, lo que demuestra que el sistema se hizo más resistivo a la transferencia electrónica y por esto, se necesitó más energía para que el proceso ocurra.

Tabla 5. Diferencia entre potencial de pico de oxidación y de reducción (ΔEp) y potenciales de oxidación para cada electrodo utilizado.

Electrodo	ΔEp (mV)	Potencial oxidación (V)
GCE	60	0,230
GCE/MoS ₂	60	0,230
GCE/OGr	77	0,270
GCE/MoS ₂ /OGr	71	0,300

V.2.2 Respuesta electroquímica de tiocolina

La señal analítica del biosensor está dada por la oxidación de la tiocolina. La tiocolina no es comercial por lo que es necesario obtenerla enzimáticamente. En la figura 28 se recuerda la reacción catalizada por la enzima acetilcolinesterasa que estará anclada al electrodo para poder hidrolizar acetiltiocolina a tiocolina, esta última será oxidada en el electrodo para dar la señal correspondiente.

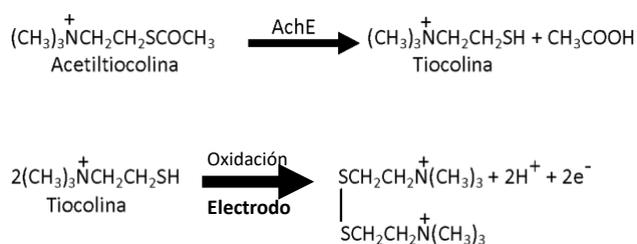


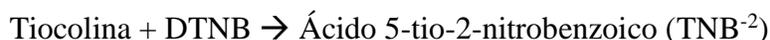
Figura 28. Reacción de hidrólisis de acetiltiocolina a tiocolina, y oxidación de tiocolina en el electrodo.

Generación de tiocolina en solución

La tiocolina, al no ser comercial, debe ser sintetizada enzimáticamente a través de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) a partir de:



Obtenido el producto de la reacción, se cuantificó siguiendo el Método de Ellman (49). Éste es un método analítico de tipo colorimétrico basado en la reacción de Ellman:



La tiocolina, molécula con un grupo -SH libre capaz de reaccionar con el DTNB, da como producto de sustitución el TNB⁻² que presenta un máximo de absorbancia a 415 nm en el rango visible del espectro, por lo que es posible hacer un seguimiento de la reacción enzimática midiendo la producción de TNB⁻² mediante espectrofotometría UV/Visible.

Se siguió la reacción a 30, 60 y 120 minutos (tabla 6) comenzando con acetiltiocolina 6 mM y 3 µL de acetilcolinesterasa. Se observa que a las dos horas de transcurrida la reacción se obtiene un 98% de tiocolina, por lo que los experimentos posteriores se realizaron luego de las 2 horas para asegurar una máxima concentración de tiocolina (Figura 29).

Tabla 6. Concentración y % de conversión obtenida luego de 30, 60 y 120 minutos.

Acetiltiocolina 6,0 mM				
Muestra	Concentración tiocolina			% Conversión a las 2 horas
	30 minutos	1 hora	2 horas	
1	4,3 mM	4,3 mM	5,9 mM	98%
2	4,2 mM	5,2 mM	5,9 mM	98%
3	4,3 mM	5,6 mM	5,9 mM	98%

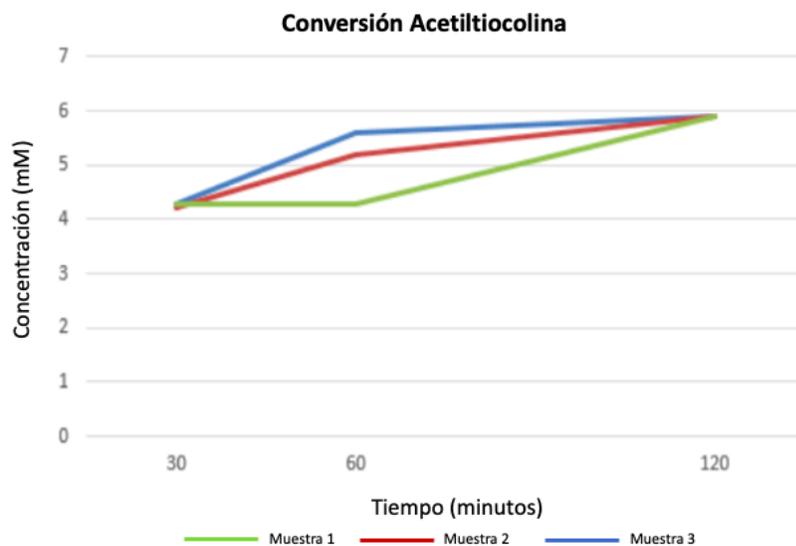


Figura 29. Representación gráfica de la conversión de acetilcolina a tiocolina a los 30, 60 y 120 minutos. Solución de partida: acetilcolina 6,0 mM.

Voltametría cíclica (VC) de tiocolina

Para la caracterización de los sistemas se realizó VC de tiocolina para los distintos electrodos: GCE, GCE/MoS₂, GCE/MoS₂/OGr y GCE/OGr.

En la figura 30 se presenta el VC obtenido utilizando el electrodo sin modificar (GCE), en donde se observa una señal analítica correspondiente a la oxidación de tiocolina a los 0,685 V con corrientes en el orden de los μA .

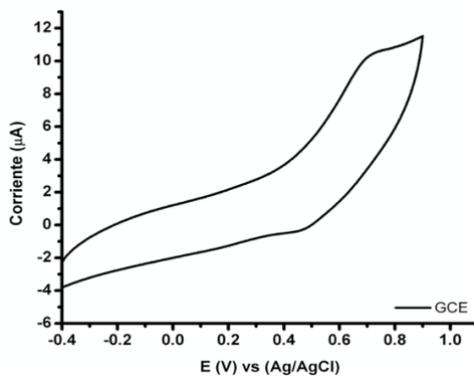


Figura 30. VC con electrodo GCE sin modificar en presencia de 1,2 mM de tiocolina. Velocidad de barrido 0,100 V/s, 0,1 M PBS pH 7,4.

En la figura 31 se comparan los VC obtenidos utilizando los diferentes electrodos modificados. En el voltamograma utilizando GCE sin modificar no es posible observar la señal analítica de este electrodo debido a que la corriente obtenida está en otra orden de magnitud. Para los electrodos modificados con OGr (figura 31, **(b)** morado) y MoS₂ (figura 31, **(c)** anaranjada), se presentan los VC amplificados en escala observándose que la tiocolina no presentó señal analítica frente a estos sistemas. Finalmente, para el electrodo modificado con el híbrido (figura 31, **(a)** rosado), la tiocolina presentó señal analítica en donde se observa la oxidación de esta a 0,718 V con una corriente en el orden de los mA.

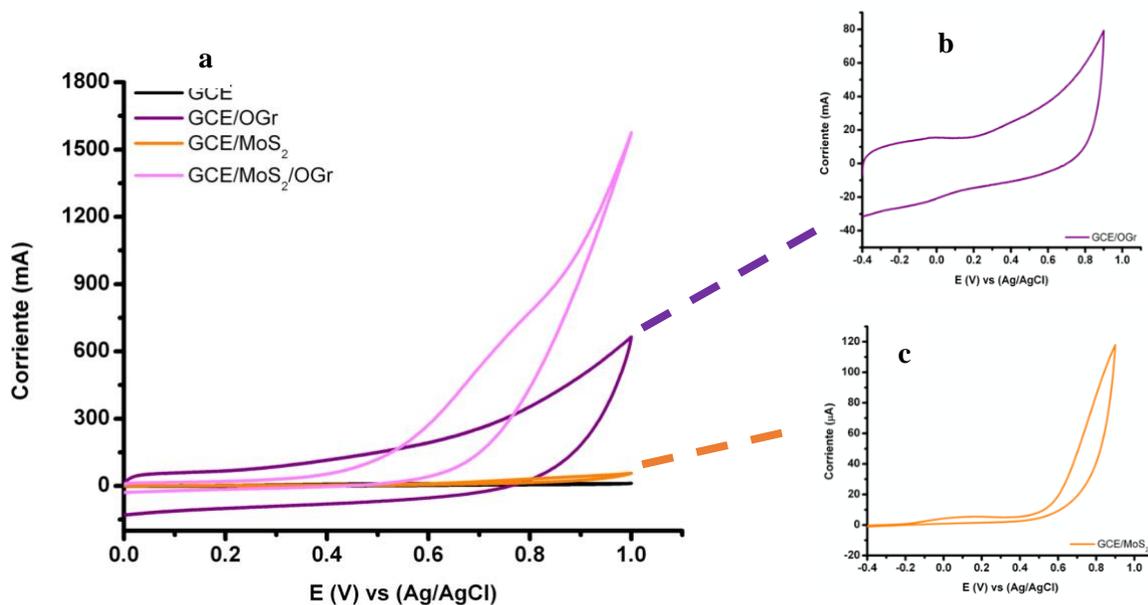


Figura 31. VC con electrodos: GCE sin modificar, **a)** rosado GCE/MoS₂/OGr, **b)** GCE/OGr, **c)** GCE/MoS₂ y en presencia de 1,2 mM de Tiocolina. Velocidad de barrido 0,100 V/s, PBS pH 7,4.

V.5 Funcionalización de electrodos modificados

Los electrodos previamente modificados con el material híbrido (GCE/MoS₂/OGr) fueron funcionalizados a través del método *drop-casting* con el aminoácido L-cisteína por 30 y 60 minutos. Para su caracterización se utilizó voltametría cíclica (figura 32).

En la figura 32 el voltamograma cíclico exhibe la respuesta del electrodo sin modificar GCE (curva negra, A), en donde no se observa una señal clara debido a la distinta orden de magnitud de la señal analítica obtenida (figura 30). La señal obtenida en morado, B, representa la respuesta obtenida con el electrodo modificado con el material híbrido con su respectiva señal de oxidación de tiocolina a 0,758 V. Se presenta en color anaranjado, C, y rosado, D, las señales electroquímicas del sistema funcionalizado por los 30 y 60 minutos respectivamente. Estos últimos presentaron una respuesta similar al sistema sin funcionalizar, indicando que este proceso de funcionalización no interfirió en la respuesta analítica o bien, el sistema no cambia la respuesta porque el proceso de funcionalización no fue satisfactorio.

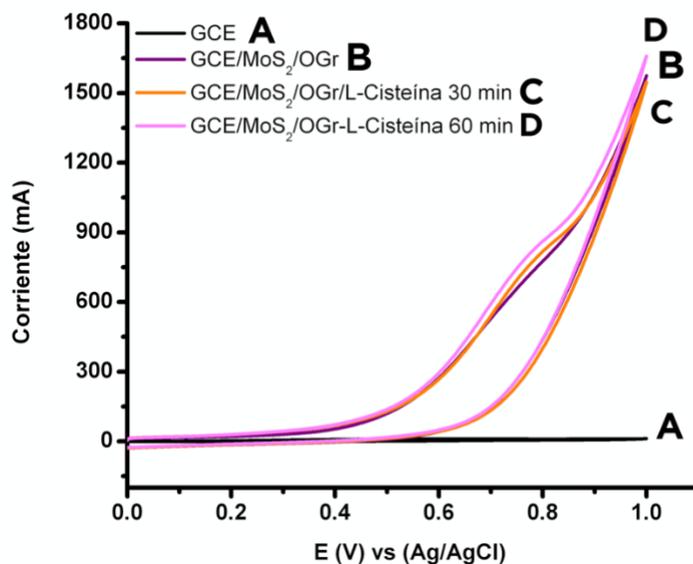


Figura 32. VC con diferentes electrodos: GCE sin modificar (curva negra, A), GCE/MoS₂/OGr sin funcionalizar (curva morada, B), GCE/MoS₂/OGr/L-Cys 30 min (curva anaranjada, C) y GCE/MoS₂/OGr/L-Cys 60 min (curva rosada, D) en presencia de 1,2 mM de tiocolina. Velocidad de barrido 0,100 V/s, 0,1 M PBS pH 7,4.

VI. DISCUSIÓN

Esta tesis contempló el desarrollo de un biosensor electroquímico para la detección de pesticidas organofosforados. Se utilizó OGr comercial y MoS₂ exfoliado para construir el composito y modificar el electrodo. El MoS₂ exfoliado se obtuvo a partir de MoS₂ *bulk* comercial, el cual fue sometido a una serie de sonicaciones y centrifugaciones.

Se estimó el tamaño hidrodinámico del material a través de DLS, obteniéndose tamaños promedios de $43,0 \pm 0,4$ nm para el material exfoliado en isopropanol (IPA) por 300 minutos. El tamaño obtenido por DLS es un tamaño estimado que considera el tamaño de la partícula solvatada (35), en este caso, las nanoestructuras de MoS₂ solvatadas por moléculas del solvente isopropanol. Wu, J. et al. (50) obtuvieron tamaños de 200 nm, medidos a través de la técnica TEM, exfoliando el material en el solvente 2-metil-2-pirrolidona por 100 minutos. A diferencia del DLS, ésta técnica entrega el tamaño correspondiente exactamente al material o partícula en estudio, no solvatada. Esto indica que la elección del solvente y el tiempo utilizado permitió obtener nanoestructuras de menor tamaño que lo reportado por los investigadores mencionados anteriormente.

