

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica



TESIS DOCTORAL

**Nanomateriales híbridos de óxido de grafeno y
polímeros hidrosolubles para el diseño de plataformas
biosensoras electroquímicas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Elena Araque Caballero

Directores

José Manuel Pingarrón Carrazón
Reynaldo Villalonga Santana
María Gamella Carballo

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



Nanomateriales híbridos de óxido de grafeno y polímeros hidrosolubles para el diseño de plataformas biosensoras electroquímicas

Directores:

Dr. José Manuel Pingarrón Carrazón

Catedrático de la U.C.M.

Dr. Reynaldo Villalonga Santana

Contratado Ramón y Cajal

Dra. María Gamella Carballo

Investigadora de la U.C.M.

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR:

ELENA ARAQUE CABALLERO

MADRID, 2015



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Químicas

Dpto. Química Analítica

Ciudad Universitaria
28040 Madrid
Tfno.: 91.394.43.31
Fax.: 91.394.43.29
E-mail: depquian@quim.ucm.es

DOÑA M^a CRUZ MORENO BONDI, CATEDRÁTICA Y DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

HACE CONSTAR:

Que el trabajo titulado *“Nanomateriales híbridos de óxido de grafeno y polímeros hidrosolubles para el diseño de plataformas biosensoras electroquímicas”* ha sido realizado bajo la dirección de los Doctores **José Manuel Pingarrón Carrazón, Reynaldo Villalonga Santa y María Gamella Santana**, profesores de dicho Departamento, constituyendo la Tesis Doctoral de su autora.

Madrid, 20 de abril de 2015

Fdo. M^a Cruz Moreno Bondi

Fdo. José Manuel Pingarrón Carrazón

Fdo. Reynaldo Villalonga Santana

Fdo. María Gamella Carballo

Fdo. Elena Araque Caballero

GLORASIO DE ABREVIATURAS

1-mTP53: Sonda de ADN no complementaria

4-ATF: 4-aminotiofenol

A

AchE: Acetilolinesterasa

AFM: Microscopía de fuerza atómica

AuNPs: Nanopartículas de oro

APTES:
Aminopropiltrimetoxisilano

B

BQ: 1,2-Benzoquinona

C

cADN:

CD: Ciclodextrina

CMC: Carboximetilcelulosa

CMCox: Carboximetilcelulosa oxidada

CNTs: Nanotubos de carbono

CV: Voltamperometría Cíclica

D

DMF: Dimetilformamida

DNA: Ácido desoxirribonucleico

E

EDC: Clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EIS: Espectroscopia de impedancia electroquímica

EtOH: Etanol

F

FE-SEM: Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo

FTIR: Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier

G

GCE: Electrodo de carbono vítreo

GO: Óxido de grafeno

GOx: Glucosa oxidasa

GPTMS: (3-glicidiloxipropil) trimetoxisilano

Grf: Grafeno

H

HDPE: Polietileno de alta densidad lineal

HRP: Peroxidasa de rábano

HR-TEM: Microscopía de transmisión electrónica de alta resolución

L

lcpp53: Sonda de captura larga

LLDPE: Polietileno de baja densidad lineal

M

MBs: Partículas magnéticas

MES: Ácido 2-morfolinoetanosulfónico

MWCNTs: Nanotubos de carbono de pared múltiple.

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

N

NHS: N-hidroxisuccinimida

NPs: Nanopartículas

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido de hidrógeno

P

PAMAM: Dendrímero de poliamidoamina

PANI: Polianilina

PBS: Disolución reguladora de fosfato salino

PCR: Reacción de la polimerasa en cadena

PDDA: Poli (dialildimetilamonio)

PEDOT: poli-(3,4-etilendioxitiofenol)

PET: Poli (tereftalato de etileno)

PI: Poliimida

PMMA: Poli (metil metacrilato)

PP: Polipropileno

PPS: Polisulfuro de fenileno

PS: Poliestireno

PSS: Sulfonato de poliestireno

PU: Poliuretano

PVA: Alcohol polivinílico

R

rGO: Óxido de grafeno reducido

RNA: Ácido ribonucleico

S

SAED: Difracción de electrones del área seleccionada

scpp53: Sonda de captura corta

SDS: Dodecilsulfato sódico

Sil: Silanizado

SPCEs: Electrodo serigrafados de carbono

Strep-HRP: Estreptavidina-Peroxidasa

Sulfo-NHS: N-sulfohidroxisuccinimida

SWCNTs: Nanotubos de carbono de pared sencilla

T

TEM: Microscopía de transmisión electrónica

TG: Termogravimetría

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

Tyr: Tirosinasa

TP53: Sonda diana de ADN

X

XRD: Difracción de Rayos X

ÍNDICE

SUMMARY	1
I. INTRODUCTION	3
II. AIMS OF THIS WORK	4
III. RESEARCH RESULTS	4
IV. CONCLUSIONS	9
1. INTRODUCCIÓN	11
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	15
3. ANTECEDENTES	21
3.1. NANOMATERIALES EN EL DISEÑO DE BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS	23
3.1.1. NANOMATERIALES DE CARBONO	25
3.1.1.1. GRAFENO.....	26
3.2. NANOMATERIALES HÍBRIDOS BASADOS EN GRAFENO	29
3.2.1. HÍBRIDOS DE GRAFENO Y NANOPARTÍCULAS	32
3.2.2. HÍBRIDOS DE GRAFENO Y POLÍMEROS	37
3.2.2.1. CARBOXIMETILCELULOSA.....	40
3.2.2.2. DENDRÍMEROS DE POLIAMIDOAMINA.....	41
3.3. BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS BASADOS EN GRAFENO	44
3.3.1. BIOSENSORES ENZIMÁTICOS BASADOS EN GRAFENO	46
3.3.1.1. BIOSENSORES ENZIMÁTICOS PARA LA DETECCIÓN DE GLUCOSA.....	47
3.3.1.2. BIOSENSORES ENZIMÁTICOS PARA LA DETECCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.....	52
3.3.1.2.1. Tirosinasa.....	53
3.3.1.2.2. Peroxidasa de rábano.....	54
3.3.2. GENOSENSORES BASADOS EN GRAFENO	58

4. PARTE EXPERIMENTAL	65
4.1. INSTRUMENTACIÓN	67
4.1.1. APARATOS	67
4.1.2. ELECTRODOS	70
4.2. REACTIVOS	71
4.3. DISOLUCIONES	74
4.4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	77
4.4.1. PREPARACIÓN DE LOS MATERIALES HÍBRIDOS BASADOS EN GRAFENO Y POLÍMEROS	77
4.4.1.1. PREPARACIÓN DE PAMAM-Sil-rGO	77
4.4.1.2. PREPARACIÓN DE CMCo _x -rGO	78
4.4.1.3. PREPARACIÓN DE PAMAM-AuNPs-rGO	78
4.4.1.3.1. Método químico	78
4.4.1.3.2. Método electroquímico	79
4.4.2. PRETRATAMIENTO Y LIMPIEZA DE LOS ELECTRODOS DE CARBONO VITRIFICADO	79
4.4.3. REDUCCIÓN ELECTROQUÍMICA DEL ÓXIDO DE GRAFENO	80
4.4.4. PREPARACIÓN DE ELECTRODOS NANOESTRUCTURADOS CON LOS MATERIALES HÍBRIDOS DE GRAFENO Y POLÍMEROS	80
4.4.4.1. ELECTRODO DE CARBONO MODIFICADO CON Tyr/CMCo _x - rGO PARA LA DETECCIÓN DE CATECOL	80
4.4.4.2. ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE CARBONO MODIFICADOS CON cpp53/CMCo _x -rGO PARA LA DETECCIÓN DEL GEN p53	80
4.4.4.3. ELECTRODO DE CARBONO MODIFICADO CON Tyr/PAMAM- Sil-rGO PARA LA DETECCIÓN DE CATECOL	81

4.4.4.4. ELECTRODO DE CARBONO MODIFICADO CON GO _x /PtNPs/PAMAM-Sil-rGO PARA LA DETECCIÓN DE GLUCOSA.....	82
4.4.4.5. ELECTRODOS DE CARBONO MODIFICADO CON HRP/PAMAM-AuNPs-rGO PARA LA DETECCIÓN DE CATECOL.....	83
4.4.4.5.1. Modificación del electrodo con el material obtenido mediante el método químico.....	83
4.4.4.5.2. Método electroquímico.....	83
4.4.5. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS MATERIALES HÍBRIDOS DE GRAFENO Y DE LAS SUPERFICIES ELECTRÓDICAS.....	84
4.4.5.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE EMISIÓN DE CAMPO.....	84
4.4.5.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.....	85
4.4.5.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE ALTA RESOLUCIÓN.....	85
4.4.5.4. MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA.....	86
4.4.5.5. DIFRACCIÓN DE RAYOS X.....	86
4.4.5.6. TERMOGRAVIMETRÍA.....	87
4.4.5.7. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER.....	88
4.4.5.8. ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	88
4.4.6. EXTRACCIÓN DE RNA Y SÍNTESIS DE cDNA.....	89
4.4.7. REALIZACIÓN DE LAS MEDIDAS ELECTROQUÍMICAS.....	90
4.4.7.1. VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA.....	90
4.4.7.2. ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA.....	90
4.4.7.3. AMPEROMETRÍA EN DISOLUCIONES AGITADAS.....	91
4.4.7.4. AMPEROMETRÍA EN DISOLUCIONES NO AGITADAS.....	91
4.4.8. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS.....	92
4.4.8.1. MUESTRAS BIOLÓGICAS CONTAMINADAS.....	92

ÍNDICE

4.4.8.2. MUESTRAS DE BEBIDA CARBONATADA AZUCARADA.....	92
4.4.8.3. MUESTRAS DE INFUSIONES.....	92
4.4.9. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES MEDIANTE EL MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU.....	93
4.5. CÁLCULOS.....	93
4.5.1. CURVAS DE CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS.....	93
4.5.2. CONSTANTES CINÉTICAS DE LA REACCIÓN ENZIMÁTICA.....	94
4.5.3. ESTUDIO DEL EFECTO MATRIZ.....	95
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	97
5.1. MATERIAL HÍBRIDO BASADO EN GO Y CMC.....	99
5.1.1. PREPARACIÓN DEL MATERIAL HÍBRIDO CMCox-rGO.....	101
5.1.2. CARACTERIZACIÓN DEL NANOMATERIAL HÍBRIDO CMCox-rGO.....	102
5.1.2.1. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO.....	102
5.1.2.2. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE TERMOGRAVIMETRÍA.....	103
5.1.2.3. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE DIFRACCIÓN DE RAYOS X.....	104
5.1.2.4. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	106
5.1.2.5. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA.....	107
5.1.2.6. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE EMISIÓN DE CAMPO.....	108
5.1.2.7. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE ALTA RESOLUCIÓN.....	109
5.1.3. APLICACIÓN AL DESARROLLO DE BIOCENSORES ELECTROQUÍMICOS.....	110
5.1.3.1. BIOCENSOR Tyr/CMCox-rGO/GCE.....	110
5.1.3.1.1. Preparación del electrodo enzimático.....	110
5.1.3.1.2. Caracterización de la superficie electródica.....	110

5.1.3.1.3. Optimización de las variables experimentales.....	114
a) Optimización de la composición del biosensor.....	114
b) Selección del potencial aplicado.....	115
c) Influencia del pH del medio de medida.....	116
5.1.3.1.4. Características analíticas del biosensor.....	117
a) Repetibilidad de las medidas.....	120
b) Reproducibilidad en la fabricación del biosensor.....	120
c) Tiempo de vida útil del biosensor.....	120
5.1.3.1.5. Cinética de la reacción enzimática.....	121
5.1.3.2. BIOSENSORES DE DNA cyp53/CMCox-rGO/SPCE PARA LA DETECCIÓN DEL GEN p53.....	122
5.1.3.2.1. Preparación de los genosensores.....	123
5.1.3.2.2. Optimización de las variables experimentales.....	127
a) Optimización de la cantidad de nanomaterial.....	127
b) Optimización de la concentración de las sondas de captura.....	128
c) Optimización del tiempo de inmovilización de las sondas de captura.....	130
d) Optimización del tiempo de hibridación.....	130
5.1.3.2.3. Características analíticas de los genosensores.....	131
a) Reproducibilidad en la fabricación de los genosensores.....	133
b) Tiempo de vida útil de los genosensores.....	133
5.1.3.2.4. Selectividad de los genosensores.....	134
5.1.3.2.5. Detección electroquímica de la hibridación del DNA en muestras biológicas complejas.....	136
5.1.3.2.6. Detección del cDNA de células tumorales del cáncer de mama.....	137
5.2. MATERIAL HÍBRIDO BASADO EN GO Y PAMAM.....	139
5.2.1. PREPARACIÓN DEL MATERIAL HÍBRIDO PAMAM-Sil-rGO.....	141

5.2.2. CARACTERIZACIÓN DEL NANOMATERIAL HÍBRIDO PAMAM-Sil-rGO	142
5.2.2.1. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO	142
5.2.2.2. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE TERMOGRAVIMETRÍA	144
5.2.2.3. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE DIFRACCIÓN DE RAYOS X	144
5.2.2.4. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE ESPECTROSCOPIA RAMAN	145
5.2.2.5. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA	147
5.2.2.6. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN	148
5.2.2.7. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE ALTA RESOLUCIÓN	149
5.2.2.8. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE EMISIÓN DE CAMPO	150
5.2.3. APLICACIÓN AL DESARROLLO DE BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS	151
5.2.3.1. BIOSENSOR Tyr/PAMAM-Sil-rGO/GCE	151
5.2.3.1.1. Preparación del electrodo enzimático	151
5.2.3.1.2. Caracterización de la superficie electródica	152
5.2.3.1.3. Optimización de las variables experimentales	156
a) Optimización de la composición del biosensor	156
b) Selección del potencial aplicado	158
c) Influencia del pH del medio de medida	159
5.2.3.1.4. Características analíticas del biosensor	160
a) Repetibilidad de las medidas	162
b) Reproducibilidad en la fabricación del biosensor	163
c) Tiempo de vida útil del biosensor	163
5.2.3.1.5. Cinética de la reacción enzimática	164
5.2.3.2. BIOSENSOR GOx/PtNPs/PAMAM-Sil-rGO/GCE PARA LA DETECCIÓN DE GLUCOSA	165

5.2.3.2.1. Preparación del electrodo enzimático.....	165
5.2.3.2.2. Caracterización de la superficie electródica.....	166
5.2.3.2.3. Optimización de las variables experimentales.....	172
a) Optimización de la composición del biosensor.....	172
b) Selección del potencial aplicado.....	174
c) Influencia del pH del medio de medida.....	175
5.2.3.2.4. Características analíticas del biosensor.....	176
a) Repetibilidad de las medidas.....	178
b) Reproducibilidad en la fabricación del biosensor.....	179
c) Tiempo de vida útil del biosensor.....	179
5.2.3.2.5. Cinética de la reacción enzimática.....	179
5.2.3.2.6. Selectividad del biosensor.....	181
5.2.3.2.7. Determinación de glucosa en muestras reales.....	181
5.3. MATERIALES HÍBRIDOS BASADOS EN GO, AuNPs Y PAMAM.....	183
5.3.1. PREPARACIÓN DEL NANOMATERIAL HÍBRIDO PAMAM-AuNPs-rGO.....	186
5.3.2. CARACTERIZACIÓN DEL NANOMATERIAL HÍBRIDO PAMAM-AuNPs-rGO.....	188
5.3.2.1. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO.....	188
5.3.2.2. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.....	189
5.3.2.3. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE EMISIÓN DE CAMPO.....	190
5.3.3. APLICACIÓN AL DESARROLLO DE BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS.....	190
5.3.3.1. BIOSENSOR HRP/PAMAM-AuNPs-rGO/GCE.....	190
5.3.3.1.1. Preparación de los electrodos enzimáticos.....	190
5.3.3.1.2. Caracterización de la superficie electródica HRP/PAMAM-AuNPs-rGO ^e /GCE.....	192
5.3.3.1.3. Optimización de las variables experimentales.....	194

ÍNDICE

a) Optimización de la composición del biosensor.....	194
b) Selección del potencial aplicado.....	196
c) Influencia del pH del medio de medida.....	197
5.3.3.1.4. Características analíticas del biosensor.....	198
a) Repetibilidad de las medidas.....	199
b) Reproducibilidad en la fabricación del biosensor.....	200
c) Tiempo de vida útil del biosensor.....	200
5.3.3.1.5. Cinética de la reacción enzimática.....	200
5.3.3.1.6. Determinación de la cantidad de fenoles totales en muestras reales.....	201
6. CONCLUSIONES.....	203
7. BIBLIOGRAFÍA.....	207
8. PUBLICACIONES.....	227

SUMMARY

I. INTRODUCTION

The advent of nanotechnology has opened new possibilities for the design of a new generation of biomaterials, drug-delivery systems, protective coatings, electronic devices and sensor systems with nanometric dimensions [Eguílaz, 2011], [Jariwala, 2013], [Villalonga, 2013], [Walcarius, 2013]. Undoubtedly, the key challenge to achieve these goals is the tailor-made preparation of advanced functional nanomaterials with novel and well-defined properties. A rational strategy to synthesize these nanostructures is the functionalization with other molecular or nanosized materials to yield hybrid derivatives, in which the resulting structure, degree of organization and therefore the synergistic and novel properties are ruled by the chemical nature and molecular architecture of the individual components [Grosso, 2011]. In particular, considerable interest is currently devoted to the preparation of conductive hybrid nanomaterials with improved biocompatibility for proteins, nucleic acids, cells and tissues oriented to the fabrication of bioelectronics, biocomputing and biosensing systems [Haddad, 2011], [Le Goff, 2011], [Shao, 2010a], [Villalonga, 2011a], [Villalonga, 2011b].

In this context, graphene appears to be the most promising nanomaterial owing to its unique properties such as large surface-to-volume ratio, remarkable electrical, thermal and mechanical properties, and relatively low production cost [Allen, 2010]. However, the high hydrophobicity and the absence of chemical functionalities in graphene prevent the direct application of this nanomaterial in biologically driven applications. In fact, graphene is not soluble in aqueous media and its carbonaceous sheets tend to be irreversibly clustered into graphitic nano- and microstructures through strong π - π stacking and van der Waals interactions [Yang, 2011]. This hydrophobic environment is also counterproductive for the active conformation of proteins, the diffusion of substrates from the bulk solution to the graphene-protein interface, and thus, the efficient occurrence of biorecognition and catalytic events. In addition, the stable and large attachment of biomolecules on graphene nanosheets is not allowed as a consequence of the lack of chemical functional groups in this nanomaterial for covalent immobilization [Liu, 2012].

Graphene nanosheets can be easily provided with reactive and hydrophilic functional groups by either chemical or supramolecular modifications. Many synthetic approaches commonly use graphene oxide (GO), a water-dispersible derivative that can be easily prepared by oxidative treatment of graphite as the

SUMMARY

starting material [Dreyer, 2010]. GO mainly consists of graphene-like sheets [Rourke, 2011], with hydroxyl and epoxide groups on the basal planes and carbonyl and carboxyl groups at the sheet edges [Allen, 2010]. These oxygen functionalities can be selectively used as anchoring points for chemical modification [Dreyer, 2010]. GO and its derivatives can be easily reduced by chemical, thermal, photothermal, and electrochemical methods, restoring in high yield the structural and electrical conductivity properties of graphene [Dreyer, 2010], [Liu, 2012].

However, such modifications should be highly controlled to avoid excessive structural and electronic perturbations in the graphene sheets. For this reason, the synthesis of highly soluble and functionalized graphene-based hybrid nanomaterials with low modification of the carbonaceous sheets is highly desired.

II. AIMS OF THIS WORK

In this PhD Thesis, graphene based hybrid nanomaterials have been prepared by covalent modification with water-soluble polymers such as PAMAM G-4 dendrimers and carboxymethylcellulose (CMC). These hybrid nanomaterials were prepared through rational strategies oriented to provide the nanomaterial with a high density of functional groups but avoiding large perturbation of the conductive carbon structure. These approaches were based on the group-selective modification of the hydroxyl groups on the basal planes of GO by treatment with reactive silane derivatives, and the further anchoring of ionic polymeric materials to the reactive silane moieties.

The nanohybrids were characterized by different physico-chemical techniques including microscopic, spectroscopic, thermal and electrochemical techniques. Moreover, these advanced nanomaterials were employed as scaffold for the covalent immobilization of enzymes and nucleic acids on electrode surfaces to design novel electrochemical biosensors.

III. RESEARCH RESULTS

III.1. CMCox-rGO HYBRID NANOMATERIAL

A novel hybrid nanomaterial was synthesized by covalent attachment of O-carboxymethylcellulose to reduced graphene oxide. Graphene oxide was first anchored with (3-aminopropyl) triethoxysilane moieties to provide reactive primary amino groups at the basal plane. Periodate-oxidized O-carboxymethylcellulose was

further covalently attached to this aminated nanomaterial through reductive alkylation with NaBH₄. Stable aqueous dispersions were obtained with the resulting hybrid nanomaterial, which was used to coat carbon electrode surfaces for biosensor design.

The hybrid nanomaterial, and its intermediate derivatives, were characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Thermogravimetry (TG/DTG), X-Ray Diffraction (XRD), RAMAN Spectroscopy (RAMAN), Atomic Force Microscopy (AFM), Field Emission Scanning Electron Microscopy (FE-SEM), Transmission Electron Microscopy (TEM) and High Resolution Transmission Electron Microscopy (HR-TEM), to confirm their structure, morphology and chemical composition.

III.1.a. Biosensor based on Tyr immobilized on CMCo_x-rGO modified GCE

Glassy carbon electrodes were coated with the CMCo_x-rGO hybrid nanomaterial, and further employed as support for the covalent immobilization of the enzyme tyrosinase (Tyr) through a carbodiimide-mediated coupling reaction. The nanostructured surface was characterized by FE-SEM, Electrochemistry Impedance Spectroscopy (EIS) and Cyclic Voltammetry (CV). The experimental variables involved in the preparation and use of the enzyme electrode were optimized toward its amperometric signal to catechol as model compound (**Table 1**).

Table 1. Experimental variables optimized

Variable	Studied range	Selected Value
CMCo _x -rGO (μg)	5–30	10
Tyr (ng)	25–200	50
E (V)	-0.2–0.1	-0.15
pH	5.0–7.5	6.0

The nanostructured enzyme electrode was successfully employed for the amperometric detection of catechol in the 20 nM – 56 μM concentration range. The biosensor showed excellent analytical performance with a high sensitivity of 270 mA/M and a low detection limit of 0.2 nM. The reproducibility between different electrodes fabricated in the same way, was R.S.D. 9.1% (n = 10) and between different measurements with the same electrode R.S.D. 2.7% (n = 10). In terms of stability, the biosensor exhibited full electrocatalytic response after one week of storage.

SUMMARY

III.1.b. Genosensor based on DNA immobilized on CMCox-rGO modified SPCE

Novel disposable electrochemical DNA sensors were prepared for the detection of a target DNA sequence of p53 tumor suppressor (*TP53*) gene. The electrochemical platform consisted of screen-printed carbon electrodes (SPCEs) functionalized with the water-soluble rGO-CMC hybrid nanomaterial. Two different configurations involving hairpin specific capture probes of different length covalently immobilized through carbodiimide chemistry on the surface of rGO-CMC-modified SPCEs were implemented and compared.

Upon hybridization, a streptavidin-peroxidase (Strep-HRP) conjugate was employed as labeling. Hybridization was monitored by recording the amperometric responses measured at -0.10 V (vs an Ag pseudoreference electrode) upon addition of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) as redox mediator and H_2O_2 as the enzyme substrate. The implemented DNA platforms allow the direct target DNA quantification with good analytical characteristics (**Table 2**)

Table 2. Analytical characteristics for both genosensor configurations

	lcpp53*	sccp53**
Slope, $\mu A/\mu M$	-5.20×10^{-7}	6.78×10^{-7}
Intercept, A	9.31×10^{-8}	2.96×10^{-8}
Lineal range, μM	0.01–0.1	0.01–0.1
R	0.996	0.998
LOD, nM	2.9	3.4
RSD_{n=10}, %	6.1	4.3

lcpp53**: Long capture probe 5'-[Bt η]GAG GTC ATG GTG GGG GCA GCG CCT CAC AAC CTC[AmC7]-3'. *sccp53**: Short capture probe 5'-[Bt η]GT TGT GCA GCG CCT CAC AAC[AmC7]-3'

Also, the possibility of discriminating a single nucleotide polymorphism (SNP) in undiluted human serum and saliva samples, and in cDNAs from human breast cancer cell lines was demonstrated, which makes such platforms excellent tools for diagnosis in clinical analysis.

III.2. PAMAM-Sil-rGO HYBRID NANOMATERIAL

Reduced graphene nanoparticles were prepared from graphene oxide through a two-step covalent modification approach. Graphene oxide was first enriched with reactive epoxy groups by anchoring (3-glycidyloxypropyl)trimethoxysilane at the hydroxyl groups located on the nanocarbon basal plane. Modified graphene oxide

was further cross-linked and partially reduced by treatment with the fourth generation ethylenediamine core polyamidoamine G-4 dendrimer producing graphene nanoparticles with crumpled paper-like morphology.

The nanomaterials were characterized by FTIR, TG/DTG, XRD, RAMAN, AFM, FE-SEM, TEM and HR-TEM to ensure their composition, structure and morphology-

III.2.a. Biosensor based on Tyr immobilized on PAMAM-Sil-rGO modified GCE

This graphene derivative was employed as a coating material for glassy carbon electrodes and the nanostructured electrode was tested for the preparation of electrochemical biosensors by immobilizing the enzyme tyrosinase through cross-linking with glutaraldehyde.

The nanostructured surface was characterized by FE-SEM, EIS and CV. All the experimental variables were optimized toward the amperometric signal to catechol (**Table 3**).

Table 3. Experimental variables optimized

Variable	Studied range	Selected Value
PAMAM-Sil-rGO (μg)	2.5–20	10
Tyr (ng)	50–250	200
Tyr incubation time (min)	15–120	60
Glutaraldehyde (%)	1–7	4
E (V)	-0.25–0.05	-0.15
pH	5.0–7.5	6.0

This bioelectrode showed excellent electroanalytical behavior for catechol with a fast response in about 6 s, linear range between 10 nM and 22 mM, sensitivity of 424 mA/M, and low detection limit of 6 nM. The enzyme biosensor also showed high stability when stored at 4 °C under dry and wet conditions.

III.2.b. Biosensor based on GOx immobilized on PtNPs/PAMAM-Sil-rGO modified GCE

The PAMAM-Sil-rGO hybrid was decorated with platinum nanoparticles. A glassy carbon electrode was coated with this hybrid nanomaterial and then used as support for the covalent immobilization of glucose oxidase. This enzyme electrode was employed to construct a mediatorless glucose amperometric biosensor.

SUMMARY

The nanostructured surface was characterized by FE-SEM, EIS and CV. All the experimental variables were optimized toward the amperometric signal to glucose (**Table 4**).

Table 4. Experimental variables optimized

Variable	Studied range	Selected Value
PAMAM-Sil-rGO (μg)	5–15	12.5
GOx (μg)	25–200	150
GOx incubation time (min)	30–120	90
Glutaraldehyde (%)	1–7	4
H ₂ PtCl ₆ (μg)	10–80	40
E (V)	0.2–0.5	0.4
pH	5.0–9.0	7.5

The resulting biosensor exhibited good electrocatalytical activity for the oxidation of the H₂O₂ produced by the enzyme-catalyzed reaction, being able to detect glucose when poised at 0.4 V. The biosensor showed a wide linear response to glucose ranging from 10 μM to 8.1 mM, high sensitivity of 1.76 $\mu\text{A}/\text{M}$ and low detection limit of 0.8 μM . The biosensor was successfully tested for the quantification of glucose in samples of commercial soft drinks.

III.3. PAMAM-AuNPs-rGO HYBRID NANOMATERIAL

In the last work we have prepared a hybrid material composed of rGO, AuNPs and PAMAM 4-G with cysteamine core. In this case, the GO functionalization was made by grafting a tiolated diazonium salt to provide the nanomaterial with SH functional groups. This modification was carried out through two different approaches: chemical and electrochemical, obtaining two different materials, PAMAM-AuNPs-rGO^q and PAMAM-AuNPs-rGO^e, respectively.

The obtained materials were employed to coat GCE electrodes in order to immobilize HRP and use them as catechol biosensor.

Both materials and each respective biosensor platforms (HRP/PAMAM-AuNPs-rGO^q/GCE and HRP/PAMAM-AuNPs-rGO^e/GCE) were characterized and compared. The results showed that HRP/PAMAM-AuNPs-rGO^e/GCE platform provided better analytical response and, consequently, this electrode configuration was selected to construct the enzyme biosensor.

All the experimental variables were optimized toward the amperometric signal to catechol (**Table 5**).

Table 5. Experimental variables optimized

Variable	Studied range	Selected Value
GO (μg)	2.5–15	12.5
4-ATF (mg/mL)	0.15–1.0	0.9
AuNPs (10^9 particles/mL)	3.8–18.0	7.2
PAMAM (μg)	0.1–1.5	0.5
HRP (μg)	1.0–11.0	6.0
Glutaraldehyde (%)	1.5–8.5	5.0
E (V)	-0.5–0.0	-0.1
pH	5.0–9.0	6.5

The resulting biosensor was successfully employed for the amperometric detection of catechol in the 1.0–815 μM concentration range. The biosensor showed good analytical performance with a sensitivity of 815 $\mu\text{A/M}$, a detection limit of 0.7 μM and a reproducibility of R.S.D. 9.8% ($n = 10$) between different electrodes fabricated in the same way.

IV. CONCLUSIONS

The results achieved in this PhD Thesis support the following conclusions:

1. The silanization of graphene oxide allows its functionalization with highly reactive groups, without any appreciable change in its structural and electrical properties. These reactive groups can be used as centers for the subsequent modification, by using, for example, cationic or anionic polymers with linear or dendritic structure, that provide functional groups at the nanomaterial in order to immobilize biomolecules. The different hybrid nanomaterials prepared in this Thesis by using this synthetic strategy, showed high dispersibility in aqueous solutions and a high density of functional groups, allowing the immobilization of biomolecules.
2. The CMCox-GO nanohybrid material prepared by GO silanization with APTES and its subsequent reductive alkylation with oxidized CMC, showed sheets morphology, provided with fractal type structures at the edges and shaped hanging wire branches. This nanomaterial was employed as transducer element to design an amperometric enzymatic biosensor for the detection of catechol by immobilizing the enzyme tyrosinase through covalent binding. The

SUMMARY

biosensor showed excellent analytical properties and stability. This graphene derivative was also used as a coating material for screen-printed electrodes and the nanostructured electrode was tested for the preparation of a genosensor for the detection of p53 gene, one of the most important tumor markers. The genosensor was tested in real samples without carrying out any sample pretreatment, being able to detect the presence of p53 at very low concentration levels and discriminate a single nucleotide mutation in this marker.