El material híbrido utilizado para las pruebas electroquímicas fue obtenido por sonicación por 4 horas en solvente IPA en donde se obtuvo un tamaño hidrodinámico de 136 ± 4 nm. Este composito no ha sido reportado para la construcción de biosensores para la detección de pesticidas, a pesar de esto, Checkin, F et al. (51) construyeron un biosensor para la detección de ácido fólico en suero humano utilizando el composito MoS₂/OGr obtenido a través de sonicación por 30 minutos en solvente N, N-dimetilformamida, en donde obtuvieron tamaños sobre los 700 nm. Otros investigadores también utilizan este composito, pero dopado con otras moléculas o formando el híbrido con más materiales (11, 28). Los resultados obtenidos demuestran que el método utilizado permitió la obtención de un material exfoliado de bajo tamaño el cual fue utilizado para las pruebas electroquímicas.

La difracción de rayos X de polvo, demostró por su parte que al obtener el composito por sonicación aparecieron las señales de ambos materiales, una suma de ellos. Ambos

mantuvieron su estructura, en donde para el MoS₂ se observaron los planos de difracción típicos (002), (100), (103), (110) y para el OGr los planos de difracción (100) y (002) característicos de este material (51, 52).

Los datos obtenidos indicaron que el proceso de sonicación permitió la fragmentación del material a tamaños nanométricos, sin interferir en la estructura del material, tanto para el MoS₂ exfoliado como para el composito.

La caracterización electroquímica por VC utilizando una solución de FcOH, demostró que al modificar el electrodo con el composito se obtenía un aumento en la señal analítica (aumento en corriente) frente a los electrodos modificados con los nanomateriales individuales. Esto indica que ambos materiales estarían potenciando la respuesta electroquímica generando un proceso de sinergia. Este comportamiento ha sido reportado anteriormente, en donde al utilizar los materiales por sí solos exhiben menor respuesta analítica que cuando se utiliza el composito (53). Este resultado y el obtenido por DRX-Polvo indican que el MoS₂ y OGr estarían interaccionando entre sí. El potencial de oxidación para el ferroceno metanol aumentó de 0,230 a 3,000 V, lo cual indica que el sistema necesitó más energía para que el proceso electroquímico ocurriera. Estos aumentos en el potencial de oxidación de tiocolina puede deberse a la cantidad de material utilizada en la modificación del electrodo. Cabe destacar que muchos investigadores optimizan la cantidad de material utilizado en la modificación del electrodo para así obtener la máxima respuesta analítica posible (54, 55, 56), por lo que es un parámetro que se debió haber estudiado para así obtener mejores respuestas analíticas y potenciales de oxidación mas bajos. Cuando se probó el sistema en una solución con el mediador redox, tiocolina, se observó el mismo comportamiento, en donde el electrodo modificado con el composito mostró una señal de oxidación irreversible para la tiocolina a los 0,700 V, lo cual no se observó con los otros materiales, lo que indicó nuevamente el proceso sinérgico que estos dos materiales generan.

Como se decidió trabajar con una enzima como receptor biológico, fue necesario funcionalizar el sistema para poder anclar posteriormente la enzima. El voltamograma cíclico obtenido para los electrodos funcionalizados mostró la misma señal de oxidación irreversible

para la tiocolina que los electrodos sin funcionalizar, lo cual indica que el método de funcionalización no interfiere en la señal. También existe la posibilidad de que no haya habido funcionalización. Para corroborar esto, es necesaria la realización de otros experimentos que permitan la caracterización de la superficie. Por ejemplo, Ayat et al. (57) desarrollaron un biosensor de silicio poroso que permitió la funcionalización a través de hidrosililación térmica con cadenas de ácido carboxílico. Luego se realizó una activación a través del método EDC-NHS para el anclaje de la enzima acetilcolinesterasa. Para estudiar la superficie, utilizaron la técnica de medición de ángulo de contacto. Considerando una gota de líquido depositada sobre una superficie sólida plana y horizontal, el ángulo de contacto se define como el ángulo formado por la intersección de la interfaz líquido-sólido y la interfaz líquido-vapor (adquirido geoméricamente aplicando una línea tangente desde el punto de contacto a lo largo de la interfaz líquido-vapor en el perfil de la gota) (58). La figura 33 exhibe que un ángulo menor a 90° ($\theta < 90^\circ$) indica que la humectación de la superficie es favorable y el líquido se extenderá sobre el área superficial, mientras que un ángulo mayor a 90° ($\theta > 90^\circ$) indica generalmente que la humectación de la superficie no es favorable por lo que el líquido minimiza el contacto con la superficie y forma una gota compacta (58).

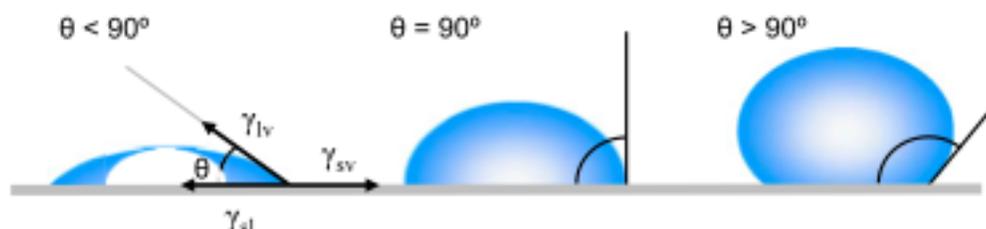


Figura 33. Ilustración del ángulo de contacto formado por gotas de líquido sobre una superficie sólida, lisa y homogénea. Fig. recuperada de Ref. 58.

En este caso, los investigadores (57) obtuvieron ángulos mayores a 90° debido a la naturaleza hidrofóbica de la superficie (silicio poroso con superficie hidrogenada), pero cuando funcionalizaron y activaron por EDC-NHS (funciones polares expuestas) el ángulo obtenido fue menor a 90° , indicando que la superficie se tornó hidrofílica debido a la exitosa funcionalización.

Otra forma interesante de estudiar si ocurrió o no funcionalización, es realizar una voltametría cíclica aplicando potenciales hacia valores negativos que demuestre el rompimiento del enlace S-S que se forma entre el MoS₂ y la L-cisteína.

Los experimentos que se alcanzaron a realizar exhibieron un material comprometedor para la construcción de biosensores para pesticidas. debido a su tamaño a nanoescala obtenido por sonicación en solvente IPA y también, por el efecto sinérgico que exhibieron en los experimentos electroquímicos por lo que estas características posicionan al material híbrido MoS₂/OGr como un excelente composito para la generación futura de nuevos biosensores.

VII. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO.

Se realizó una búsqueda exhaustiva de la bibliografía existente relacionada a la construcción de biosensores electroquímicos para la detección de pesticidas. Todos los trabajos presentados fueron publicados en los últimos 4 años (periodo 2016-2020) los cuales incluyen estudios con distintos nanomateriales como MoS₂, OGr y otros. En total, 15 estudios serán presentados y contrastados para lograr abordar los objetivos que no pudieron realizarse experimentalmente.

VII.1 Sistemas utilizados en cada artículo:

- a) **GCE/m-MoS₂/PdNi NHs/CS:** Song et al. construyeron un sistema con electrodos de carbono vítreo (GCE) modificados con nanohilos (NHs) de PdNi, mono-nanoláminas (m-MoS₂) de MoS₂ y quitosano (CS) (25).
- b) **EPI/OGr-MoS₂-NPsAu:** Jia et al. construyó el electrodo de trabajo en base a *films* flexibles de poliimida (EPI) modificadas óxido de grafeno reducido (OGr), monoláminas de disulfuro molibdeno (MoS₂) y nanopartículas de oro (AuNPs) (59).
- c) **GCE/AgNPs-N-F-MoS₂/CNTs-NH₂:** Song et al. construyeron un sistema utilizando electrodos de carbono vítreo (GCE) modificadas con nanopartículas de plata (AgNPs) y nanoláminas de disulfuro de molibdeno co-dopadas con nitrógeno y flúor (N-F-MoS₂) funcionalizadas con nanotubos de carbono y grupos aminos (CNTs-NH₂) (60).
- d) **GCE/OGr-CS/AuNPs/CPBA:** Liu et al. realizaron un biosensor utilizando electrodos de carbono vítreo (GCE) modificados con nanocompositos de óxido de grafeno reducido, nanopartículas de oro y ácido 3-carboxifenilborónico (CPBA) (61).
- e) **GCE/Ag@OGr-NH₂/NA/GA:** Guler et al. crearon un biosensor utilizando electrodos de carbono vítreo (GCE) modificado con nanocompositos de Plata/Óxido de grafeno reducido aminado (Ag@OGr-NH₂), glutaraldehído (GA) y nafiión (NA) (62).
- f) **GCE/OGr:** Da Silva et al. realizaron un biosensor utilizando electrodos de carbono vítreo (GCE) modificados con óxido de grafeno reducido (OGr) (63).

- g) **GCE/Ag-OGr-NH₂/poli(FBThF)**: Zhang et al. utilizaron electrodos de carbono vítreo (GCE) y modificaron con un polímero conjugado (poli(FBTHF)) y nanocompositos de plata y óxido de grafeno aminado (Ag-OGr-NH₂) (64).
- h) **GCE/CuNHs-OGr-TEPA/CS**: Li et al. crearon un biosensor utilizando electrodos de carbono vítreo (GCE) modificados con nanohilos de cobre, óxido de grafeno reducido tetraetilen-pentamina (OGr-TEPA) y quitosano (CS) (65).
- i) **GCE/Ti₃C₂T_x-CS**: Zhou et al. utilizaron electrodos de carbono vítreo (GCE) modificados con nanocompositos de carburos metálicos de transición (Ti₂C₂T_x) y quitosano (CS) (66).
- j) **GCE/OGr/TiO₂-CS**: Cui et al. utilizaron electrodos de carbono vítreo (GCE) modificados con nanocompositos de óxido de titanio (TiO₂) y quitosano (CS) (67).
- k) **GCE/AuNRs@MS'@TiO₂-CS/CS**: Cui et al. utilizaron electrodos de carbono vítreo modificados con óxido de titanio y quitosano (TiO₂-CS) dopadas con nanobarras de oro (AuNRs) (68).
- l) **GCE/AgNHs/TiO₂-CS/CS**: Wangbo et al. crearon un sistema con electrodos de carbono vítreo (GCE) modificados con nanohilos de plata (AgNHs), dióxido de titanio (TiO₂) y quitosano (CS) (69).
- m) **GCE/AgNhs/Gra/TiO₂-CS/CS**: Zhang et al. crearon un sistema con electrodos de carbono vítreo (GCE) modificado con nanohilos de plata (AgNHs), grafeno (Gra), nanocompositos de óxido de titanio (TiO₂) y quitosano (CS) (70).
- n) **PSiE/COOH**: Ayat et al. construyeron un electrodo poroso de silicio (PSi) funcionalizado con grupos -COOH (57).
- o) **GCE/3DG-CuONFs/CS**: Bao et al. realizaron un biosensor utilizando electrodos de carbono vítreo modificados con nanoflores de óxido de cobre (CuONfs), grafeno en 3D (3DG) y quitosano (CS) (71).

Como es posible apreciar, distintos materiales son utilizados en la modificación de los electrodos donde generalmente se utiliza más de un material (híbrido) para obtener mejores respuestas analíticas y cada uno de ellos utiliza diferentes técnicas para poder anclar la enzima al sistema. El proceso de inmovilización confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio en un soporte dando lugar a formas insolubles que retienen su actividad

catalítica (72). Los métodos de inmovilización se suelen clasificar en 2 categorías: 1) Retención física y 2) Unión química (73):

VII.1.1 Retención física

Atrapamiento: método basado en la oclusión de las enzimas dentro de una red polimérica que permite al sustrato y a los productos pasar a través de ellos y retener las enzimas.

Inclusión en membranas: puede ser por microencapsulación en donde las enzimas están rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero la enzima permanece encapsulada. También con reactores de membrana en donde los reactores emplean membranas permeables al producto final, permeables o no al sustrato inicial e impermeable para la enzima (74).

De los artículos estudiados, los que utilizan técnicas de inmovilización física son:

Tabla 7. Electrodo de trabajo modificados con distintos materiales que utilizan inmovilización física con quitosano (CS).

Electrodo de trabajo	Referencia
GCE/m-MoS ₂ /PdNi NHs/CS	25
GCE/CuNHs-OGr-TEPA/CS	65
GCE/Ti ₃ C ₂ T _x -CS	66
GCE/OGr/TiO ₂ -CS	67
GCE/AuNRs@MS'@TiO ₂ -CS/CS	68

GCE/AgNHs/TiO ₂ -CS/CS	69
GCE/AgNHs/Gra/TiO ₂ -CS/CS	70
GCE/3DG-CuONFs/CS	71

VII.1.2 Retención química

Existen 3 formas de inmovilizar químicamente una enzima (75):

Adsorción: técnica en donde la enzima se une sin funcionalizar mediante las interacciones iónicas como fuerzas de van der Waals y puentes de hidrógeno.

Unión covalente: consiste en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionan con nucleófilos de las proteínas.

Entrecruzamiento: se utilizan reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de enzima.