3. Crumpled graphene nanoparticles were prepared by covalent attachment of PAMAM G-4 to silanized GO. This nanohybrid was employed in the design of an amperometric biosensor for catechol. The subsequent decoration of this material with PtNPs allowed developing an electrochemical mediatorless glucose biosensor. Both biosensors showed a good reproducibility, high sensitivity, low detection limits as well as a fast response. These results suggest that this novel hybrid nanomaterial can be employed to prepare sensitive and reliable enzyme biosensors.
4. The influence of the chemical and electrochemical diazotization methodologies on the structural and functional properties of the obtained rGO nanohybrid material was comparatively studied. Using AuNPs and PAMAM dendrimer as tool to immobilize HRP, it was concluded, that the electrochemical diazotization method resulted in a higher degree of structural modification. This fact allowed a larger functionalization, as well as better electroanalytical response of enzymatic biosensor constructed with this nanohybrid.
5. Presented results show the analytical usefulness and versatility of the prepared biosensors. For all presented biosensor, reproducibility and repeatability measurements showed relative standard deviations below 10%. Hence, demonstrating reliability on manufacturing process and the applicability of the hybrid nanomaterials to prepare sensitive and reliable enzyme biosensors.

1

INTRODUCCIÓN

La necesidad de dar solución a los diversos problemas analíticos que se presentan en los sectores agroalimentario, medioambiental, industrial, clínico, forense y de biodefensa, demanda el diseño y establecimiento de nuevas metodologías y técnicas de bajo coste, altamente sensibles, fáciles de utilizar, rápidas, fiables y portátiles, que permitan la detección "in situ" de los analitos de interés. Esta necesidad ha impulsado el desarrollo de la tecnología de los biosensores electroquímicos, en los cuales la alta selectividad y especificidad de los biorreceptores se combinan con la sensibilidad, rapidez y facilidad de miniaturización de los transductores electroquímicos.

Uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta en el desarrollo de biosensores es el diseño de superficies transductoras electrocatalíticas, con propiedades electroconductoras mejoradas que permitan la transferencia electrónica y que sean biocompatibles, para así proporcionar un entorno adecuado a moléculas biológicas tales como proteínas, ácidos nucleicos o bacterias.

Los avances en la Nanotecnología y la Ciencia de los Nanomateriales en las últimas décadas han impactado en el desarrollo de la tecnología de los biosensores, dotándoles de una gran variedad de nanomateriales que han sido utilizados como elementos de transducción electroquímica. Esta aplicación ha estado fundamentada por las excelentes propiedades ópticas, mecánicas y electroconductoras de los nanomateriales, las cuales están relacionadas con su elevada relación área/volumen y sus propiedades superficiales.

Desde su descubrimiento en 2004, el grafeno ha sido uno de los nanomateriales más empleados en el desarrollo de sistemas biosensores de diferente arquitectura, debido a sus propiedades únicas. Sin embargo, la baja disponibilidad de grupos funcionales, así como su escasa solubilidad en la mayoría de los disolventes, limita una mayor aplicación del mismo en la química bioelectroanalítica.

Una gran ventaja de los nanomateriales es la posibilidad de combinarlos con otros materiales dando lugar a nanohíbridos con las propiedades combinadas de sus componentes e incluso a la aparición de otras nuevas, pudiendo llegar a ser diseñados a la carta en función de las necesidades de cada aplicación.

1. INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista electroanalítico es muy interesante la preparación de nanohíbridos a partir de materiales conductores modificados con polímeros hidrofílicos, que doten al material de numerosos grupos funcionales, confieran elevada solubilidad en medio acuoso y faciliten la correcta y estable inmovilización de biorreceptores mediante uniones covalentes.

Aunque muchos autores se han interesado en mejorar las propiedades del grafeno y sus derivados empleando polímeros iónicos, la mayoría han centrado sus esfuerzos en la preparación de sistemas compósitos por simple mezcla de los distintos componentes.

En esta Tesis Doctoral se describe por primera vez la preparación de derivados de óxido de grafeno covalentemente modificado con el polisacárido aniónico carboximetilcelulosa, así como con dendrímeros y dendrones catiónicos de poliamidoamina. Estos últimos se han empleado en el diseño de nanohíbridos de tres componentes mediante la incorporación de nanopartículas metálicas. Los nanohíbridos preparados se han caracterizado mediante diferentes técnicas fisicoquímicas, y se han utilizado como andamiajes para la inmovilización de biomoléculas (enzimas y cadenas de DNA) y como elementos transductores con el fin de desarrollar novedosas plataformas biosensoras electroquímicas.

2

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El diseño de nuevas plataformas biosensoras de tercera generación, altamente sensibles y reproducibles, con bajos límites de detección e interferencias, de fácil manejo, robustas y miniaturizadas, constituye el principal reto de la Química Bioelectroanalítica moderna. Afrontar esta problemática impone adoptar estrategias originales y multidisciplinarias, fundamentalmente centradas en el desarrollo de nuevos nanomateriales para la preparación de electrodos con óptima arquitectura e idóneas características estructurales y electroconductoras, así como en el establecimiento de nuevos procedimientos para la eficiente inmovilización selectiva de biomoléculas sobre la superficie de dichos electrodos.

Para solucionar esta problemática, el **objetivo general** de esta Tesis Doctoral ha sido el **diseño y construcción de nuevos sistemas biosensores electroquímicos basados en el empleo de electrodos modificados con nanomateriales híbridos de óxido de grafeno con polímeros hidrosolubles y nanopartículas metálicas.**

Con el fin de lograr dicho objetivo general, se han planteado los siguientes **objetivos específicos:**

- 1- Preparación y caracterización de nuevos nanomateriales híbridos de óxido de grafeno con polímeros aniónicos y catiónicos, y nanopartículas metálicas.
- 2- Preparación de electrodos modificados con nanomateriales híbridos, y su posterior uso como soporte para la inmovilización de biomoléculas.
- 3- Construcción y caracterización de nuevos biosensores enzimáticos y genosensores.
- 4- Evaluación de las plataformas bioanalíticas en el análisis de muestras reales.

El **plan de trabajo** propuesto para la consecución de los objetivos planteados se puede resumir en las siguientes etapas:

1. Diseño y preparación de los nanomateriales híbridos
2. Caracterización fisicoquímica de los nanomateriales híbridos sintetizados.
3. Modificación de superficies electródicas con los materiales diseñados y su posterior caracterización física y electroquímica empleando diversas técnicas.
4. Aplicación de dichos electrodos nanoestructurados al desarrollo de biosensores electroquímicos enzimáticos y genosensores, evaluando la optimización de variables experimentales, características analíticas,

estabilidad, selectividad y su aplicación a la determinación de analitos en muestras reales.

En la **Figura 2.1.** se muestran los distintos materiales preparados durante la realización de esta Tesis Doctoral, así como los biosensores desarrollados a partir de ellos.

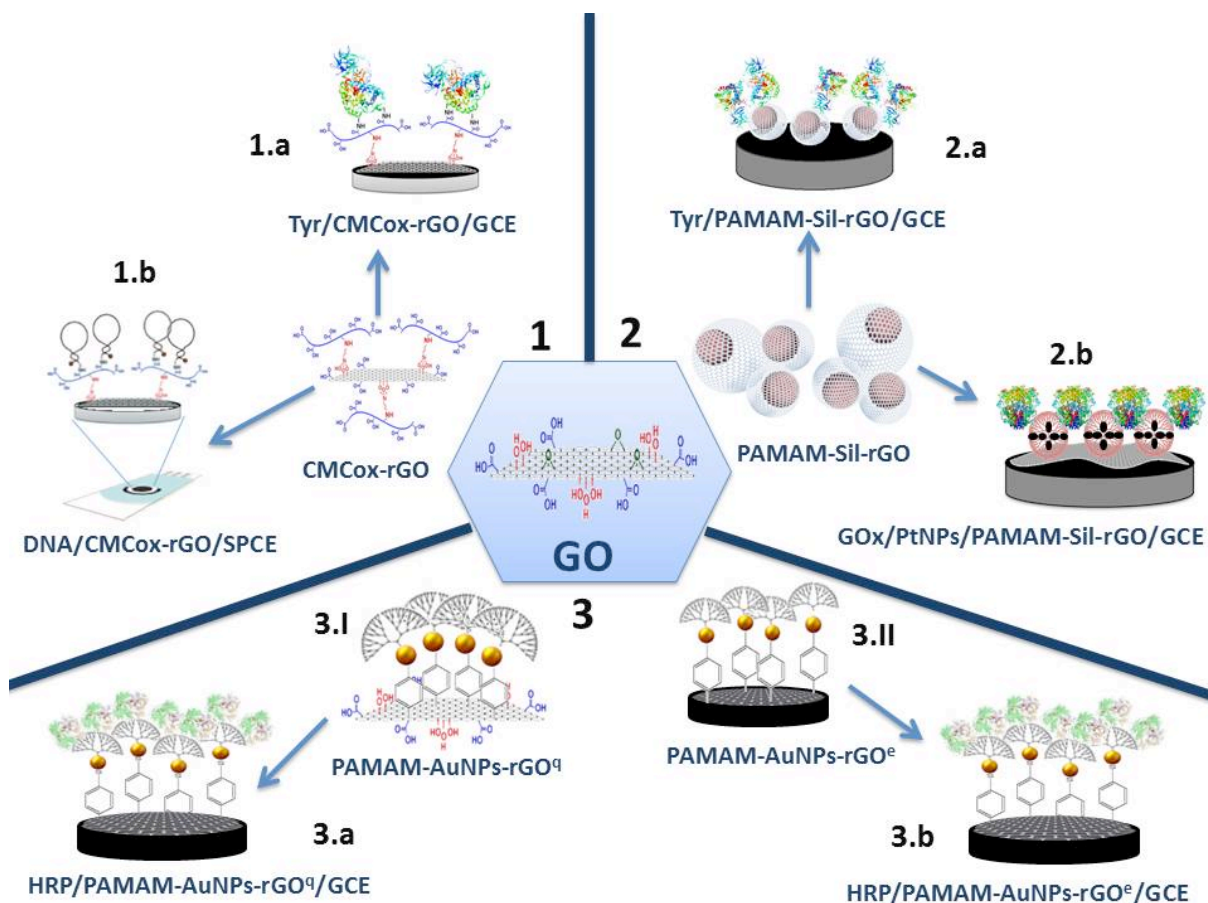


Figura 2.1. Materiales preparados y biosensores desarrollados. (1) CMCox-rGO, (1.a) Tyr/CMCox-rGO/GCE, (1.b) DNA/CMCox-rGO/SPCE, (2) PAMAM-Sil-rGO, (2.a) Tyr/PAMAM-Sil-rGO/GCE, (2.b) GOx/PtNPs/PAMAM-Sil-rGO/GCE, (3.I) PAMAM-AuNPs-rGO^q, (3.II) PAMAM-AuNPs-rGO^e, (3.a) HRP/PAMAM-AuNPs-rGO^q/GCE, (3.b) HRP/PAMAM-AuNPs-rGO^e/GCE.

En primero lugar se preparó un material híbrido de óxido de grafeno reducido (rGO) con carboximetilcelulosa oxidada (CMCox) (**Figura 2.1.1**) que se ha aplicado en el desarrollo de un biosensor enzimático de tirosinasa (Tyr) utilizando electrodos de carbono vitrificados (GCE) (**Figura 2.1.1.a**) y un biosensor de DNA empleando electrodos serigrafados de carbono (SPCEs) (**Figura 2.1.1.b**). En segundo lugar se preparó un material híbrido de rGO con dendrímero de poliamidoamina de cuarta generación (PAMAM G-4) (**Figura 2.1.2**) y se ha aplicado en desarrollo de un biosensor de Tyr (**Figura 2.1.2.a**) y otro de glucosa oxidasa (GOx) introduciendo

además nanopartículas de platino (PtNPs) (**Figura 2.1.2.b**). Por último, se preparó un nanomaterial híbrido de óxido de grafeno con nanopartículas de Au (AuNPs) y dendrones de PAMAM, empleando como intermedios, derivados obtenidos mediante *grafting* químico (PAMAM-AuNPs-rGO^q) (**Figura 2.1.3.I**) y electroquímico (PAMAM-AuNPs-rGO^e) (**Figura 2.1.3.II**) sobre el nanomaterial de carbono. Finalmente se emplearon en la modificación de GCE para la inmovilización posterior de la enzima peroxidasa (HRP) con el fin de comparar la respuesta analítica de ambos biosensores enzimáticos (**Figura 2.1.3.a y b**).

3

ANTECEDENTES

3.1. NANOMATERIALES EN EL DISEÑO DE BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS

En los últimos años el diseño y empleo de nuevos materiales ha cobrado gran interés, tanto desde un punto de vista científico como tecnológico. En este sentido, el desarrollo de estructuras nanométricas supone una gran novedad respecto de las basadas en materiales macroscópicos, no solo en cuanto a su tamaño, si no además porque estas nanoestructuras poseen características fisicoquímicas diferentes **[Vaseashta, 2005]**.

Los nanomateriales son aquellos en los que al menos una de sus dimensiones se encuentran en el rango de la nanoescala, es decir, entre 1 y 100 nanómetros y se clasifican en base a sus dimensiones o la de alguno de sus componentes, estableciéndose así cuatro categorías 0D, 1D, 2D y 3D. Existen diversos tipos de materiales de tamaño nanométrico, ya sean aislantes, semiconductores o electroconductores, que se presentan en diversas morfologías como nanopartículas, nanopolvos, nanotubos, nanocápsulas, materiales nanoporosos, nanohilos, polímeros, etc. En estos nanomateriales, la proporción de átomos en la superficie con respecto al interior es mucho más alta que en materiales de tamaño más elevado. Por consiguiente, si reducimos las dimensiones de un material, modificaremos sus propiedades y en consecuencia podremos diseñar materiales con propiedades a la carta.

Indudablemente el uso de nanomateriales ha sido la corriente fundamental seguida por la comunidad científica para mejorar las propiedades electrónicas de los sistemas biosensores **[Wang, 2005]**, **[Gooding, 2005]**, **[Shao, 2010a]** **[Agüí, 2008]**, **[Pingarrón, 2008]**. Especialmente aquellos que son electroconductores poseen características únicas que justifican su empleo en el diseño de biosensores, puesto que mejoran sus características analíticas **[Guo, 2009]**. Los nanomateriales pueden actuar como unidades de ensamblaje supramolecular con propiedades funcionales únicas, permitiendo el diseño de una gran variedad de arquitecturas sobre los electrodos, basándose en las siguientes propiedades:

- Poseen una elevada relación área superficial/volumen, proporcionando grandes áreas superficiales electroquímicamente activas a los electrodos, y por tanto mayor capacidad de detección. Esta mayor área superficial

3. ANTECEDENTES

favorece una mayor densidad de biomoléculas inmovilizadas sobre la superficie del electrodo, mejorando así la sensibilidad de los análisis.