Tabla 8. Electrodo de trabajo con su respectivo método de inmovilización química.

Electrodo de trabajo	Tipo de inmovilización	Referencia
EPI/OGr-MoS ₂ -NPsAu	Unión covalente con nanopartículas de oro	59
GCE/AgNPs-N-F-MoS ₂ /CNTs-NH ₂	Unión covalente con nanotubos de carbono aminados	60
GCE/OGr-CS/AuNPs/CPBA	Unión covalente con CPBA	61
GCE/Ag@OGr-NH ₂ /NA/GA	Entrecruzamiento con GA	62
GCE/OGr	Entrecruzamiento con óxido de grafeno	63
GCE/Ag-OGr-NH ₂ /poli(FBThF)	Entrecruzamiento con poli(FBThF)	64
PSiE/COOH	Unión covalente con superficie carboxilada	57

Algunos investigadores, como Ayat et al. (57), utilizan la técnica EDC-NHS previo al anclaje de la enzima para que la interacción enzima-superficie sea más eficiente.

Método EDC-NHS: Este método consiste en la formación de compuestos intermediarios que reaccionan fácil y rápidamente para producir enlaces covalentes entre los grupos carboxilos y los grupos aminos de la enzima acetilcolinesterasa. Los mediadores EDC NHS actúan como catalizadores al proveer una ruta alternativa con una menor energía de

activación (76). Con esto, los investigadores activan los grupos -COOH del material carboxilado para que reaccionen con los grupos amino de la enzima.

Generalmente, se observa un incremento en la estabilidad de las enzimas luego de su inmovilización, que se debe a (72):

- 1) *Estabilización conformacional de la enzima*: esto se debe a la existencia de uniones multi-puntuales enzima-soporte. La estructura de la enzima (estructura terciaria) adquiere una mayor rigidez y se hace más resistente a la desactivación térmica o química. Cabe aclarar que esto ocurre con el método que incluye formación de enlaces covalentes.
- 2) *Protección frente a proteasas*: al unirse a soporte se elimina su capacidad proteolítica y evita su autólisis.
- 3) *Evita agregación intermolecular*: esto debido a que se mantienen las enzimas retenidas en una región de la superficie.
- 4) *Alteración del microentorno de la enzima*: esto ocurre por la interacción de la enzima con el soporte.

Pero también, la actividad de la enzima puede disminuir e incluso perderse. Esto se puede deber a (73):

- 1) La unión enzima-sustrato se produce de tal forma que se impide el paso del sustrato.
- 2) Los grupos reactivos del soporte reaccionan con algún aminoácido del centro activo de la enzima o algún grupo que sea esencial para la actividad catalítica de la enzima.
- 3) La inmovilización puede provocar cambio conformacional en la proteína e inactivarla.
- 4) Las condiciones experimentales causan la desnaturalización de la enzima.

Si la enzima retiene cierta actividad enzimática ya sea una disminución o aumento de la actividad, esto puede deberse a (73):

- 1) *Efectos difusionales*: debido a la inmovilización, la difusión de los sustratos hacia el centro activo puede estar impedida por resistencias de tipo externo e interno.

- 2) *Efectos electrostáticos*: efecto entre el sustrato y el soporte, por ejemplo, si tienen la misma carga existe una repulsión mutua, mientras que con cargas opuestas hay atracción.
- 3) *Impedimentos estéricos*: o de tamaño de sustrato. Toda enzima puede ser inmovilizada sin que haya pérdida de actividad lo cual suele ser válido cuando el sustrato es de bajo peso molecular.
- 4) *Efectos en el microentorno*: Al inmovilizar la enzima, ésta se somete a un entorno diferente al habitual. Se puede observar un desplazamiento en el valor del pH óptimo de la catálisis enzimática y también un intervalo de pH mayor en el cual la enzima puede actuar de forma eficiente.

VII.2 Caracterización de electrodos modificados

VII.2.1 Voltametría Cíclica

Como se mencionó anteriormente, la acetilcolinesterasa cataliza la hidrólisis de acetiltiocolina a la tiocolina, generando una señal electroquímica correspondiente a la oxidación irreversible de la tiocolina. Esta señal es la utilizada para evaluar la incorporación de la enzima al biosensor y optimizar las condiciones de inmovilización. Para este propósito se utiliza voltametría cíclica. Algunos estudios siguieron esta técnica para demostrar la inmovilización de la enzima en sus respectivos sistemas.

Por ejemplo:

- a) Jia et al. (59) utilizaron esta técnica con un barrido de potencial cíclico desde 0,200 V a 0,800 V. Como se observa en la figura 34 **a**, se utilizó el electrodo modificado en ausencia de acetiltiocolina (**a**) y en presencia de acetiltiocolina (**b**).
- b) Liu et al. (61) por su parte, utilizaron un barrido de potencial cíclico de 0,200 a 1,000 V con los electrodos modificados con (**a**) GCE, (**b**) electrodo modificado sin la enzima y (**c**) electrodo modificado con la enzima, todos estos en ausencia de acetiltiocolina (solo en buffer fosfato) y (**h**) electrodo modificado con la enzima en presencia de acetiltiocolina. Solo en este último caso se obtuvo respuesta electroquímica al estar presente la enzima y la acetiltiocolina (figura 34, **b**).

- c) Zhou et al. (66) utilizaron un barrido de potencial cíclico de 0,200 a 1,200 V. En la figura 34 c se observan los electrodos (a) GCE, (b) sistema sin la enzima y (c) sistema con la enzima en presencia de acetiltiocolina.

En todos los casos, los electrodos modificados sin la enzima en presencia o no de acetiltiocolina no presentaron pico de oxidación de tiocolina. Cuando los electrodos se modificaron con la enzima sin presencia de acetiltiocolina, se observó el mismo comportamiento mencionado anteriormente, y cuando los electrodos se modificaron con la enzima en presencia de acetiltiocolina, se observó un pico de oxidación de tiocolina a 0,490 V (a), 0,685 V (b) y 0,655 V (c).

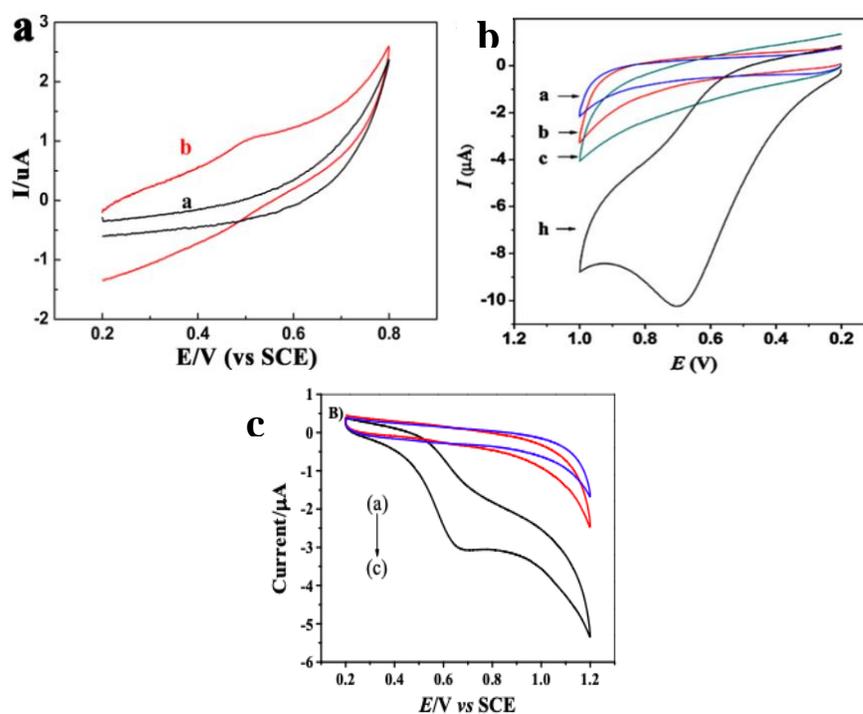


Figura 34. En a) voltamograma cíclico utilizando electrodo AChE/AuNPs-MoS₂-rGO/PI en ausencia (curva a, negro) y presencia (curva b, rojo) de 90 mg/mL de acetiltiocolina en una solución 0,1 M PBS pH 7,4. En b) voltamograma cíclico de GCE (a, azul), AChE/CPBA/AuNPs/OGr-CS/GCE (c, celeste) en PBS 0,1 M, pH 7,0; y CPBA/AuNPs/OGr-CS/GCE (b, rojo), AChE/CPBA/AuNPs/OGr-CS/GCE (h, negro) en 0,1 M PBS pH 7,0 que contiene 1,0 mM acetiltiocolina. En c) GCE/Ti₃C₂T_x-CS PBS pH 8,0. Velocidad barrido 0,100/0,200 V/s (Figura extraída de referencias 50, 52, 56). En c) voltamograma cíclico utilizando GCE (a, azul), CS-Ti₃C₂T_x/GCE (b, rojo) y AChE/CS-Ti₃C₂T_x/GCE (negro) en una solución 0,1 M PBS pH 8,0 y 1,0 mM acetiltiocolina. Figura recuperada de Ref. 59, 61, 66.

VII.2.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Otras técnicas pueden ser utilizadas para demostrar el anclaje de la enzima al material, por ejemplo, da Silva et al. (63), aparte de las pruebas electroquímicas correspondientes, realizaron estudios de imágenes SEM de sus electrodos modificados con y sin la enzima.

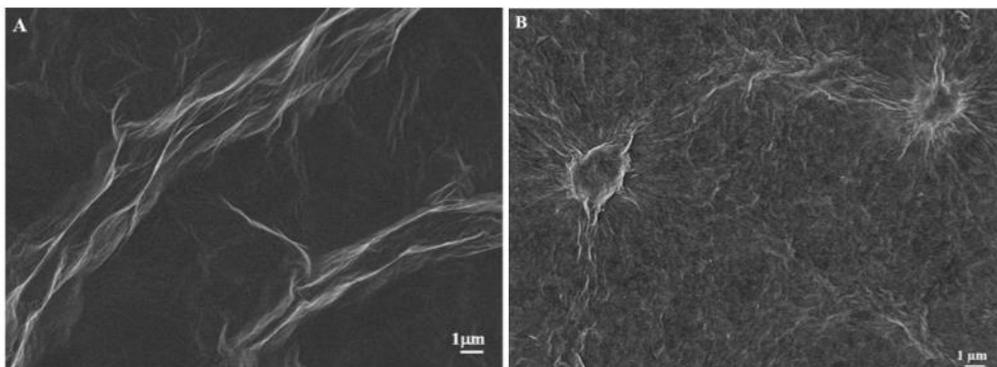


Figura 35. Micrografías SEM de óxido de grafeno reducido (izquierda) y óxido de grafeno reducido/acetilcolinesterasa. Figura recuperada de Ref. 63.

En la figura 35 de la izquierda se observa el OGr con su morfología típica y en la derecha se observa la incorporación de la enzima en el material formando *clusters*, lo cual permitiría inmovilizar la enzima en el material.

Li et al. (65), para demostrar la inmovilización de la enzima, utilizan espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS):

VII.2.3 Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS)

Técnica no destructiva particularmente sensible a pequeños cambios en el sistema que permite la caracterización de las propiedades de materiales y sistemas electroquímicos incluso en medios poco conductores. Consiste en la aplicación de una perturbación senoidal de potencial eléctrico de frecuencia variable al material estudiado y el registro de la respuesta en corriente dentro de una celda electroquímica (77).

Impedancia: Se define como el cociente entre el potencial aplicado y la intensidad medida a la salida (78).

$$I = V/Z \quad \text{(Ecuación 7)}$$

Los investigadores entonces compararon la respuesta de **(a)** GCE, **(b)** GCE modificado con los nanomateriales sin la enzima y **(c)** GCE modificado con los nanomateriales con la enzima representado en el diagrama de Nyquist (figura 36) (65):

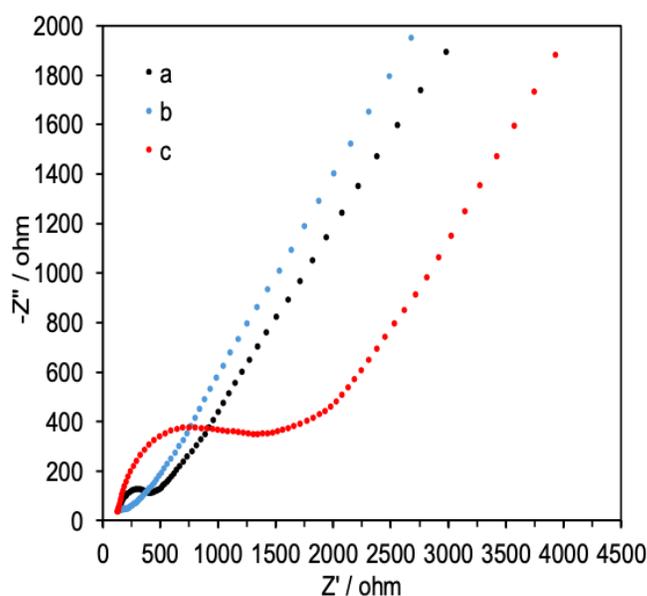


Figura 36. EIS de electrodos **a)** GCE (negro), **b)** GCE/OGGr-Cu-TEPA (celeste) y **c)** GCE/OGGr-TEPA-Cu-AChE-CS (rojo) en una solución 0,1 M KCl con 5,0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Figura recuperada de Ref. 65.

Estos resultados demostraron que en **(b)** desaparece el semicírculo de la curva **(a)** correspondiente al GCE. Esto indicó que se acelera la transferencia de electrones y disminuyó la impedancia del electrodo. Cuando se agregó la enzima **(c)**, el semicírculo de la curva aumentó significativamente, indicando que la enzima se inmovilizó y aumentó la impedancia del electrodo. Todo esto podría atribuirse a la inherente conductividad eléctrica de los materiales utilizados.

Esta técnica también es utilizada por otros investigadores (60-67, 70, 72) que desearon demostrar una correcta inmovilización de la proteína.

Demostrada la inmovilización de la enzima, es importante optimizar las condiciones de los experimentos para así obtener la mejor respuesta analítica posible.

VII.3 OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES EXPERIMENTALES

Al utilizarse como componente biológico la enzima acetilcolinesterasa, es necesario tener en cuenta que la enzima al ser una proteína que posee estructura terciaria puede desnaturalizarse, o sea, perder su estructura típica (79).

Los factores que más influyen en la actividad catalítica de las enzimas son el pH y la temperatura a la que ocurre la reacción (80):

- **pH:** Estas proteínas poseen grupos ionizables en las cadenas laterales de los aminoácidos que lo conforman. El estado de ionización (carga positiva, negativa o neutra) de estos grupos funcionales, y por lo tanto la configuración estructural de la enzima, va a depender del pH del medio. Entonces, cada enzima va a tener una actividad óptima a un pH óptimo.
- **T°:** El aumento de temperatura en general aumenta la velocidad de las reacciones químicas, pero a partir de cierta temperatura se desnaturaliza la enzima. A mayor temperatura, la actividad enzimática disminuye hasta desaparecer.

Por esta razón, es importante conocer el valor óptimo de estos parámetros. Ningún artículo reporta estudios en función de la temperatura por lo que se asume que la temperatura óptima es la temperatura ambiente. Por otra parte, el parámetro mayormente estudiado es el pH:

VII.3.1 Efecto del pH

Casi todas las enzimas intracelulares exhiben una importante dependencia al valor del pH. Normalmente muestran una actividad óptima entre pH 7,0 y 9,0 y pueden ser denaturalizadas a bajos o altos valores de pH (64).

Para determinar el efecto del pH una de las técnicas utilizadas es la voltametría de pulso diferencial (VPD):

VII.3.1.1 Voltametría de pulso diferencial (VPD):

En esta técnica no se utiliza un barrido lineal de potencial. En lugar de ello, se aplica una rampa de potencial con las siguientes características (81):

El potencial inicial aplicado durante la mayor parte del tiempo de vida de la gota aumenta de gota a gota, con incrementos de amplitud constante y pequeños. Antes de la caída de la gota, se aplica un impulso de potencial constante durante un tiempo corto y definido. Se miden dos intensidades de corriente en la misma gota: antes de aplicado el impulso y otra antes de la caída de la gota. Se registra la diferencia entre estas dos intensidades de corriente en función del potencial, generando de esta forma voltamogramas en forma de “pico”, como se observa en la figura 37.

Esta técnica se caracteriza por tener alta sensibilidad debido a la disminución de la contribución de la corriente capacitiva (no Faradaica), alcanzando límites de detección en el orden de los 1×10^{-10} hasta los 1×10^{-4} M (81).

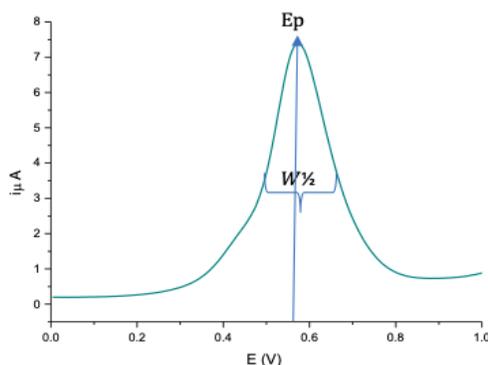


Figura 37. Respuesta típica en VPD.

Para estudiar esto, se prepararon tampones con distintos valores de pH (60-66, 72) y se obtuvieron resultados como los de la figura 38 **a,b** en donde los investigadores presentaron un gráfico Corriente vs pH en base a los voltamogramas obtenidos:

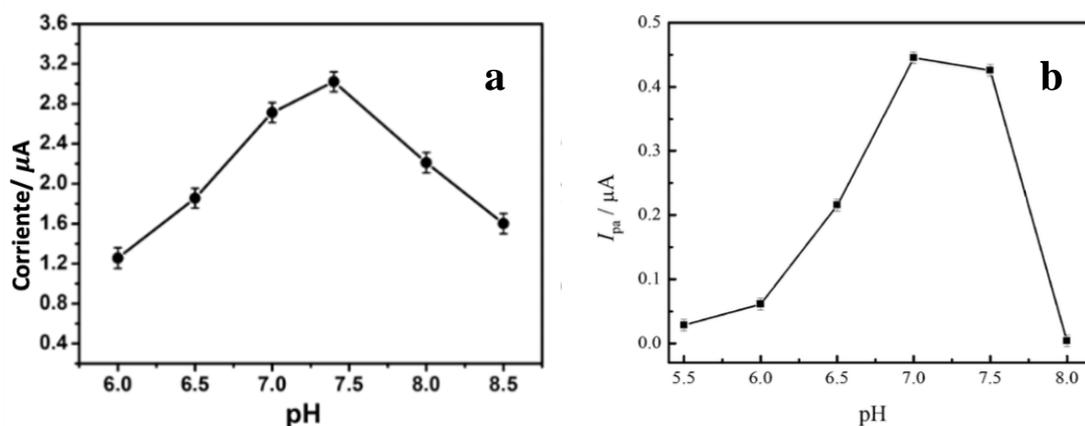


Figura 38. En **a)** efecto del pH del PBS en el pico de corriente anódica para la oxidación de tiocolina a partir de la respuesta VPD utilizando AChE/CNTs-NH₂/Ag NPs-N-F-MoS₂/GCE en una solución con 4,0 mM acetiltiocolina y distintos valores de pH de PBS. En **b)** efecto del pH del PBS en el pico de corriente anódica para la oxidación de tiocolina a partir de la respuesta VPD utilizando AChE/OGr/GCE en una solución 0,2 M PBS pH 7,0 y 40 μM de acetiltiocolina. Figura recuperada de Ref. 60, 63.

Como se observa en la figura 38, en **(a)** estudiaron un rango de pH entre 6,0-8,5 y la mayor respuesta analítica se obtiene a pH 7,5, por ende, ese pH fue utilizado como pH óptimo (60) y en **(b)** utilizaron un rango de pH de 5,5-8,0 y la máxima señal la obtienen a pH 7,0, pH utilizado como pH óptimo (63). Como muestra la imagen 38, luego de cierto pH la respuesta comenzó a disminuir lo cual podría explicarse a que, al alcanzar valores extremos de pH, ya sea ácidos o básicos, la enzima sufre desnaturalización (60, 63). Tal proceso se ve reflejado en la pérdida de actividad de la enzima y por ende a la menor corriente resultante.

Otros parámetros fueron utilizados también para optimizar el funcionamiento del biosensor con el fin de obtener la máxima respuesta analítica posible:

VII.3.2 Concentración de material

Se estudió el efecto que tiene sobre la respuesta analítica modificar el electrodo con distintas concentraciones de material, distintas proporciones si es más de un material, etc. La técnica mayormente utilizada fue la voltimetría de pulso diferencial (25, 60, 63-68).

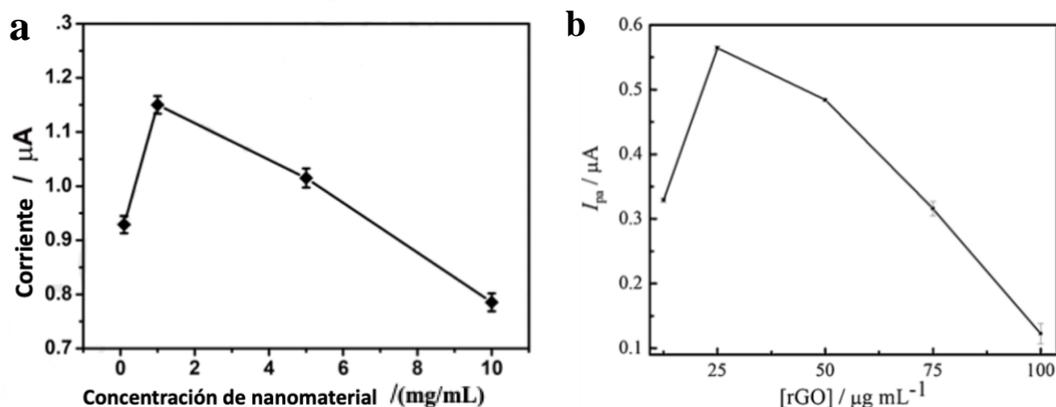


Figura 39. En **a)** Optimización de la concentración de nanocomposito PdNi NHs/m-MoS₂ para la modificación de AChE-Chit/PdNi NHs/m-MoS₂/GCE utilizando VPD en una solución 0,1 M PBS pH 7,4 en presencia de 3,0 mM de acetilcolina. En **b)** Optimización de la concentración de OGr para la modificación de GC/OGr/AChE utilizando VPD en una solución 0,2 M PBS pH 7,0 en presencia de 40 µM de acetilcolina. Figura recuperada de Ref. 25, 63.

Como se observa en la figura 39, en **(a)** utilizaron concentraciones en un rango de 0,5 mg/mL a 10,0 mg/mL en donde se ve que la mayor respuesta analítica apareció a 1,0 mg/mL, por lo que esta fue la concentración utilizada de nanomaterial (PdNi NHs/m-MoS₂) para la modificación de los electrodos (25) y en **(b)**, concentraciones de 12,5-100,0 µg/mL fueron probadas obteniéndose la mayor respuesta analítica a los 25,0 µg/mL por lo que para estos investigadores esta fue la concentración óptima de óxido de grafeno reducido (63). Como muestra la figura, luego de cierta concentración de material la corriente disminuyó. Esto podría explicarse ya que, al modificar el electrodo con mayor concentración de material, se estaría formando una capa gruesa y no uniforme en la superficie lo cual podría dificultar el proceso electroquímico.

VII.3.3 Concentración de enzima

Se estudió el efecto que tiene sobre la respuesta analítica modificar el electrodo con distinta cantidad de enzima (unidades de enzima) o concentración en masa de esta. La técnica mayormente utilizada fue la voltimetría de pulso diferencial (60-66, 71):

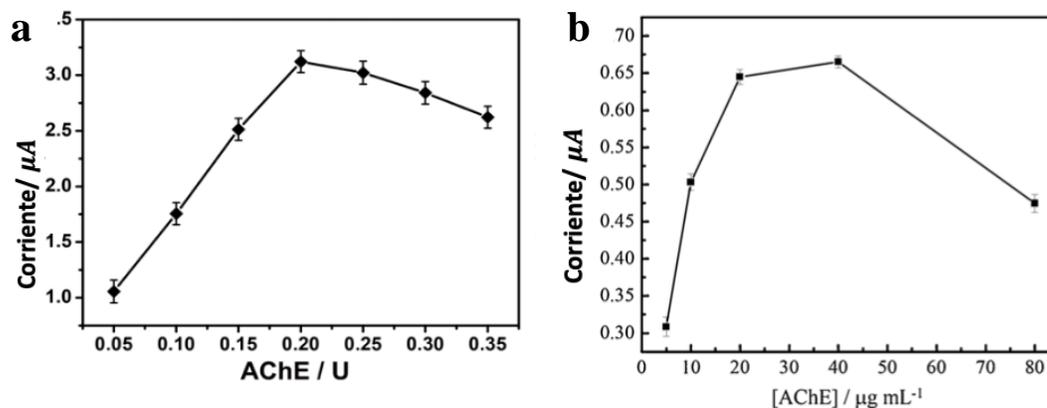


Figura 40. En **a)** efecto de la concentración de enzima utilizada en la modificación del electrodo obtenida a partir de la respuesta VPD de AChE/CNTs-NH₂/Ag NPs-N-F-MoS₂/GCE a distintas U de enzima. En **b)** efecto de la concentración de enzima utilizada en la modificación del electrodo obtenida a partir de la respuesta VPD de poli(FBThF)/Ag-OG-NH₂/AChE/GCE with 1 mM ATCl in 50 mM PBS. Figura recuperada de Ref. 60, 64.

La figura 40 muestra en **(a)** el gráfico corriente vs U enzima en donde estudiaron un rango de 0,05 a 0,35 U. La mayor corriente se observa a los 0,20 U de enzima, por lo que este valor fue utilizado por los investigadores en todos sus experimentos de modificación de electrodos (60) y en **(b)**, estudiaron un rango de enzima de 5,0-80,0 $\mu g/mL$ y la mayor corriente se obtuvo a los 40,0 $\mu g/mL$ de enzima, por lo que esta última es la concentración óptima de enzima (64). Como vemos, luego de cierta cantidad de enzima la corriente comienza a disminuir. Este comportamiento puede deberse a que, a mayor cantidad de enzima, se forma una capa más gruesa de enzima lo cual estaría bloqueando la transferencia electrónica.