- Pueden acelerar los procesos de transferencia electrónica entre los electrodos y las moléculas objeto del análisis, reduciendo por tanto los tiempos de respuesta analítica.
- Pueden actuar como nanoconectores entre la superficie de los electrodos y el centro activo de enzimas redox, permitiendo el diseño de biosensores de tercera generación, donde no sea necesario emplear mediadores redox.
- Los electrodos nanoestructurados funcionan como ensamblados de nanoelectrodos, lo cual contribuye a reducir los límites de detección analítica al poseer una relación mayor entre la corriente faradaica y capacitiva que los electrodos no nanoestructurados.
- En algunos casos, la estructura superficial de los nanomateriales contribuye a catalizar los procesos bioelectroquímicos que ocurren sobre los electrodos, haciendo posible una disminución del valor del potencial de medida.
- Los nanoensamblajes tridimensionales sobre la superficie de los electrodos crean microentornos estables y favorables para el mantenimiento de la estructura biológicamente activa de las biomoléculas, aumentando así la estabilidad de los biosensores.

Como se observa en la **Figura 3.1** son varios los nanomateriales empleados hasta ahora en el campo de los biosensores.

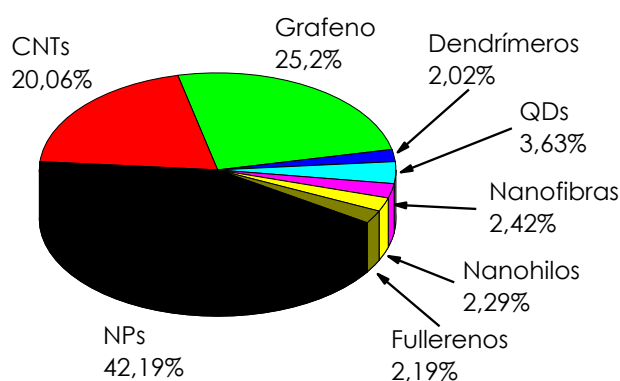


Figura 3.1. Tendencia de la utilización de los distintos nanomateriales en el diseño de biosensores electroquímicos.

3.1.1. NANOMATERIALES DE CARBONO

Los nanomateriales de carbono son una de las familias más importantes dentro de los materiales nanométricos. Los principales materiales dentro de esta familia son los fullerenos, los nanotubos y el grafeno (**Figura 3.2**), cuya composición es exactamente la misma (átomos de carbono), pero difieren en apariencia y características.

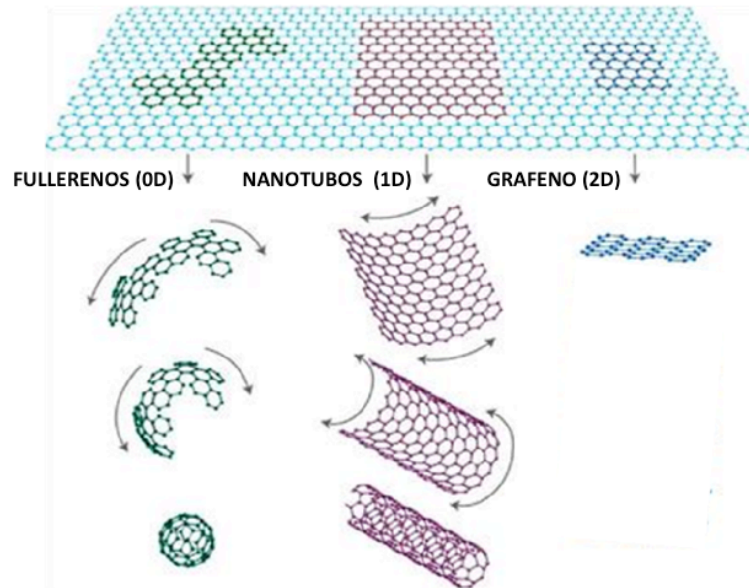


Figura 3.2. Distintos nanomateriales de carbono

En los años ochenta Curl, Kroto y Smalley descubrieron el fullereno (0D), una molécula de sesenta átomos de carbono (C_{60}) y con forma de balón de fútbol [**Kroto, 1985**]. En 1991, durante la preparación de fullerenos, lijima observó la formación de especies con forma de aguja, constituidas por estructuras tubulares concéntricas que contenían entre 2 y 50 láminas de carbono, denominadas hoy en día nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs) [**Iijima, 1991**]. Años más tarde Iijima [**Iijima, 1993**] y Bethune [**Bethune, 1993**] observaron que la adición de elementos metálicos como Fe o Co en el método de producción de MWCNTs, originaba estructuras tubulares con una única lámina de carbono, conocidas como nanotubos de carbono de pared sencilla (1D) (SWCNTs).

El material de carbono más recientemente descubierto ha sido el grafeno (2D). Fueron Geim y Novoselov quienes, en 2004, reportaron la preparación de grafeno mediante exfoliación mecánica del grafito [**Novoselov, 2004**], trabajo que les valió el Premio Nobel de Física en 2010.

3. ANTECEDENTES

Otras formas nanométricas de carbono que podemos encontrar son nanohilos [Zhao, 2003], nanofibras [Jong, 2000], materiales mesoporosos de carbono [Liang, 2008], etc.

Los materiales de carbono se han utilizado frecuentemente en electroquímica debido a que poseen una baja corriente residual, una superficie fácilmente renovable y un amplio rango de potencial de trabajo. Estos materiales además presentan un gran sobrepotencial de reducción del O₂ y una elevada densidad de defectos en los bordes, que aportan una multitud de puntos activos para la transferencia electrónica hacia las biomoléculas, como por ejemplo enzimas. [Lawal, 2015].

El uso de estos nanomateriales ha hecho posible la preparación de superficies electrónicas nanoestructuradas en las que se aprovechan los nuevos avances en la tecnología de sensores, así como también el amplio margen de posibilidades existentes, basadas en el empleo de sistemas biológicos y en la aplicación de distintos esquemas de (bio)ensayo-transducción. Estas ventajas afectan y mejoran las propiedades electroanalíticas básicas, como son la sensibilidad y la selectividad de los métodos, y la repetitividad de las medidas.

3.1.1.1. GRAFENO

El descubrimiento del grafeno en 2004 [Novoselov, 2004], ha supuesto una nueva dimensión en el área de los biosensores electroquímicos. Desde entonces, este material ha sido objeto de numerosas investigaciones debido a su estructura única y unas propiedades electrónicas y mecánicas que han hecho a este material muy atractivo para numerosas aplicaciones.

El grafeno es un compuesto formado por átomos de carbono con hibridación sp^2 distribuidos de forma ordenada en un espacio bidimensional, unidos mediante enlace covalente, situados a lo largo de un plano y que presentan un aspecto de panel de abeja (Figura 3.3.A). Los electrones localizados en los orbitales sp^2 forman entre sí enlaces σ_{C-C} , mientras que los electrones localizados en los orbitales p se posicionan perpendicularmente al plano, solapándose lateralmente y originando orbitales π , lo cual contribuye a la deslocalización electrónica y a la conducción eléctrica en toda la superficie planar [Ratinac, 2011] (Figura 3.3.B).

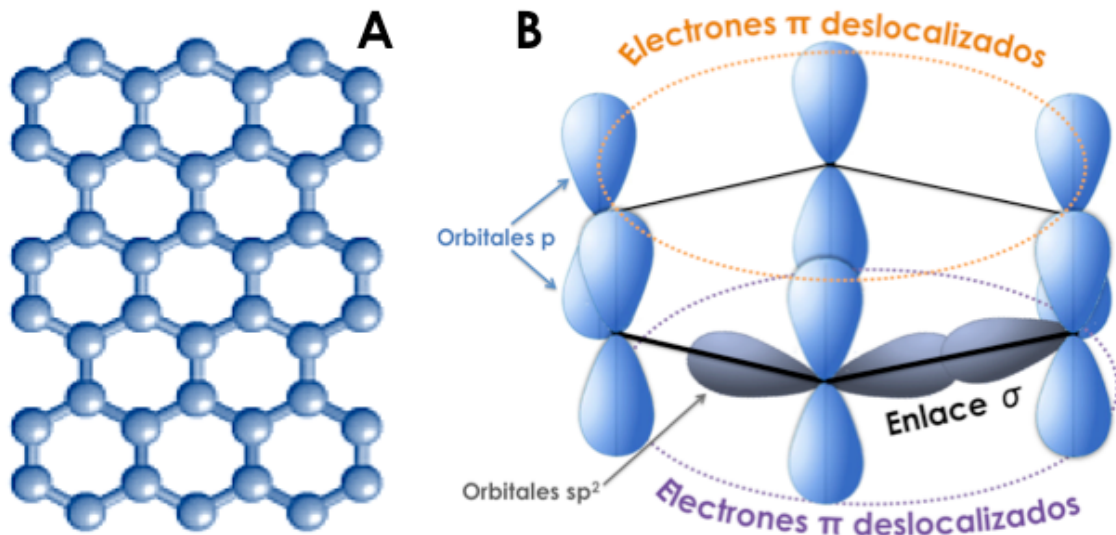


Figura 3.3. (A) Red bidimensional de grafeno y (B) orbitales sp^2 del carbono que forman el enlace σ y orbitales p con electrones π deslocalizados.

Es muy complejo producir capas individuales de grafeno con los métodos de fabricación actuales, por lo que el término grafeno puede incluir desde una a varias capas apiladas y unidas mediante fuerzas de Van der Waals e interacciones entre orbitales π . Las propiedades del grafeno se ven afectadas por el número de capas que posea el material. En consecuencia, en la literatura se pueden encontrar términos como el grafeno de una sola capa, doble capa o bicapa de grafeno, grafeno de pocas capas (generalmente considerado entre 3 y 9 capas) [Geim, 2007] y grafeno multicapa (entre 9 y 12 capas) [Novoselov, 2004], [Novoselov, 2005]. A partir de unas 12 capas, el material tiende a un comportamiento más parecido al grafito.

Durante estos últimos años, el grafeno ha sido objeto de estudio ya que presenta propiedades físicas y químicas únicas comparadas con otros materiales de carbono de gran aplicación en áreas como la electrónica, química o electroquímica, entre las que destacan:

- Alta conductividad térmica (entre 3080 y 5150 W/m K) y eléctrica ((200 S/m) (ésta última nunca puede ser nula) [Huang, 2011], [Gao, 2015].
- Excelente estabilidad térmica con una temperatura de resistencia a la oxidación de hasta 601 °C [Wu, 2009a].
- Alta elasticidad y dureza.
- Elevada área superficial (2600 cm^2/g) [Stoller, 2008] .

3. ANTECEDENTES

- Alta resistencia mecánica (200 veces mayor que la del acero) [Lee, 2008].
- Puede reaccionar químicamente con otras sustancias para formar compuestos con diferentes propiedades.
- Soporta la radiación ionizante.
- Es muy ligero y flexible.
- Bajo efecto Joule.
- Posee propiedades fotoeléctricas.

El grafeno presenta además, excelentes propiedades electroquímicas entre las que se incluyen una amplia ventana de potencial, baja resistencia a la transferencia de carga y una excelente actividad electrocatalítica [Gao, 2015].

Sin embargo, su aplicación sobre electrodos se ve afectada por la baja reactividad intrínseca, baja solubilidad y bajo rendimiento de producción (pocas monocapas por área de sustrato), que es causada principalmente por la elevada energía de interacción entre las capas. La solución a este problema consiste en la dispersión de las capas mediante sonicación o el uso de formas químicamente modificadas como puede ser el óxido de grafeno.

El óxido de grafeno (GO) es un material empleado como precursor para la fabricación en serie de materiales basados en grafeno [Mao, 2012] y que se obtiene tras el tratamiento del grafito con oxidantes fuertes [Marcano, 2010]. El método Hummers (Figura 3.4) es el procedimiento más utilizado para la obtención del óxido de grafeno y se basa en el tratamiento del grafito con KMnO_4 y H_2SO_4 concentrado, en presencia de NaNO_3 .

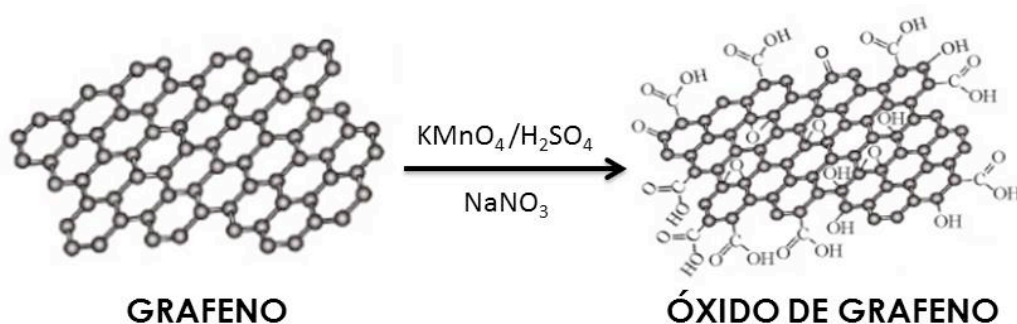


Figura 3.4. Oxidación ácida del grafeno mediante el método Hummers

La estructura del GO ha estado sujeta a debate durante muchos años, debido a la complejidad del material y a la falta de instrumentación analítica adecuada para trabajar con este tipo de estructuras [Dreyer, 2010]. En este derivado, los

procesos de oxidación dan lugar a la aparición de grupos epóxido, carbonilo, carboxilo e hidroxilo que disminuyen la interacción entre capas y aumentan el carácter hidrofílico del material [Cai, 2011]. El GO se puede dispersar en agua en un orden de 1-4 mg/mL [Si, 2008], hecho que se explica en base a la absorción de las moléculas de agua en la superficie de los planos laminares mediante enlaces de hidrógeno. La absorción del agua junto con los grupos oxigenados ya mencionados, influyen en las características estructurales, mecánicas y electrónicas del material [Dikin, 2007]. El GO también puede ser dispersado en disolventes orgánicos como el dihidrofurano, N-metil-2-pirrolidona, dimetilformamida, o-xilano y etilenglicol [Dreyer, 2010].

La principal limitación que presenta el GO es que la formación de defectos estructurales y vacantes interrumpen la red carbonácea sp^2 empeorando así las propiedades electrónicas [Park, 2009a]. La reducción del GO restaura gran parte de la conductividad, a pesar de que algunos defectos no se llegan a eliminar. No obstante, el GO reducido combina características tanto de grafeno como del GO y da lugar a materiales con buena conductividad, estabilidad térmica y capacidad de procesamiento.

3.2. NANOMATERIALES HÍBRIDOS BASADOS EN GRAFENO

Los nanomateriales ofrecen la posibilidad de diseñar una gran variedad de nanoarquitecturas tridimensionales, basándose en la combinación de varios de ellos. Esto ha abierto una nueva y amplia área de investigación en Ciencia de los Materiales, donde el grafeno es uno de los más versátiles, por lo que ha sido empleado en numerosas aplicaciones (Figura 3.5) como la construcción de nuevos materiales y el desarrollo de dispositivos electrónicos y optoelectrónicos [Berger, 2004], sensores químicos [Ouyang, 2013], [Shao, 2010b], nanocompuestos [Cao, 2013a], [Cheng, 2013], [Du, 2004], [Radhapyari, 2013], [Wu, 2013], [Zhang, 2013b], [Zhou, 2011], biosensores ópticos [Xu, 2013a], dispositivos de almacenamiento de energía [Chen, 2013a], [Xu, 2013b], etc. Su utilización también está en auge en aplicaciones como sensores electroquímicos y biosensores [Chen, 2013b], [Cohen, 2001], [Putzbach, 2013], [Wang, 2012a], [Yogeswaran, 2008].