VII.3.4 Tiempo incubación con el pesticida en estudio

Para obtener la máxima corriente se estudió el tiempo de incubación óptimo del electrodo en una solución que contenga el pesticida. Se utilizaron las técnicas de voltametría cíclica (60) y voltametría de pulso diferencial (57, 59-61, 63-71):

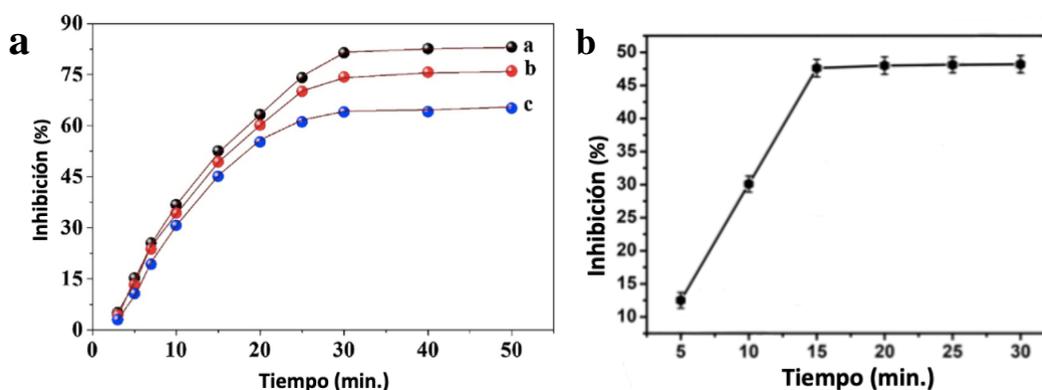


Figura 41. En **a)** Efecto de la inhibición de madatión (a), malatión (b) y clorpirifos (c) obtenida a partir de voltametría cíclica de NA/Ag@rOG-NH₂/AChE/GCE en una solución 0,1 M PBS pH 8,0. En **b)** efecto de la inhibición de clorpirifos obtenida a partir de la respuesta VPD de AChE/CNTs-NH₂/Ag NPs-N-F-MoS₂/GCE a distintos tiempos de incubación con pesticida. Figura recuperada de Ref. 60, 62.

En la figura 41, en **(a)** se presentan los resultados obtenidos con 3 pesticidas (malatión, madatión y clorpirifos) que fueron probados desde 0 a 50 minutos. A los 30 minutos se obtuvo el máximo % de inhibición por lo que éste fue el tiempo elegido por los investigadores (62) y en **(b)**, a los 15 minutos se obtuvo el máximo porcentaje de inhibición, seleccionándolo como tiempo óptimo (60). En ambos se alcanza un *plateau* (30 y 15 minutos en adelante respectivamente). Tal comportamiento se podría explicar debido a que se alcanzó un equilibrio en los sitios de unión de la enzima con el pesticida.

VII.4 Respuesta amperométrica del biosensor

Elegidas las condiciones óptimas experimentales, se estudió la respuesta amperométrica del biosensor utilizando distintas concentraciones de acetiltiocolina (las concentraciones elegidas dependen de cada grupo de investigación) (58-61, 64, 66-71). Otros investigadores utilizaron la técnica voltametría de pulso diferencial y distintas concentraciones de pesticida (64, 66):

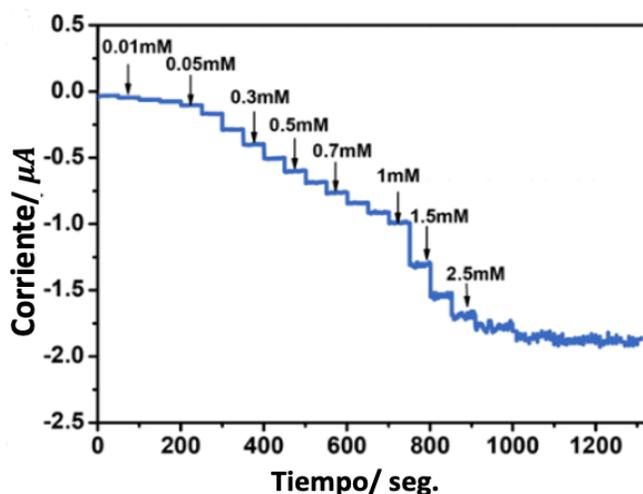


Figura 42. Respuesta amperométrica de AChE/CNTs-NH₂/Ag NPs-N-F-MoS₂/GCE de distintas concentraciones de acetiltiocolina en una solución 0,1 M PBS, con agitación. Figura recuperada de Ref. 25.

La figura 42 exhibe el amperograma de la respuesta electroquímica realizada por Song et al. (25). Se observa el voltamograma obtenido al adicionar diferentes concentraciones de acetiltiocolina sucesivamente. La corriente de oxidación aumentó a medida que aumentó la concentración de acetiltiocolina y se estabilizó a concentraciones mayores.

A partir de los experimentos amperométricos, se obtuvieron curvas de calibración (corriente vs concentración) las que se presentan como ejemplo en la figura 43 (25):

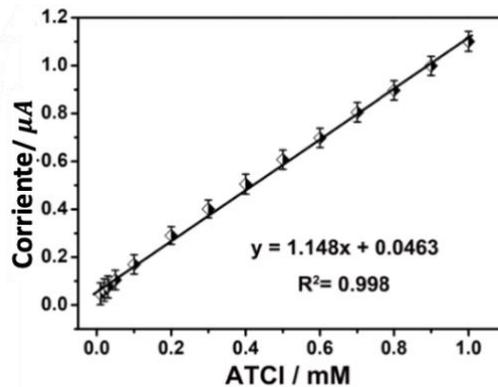


Figura 43. Curva de calibración obtenida a partir de la respuesta amperométrica de AChE/CNTs-NH₂/Ag NPs-N-F-MoS₂/GCE de distintas concentraciones de acetilticolina en una solución 0,1 M PBS. Figura recuperada de Ref. 25.

Con la curva obtenida por regresión lineal se obtuvo también una ecuación del tipo $I = aC + b$, (**ecuación 8**), en donde I representa la corriente de oxidación/reducción (μA) y C representa la concentración de acetilticolina utilizada (mM). Con estos datos fue posible obtener el rango lineal del biosensor (0,1 a 1,0 mM), valores donde la sensibilidad es constante con una variación determinada y la sensibilidad que es la pendiente de la recta obtenida (1,148 mM) (25).

VII.5 Parámetros enzimáticos

Otro parámetro importante de analizar es la constante de Michaelis-Menten (K_m) (25, 57, 60-62, 66-71).

El comportamiento cinético de la mayoría de las enzimas sigue la forma de Michaelis-Menten (82):

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{V}{1 + \frac{K_m}{[S]}} \quad \text{(Ecuación 9)}$$

Donde v es la velocidad instantánea a un tiempo t cuando la concentración de sustrato es $[S]$. La forma usual de evaluar estos parámetros (V, K_m) es en la forma de doble recíprocos:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} * \frac{1}{[S]} \quad \text{(Ecuación 10)}$$

La representación gráfica del recíproco de la velocidad inicial, $\frac{1}{V_o}$, versus el recíproco de la concentración de sustrato, $\frac{1}{[S]}$, proporciona una línea recta con pendiente $\frac{K_m}{V_{max}}$ en un gráfico doble-recíproco o *Lineweaver-Burk*. El punto donde la línea interseca la ordenada es igual a $\frac{1}{V_{max}}$ y la intersección en la abscisa es igual a $-\frac{1}{K_m}$. La utilización de este gráfico permite calcular con precisión V_{max} y K_m (84).

Para el estudio cinético enzimático en electrodos se utiliza la ecuación de *Lineweaver-Burk* modificada (83):

$$\frac{1}{I_S} = \frac{1}{I_{max}} + \frac{K_m}{I_{max}} * \frac{1}{[S]} \quad \text{(Ecuación 11)}$$

En donde I_S es la corriente en estado estacionario medida a distintas concentraciones de sustrato, I_{max} es la máxima corriente alcanzable, K_m es la constante de Michaelis Menten y $[S]$ es la concentración del sustrato.

K_m es entonces una medida de la afinidad de la enzima por el sustrato. Cuanto menor es K_m , mayor es la afinidad de la enzima por el sustrato y viceversa (84).

VII.6 Pesticidas

A continuación, se presentan los pesticidas estudiados en los artículos reportados:

Tabla 9. Pesticidas utilizados en cada estudio. O: organofosforado y C: carbamatos.

Electrodo	Pesticida	Referencia
GCE/m-MoS₂/PdNi NHs/CS	Ometoato (O)	25
EPI/OGr-MoS₂-NPsAu	Paraoxón (O)	59
GCE/AgNPs-N-F- MoS₂/CNTs-NH₂	Monocrotofós (O) Clorpirifos (O)	60
GCE/OGr- CS/AuNPs/CPBA	Clorpirifos (O) Malatión (O) Carbofurán (C) Isoprocab (C)	61
GCE/Ag@OGr- NH₂/NA/GA	Malatión (O) Clorpirifos (O)	62
GCE/OGr	Carbaril (C)	63
GCE/Ag-OGr- NH₂/poli(FBThF)	Malatión (O) Triclorfón (O)	64
GCE/CuNHs-OGr- TEPA/CS	Malatión (O)	65
GCE/Ti₃C₂T_x-CS	Malatión (O)	66
GCE/OGr/TiO₂-CS	Diclorvos (O)	67
GCE/AuNRs@MS'@Ti O₂-CS/CS	Fentió (O) Diclorvos (O)	68
GCE/AgNHs/TiO₂- CS/CS	Diclorvos (O)	69
GCE/AgNhs/Gra/TiO₂- CS/CS	Diclorvos (O)	70
PSiE/COOH	Malatión (O)	57
GCE/3DG-CuONFs/CS	Diclorvos (O)	71

Como se observa en la tabla 9, los pesticidas mayormente utilizados en los artículos revisados son del grupo de organofosforados (O). Esto porque son de bajo costo, alta actividad, fácil acceso, son simples de manufacturar y son los más utilizados alrededor del mundo (85). En Chile también los insecticidas organofosforados son los más vendidos y utilizados; como por ejemplo el clorpirifos y el diazinon, pertenecientes a los grupos alta o moderadamente peligrosos.

VII.7 Estudio de pesticidas

Optimizado el tiempo de incubación con el pesticida y todos los otros parámetros descritos anteriormente, se evaluó la respuesta del biosensor en la detección de pesticidas (25, 57, 59-71). Se utilizaron las técnicas de amperometría (figura 44, (a)) y voltametría de pulso diferencial (VPD) (figura 44, (b)):

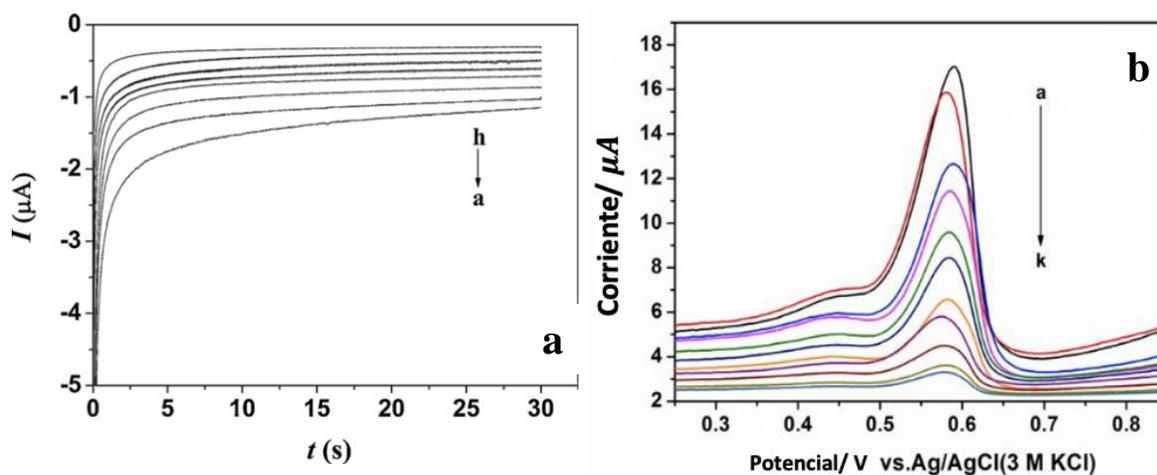


Figura 44. En **a)** respuesta cronoamperométrica de AChE/CPBA/AuNPs/OGr-CS/GCE en 0,1 M PBS pH 7,0 y acetiltiocolina 0,15 mM luego de incubar con diferentes concentraciones de pesticidas. Figura recuperada de Ref. 60. En **b)** Respuesta VPD obtenida de AChE-CS/3DG-CuONFs/GCE en solución 0,1 M PBS pH 7,4 y 0,5 mM de acetiltiocolina luego de incubar el electrodo modificado con diferentes concentraciones de pesticida. Figura recuperada de Ref. 71.

En ambos casos se observa que, al aumentar la concentración de pesticida utilizado, la respuesta analítica obtenida disminuyó. A partir de estos resultados se construyeron las

curvas de calibración correspondientes que se muestran como ejemplo en la figura 45 y la ecuación lineal de cada caso:

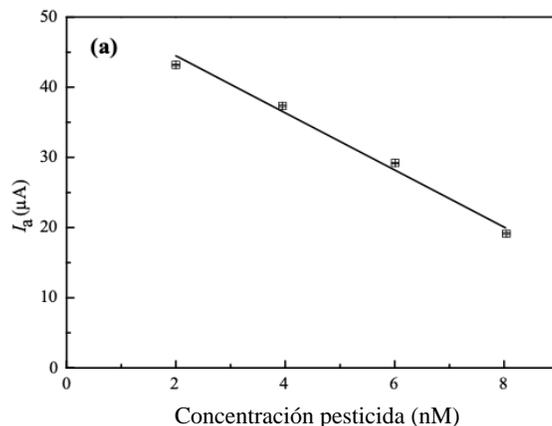


Figura 45. Curva de calibración obtenida a partir de voltametría del electrodo P*Si*/AChE en una solución de 0,3 mM acetilcolinam pH 6,8 PBS a diferentes concentraciones de pesticidas. Figura recuperada de Ref. 71.

Con esto es posible obtener el rango lineal, la sensibilidad y el límite de detección del sistema utilizado. Otra forma de obtener el límite de detección es utilizando la fórmula $LOD = 3 \frac{S_b}{S}$, donde S_b es la desviación estándar de 10 blancos medidos y S la sensibilidad (25, 57, 59-61, 63-71).

Tabla 10. Comparación de los biosensores estudiados en la determinación de pesticidas.

Electrodo	Pesticida	Rango lineal (mM)	Límite detección (mM)	Referencia
GCE/m-MoS ₂ /PdNi NHs/CS	Ometoato	10 ⁻¹⁰ mM-10 ⁻⁴	5,0×10 ⁻¹¹	25
EPI/OGr-MoS ₂ - NPsAu	Paraoxón	1,82×10 ⁻⁵ –5,45×10 ⁻⁴	0,05	59
GCE/AgNPs-N-F- MoS ₂ /CNTs-NH ₂	Monocrotofós Clorpirifos	7,78×10 ⁻¹⁰ - 4,48×10 ⁻⁶ 2,85×10 ⁻⁷ - 2,85×10 ⁻⁴	2,0×10 ⁻¹⁰ 3,0×10 ⁻⁹	60

GCE/OGr- CS/AuNPs/CPBA	Clorpirifos	$1,93 \times 10^{-6} - 2,85 \times 10^{-5};$ $2,85 \times 10^{-5} - 2,85 \times 10^{-4}$	$3,14 \times 10^{-6}$	61
	Malatión	$1,51 \times 10^{-6} - 3,01 \times 10^{-5};$ $6,05 \times 10^{-5} - 3,02 \times 10^{-4}$	$1,51 \times 10^{-6}$	
	Carbofurán	$4,51 \times 10^{-7} - 4,51 \times 10^{-5};$ $4,51 \times 10^{-5} - 4,51 \times 10^{-4}$	$2,25 \times 10^{-7}$	
	Isoprocarb	$1,03 \times 10^{-5} - 4,51 \times 10^{-5};$ $1,03 \times 10^{-4} - 7,76 \times 10^{-4}$	$2,59 \times 10^{-6}$	
GCE/Ag@OGr- NH₂/NA/GA	Malatión	$1,91 \times 10^{-2} - 2,35 \times 10^{-1}$	$1,26 \times 10^{-5}$	62
	Clorpirifos	$3,45 \times 10^{-3} - 3,48 \times 10^{-1}$	$3,99 \times 10^{-5}$	
GCE/OGr	Carbaril	$1,0 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-5}$	$1,90 \times 10^{-3}$	63
GCE/Ag-OGr- NH₂/poli (FBThF)	Malatión	$2,99 \times 10^{-7} - 2,99 \times 10^{-5}$	$9,69 \times 10^{-8}$	64
	Triclorfón	$8,00 \times 10^{-8} - 8 \times 10^{-7}$	$3,88 \times 10^{-9}$	
GCE/CuNHs- OGr-TEPA/CS	Malatión	$3,0 \times 10^{-9} - 6 \times 10^{-5}$	$1,20 \times 10^{-9}$	65
GCE/Ti₃C₂T_x-CS	Malatión	$1,0 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-5}$	$3,0 \times 10^{-12}$	66
GCE/OGr/TiO₂- CS	Diclorvos	$3,6 \times 10^{-5} - 2,26 \times 10^{-2}$	$0,29 \times 10^2$	67
GCE/AuNRs@M S'@TiO₂-CS/CS	Fentión	$1,8 \times 10^{-5} - 4,53 \times 10^{-4}$	$5,30 \times 10^{-6}$	68
	Diclorvos	$4,53 \times 10^{-4} - 1,36 \times 10^{-2}$	$1,30 \times 10^{-6}$	
GCE/AgNHs/TiO₂ -CS/CS	Diclorvos	$3,50 \times 10^{-5} - 2,26 \times 10^{-2}$	$7,4 \times 10^{-3}$	69
GCE/AgNhs/Gra/ TiO₂-CS/CS	Diclorvos	$3,60 \times 10^{-5} - 2,26 \times 10^{-2}$	$7,4 \times 10^{-3}$	70
PSiE/COOH	Malatión	$2,0 \times 10^{-6} - 8 \times 10^{-6}$	-	57
GCE/3DG- CuONFs/CS	Diclorvos	$1,13 \times 10^{-2} - 22,6$	$1,45 \times 10^{-5}$	71

Junto a esto, se estudia el porcentaje de inhibición (% I) utilizando diferentes concentraciones de pesticidas, lo que se calcula con la siguiente fórmula (25, 59, 61, 62, 66, 69):

$$\text{Inhibición \%} = \left(\frac{I_{max} - I_{in}}{I_{max}} \right) \times 100 \quad (\text{Ecuación 12})$$

En donde I_{max} es el pico de corriente de acetiltiocolina en el biosensor/AChE y I_{in} es el pico de corriente de acetiltiocolina en el biosensor/AChE luego de la inhibición realizada por la presencia del pesticida.

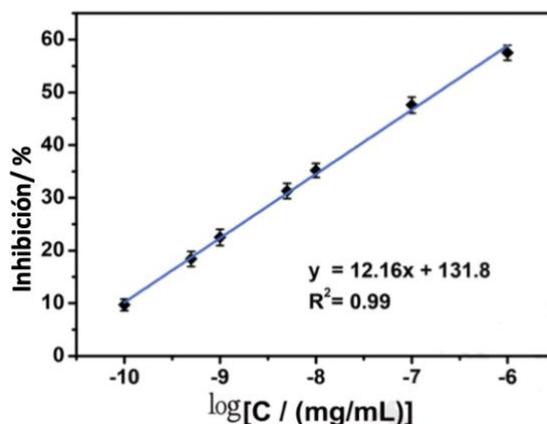


Figura 46. Curva de calibración obtenida a partir de VPD de AChE/CNTs-NH₂/Ag NPs-N-F-MoS₂/GCE en una solución con 0,1 M PBS, pH 7,4 y 4,0 mM acetiltiocolina incubada a diferentes concentraciones de pesticida por 15 minutos. Figura recuperada de Ref. 60.

Como exhibe la figura 46 (60), se observa una relación lineal entre el porcentaje de inhibición y el logaritmo de la concentración de pesticida, comportamiento observado en todos los artículos estudiados (25, 57, 60-71). Esto se debe a que a medida que se aumenta la concentración de pesticida, la enzima es mayormente inhibida. Como resultado, menos tiocolina es formada por la enzima y, por ende, menos oxidación de la tiocolina habrá, resultando en una baja de corriente a medida que se aumente la concentración de pesticida.

VII.8 Repetibilidad, reproducibilidad, estabilidad y estudio de interferentes

Para evaluar estos parámetros se utilizaron técnicas como voltametría de pulso diferencial (25, 57, 60, 65-70), voltametría cíclica (59, 62-64) y amperometría (59, 71) en presencia de los pesticidas estudiados.

VII.8.1 Repetibilidad

Para estudiar la repetibilidad del biosensor se utilizó un electrodo modificado y se realizaron mediciones sucesivas del mismo para evaluar si la respuesta entre estas mediciones era similar. Se calculó la desviación estándar relativa (RSD) y se informaron los valores en porcentaje (%). Por ejemplo, Song et al. (25) utilizaron el electrodo modificado y realizaron 5 DPV sucesivas. Obtuvieron una RSD de 2,7% lo que indicó una buena repetibilidad en el método. da Silva et al. (63) para estudiar este parámetro realizaron 10 DPV sucesivas y obtuvieron una RSD de 1,3%.

VII.8.2 Reproducibilidad

Este parámetro se obtuvo utilizando más de un electrodo modificado y midiendo cada uno individualmente. Se calculó la desviación estándar relativa (RSD) y se informaron los valores en porcentaje (%). Por ejemplo, Song et al., en otro estudio, utilizan 6 electrodos modificados y de cada uno se obtuvo el DPV correspondiente. Obtuvieron valores de RSD de 2,6%, indicando que el biosensor construido exhibe una reproducibilidad aceptable (60). Por otro lado, Zhang et al. utilizaron 5 electrodos para esta medición y obtuvieron un RSD de 2,3%, lo que demostró que su biosensor propuesto exhibía una reproducibilidad aceptable (70).

VII.8.3 Estudio de interferentes

Para determinar la selectividad del método, se realizaron estudios de interferencia, estudiando compuestos como: glucosa, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido úrico, glutamato (GLU), dopamina, sacrosa, fenol, catecol, nitrobenzeno, cloranfenicol, Zn^{2+} , Mg^{+2} , Cl^- , Hg^{+2} , I^- , Cu^{+2} , Ba^{+2} , Ca^{+2} , SO_4^{-2} , PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , NO_3^- , $FeCl_3$, $NaCl$, $MgCl_2$, $NaHCO_3$ y Na_3PO_4 . Estos fueron elegidos porque se encuentran normalmente en la comida y en el medio ambiente (25), y además porque se ha reportado que iones metálicos y sales

inorgánicas podrían interferir en los biosensores basados en materiales a nanoescala (figura 47) (65).

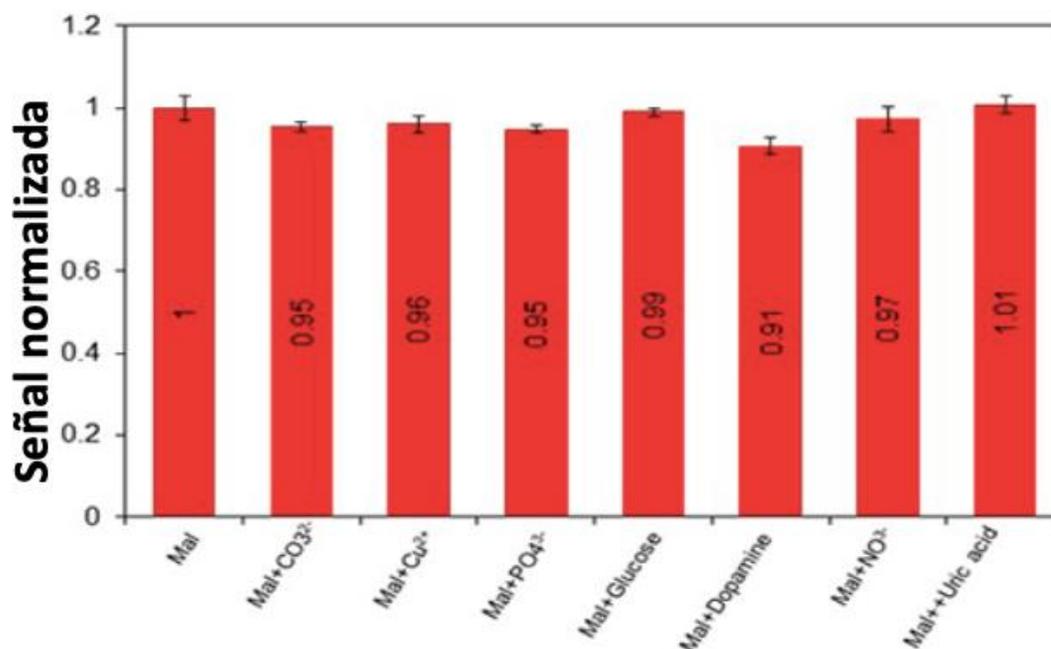


Figura 47. Respuesta VPD DE AChE-CS/OGr-TEPA-Cu NHs/GCE en 10 ng/mL de malatión (mal), 2 mM de acetiltiocolina y 1 mM CO₃²⁻, 1 mM Cu²⁺, 1 mM PO₄³⁻, 1 mM glucosa, 1 mM dopamina, 1 mM NO₃⁻, 1 mM ácido úrico (interferentes). Figura recuperada de Ref. 65.

VII.8.4 Estabilidad

El estudio de la vida útil del biosensor también es un parámetro importante de estudiar (figura 48). La estabilidad de todos los biosensores considerados en esta revisión se evaluó utilizando VPD, VC y amperometría en un periodo de tiempo de 30 días.