3. ANTECEDENTES



Figura 3.5. Esquema de aplicaciones de los derivados de grafeno en distintos campos científicos y tecnológicos.

Como elementos de transducción en el desarrollo de biosensores electroquímicos, se han utilizado con éxito una gran variedad de nanomateriales denominados “duros” (nanopartículas magnéticas, polímeros conductores, materiales basados en óxidos metálicos y no metálicos, fullerenos, nanofibras de carbono, grafeno, quantum dots, etc.) y otros denominados “blandos” basados en polímeros. Entre todos ellos, encontramos el GO, que ha sido empleado con este fin, debido a la facilidad de ser procesado y manejado, así como a su flexibilidad. Este derivado de grafeno se ha combinado con otros materiales tales como nanopartículas y/o polímeros para así conseguir un aumento de la sensibilidad y/o selectividad de los sensores.

Un nanomaterial híbrido se define como una combinación intencionada de al menos un nanomaterial, con uno o más materiales a nivel atómico o nanométrico, complementándose cada uno de ellos para tener nuevas y mejoradas funciones y propiedades [Yáñez-Sedeño, 2015].

En función del material con que se una el grafeno podemos dividir los nanomateriales híbridos resultantes en dos categorías (**Figura 3.6**):

- *los nanomateriales híbridos inorgánicos*, en los que el grafeno se combina

con especies metálicas y no metálicas, normalmente en forma de nanopartículas, y

- los *nanomateriales híbridos orgánicos*, en los que el grafeno se combina con polímeros, materiales porosos, compuestos organometálicos (MOFs), etc.

Existen numerosos métodos de preparación de materiales híbridos [Bai, 2012], siendo los más comunes la unión mediante reacción de los distintos componentes [Zhou, 2010] o la generación *in situ* del grafeno y/o la especie inorgánica en una misma reacción [Paek, 2009], [Scheuermann, 2009].

La unión de los materiales constituyentes del nanomaterial híbrido puede ser mediante enlaces covalentes o no covalentes. Cabe resaltar, que la modificación del GO está favorecida por la existencia de numerosos grupos que contienen oxígeno situados en su superficie y en los bordes de las láminas [Dreyer, 2010], [Loh, 2010].

Las uniones no covalentes más comunes son las interacciones de tipo π - π , hidrofóbicas, electrostáticas o por quimisorción, en las que a veces es necesaria la incorporación de estabilizadores tales como polielectrolitos [Stankovich, 2006a], derivados de pireno [Xu, 2008] y polímeros anfífilos [Qi, 2010]. Por otro lado, los enlaces covalentes se consiguen por reacciones de diazonio y azida con los enlaces dobles (C=C) del grafeno [Loh, 2010], [Lomeda, 2008], mediante reacciones de los grupos oxigenados del material de carbono con grupos nucleofílicos (amino, hidroxilo, o isocianato, etc.) [Liu, 2008], [Wang, 2009a] y/o mediante entrecruzamiento con moléculas multifuncionales [Zhang, 2009a].



Figura 3.6. Esquema de los tipos de materiales híbridos basados en grafeno.

3.2.1. HÍBRIDOS DE GRAFENO Y NANOPARTÍCULAS

Los materiales híbridos formados por materiales inorgánicos y grafeno más importantes son los que combinan el material de carbono bidimensional con nanopartículas (NPs), ya sean metálicas o de óxidos. Las NPs son entidades, generalmente de forma esférica, con dimensiones entre 1 y 100 nm. El tamaño nanométrico, en comparación con partículas de la misma naturaleza pero de tamaño micrométrico, es el que hace que presenten unas excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas apropiadas para el desarrollo de biosensores.

La preparación de NPs metálicas ha cobrado gran interés debido a las particularidades de sus propiedades ópticas, magnéticas, eléctricas y catalíticas. Muchas de estas propiedades y sus posibles aplicaciones están fuertemente influenciadas por el tamaño y la forma de las mismas, ya que permiten tener una elevada relación entre el área superficial y el volumen. Es por esto que se han desarrollado distintas técnicas de preparación de NPs que permiten controlar sus características morfológicas, empleando métodos sencillos y baratos [Rahman, 2011].

Junto con las características generales de las NPs, el creciente interés en la investigación de este tipo de nanomaterial en tecnología de biosensores está justificado por otras propiedades entre las que destaca la elevada área superficial, permitiendo así la inmovilización de una elevada cantidad de biomoléculas sobre la superficie electrodo nanoestructurada. Además, la superficie de las NPs puede modificarse mediante métodos físicos y/o químicos favoreciendo la inmovilización de moléculas biológicas mediante mecanismos covalentes o no covalentes. Otra ventaja de las NPs es la posibilidad de catalizar la conversión de compuestos de interés analítico, como el NADH, el H_2O_2 y el O_2 , sobre la superficie electrodo, reduciendo el potencial redox asociado a dicha reacción. Además, favorecen la transferencia electrónica entre el centro activo de las enzimas y el electrodo y actúan como unidades de ensamblaje supramolecular, permitiendo la fabricación de una gran variedad de arquitecturas sobre las superficies de los electrodos [Zhang, 2010].

En la **Tabla 3.1**, se recogen algunos de los trabajos descritos en la bibliografía durante los últimos años, en los que se han preparado materiales híbridos basados

en el empleo de grafeno y NPs, empleando distintas estrategias y que han sido aplicados a la construcción de plataformas sensoras y biosensoras.

Las NPs metálicas más comúnmente empleadas para modificar las superficies electródicas en el desarrollo de sensores y biosensores electroquímicos, son las de metales nobles, como Au, Ag, Pd y Pt, debido a que presentan una elevada resistencia a las reacciones de oxidación y su buena biocompatibilidad.

Las nanopartículas de Au (**AuNPs**), juegan un papel importante, debido a que son fáciles de preparar, poseen baja toxicidad y reactividad y son relativamente baratas. Como consecuencia de esto, han sido las más utilizadas en la construcción de numerosas plataformas nanoestructuradas en las que las partículas metálicas se inmovilizan electrostáticamente [**Aravind, 2011**], covalentemente [**Niu, 2013**] o por adsorción [**Zhang, 2013**].

A modo de ejemplo, Wang y colaboradores generaron AuNPs directamente sobre grafeno mediante electrodeposición [**Wang, 2015**]. Asimismo, Sun y colaboradores utilizaron la misma estrategia para crear un material en forma de multicapas, intercalando una capa de grafeno y una de AuNPs [**Sun, 2015**].

Las nanopartículas de plata (**AgNPs**) también se han utilizado frecuentemente ya que presentan actividad antimicrobiana, elevada conductividad térmica y eléctrica y mejor actividad electrocatalítica que las de oro, aunque no son tan estables. Se han empleado sobre todo en la fabricación de sensores de DNA, para la amplificación durante el proceso de hibridación. Por ejemplo, Huang y colaboradores desarrollaron un sensor químico para detectar la oxidación de adenina y guanina en la desnaturalización del DNA, empleando una plataforma basada en grafeno recubierto con PDA sobre la que se adsorben las AgNPs generadas *in situ* [**Huang, 2013**]. Este nanomaterial híbrido se aplicó posteriormente al desarrollo de un genosensor en el que se amplificaba la respuesta debido a la elevada área superficial que proporcionaba el material AgNPs/PDA-Grf y que permitía la inmovilización de una gran cantidad de DNA [**Huang, 2014**].

Aunque con menos frecuencia, también se han utilizado nanopartículas de Pt (**PtNPs**) y de Pd (**PdNPs**) en la preparación de nanohíbridos de grafeno para aplicaciones electroanalíticas. A pesar de ser un material que se envenena fácilmente, presenta propiedades electrocatalíticas y conductoras muy favorables para el desarrollo de sensores [**Yang, 2013**], [**Singal, 2014**], [**Lu, 2011**], [**Quin, 2012**].

3. ANTECEDENTES

Las partículas de óxidos metálicos como NiO, SnO₂, ZnO y TiO₂ también ofrecen una actividad electrocatalítica muy buena, además de poseer una elevada área superficial, baja toxicidad, biocompatibilidad y estabilidad química. Por ello, han sido empleadas en numerosos trabajos, algunos de los cuales se recogen en la **Tabla 3.1**. Yang y colaboradores desarrollaron un biosensor enzimático de AChE inmovilizada sobre una superficie de grafeno carboxilado con nanopartículas de NiO, inmovilizadas mediante interacción electrostática con los grupos –COOH **[Yang, 2013]**. Zhou y colaboradores **[Zhou, 2013]** y Wang y colaboradores **[Wang, 2014a]** emplearon, respectivamente, nanopartículas de SnO₂ y ZnO, para desarrollar biosensores para la detección de pesticidas.

Un tipo de partícula especial de óxido metálico son las nanopartículas de ferrita (Fe₃O₄), que poseen la propiedad de ser magnéticas. Teymourian y colaboradores generaron *in situ* nanopartículas magnéticas de ferrita sobre un electrodo modificado con óxido de grafeno reducido con el que desarrollan un biosensor para la determinación de lactato **[Teymourian, 2013]**, mientras que Zhang y colaboradores sintetizaron nanopartículas de Fe₃O₄ recubiertas con láminas de grafeno y las inmovilizaron sobre el electrodo utilizando Nafion **[Zhang, 2014]**, para el desarrollo de un biosensor de dopamina.

También podemos encontrar en la bibliografía trabajos en los que se han empleado nanopartículas de distinta naturaleza, bien sea metal-metal o metal-óxido metálico. Un ejemplo de ello lo encontramos en el trabajo de Cao y colaboradores, quienes emplearon nanopartículas metálicas de Pt y de Pd para formar una red sobre la superficie de grafeno y en la que inmovilizaron la enzima ChOx **[Cao, 2013b]**.

Otro tipo de nanopartículas empleadas para modificar grafeno son las formadas por un núcleo metálico o de óxido metálico recubiertas por otro metal, de tipo "core-shell", como por ejemplo partículas de Fe recubiertas de Au **[Yola, 2014]** o nanopartículas de sílica recubiertas de Ag **[Veerapandian, 2014]**.

Tabla 3.1. Materiales híbridos de grafeno y nanopartículas en el desarrollo de sensores y biosensores electroquímicos

NPs	Preparación del nanomaterial híbrido	Unión	Electrodo	Aplicación	Referencia
Au	Generación <i>in situ</i> de AuNPs sobre Grf modificado con Nf.	Electrostática	Nf/ChOx/AuNPs/Nf-Grf/GCE	Biosensor enzimático para determinación de colesterol.	[Aravind, 2011]
Au	Adsorción del Grf tiolado sobre AuE y posterior deposición de las AuNPs.	Covalente	ss-DNA/AuNPs/Grf/AuE	Genosensor para la detección del fragmento ss-DNA de <i>E.Coli</i> .	[Niu, 2013]
Au	Generación <i>in situ</i> de AuNPs sobre Grf modificado con PDA.	Adsorción	AuNPs/PDA-rGO	Sensor para detección de Cys.	[Zhang, 2013]
Au	AuNPs electrodepositadas sobre láminas de rGO.	Electrostática	DNA/AuNPs/rGO/GCE	Genosensor electroquímico.	[Wang, 2015]
Au	Multicapas de Grf y AuNPs electrodepositadas sobre la superficie de un GCE y una capa final de Au sobre la que se inmoviliza la biomolécula.	Electrostática	DNA/Au/AuNPs-Grf/GCE	Genosensor para la detección del alérgeno de cacahuete Ara h1.	[Sun, 2015]
Ag	Generación <i>in situ</i> de AgNPs sobre Grf recubierto con PDA.	Adsorción	AgNPs/PDA-Grf/GCE	Sensor químico para la detección de adenina y guanina.	[Huang, 2013]
Ag	Generación <i>in situ</i> de AgNPs sobre Grf recubierto con PDA.	Adsorción	DNA/AgNPs/PDA-Grf/GCE	Genosensor electroquímico.	[Huang, 2014]
Ag	Generación <i>in situ</i> de las AgNPs y el RGO mediante reducción electroquímica sobre GCE.	Electrostática	GOx/AgNPs/RGO/GCE	Biosensor enzimático para la determinación de glucosa.	[Palanisamy, 2014]
Ag	Generación <i>in situ</i> de AgNPs sobre CGR.	Electrostática	Nf/AChE-CS/AgNPs-CGR-Nf/GCE	Biosensor enzimático para detección de pesticidas (organofosfatos y carbamatos).	[Liu, 2014a]
Pt	PtNPs recubriendo la superficie del CGR	Electrostática	AChE-Cs/PtNPs-CGR-Nf/GCE	Biosensor enzimático para detección de pesticidas (organofosfatos y carbamatos).	[Yang, 2013]
Pt	PtNPs funcionalizadas con MPA unidas a Grf funcionalizado con PMA.	Covalente	anti-cTnl/Pt-MPA/PMA-Grf/GCE	Inmunosensor para la detección de Troponina I cardiaca humana	[Singal, 2014]
Pd	Generación <i>in situ</i> de PdNPs sobre Grf modificado con Nf.	Electrostática	PdNPs/Nf/Grf/GCE	Sensor electroquímico para la detección de glucosa.	[Lu, 2011]
Pd	PdNPs recubriendo la superficie del GO	Electrostática	PdNPs/RGO/GCE	Sensor electroquímico para la detección de glucosa.	[Quin, 2012]
NiO	NiO NPs uniformemente alojadas entre las láminas arrugadas de CGR.	Electrostática	Nf/AChE-Cs/NiO NPs-CGR-Nf/GCE	Biosensor enzimático para detección de pesticidas (carbamatos y organofosfatos).	[Yang, 2013]

Tabla 3.1. Materiales híbridos de grafeno y nanopartículas en el desarrollo de sensores y biosensores electroquímicos (Cont.)

NP _s	Preparación del nanomaterial híbrido	Unión	Electrodo	Aplicación	Referencia
SnO ₂	SnO ₂ NPs alojadas entre las láminas arrugadas de CGR.	Electrostática	Nf/AChE–Cs/SnO ₂ NPs–CGR–Nf/GCE	Biosensor enzimático para detección de pesticidas (organofosfatos y carbamatos).	[Zhou, 2013]
ZnO	ZnO NPs alojadas entre las láminas arrugadas de CGR.	Electrostática	Nf/AChE–Cs/ZnO NPs–CGR–Nf/GCE	Biosensor enzimático para detección de pesticidas (organofosfatos y carbamatos).	[Wang, 2014a]
TiO ₂	TiO ₂ NPs alojadas de forma compacta y uniforme sobre la superficie de GO formando una doble capa.	Electrostática	Nf/Hb/TiO ₂ NPs–rGO/GCE	Biosensor enzimático para la detección de H ₂ O ₂ .	[Liu, 2014b]
Fe ₃ O ₄	Fe ₃ O ₄ NPs atrapadas entre las láminas de rGO	Electrostática	LDH/Fe ₃ O ₄ /rGO/GCE	Biosensor enzimático para la determinación de lactato.	[Teymourian, 2013]
Fe ₃ O ₄	Fe ₃ O ₄ NPs recubiertas por láminas de Grf.		Nf/Fe ₃ O ₄ @Grf/GCE	Sensor electroquímico para la detección de dopamina.	[Zhang, 2014]
Pt y Pd	PtPd NPs formando una red sobre las láminas arrugadas de GO modificado con Cs	Electrostática	ChOx/PtPd–Cs–Grf/GCE	Biosensor enzimático para determinación de colesterol.	[Cao, 2013b]
Ag y Pd	AgPd NPs funcionalizadas con Ab y unidas al rGO.	Ab-Antígeno	Ab/AgPd NPs/SPCE	Inmunosensor para la detección simultánea de ractopamina, clenbuterol y salbutamol.	[Wang, 2013a]
Pt y Ce	Pt y Ce NPs electrodepositadas sobre la superficie del GO.	Electrostática	XOx/Ce-Pt NPs/RGO/PtIrE	Biosensor enzimático para la detección de xantina.	[Chaturvedi, 2014]
Au y ZnO ₂	AuNPs distribuidas uniformemente sobre la superficie de GO modificada con ZnO ₂ .		Hb/AuNPs/ZnO–Grf/GCE	Biosensor enzimático para la detección de H ₂ O ₂ .	[Xie, 2013]
Ag@SiO ₂	Partículas de sílica recubiertas de Ag y funcionalizadas con PEG, unidas al GO.	Covalente	Ag@SiO ₂ –PEG NPs/GO/AuE	Sensor electroquímico para la detección directa de quercetina.	[Veerapandian, 2014]
Au@Fe	Fe@Au NPs inmovilizadas en la superficie del GO funcionalizado con AET.	Covalente	ss-DNA/Fe@AuNPs–AET–GO/GCE	Genosensor electroquímico.	[Yola, 2014]

Abreviaturas utilizadas: **AChE:** Acetilcolinesterasa; **AET:** 2-aminoetanotiol; **anti-cTnl:** Anti-troponina I cardiaca; **AuNPs:** Nanopartículas de Au; **CGR:** Grafeno carboxilado; **ChOx:** Colesterol oxidasa; **CS:** Quitosano; **Cys:** Cisteína; **DNA:** Ácido desoxirribonucleico; **E. Coli:** *Escherichia Coli*; **GCE:** Electrodo de carbono vitrificado; **GO:** Óxido de grafeno; **GOx:** Glucosa oxidasa; **Grf:** Grafeno; **Hb:** Hemoglobina; **LDH:** Lactato deshidrogenasa; **MPA:** Ácido 3-mercaptopropiónico; **Nf:** Nafion; **PDA:** Polidopamina; **PdNPs:** Nanopartículas de Pd; **PEG:** Polietilenglicol; **PMA:** 1-pirenmetilamina; **PtIrE:** Electrodo de Pt e Ir; **PtNPs:** Nanopartículas de Pt; **rGO:** Óxido de grafeno reducido químicamente; **RGO:** Óxido de grafeno reducido electroquímicamente; **XOx:** Xantina oxidasa; **@:** Recubiertas

3.2.2. HÍBRIDOS DE GRAFENO Y POLÍMEROS

Los polímeros constituyen uno de los materiales más utilizados, debido a la amplia variedad de monómeros disponibles, las propiedades que presentan, el bajo coste, el fácil procesado y su potencial para ser reciclados y poder generar nuevos materiales.

Los nanohíbridos basados en grafeno y polímeros presentan numerosas ventajas en el campo de los sensores y biosensores, destacando la estabilidad mecánica, mejora de la dispersión del material de carbono y la disponibilidad de grupos reactivos en las cadenas de polímeros, lo cual facilita la inmovilización estable y a gran escala de las biomoléculas, dando lugar a una mejor sensibilidad y selectividad de los biosensores así como un aumento de la estabilidad de los mismos. Además, hay estudios que muestran el gran potencial de estos materiales de grafeno que mejoran las propiedades y resultados obtenidos anteriormente usando CNTs. Este hecho se atribuye a que el grafeno presenta mejores propiedades eléctricas, térmicas y mecánicas, junto con una mayor relación área superficial/volumen [Kuilla, 2012].

Con el objetivo de conseguir una adecuada unión de los polímeros con el grafeno, un paso muy importante en el diseño y preparación del material híbrido es la funcionalización del derivado de grafeno con grupos capaces de reaccionar específicamente con residuos de la matriz polimérica.

Los polímeros más comúnmente utilizados en el campo de los sensores son resina epoxi [Tang, 2013], PMMA [Jang, 2009], PP [Wakabayashi 2008], LLDPE [Kim, 2010], HDPE [Kim, 2009], PS [Liu, 2013], PPS [Zhao, 2007], nailon [Scully, 2009], PANI [Bo, 2011], [Radhapyari, 2013], PSS [Kornmann, 2001], PEDOT [Lu, 2013], [Wang, 2014b], CD [Chen, 2013c], [Gong, 2014], PDDA [Song, 2015], PET [Hsueh, 2003], PI [Moujahid, 2003], PVA [Liang, 2009], PU [Lee, 2009], polisacáridos, dendrímeros, etc.

En la **Tabla 3.2** Se recogen ejemplos de sensores desarrollados en los últimos años en los que han utilizado nanohíbridos de grafeno con polímeros de diversa naturaleza.

Tabla 3.2. Materiales híbridos de grafeno y polímeros en el desarrollo de sensores y biosensores electroquímicos

Polímero	Material	Electrodo	Aplicación	Referencia
PANI	PANI electropolimerizado en rGO con una morfología esponjosa	HRP/PANI-rGO/ITO	Biosensor para la detección de artesunato en fármacos y fluidos biológicos.	[Radhapyari, 2013]
PANI	PANI con forma de hilos generados por electropolimerización sobre GO	DNA/PANI/Grf/GCE	Genosensor electroquímico.	[Bo, 2011]
PVP y PANI	Estructuras 3D con forma de gotas.	ChOx/PANI/PVP/Grf/SPCE	Biosensor enzimático para la detección de colesterol.	[Ruecha, 2014]
PDDA	Mezcla de Grf y una red interconectada de MWCNTs y PDDA.	MWCNTs-PDDA/Grf/GCE	Sensor para la detección de catecol e hidroquinona.	[Song, 2015]
PEDOT	Electropolimerización de PEDOT y reducción simultánea del GO sobre el GCE	AOD/PEDOT/RGO/GCE	Biosensor enzimático para la detección de Vitamina C.	[Lu, 2013]
PEDOT	Láminas arrugadas de PEDOT sobre GO	PEDOT/RGO/GCE	Sensor para la detección de dopamina.	[Wang, 2014b]
PDPB	PDPB electropolimerizado sobre el RGO.	IL/AntB ₁ /AuNPs/PDPB/RGO/AuE	Inmunosensor para la detección de Aflatoxina B ₁ .	[Linting, 2012]
PS	Poliestireno injertado aleatoriamente sobre láminas arrugadas de GO.	Poliestireno/GO/GCE	Sensor para la detección de dopamina.	[Liu, 2013]
CD	rGO recubierto por CD	β -CD/rGO/GCE	Sensor para la detección de pesticidas.	[Chen, 2013c]
CD	Adsorción de CD en las láminas de Grf	Cyt c/CD/Grf/GCE	Biosensor para la detección de aminoácidos.	[Gong, 2014]
PABA	ABA electropolimerizado sobre el GO reducido electroquímicamente y con una morfología arrugada.	PABA/RGO/GCE	Sensor para la detección de ácido siálico.	[Zhou, 2014]
PLLy	GO carboxilado unido electrostáticamente a L-Lys polimerizada sobre la superficie del GCE	DNA/COOH-GO/PLLy/GCE	Genosensor para la detección del gen <i>tlh</i> presente en la bacteria <i>Vibrio Parahaemolyticus</i> .	[Sun, 2012]
PTH	Tionina electropolimerizada sobre rGO y con morfología rugosa.	ADH/PTH-RGO/GCE	Biosensor enzimático para la detección de etanol.	[Li, 2013a]

Tabla 3.2. Materiales híbridos de grafeno y polímeros en el desarrollo de sensores y biosensores electroquímicos (cont.)

Polímero	Material	Electrodo	Aplicación	Referencia
Nf	Nf y Grf mezclados y adsorbidos sobre el GCE	Nf/Grf/GCE	Sensor para la detección de codeína.	[Li, 2013b]
Cs	Cs en forma de nubes sobre la superficie de GO arrugado	ssDNA/Cs-GO/ITO	Genosensor para la detección del fragmento ss-DNA de <i>Salmonella typhimurium</i> .	[Singh, 2013]
CMC	Unión covalente de CMC al GO y reducción simultánea.	Hb/CMC-rGO/GCE	Biosensor enzimático para la detección de H ₂ O ₂ .	[Cheng, 2013]
PAMAM-1G	Crecimiento del dendrímero sobre el GO.	DNA/AUNPs/PAMAM-GO/AuE	Genosensor electroquímico.	[Jayakumar, 2012]
PAMAM-3.5G	PAMAM y GO unidos por enlaces de H e interacciones hidrofóbicas.	CS-GOx/AgNPs/PAMAM-RGO/GCE	Biosensor enzimático para la detección de glucosa.	[Luo, 2012]

Abreviaturas utilizadas: **ABA:** ácido anilinborónico; **AgNPs:** Nanopartículas de Ag; **AntB₁:** Antiaflatoxina B₁; **AOD:** Alcohol oxidasa; **AuNPs:** Nanopartículas de Au; **AuE:** Electrodo de Au; **CD:** Ciclodextrina; **CMC:** Carboximetilcelulosa; **CS:** Quitosano; **ChOx:** Colesterol oxidasa; **Cyt c:** Citocromo C; **DNA:** Ácido desoxirribonucleico; **GCE:** Electrodo de carbono vitrificado; **GO:** Óxido de grafeno; **GOx:** Glucosa oxidasa; **Grf:** Grafeno; **Hb:** Hemoglobina; **HRP:** Peroxidasa; **IL:** Líquido iónico; **ITO:** Electrodo de óxido de indio y estaño; **MWCNTs:** Nanotubos de carbono de pared múltiple; **Nf:** Nafion; **PAMAM:** dendrímero poliamidoamina; **PANI:** Polianilina; **PDDA:** poli (dialildimetilamonio); **PDPB:** poli 2,5-di-(2-tienil)-1-pirrol-1-(ácido p-benzoico); **PEDOT:** poli-(3,4-etilendioxitiofeno); **PLLy:** Poli-L-Lisina; **PS:** Poliestireno; **PTH:** Politionina; **PVP:** Polivinilpirrolidona; **rGO:** Óxido de grafeno reducido; **SPCE:** Electrodo de carbono serigrafiado.

3. ANTECEDENTES

En el desarrollo de esta Tesis Doctoral se ha centrado la atención en dos tipos de polímeros: uno, semisintético y aniónico, como es la carboximetilcelulosa (CMC) y otros sintéticos y catiónicos como son los dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM).

3.2.2.1. CARBOXIMETILCELULOSA

La O-carboximetilcelulosa o CMC es un importante polisacárido lineal y aniónico formado por unidades de D-glucopiranososa y O-(carboximetil)-D-glucopiranososa unidas por enlaces glicosídicos $\beta(1-4)$. En la **Figura 3.7** se representa la estructura de la sal sódica de este polisacárido.

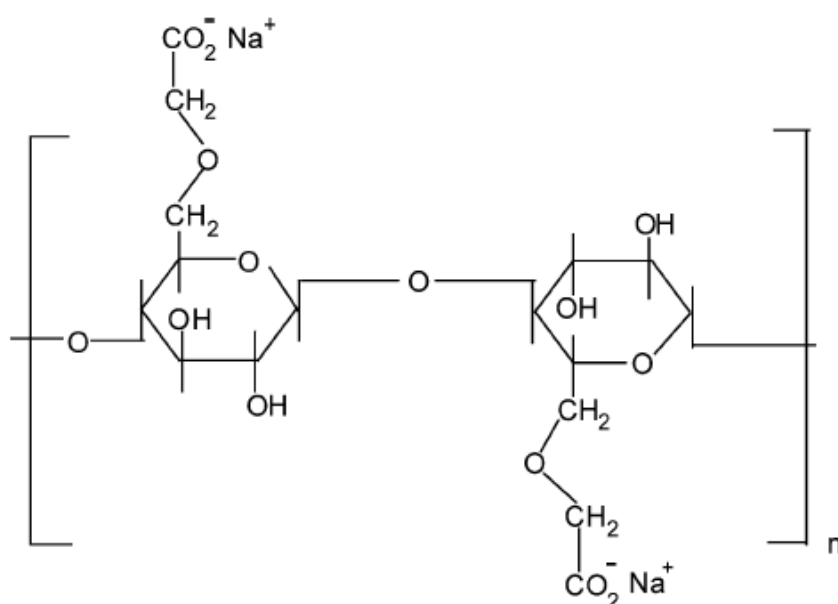


Figura 3.7. Estructura de la sal sódica de la CMC.

Este derivado de la celulosa se forma por la reacción con ácido cloroacético en medio fuertemente alcalino. Los grupos carboximetil sódicos (CH_2COONa) son los responsables de la elevada solubilidad en agua. Otras propiedades importantes de este polímero son su alta hidrofiliidad, volumen hidrodinámico, capacidad de proporcionar viscosidad y de actuar como agente floculante, su bajo coste y facilidad de obtención [Ninan, 2013]. Estas propiedades dependen principalmente de tres factores: 1) el peso molecular del polímero, 2) el número promedio de grupos carboxilo y 3) la distribución de los sustituyentes carboxílicos a lo largo de la cadena polimérica [Reuben 1983], [Kamide 1985], [Baar, 1994].

Debido a sus propiedades, este polímero se ha empleado en el desarrollo de biosensores, demostrándose que puede ser utilizado para estabilizar proteínas [Chiumiento, 2006], [Darias, 2002], [Valdivia, 2007], [Villalonga, 1999], [Villalonga, 2000], [Villalonga, 2003].

También se ha descrito en la bibliografía el empleo de CMC para funcionalizar CNTs, proporcionándoles estabilidad y solubilidad [Shao, 2009], así como su empleo como agente dispersante del grafeno [Yang, 2010].

A pesar de las ventajas que presenta este derivado de celulosa y de ser uno de los mejores dispersantes del grafeno [Yang, 2010], no se han publicado trabajos en los que utilicen híbridos covalentes de grafeno y dicho polímero. Sólo se ha encontrado un biosensor enzimático para la detección de H_2O_2 (Tabla 3.2), en el que mezclan la CMC y el GO, reduciéndolo posteriormente y cubriendo la superficie de un GCE para la inmovilización final de hemoglobina [Cheng, 2013].

3.2.2.2. DENDRÍMEROS DE POLIAMIDOAMINA

Los dendrímeros y dendrones son polímeros sintéticos, monodispersos y de tamaño nanométrico, con una arquitectura tridimensional y altamente ramificada [Vögtle, 2009]. Estas macromoléculas se preparan, normalmente, mediante métodos de síntesis divergentes o convergentes, a través de una secuencia de reacciones reiterativa en la que cada paso da lugar a una nueva generación del material, con un aumento de grupos funcionales terminales en la superficie. En la Figura 3.8 se representan ambas estrategias de síntesis, así como los principales parámetros estructurales de una molécula de dendrímero.