Todos los estudios exhibieron más del 80% de retención de respuesta del biosensor, lo cual describen como estabilidad aceptable. 8 de ellos retuvieron más del 90% de la respuesta inicial (25, 59, 61, 62, 67, 68, 69, 71) y 3 de ellos no observaron cambios

significativos en la respuesta a los 30 días (62, 68, 70). Estos 11 últimos estudios demostraron tener estabilidades muy buenas.

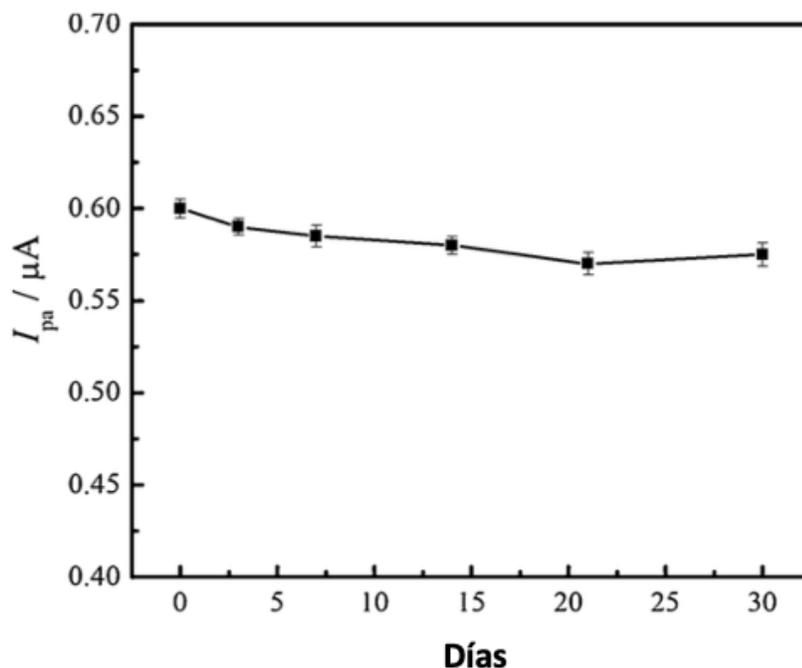


Figura 48. Tiempo de estabilidad del biosensor GCE/OGr/AChE evaluado a través de VPD en presencia de $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ de acetiltiocolina. Los electrodos se mantuvieron en 0,2 M PBS pH 7,0 at 4 °C. Figura recuperada de Ref. 63.

VII.9 Reactivación del biosensor

En los artículos estudiados, los investigadores evaluaron la respuesta de los biosensores desarrollados luego de la incubación con el pesticida para así inhibir la enzima acetilcolinesterasa y poder reactivarla posteriormente. Para este propósito se utilizó yoduro de pralidoxima (2-PAM) por 15 minutos (62, 63) y buffer fosfato por 30 minutos (70). Con esto, retuvieron más del 90% de la respuesta inicial y casi el 100% de la respuesta inicial respectivamente. En la figura 49 se observa el histograma de la reactivación del biosensor de Hui-Fang Cui et al (67), en donde se aprecia la recuperación casi total de la respuesta analítica.

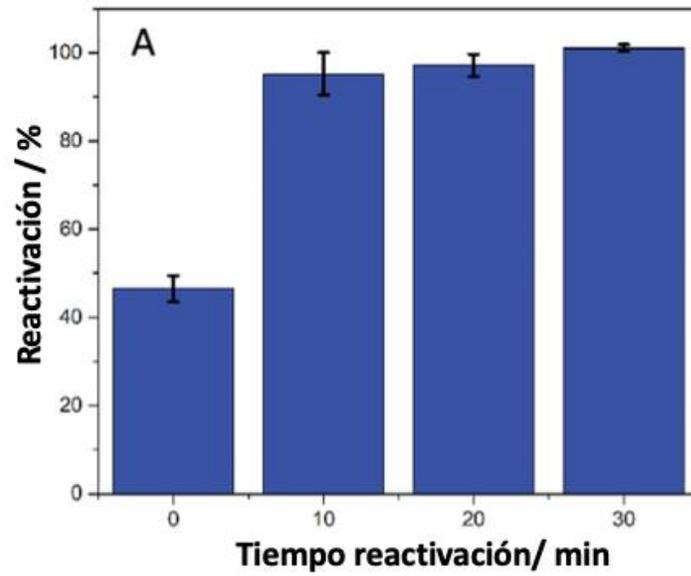


Figura 49. Histograma del % de reactivación del biosensor a partir de la respuesta DPV de AChE/CS/TiO₂-CS/Gra/AgNHs/GC luego de la inhibición con diclorvos 63 uM y la reactivación con PBS. Figura recuperada de Ref. 64.

VIII. CONCLUSIONES DEL ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO.

De acuerdo con los artículos revisados, se observa que es posible construir biosensores utilizando diferentes nanomateriales o mezclas de estos (compositos) para la detección sensible de pesticidas organofosforados y carbamatos. Se reportan límites de detección en el orden mM hasta valores de pM, dependiendo del sistema utilizado. Estos valores se obtienen luego de realizar una optimización de parámetros como T° y pH de medición, tiempos de incubación con el pesticida, cantidad de nanomaterial utilizado, etc. Junto a esto, los biosensores construidos mostraron ser selectivos frente a diferentes interferentes estudiados. Finalmente, se informa que la reactivación enzimática es satisfactoria, obteniéndose, luego de aplicar protocolos de recuperación, actividad enzimática cercana al 100%, lo cual permitiría la reutilización del biosensor.

Todos estos estudios contribuyen de manera positiva al área de los biosensores electroquímicos, con los cuales se obtienen resultados prometedores para seguir las investigaciones en este ámbito. Así es posible pensar en disponer en un futuro de un biosensor de campo capaz de sensar muestras *in situ* y ayudar a combatir los diferentes problemas que se presentan debido al mal uso de los pesticidas en nuestro país y en el mundo.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Lucio, M., & Daniel, R. (2020). Pesticidas agrícolas y su efecto en el suelo (tesis de pregrado). Universidad técnica de Babajoyo, Ecuador. Recuperado el 12 de marzo de 2021, de <http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/handle/49000/8374/E-UTB-FACIAGING%20AGRON-000257.pdf?sequence=1>.
- 2) Departamento de reglamentación de pesticidas de California. (s.f). *¿Qué es un pesticida?* [Ilustración]. California, Estados Unidos. DPR. Recuperado el 12 de marzo de 2021, de <https://www.cdpr.ca.gov/docs/dept/factshts/spanish/what-s.pdf>.
- 3) Karam, M. Á., Ramírez, G., Montes, L. P. B., & Galván, J. M. (2004). Plaguicidas y salud de la población. *CIENCIA ergo-sum, Revista Científica Multidisciplinaria de Prospectiva*, 11(3), 246-254.
- 4) Anasac. (s.f). Plaguicidas. Santiago, Chile. Anasac Control. Recuperado el 12 de marzo de 2021, de <http://www.anasaccontrol.cl/website/wp-content/uploads/2013/06/Plaguicidas.pdf>.
- 5) Ardila, G. P. (1995). Neurotoxicidad por plaguicidas. *Salud UIS*, 23(1-2), 24-28.
- 6) Reigart, J. R., & Roberts, J. R. (1999). *Reconocimiento y manejo de los envenenamientos por pesticidas*. US Environmental Protection Agency.
- 7) Badii, M. H., & Varela, S. (2015). Insecticidas organofosforados: efectos sobre la salud y el ambiente. *Cultura Científica y Tecnológica*, 5(28), 5-17.
- 8) Soreq, H., & Seidman, S. (2001). Acetylcholinesterase—new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(4), 294-302.
- 9) Dvir, H., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T. L., & Sussman, J. L. (2010). Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chemico-biological interactions*, 187, 110-22.
- 10) Li, Y., Bai, Y., Han, G., & Li, M. (2013). Porous-reduced graphene oxide for fabricating an amperometric acetylcholinesterase biosensor. *Sensors and actuators B: Chemical*, 185, 10-22.
- 11) Liu, T., Su, H., Qu, X., Ju, P., Cui, L., & Ai, S. (2011). Acetylcholinesterase biosensor based on 3-carboxyphenylboronic acid/reduced graphene oxide–gold nanocomposites modified electrode for amperometric detection of organophosphorus and carbamate pesticides. *Sensors and actuators B: Chemical*, 160(1), 1255-1261.

- 12) Zhang, W., Asiri, A. M., Liu, D., Du, D., & Lin, Y. (2014). Nanomaterial-based biosensors for environmental and biological monitoring of organophosphorus pesticides and nerve agents. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 54, 1-10.
- 13) Jiménez, C. (2009). Biosensores: Aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimenticios. *Vitae*, 16(1), 144-154.
- 14) Boix Cayuela, M. (2018). Biosensores enzimáticos electroquímicos en la industria alimentaria (tesis de grado). Universidad Complutense, España. Recuperado el 12 de marzo de 2021, de <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/MARTA%20BOIX%20CAYUELA.pdf>.
- 15) Herrasti, Z. (2014). Superficies nanoestructuradas para el desarrollo de biosensores electroquímicos e integración en un sistema de detección portable (tesis doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona, España. Recuperado el 12 de marzo de 2021, de <https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/285057/zhs1de1.pdf?sequence=1>.
- 16) Velázquez, V. J. G. (2015). Nanomateriales de Carbono, síntesis, funcionalización y aplicaciones (tesis doctoral). Universidad Carlos III de Madrid, España. Recuperado el 12 de marzo de 2021, de <https://core.ac.uk/reader/30276750>.
- 17) Wang, J. (2005). Nanomaterial-based electrochemical biosensors. *Analyst*, 130(4), 421-426.
- 18) Sanchez, F., & Sobolev, K. (2010). Nanotechnology in concrete—a review. *Construction and building materials*, 24(11), 2060-2071.
- 19) Nasrollahzadeh, M., Sajjadi, M., Sajadi, S. M., & Issaabadi, Z. (2019). Green nanotechnology. *Interface Science and Technology*, 28, 145-198.
- 20) Quintili, M. (2012). Nanociencia y Nanotecnología, un mundo pequeño. *Cuadernos del Centro de Estudios en Diseño y Comunicación. Ensayos*, (42), 125-155.
- 21) Berlanga Mora, I. (2013). Síntesis y caracterización de nanomateriales 0D, 1D y 2D (tesis doctoral). Universidad Autónoma de Madrid, España. Recuperado el 12 de marzo de 2021, de <https://repositorio.uam.es/handle/10486/660464>.

- 22) Thanh, T. D., Chuong, N. D., Van Hien, H., Kshetri, T., Kim, N. H., & Lee, J. H. (2018). Recent advances in two-dimensional transition metal dichalcogenides-graphene heterostructured materials for electrochemical applications. *Progress in Materials Science*, 96, 51-85.
- 23) Gan, X., Zhao, H., & Quan, X. (2017). Two-dimensional MoS₂: A promising building block for biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 89, 56-71.
- 24) Ramakrishna Matte, H. S. S., Gomathi, A., Manna, A. K., Late, D. J., Datta, R., Pati, S. K., & Rao, C. N. R. (2010). MoS₂ and WS₂ analogues of graphene. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(24), 4059-4062.
- 25) Song, D., Wang, Y., Lu, X., Gao, Y., Li, Y., & Gao, F. (2018). Ag nanoparticles-decorated nitrogen-fluorine co-doped monolayer MoS₂ nanosheet for highly sensitive electrochemical sensing of organophosphorus pesticides. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 267, 5-13.
- 26) Compton, O. C., & Nguyen, S. T. (2010). Graphene oxide, highly reduced graphene oxide, and graphene: versatile building blocks for carbon-based materials. *Small*, 6(6), 711-723.
- 27) Hernández. C & Quiroz. D (2015). Grafeno: Estado del arte (tesis de maestría). Centro de Investigación en materiales avanzados. Nezahualcóyotl, México. Recuperado el 12 de marzo de 2021, de <https://cimav.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1004/743>.
- 28) Zhou, Q., Yang, L., Wang, G., & Yang, Y. (2013). Acetylcholinesterase biosensor based on SnO₂ nanoparticles-carboxylic graphene-nafion modified electrode for detection of pesticides. *Biosensors and Bioelectronics*, 49, 25-31.
- 29) Du, D., Huang, X., Cai, J., & Zhang, A. (2007). Amperometric detection of triazophos pesticide using acetylcholinesterase biosensor based on multiwall carbon nanotube-chitosan matrix. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 127(2), 531-535.
- 30) SAG. (s.f). ¿Qué es y qué hace el SAG? | Santiago, Chile. SAG. Recuperado el 12 de marzo de 2021, de <https://www.sag.gob.cl/quienes-somos/que-es-y-que-hace-el-sag>.
- 31) El Mostrador. (2019). La muerte silenciosa: uso en Chile de plaguicidas prohibidos en el mundo causa daño cognitivo en menores. Santiago, Chile. El mostrador online. Recuperado el 12 de marzo de 2021, de

- <https://www.elmostrador.cl/destacado/2019/01/17/la-muerte-silenciosa-uso-en-chile-de-plaguicidas-prohibidos-en-el-mundo-causa-dano-cognitivo-en-menores/>.
- 32) Universidad de Chile, Radio Juan Gómez Millas. (2019). Revelan presencia de plaguicidas dañinos en orina de escolares en Talca. Santiago, Chile. Radio JGM. Recuperado el 12 de marzo de 2021, de <https://radiojgm.uchile.cl/revelan-presencia-de-plaguicidas-daninos-en-orina-de-escolares-en-talca/>.
- 33) Chen, X., Berner, N. C., Backes, C., Duesberg, G. S., & McDonald, A. R. (2016). Functionalization of Two-Dimensional MoS₂: On the Reaction Between MoS₂ and Organic Thiols. *Angewandte Chemie*, 128(19), 5897-5902.
- 34) Estelrich, J. & Pons, M. (1991). *La espectroscopía de correlación fotónica y sus aplicaciones*, Industria farmacéutica: Equipos, procesos y tecnología (4), 81-86.
- 35) GuíaLab. (2019). Dispersión de luz dinámica: definición de términos comunes. Buenos Aires, Argentina. GuíaLab. Recuperado el 12 de marzo de 2021, de <https://www.guialab.com.ar/notas-tecnicas/dls/>.
- 36) Douglas A. Skoog, Holler, F (2008). Principios de Análisis Instrumental. México. Cengage Learning.
- 37) Universidad Carlos III de Madrid. (s.f). Práctica 4. Difracción de Rayos X. Madrid, España. OCW. Recuperado el 12 de marzo de 2021, de http://ocw.uc3m.es/cursos-archivados/caracterizacion-de-materiales/practicas-2/Practicas_de_DRX.pdf.
- 38) Ceja, M. E. A., & Arizaga, G. G. C. (2010). Utilidad de la difracción de rayos x en las nanociencias. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*, 3(2).
- 39) Patterson, A. L. (1939). The Scherrer formula for X-ray particle size determination. *Physical review*, 56(10), 978-982.
- 40) Penagos, J. I. C. (2013). Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM). *Elementos*, 3(3), 133-146.
- 41) Sahagún, J. L. O. (1997). *Métodos de microscopía electrónica de barrido en biología*. España. Universidad de Cantabria.
- 42) Brunatti, C., & Martin, A. (s.f). Introducción a la Espectroscopía de Absorción Molecular Ultravioleta, Visible e Infrarrojo Cercano. Buenos Aires, Argentina.

- Materias UBA. Recuperado el 12 de marzo de 2021, de <http://materias.fi.uba.ar/6305/download/Espectrofotometria.pdf>
- 43) Díaz, N. A., Ruiz, J. A. B., Reyes, E. F., Cejudo, A. G., Novo, J. J., Peinado, J. P. & Fiñana, I. T. (2010). Espectrometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. Córdoba, Argentina. UCO. Recuperado el 12 de marzo de 2021, de https://www.uco.es/dptos/bioquimicabiolmol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETRIA.pdf.
- 44) McMurry J. (2008). Química Orgánica. México. Cengage Learning,
- 45) Flores, E. (1995). Voltametría cíclica: la espectroscopia electroquímica. Parte I. *Revista de Química*, 9(2), 165-172.
- 46) Mantel, C. (1980). Ingeniería electroquímica. España. Editorial Reverté.
- 47) Gómez-Biedma, S., Soria, E., & Vivó, M. (2002). Análisis electroquímico. *Revista de Diagnóstico Biológico*, 51(1), 18-27.
- 48) Rodríguez, A. M., Zunino, M. P., & Dambolena, J. S. (2018). Optimización de ensayos de inhibición de acetilcolinesterasa en *Sitophilus zeamais* (Mots.). *Revista de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 5(1), 51-58.
- 49) Andrade Guel, M. L., López López, L. I., & Sáenz Galindo, A. (2012). Nanotubos de carbono: funcionalización y aplicaciones biológicas. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 43(3), 9-18.
- 50) Wu, J. Y., Lin, M. N., Wang, L. D., & Zhang, T. (2014). Photoluminescence of MoS₂ prepared by effective grinding-assisted sonication exfoliation. *Journal of Nanomaterials*, 2014.
- 51) Chekin, F., Teodorescu, F., Coffinier, Y., Pan, G. H., Barras, A., Boukherroub, R., & Szunerits, S. (2016). MoS₂/reduced graphene oxide as active hybrid material for the electrochemical detection of folic acid in human serum. *Biosensors and Bioelectronics*, 85, 807-813.
- 52) Ramos, M. A., Correa, V., Torres, B., Flores, S., Farias Mancilla, J. R., & Chianelli, R. R. (2011). Spherical MoS₂ micro particles and their surface dispersion due to addition of cobalt promoters. *Revista mexicana de física*, 57(3), 220-223.

- 53) Cruz Escobar, B. A. (2020). Síntesis de una película de conductora de óxido de grafeno reducido y poli-3-hexiltiofeno con potencial aplicación en electrónica flexible (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Nuevo León, México. Recuperado el 12 de marzo de 2021, de <http://eprints.uanl.mx/19955/1/1080314439a.pdf>.
- 54) Miravete, A; Larrodé, E; Castejón, L; Clemente, L; Lizaranzu, M; Cuartero, J; Revuelta, D; Millán, C; Gómez, V; Calvo, J; Tolosana, N; Peralta, J. *Materiales Compuestos*. España. Editorial Reverté.
- 55) Montes, R., Céspedes, F., Gabriel, D., & Baeza, M. (2018). Electrochemical biosensor based on optimized biocomposite for organophosphorus and carbamates pesticides detection. *Journal of Nanomaterials*. 2018,1-13
- 56) Deo, R. P., Wang, J., Block, I., Mulchandani, A., Joshi, K. A., Trojanowicz, M., & Lin, Y. (2005). Determination of organophosphate pesticides at a carbon nanotube/organophosphorus hydrolase electrochemical biosensor. *Analytica Chimica Acta*, 530(2), 185-189.
- 57) Ayat, M., Ayouz, K., Yaddadene, C., Berouaken, M., & Gabouze, N. (2020). Porous silicon-modified electrode for electrochemical pesticide biosensor. *Journal of Coatings Technology and Research*, 1-10.
- 58) Yuan, Y. & Lee, T. (2013). Contact Angle and Wetting Properties. En Bracco, G, Holst B (Eds.), *Springer Series in Surface Sciences* (4). Springer, Berlín.
- 59) Jia, L., Zhou, Y., Wu, K., Feng, Q., Wang, C., & He, P. (2020). Acetylcholinesterase modified AuNPs-MoS₂-rGO/PI flexible film biosensor: Towards efficient fabrication and application in paraoxon detection. *Bioelectrochemistry*, 131, 107392.
- 60) Song, D., Wang, Y., Lu, X., Gao, Y., Li, Y., & Gao, F. (2018). Ag nanoparticles-decorated nitrogen-fluorine co-doped monolayer MoS₂ nanosheet for highly sensitive electrochemical sensing of organophosphorus pesticides. *Sensors and actuators B: Chemical*, 267, 5-13.
- 61) Liu, T., Su, H., Qu, X., Ju, P., Cui, L., & Ai, S. (2016). Acetylcholinesterase biosensor based on 3-carboxyphenylboronic acid/reduced graphene oxide-gold nanocomposites modified electrode for amperometric detection of organophosphorus and carbamate pesticides. *Sensors and actuators B: Chemical*, 160(1), 1255-1261.

- 62) Guler, M., Turkoglu, V., & Basi, Z. (2017). Determination of malation, methidathion, and chlorpyrifos ethyl pesticides using acetylcholinesterase biosensor based on Nafion/Ag@ rGO-NH₂ nanocomposites. *Electrochimica Acta*, 240, 129-135.
- 63) Da Silva, M. K., Vanzela, H. C., Defavari, L. M., & Cesarino, I. (2018). Determination of carbamate pesticide in food using a biosensor based on reduced graphene oxide and acetylcholinesterase enzyme. *Sensors and actuators B: Chemical*, 277, 555-561.
- 64) Zhang, P., Sun, T., Rong, S., Zeng, D., Yu, H., Zhang, Z., ... & Pan, H. (2019). A sensitive amperometric AChE-biosensor for organophosphate pesticides detection based on conjugated polymer and Ag-rGO-NH₂ nanocomposite. *Bioelectrochemistry*, 127, 163-170.
- 65) Li, S., Qu, L. M., Wang, J. F., Ran, X. Q., & Niu, X. (2020). Acetylcholinesterase based rGO-TEPA-Copper nanowires biosensor for detecting malathion. *International Journal of Electrochemical Science*, 15, 505-514.
- 66) Zhou, L., Zhang, X., Ma, L., Gao, J., & Jiang, Y. (2017). Acetylcholinesterase/chitosan-transition metal carbides nanocomposites-based biosensor for the organophosphate pesticides detection. *Biochemical Engineering Journal*, 128, 243-249.
- 67) Cui, H. F., Wu, W. W., Li, M. M., Song, X., Lv, Y., & Zhang, T. T. (2018). A highly stable acetylcholinesterase biosensor based on chitosan-TiO₂-graphene nanocomposites for detection of organophosphate pesticides. *Biosensors and Bioelectronics*, 99, 223-229.
- 68) Cui, H. F., Zhang, T. T., Lv, Q. Y., Song, X., Zhai, X. J., & Wang, G. G. (2019). An acetylcholinesterase biosensor based on doping Au nanorod@ SiO₂ nanoparticles into TiO₂-chitosan hydrogel for detection of organophosphate pesticides. *Biosensors and Bioelectronics*, 141, 111452.
- 69) Wangbo, W., Shu, W., Hu, H., Zhang, J., & Yang, L. (2019). A silver-graphene modified acetylcholinesterase biosensor for detecting organophosphate pesticides. *2019 20th International Conference on Electronic Packaging Technology (ICEPT)*. Conferencia llevada a cabo en Hong Kong, China.

- 70) Zhang, J., Wang, B., Li, Y., Shu, W., Hu, H., & Yang, L. (2019). An acetylcholinesterase biosensor with high stability and sensitivity based on silver nanowire–graphene–TiO₂ for the detection of organophosphate pesticides. *RSC advances*, 9(43), 25248-25256.
- 71) Bao, J., Huang, T., Wang, Z., Yang, H., Geng, X., Xu, G., ... & Hou, C. (2019). 3D graphene/copper oxide nano-flowers based acetylcholinesterase biosensor for sensitive detection of organophosphate pesticides. *Sensors and actuators B: Chemical*, 279, 95-101.
- 72) Salazar-Leyva, J. A., Lizardi-Mendoza, J., Ramírez-Suarez, J. C., García-Sánchez, G., Ezquerro-Brauer, J. M., Valenzuela-Soto, E. M., & Pacheco-Aguilar, R. (2014). Utilización de materiales a base de quitina y quitosano en la inmovilización de proteasas: efectos en su estabilización y aplicaciones. *Revista mexicana de ingeniería química*, 13(1), 129-150.
- 73) Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, 39(2), 23-39.
- 74) Fajardo-Ochoa, R., Osuna-Castro, J. A., VillaVelázquez-Mendoza, C., Escalante-Minakata, P., Ibarra-Junquera, V., & Manzanillo, T. (2011). Inmovilización de células y enzimas. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 3(6), 42-56.
- 75) Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, 39(2), 23-39.
- 76) Herrera Estrada, L. P. (2006). Inmovilización covalente de heparina en submucosa intestinal porcina para fabricación de reemplazos vasculares (Tesis de pregrado), Universidad de los Andes, Colombia. Recuperado el 12 de marzo de 2021, de <https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/25789/u277201.pdf?sequence=1>.
- 77) Cabrera-Sierra, R., Marín-Cruz, J., & González, I. (2007). La utilización de la espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) para identificar diferentes estados superficiales en el proceso de corrosión del acero al carbono en medios amargos. *Boletín de la Sociedad Química de México*, 1(1), 32-41.

- 78) Macdonald, J.R.; Johnson, W.B. (2005). *Fundamentals of impedance spectroscopy*. Estados Unidos. New Jersey, John Wiley & Sons.
- 79) Quiroz, L. O. (2007). El Modelo Extendido de Zwanzig y la Teoría de Adam-Gibbs en el Plegamiento y Desnaturalización de Proteína (tesis doctoral). Universidad Autónoma Metropolitana, México. Recuperado el 12 de marzo de 2021, de <http://148.206.53.233/tesiuami/UAMI14148.pdf>.
- 80) Sánchez-Chávez, G., & Salceda, R. (2008). Enzimas Polifuncionales: El caso de la acetilcolinesterasa. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(2), 44-51.
- 81) Bard, A., & Faulkner, L. (2020). *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. Estados Unidos: Elizabeth Swain.
- 82) Castillo Aguilar, B., & González Hernández, R. (1996). Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. *Revista Cubana de Farmacia*, 30(1), 43.
- 83) Lee, H. J., & Wilson, I. B. (1971). Enzymic parameters: measurement of V and Km. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 242(3), 519-522.
- 84) Motta, V. T. (2003). *Bioquímica básica*. Brasil. Autolab Análisis Clínicos.
- 85) Kaur, R., Rana, S., Lalit, K., Singh, P., & Kaur, K. (2020). Electrochemical detection of methyl parathion via a novel biosensor tailored on highly biocompatible electrochemically reduced graphene oxide-chitosan-hemoglobin coatings. *Biosensors and Bioelectronics*, 167, 112486.