3. ANTECEDENTES

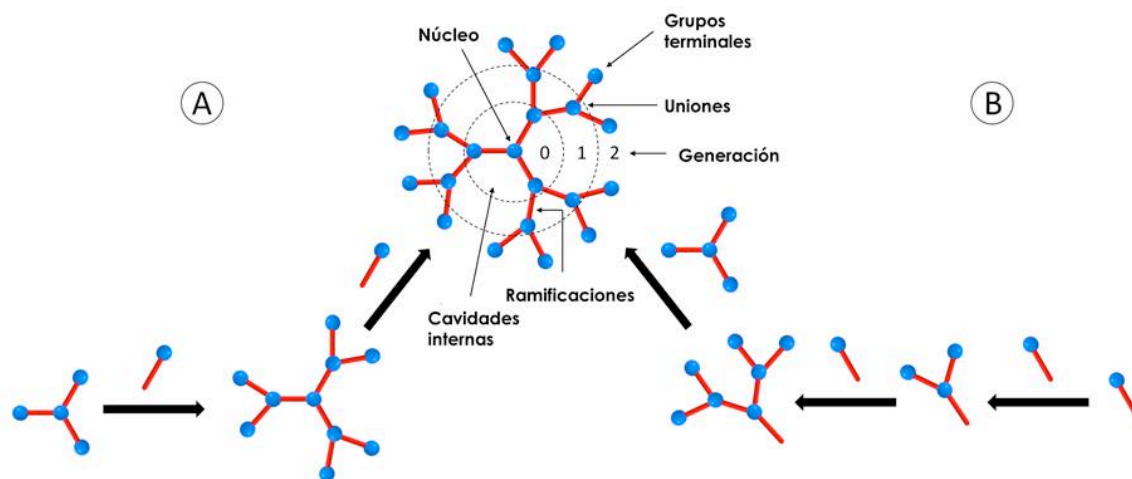


Figura 3.8. Parámetros estructurales de una molécula de dendrímero preparada mediante métodos de síntesis (A) divergentes y (B) convergente.

Estos nanomateriales “blandos” tienen unas propiedades excepcionales como son: alta homogeneidad estructural, una elevada reactividad superficial, una alta capacidad de albergar moléculas y un carácter hidrofílico/hidrofóbico [Vögtle, 2009]. Existe la posibilidad de manipular estas propiedades, mediante transformaciones químicas controladas o diseñando moléculas con una composición específica, ofreciendo así diversas posibilidades de construir arquitecturas 3D nanoestructuradas sobre la superficie electródica [Poupot, 2010], [Şenel, 2013]. Estas nuevas arquitecturas tridimensionales permiten el empleo de los dendrímeros en el diseño de nuevos sensores químicos y biosensores, así como en el desarrollo de sistemas de entrega controlada medicamentos.

Son varias las razones por las que se utilizan dendrímeros como agentes para modificar las superficies de los electrodos:

- Poseen una alta densidad de grupos químicos localizados por el perímetro externo a través de los que puede unirse de manera estable al electrodo. Estos grupos funcionales pueden emplearse también como puntos de unión para la inmovilización de los elementos de reconocimiento biológico.
- Poseen una estructura permeable con forma globular o elíptica, favoreciendo la difusión de las especies electroactivas hacia la superficie electródica.
- Tienen una forma y composición bien definida que, junto con la presencia de los numerosos grupos funcionales, permite la formación controlada de monocapas y multicapas moleculares [Sato, 2013].

- Pueden ser dopados con nanopartículas metálicas o mediadores electroquímicos, encapsulados o unidos covalentemente, para mejorar la actividad electrocatalítica y favorecer la transferencia de carga en la superficie del electrodo.
- Muchos de ellos presentan buena biocompatibilidad debido a su superficie hidrofílica, lo que permite la conservación de la conformación biológicamente activa de los biorreceptores tras la inmovilización.
- Existe la posibilidad de combinarlos con una gran variedad de nanomateriales para diseñar materiales híbridos para aplicaciones electroanalíticas.

Los dendrímeros de poliamidoamina o PAMAM (**Figura 3.9**), son los polímeros hiperramificados más empleados en biosensores electroquímicos. Muchos autores han aprovechado las ventajas del empleo de electrodos modificados con monocapas de PAMAM para el diseño de biosensores enzimáticos [**Damar, 2011**], [**Şenel, 2013**].

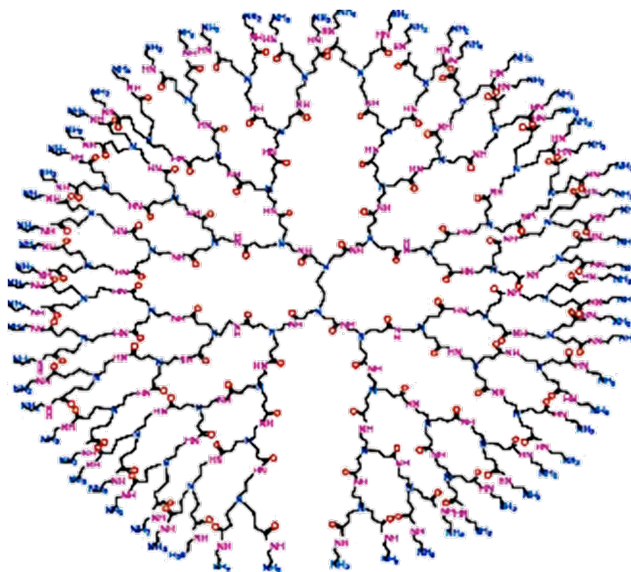


Figura 3.9. Estructura de PAMAM 4G con núcleo de etilendiamina.

En los últimos años se han empleado materiales híbridos de derivados de grafeno y dendrímeros en el desarrollo de biosensores electroquímicos, incluyéndose en muchos de ellos el empleo de nanopartículas metálicas (**Tabla 3.2**).

Jayakumara y colaboradores crecieron PAMAM de primera generación sobre GO y lo modificaron con AuNPs. El material se empleó para modificar un electrodo

3. ANTECEDENTES

de oro, sobre el que inmovilizó DNA para desarrollar un genosensor electroquímico **[Jayakumar, 2012]**. Por otro lado, Luo y colaboradores inmovilizaron la enzima GOx sobre una superficie electródica de carbono modificada con un material híbrido de GO y PAMAM 3.5G unidos por interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno e incluyendo AgNPs en el mismo **[Luo, 2012]**.

Dado que la investigación en el campo de los nanomateriales híbridos es algo bastante novedoso y reciente, existen pocos trabajos sobre nanohíbridos covalentes con polímeros tan interesantes como la CMC y los dendrímeros de PAMAM. Como se ha comentado anteriormente, las características y propiedades derivadas de la unión de estos polímeros con el grafeno resultan muy interesantes en campos como los biosensores, por lo que es importante seguir diseñando estrategias sintéticas para dichos materiales de manera que se consigan plataformas biosensoras con las que se mejoren las características analíticas.

3.3. BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS BASADOS EN GRAFENO

La cuantificación de los procesos biológicos o bioquímicos es de gran importancia para aplicaciones médicas, biológicas y bioelectrónicas. En este sentido, transformar la información biológica en una señal eléctrica fácilmente procesable es un desafío que se presenta a la Química Analítica moderna debido a la complejidad de conectar directamente un dispositivo electrónico con un medio biológico **[Grieshaber, 2008]**.

La tecnología de sensores es especialmente apropiada para resolver esta problemática de un modo barato, sencillo, rápido y fiable **[Reviejo, 2000]**. Uno de los tipos de sensores más prometedores en este contexto son los biosensores, definidos por la IUPAC como dispositivos capaces de proporcionar información analítica cuantitativa o semicuantitativa utilizando un elemento de reconocimiento biológico **[Theâveno, 1999]**. Los biosensores poseen una serie de características que los convierten en opciones extremadamente atractivas para competir con otras tecnologías en el mercado. Las más reseñables son: alta selectividad y sensibilidad, tiempos de análisis reducidos, capacidad para ser incluidos en sistemas integrados, facilidad de automatización, capacidad de respuesta en tiempo real, versatilidad y bajo coste. Estas características son especialmente destacables en el caso de los

biosensores electroquímicos en los que el sistema de transducción permite la obtención de una respuesta directa para monitorizar las reacciones bioquímicas que ocurren en el sistema de reconocimiento biológico.

A lo largo de los años se han realizado diversas clasificaciones de los biosensores. Atendiendo a la naturaleza del proceso de reconocimiento biológico, se distinguen dos grupos:

1) los **biosensores catalíticos**, que son aquellos que utilizan un biorreceptor capaz de reconocer y catalizar la transformación del analito. Estos elementos pueden ser enzimas, tejidos, o microorganismos, e incluso anticuerpos y ácidos nucleicos catalíticos.

2) los **biosensores de afinidad**, en los que el elemento de reconocimiento (anticuerpos, ácidos nucleicos, lectinas, receptores no enzimáticos, células y tejidos) se une al analito a través de una interacción específica durante la cual no produce su transformación química.

Una segunda clasificación es la que se basa en el fundamento del transductor; atendiendo a este criterio, los biosensores pueden clasificarse en: electroquímicos (amperométricos, potenciométricos, conductimétricos, impedimétricos), ópticos (absorbancia, reflectancia, fluorescencia, bioluminiscencia, resonancia de plasmón superficial), calorimétricos y de masa (piezoeléctricos), entre otros.

Actualmente, los biosensores electroquímicos son los que reciben mayor atención dentro de la investigación y representan el mercado más grande dentro de su campo. Estos biosensores son dispositivos analíticos integrados y autónomos, en los que el elemento de reconocimiento biológico se encuentra en contacto directo con un transductor electroquímico. Desde un punto de vista analítico, combinan la ventaja de poder ser portátiles, exhibir una elevada sensibilidad y un bajo límite de detección, asociada con la transducción electroquímica, con la especificidad que proporcionan los elementos de reconocimiento biológico. Debido a estas relevantes propiedades, los biosensores electroquímicos suponen una excelente alternativa a los instrumentos analíticos tradicionales.

El desarrollo de nuevos materiales y más concretamente nanomateriales ha hecho que se produzca una mejora en las características de estos dispositivos por lo que numerosos grupos de investigación introdujeron estos materiales para modificar las superficies electródicas.

3. ANTECEDENTES

El grafeno y sus derivados tales como el óxido de grafeno (GO) y el óxido de grafeno reducido (rGO) han adquirido un papel importante en la investigación de sensores electroquímicos [Pumera, 2010], [Ratinac, 2011]. Debido a la amplia ventana de potencial que ofrecen estos materiales (aproximadamente 2.5 V para grafeno en disolución reguladora de fosfato 0.1 mM) es posible la detección de numerosas moléculas incluyendo aquellas que presentan altos potenciales de oxidación o reducción como son los ácidos nucleicos.

3.3.1. BIOSENSORES ENZIMÁTICOS BASADOS EN GRAFENO

Por lo que respecta a los biosensores catalíticos, los más utilizados son los basados en proteínas capaces de catalizar reacciones biológicas. En las reacciones enzimáticas, la molécula transformada se denomina sustrato y normalmente, implica el uso de otro reactivo llamado cofactor, para generar los correspondientes productos. Las enzimas pueden clasificarse fundamentalmente en seis grupos, de los cuales, las más importantes para fines analíticos son las oxidorreductasas, las hidrolasas y algunas liasas [Serra, 2002]. El carácter catalítico de las enzimas hace que en la reacción se regenere la enzima a su estado inicial y no sea necesario ningún tipo de tratamiento para restablecer el biosensor. Esta característica hace que, en principio, sea posible una monitorización continua y reversible, lo que no siempre ocurre con otro tipo de material biológico, como es el caso de los anticuerpos. La reacción catalítica enzimática es eficiente y además extremadamente selectiva, por lo que se combinan los factores de reconocimiento particular y de amplificación, requeridos para la mayoría de las aplicaciones analíticas de los biosensores.

Desde que Clark y Lyons [Clark, 1962], propusieron el primer electrodo enzimático, los biosensores electroquímicos basados en enzimas recibieron una gran atención por sus ventajas al asociar la actividad biocatalítica de estas proteínas con la elevada sensibilidad y versatilidad de los transductores electroquímicos. La inmovilización de estas biomoléculas es un punto crítico debido a la necesidad de conservar su actividad para conseguir un biorreconocimiento eficiente del sustrato. Asimismo el transductor en el que se inmoviliza la enzima debe permitir una transferencia de carga rápida y asegurar una respuesta rápida y sensible.

Se han realizado estudios que demuestran que los defectos presentes en los bordes de las láminas de grafeno permiten una mejor transferencia electrónica que si se trabaja sobre electrodos de carbono vitrificado (GCE) llegando a poder darse la transferencia directa entre el electrodo y el centro redox de las enzimas [Liu, 2012], [Pumera, 2009]. También se ha demostrado la capacidad electrocatalítica del rGO frente a H_2O_2 y NADH, otro de los motivos que hace que éste sea un material muy atractivo en el desarrollo de sensores enzimáticos [Lin, 2009], [Zhong, 2010].

En el desarrollo de esta Tesis Doctoral, para estudiar la aplicabilidad de los materiales diseñados en el desarrollo de biosensores enzimáticos se han utilizado tirosinasa (Tyr), glucosa oxidasa (GOx) y peroxidasa (HRP) como enzimas modelo.

3.3.1.1. BIOSENSORES ENZIMÁTICOS PARA LA DETECCIÓN DE GLUCOSA

La glucosa es la principal fuente de energía metabólica y por tanto el nutriente orgánico más importante y abundante en nuestra dieta, jugando un papel importante en diversas funciones del organismo, llegando a ser un indicador de la actividad metabólica celular. Además es el único azúcar que ingresa directamente en el metabolismo energético dependiente de la insulina y se utiliza en todos los tejidos. Tanto el exceso como la falta de glucosa, provocan consecuencias indeseables relacionadas con enfermedades como la glicosuria renal, fibrosis quística, diabetes y también cáncer. Por tanto, el control de la glucosa tanto en fluidos biológicos como en alimentos es uno de los análisis más realizados en los laboratorios de química clínica y control de calidad [Campuzano, 2004].

Junto con la glucosa deshidrogenasa (GDH) y la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G-6P-DH), la glucosa oxidasa (GOx) es una de las enzimas específicas que cataliza la oxidación de la glucosa, dando como productos ácido glucónico y H_2O_2 . Esta enzima puede obtenerse de hongos tales como *Penicillium Nonatun* o *Aspergillus Niger* [Badui, 1999]. Es una proteína dimérica (Figura 3.7) con un peso molecular de 160 kDa que tiene como cofactor el dinucleótido de flavina y adenina (FAD) fuertemente enlazado a cada monómero. Cada uno de estos monómeros se pliega en dos unidades estructurales, una de las cuales se enlaza al FAD, mientras que la otra está relacionada con las uniones al sustrato. La GOx es una glicoproteína que contiene un 16 % de azúcares neutros y un 2 % de

3. ANTECEDENTES

aminoazúcares [Tsuge, 1975]. Además posee 3 residuos de cisteína y 8 sitios donde puede darse la N-glicosilación [Frederick, 1990].

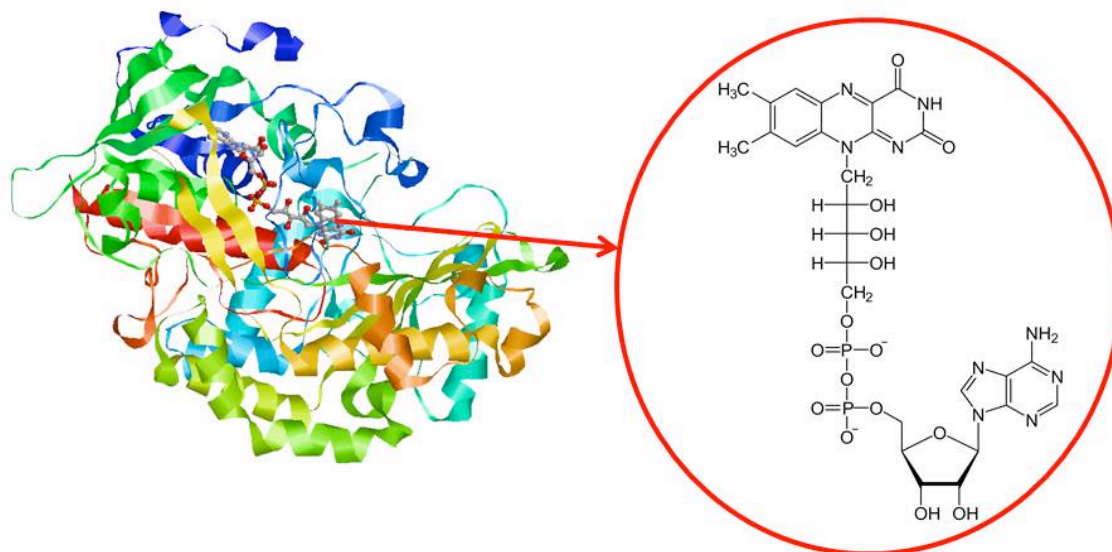


Figura 3.10. Estructura tridimensional de la enzima Glucosa oxidasa (*Aspergillus Niger*) y del cofactor FAD.

Debido a la importancia de la determinación de glucosa y a la estabilidad de la oxidasa que cataliza su oxidación, el mayor número de biosensores desarrollados, dentro de los electrodos enzimáticos, corresponde sin lugar a dudas a los que se basan en la inmovilización de glucosa oxidasa. En la **Tabla 3.3** se han recogido los trabajos más recientes y significativos donde se han desarrollado biosensores en los que se inmoviliza GOx utilizando nanomateriales basados en grafeno y sus derivados.

Se han empleado diversas configuraciones, como la inmovilización covalente de la enzima directamente sobre el grafeno [Liu, 2010] o en grafeno modificado con nanopartículas de CuO [Hsu, 2012] o TiO₂ [Jang, 2012]. Otros autores inmovilizan la proteína catalítica creando una membrana con Nafion tanto sobre grafeno funcionalizado con APTES [Zheng, 2012], decorado con AuNPs [Baby, 2010] o con espuma de grafeno mesomolecular [Wang, 2014]. También se ha empleado quitosano, ya sea solo [Liu, 2011] o con nanopartículas de Au [Shan, 2009], Pt [Wu, 2009] o Pd [Zeng, 2011]. Ruan y colaboradores modificaron la superficie de un electrodo de Au con GOx, GO y PDA, alcanzando un límite de detección para la determinación de glucosa de 0.1 μM [Ruan, 2013].

Los derivados de grafeno GO y rGO, han sido combinados con polímeros y/o nanopartículas [Chaturvedi, 2014], [Ruan, 2013], [Xue, 2014], [Hwa, 2014]. Luo y colaboradores sintetizaron un material nanocompósito de GO, PAMAM y AgNPs empleando una metodología basada en irradiación de microondas. La enzima se inmovilizó en la superficie de un GCE modificado con dicho nanomaterial, observándose una buena transferencia electrónica directa entre el electrodo y la enzima, además de presentar unas buenas características analíticas (una sensibilidad de $75.75 \mu\text{A}/\text{mM cm}^2$ y un límite de detección de $4.5 \mu\text{M}$) [Luo 2013]. Un material nanocompósito ternario fue sintetizado por Xue y colaboradores [Xue, 2014] compuesto por AuNPs en la superficie de óxido de grafeno reducido y PPy, empleando Cs para inmovilizar la enzima.

Tabla 3.3. Biosensores electroquímicos enzimáticos de glucosa oxidasa basados en materiales de grafeno

Electrodo	E, V	LD, μM	Sensibilidad, $\mu\text{A}/\text{mM cm}^2$	Intervalo lineal, mM	RSD, %	$t_{\text{respuesta}}$, s	Referencia
GOx-Grf/PtE	0.4	—	8.045	0 – 22	5.8	—	[Liu, 2010]
Nf/GOx/APTES-Grf/GCE	-0.45	1	—	1 – 32	—	—	[Zheng, 2012]
Nf/GOx/AuNPs/Grf/GCE	0.8	1	—	0.001 – 30	—	—	[Baby, 2010]
GOx/TiO ₂ /Grf/GCE	-0.6	—	6.2	0 – 8	—	—	[Jang, 2012]
GOx/CuO/Grf/GCE	0.6	1	1065	0.001 – 8	—	—	[Hsu, 2012]
GOx/Cs/Grf/GCE	-0.79	20	—	2 – 22	—	—	[Liu, 2011]
GOx/PDA/Grf/AuE	0.7	0.1	28.4	0.001 – 4.7	4.20	4	[Ruan, 2013]
GOx/Cs-AuNPs-Grf/Au	-0.2	180	—	2 – 10	—	—	[Shan, 2010]
GOx/PtNPs/Cs/Grf/GCE	0.4	0.6	—	0.0006 – 5	6	—	[Wu, 2009]
GOx/PdNPs/Cs/Grf/GCE	0.7	0.2	31.2	0.001 – 1	5.1	10	[Zeng, 2011]
GOx-PDA/GO/AuE	0.7	0.1	28.4	0.001 – 4.7	—	4	[Ruan, 2013]
GOx/Cs-Fc/GO/GCE	0.3	7.6	10	0.02 – 6.78	4.3	5	[Qiu, 2011]
GOx/Ce-PtNPs/rGO	0.4	1300	66.2	0.02 – 0.12	3.90	6.3	[Chaturvedi, 2014]
GOx/rGO/GCE	-0.44	—	1.85	0.1–27	3.58	5	[Unnikrishnan, 2013]
GOx/Ag-rGO/GCE	-0.422	160	3.84	0.5 – 12.5	4.40	—	[Palanisamy, 2014]

Tabla 3.3. Biosensores electroquímicos enzimáticos de glucosa oxidasa basados en materiales de grafeno (Cont.)

Electrodo	E, V	LD, μM	Sensibilidad, $\mu\text{A}/\text{mM cm}^2$	Intervalo lineal, mM	RSD, %	$t_{\text{respuesta}}$, s	Referencia
GOx/AuNPs/PPy/rGO/GCE	-0.67	—	123.8	0.2 – 1.2	4.1	—	[Xue, 2014]
Cs-GOx/AgNPs/PAMAM-rGO/GCE	-0.25	4.5	75.72	0.032 – 1.89	5.60	—	[Luo, 2012]
GOx-Cs/PTBO/PB/rGO/GCE	0.2	8.3	59	0.02 – 1.09	—	10	[Bai, 2013]
GOx/ZnO/CNTs-rGO/GCE	—	4.5	5.36	0.01 – 6.5	3.24	—	[Hwa, 2014]
GOx-GQD/GCE	-0.42	1.73	85	0.005 – 1.27	5	3	[Razmi, 2013]
GOx/MGF/Nf/GCE	-0.51	250	2.87	1 – 12	6.7	—	[Wang, 2014]

Abreviaturas utilizadas: APTES: Aminopropiltriétoxilano; AgNPs: Nanopartículas de Ag; AuE: Electrodo de Au; AuNPs: Nanopartículas de Au; Ce-PtNPs: Nanopartículas de Ce y Pt; CNTs: Nanotubos de carbono, Cs: Chitosan; E_{app}: Potencial aplicado; Fc: Ferroceno; GCE: Electrodo de carbono vitrificado; GQD: *Quantum dots* de grafeno; GO: Óxido de grafeno; GOx: Glucosa oxidasa; Grf: Grafeno; LD: Límite de detección; MGF: Espuma de grafeno mesocelular; Nf: Nafión; PAMAM: dendrímero de poliamidoamina; PB: Azul de Prusia; PDA: Polidopamina; PdNPs: Nanopartículas de Pd; PPy: Polipirrol; PTBO: Azul de politoluidina O; PtE: Electrodo de platino; PtNPs: Nanopartículas de Pt; rGO: Óxido de grafeno reducido; RSD: Desviación estándar relativa.

3. ANTECEDENTES

3.3.1.2. BIOSENSORES ENZIMÁTICOS PARA LA DETECCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Los fenoles son compuestos aromáticos que se caracterizan por tener uno o varios grupos hidroxilo unidos directamente al anillo aromático. Algunos ejemplos se muestran en la **Figura 3.11**.

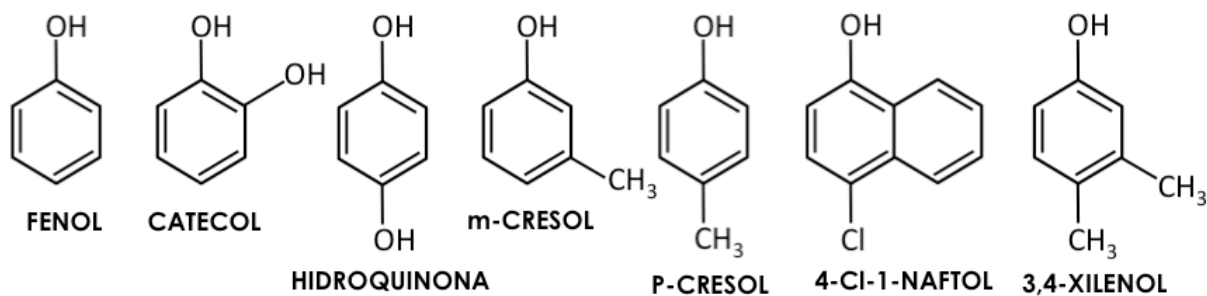


Figura 3.11. Estructura de distintos compuestos fenólicos.

Los fenoles más sencillos son líquidos o sólidos de bajo punto de fusión, pero con puntos de ebullición bastante elevados debido a su facilidad para formar enlaces de hidrógeno. La oxidación espontánea de los fenoles es catalizada por su exposición a la luz y al aire, así como por la presencia de impurezas metálicas. El mecanismo de oxidación de los fenoles es complejo e influye en gran medida la propia estructura del fenol, dando lugar a derivados de difenilo o a quinonas

El origen de estos compuestos puede ser tanto natural como antropogénico. Los compuestos fenólicos naturales son metabolitos secundarios en las plantas por lo que podemos encontrarlos en los alimentos; además se utilizan en aditivos, suplementos y nutracéuticos y pueden tener tanto un efecto beneficioso (antioxidante) como perjudicial para el organismo. Por el contrario, los compuestos fenólicos industriales de origen antropogénico son tóxicos y unos de los contaminantes más abundantes del medio ambiente.

Durante muchos años se han realizado estudios con el fin de concretar el tipo de efecto que ejercen los fenoles sobre la salud y el medio ambiente, centrandose una gran parte de los esfuerzos en el desarrollo de métodos analíticos para detectar y cuantificar dichos compuestos en los medios en los que están presentes [Meulenberg, 2009].

Las enzimas que catalizan la oxidación de los compuestos fenólicos (tirosinasas, peroxidadasas, lacasas, etc.) se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, y son de importancia fundamental para aquellos organismos que producen compuestos polifenólicos tipo melaninas [Prota 1995]. El estudio de estas enzimas ha abierto unas posibilidades en sus aplicaciones técnicas para la determinación de compuestos fenólicos de importancia medioambiental mediante la construcción de biosensores.

3.3.1.2.1. Tirosinasa

La enzima tirosinasa es una fenol oxidasa que contiene cobre y que cataliza la oxidación de los monofenoles y los catecoles a o-quinonas. Está ampliamente distribuida en la naturaleza, y se ha encontrado en bacterias, hongos, plantas y animales. Actúa en la biosíntesis de los pigmentos de melanina en la piel de los invertebrados, en la esclerotización de las cutículas de los insectos, y en la biosíntesis de compuestos polifenólicos (la mayoría de los cuales poseen una actividad antibiótica) en plantas y microbios.

Comúnmente la enzima se encuentra como una proteína tetraédrica con una masa molecular de 120 KDa, compuesta de dos subunidades de 43 KDa (subunidad H) y dos de 14 KDa (subunidad L). Las subunidades H contienen el sitio activo, en el cual se alojan 2 átomos de cobre (Cu_A y Cu_B), cada uno coordinado por 3 residuos de histidina (His61, His85 e His94 con Cu_A e His259, His263 e His296 con Cu_B). Cuatro de los residuos de His (61, 94, 259 y 263) forman enlaces de hidrógeno con los oxígenos carbonílicos peptídicos. La cavidad del sitio activo es accesible, facilitando así las interacciones con los analitos y la transferencia de carga con la superficie electrodica (**Figura 3.12**).

3. ANTECEDENTES

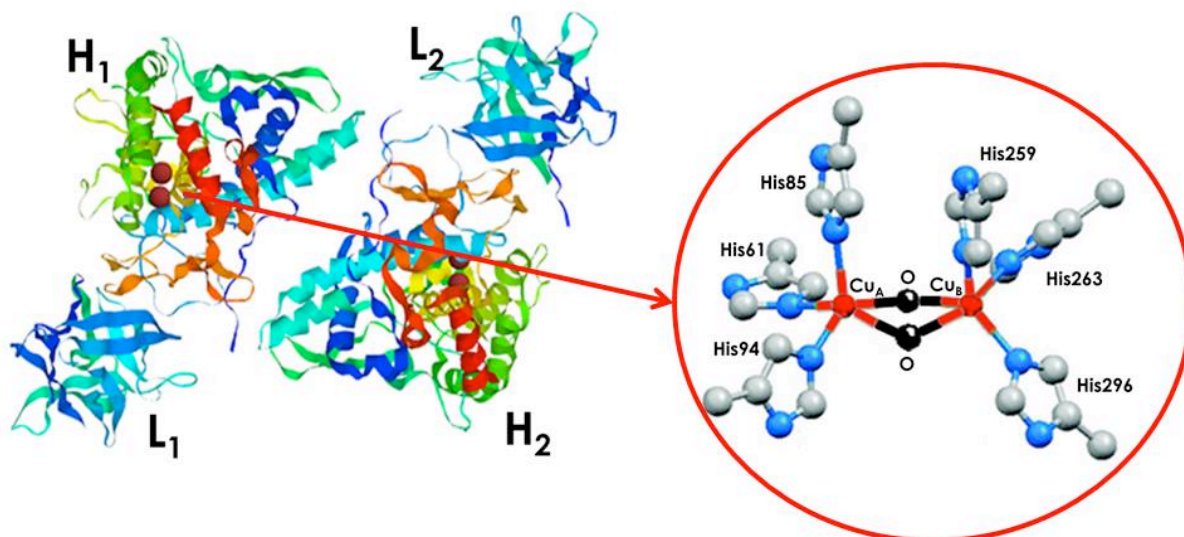


Figura 3.12. Estructura tridimensional de la enzima Tirosinasa (*Mushroom*) con las dos subunidades H y L y los dos átomos de Cu en cada sitio activo.

3.3.1.2.2. Peroxidasa de rábano

Las peroxidasa causan, con la participación del peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones, la oxidación monoelectrónica de un amplio espectro de sustratos. Se distribuyen de forma ubicua en la naturaleza y se nombran después de especificar su fuente [Scheller, 1997].

La peroxidasa de rábano (HRP) es una glicoenzima con un peso molecular de 44 KDa y un contenido en carbohidratos que representa el 20% del peso de la proteína. La HRP es una enzima redox (Figura 3.13) que tiene dos centros metálicos, uno de hierro en el centro activo y otro de dos átomos de calcio. En el centro activo de la HRP se encuentra un grupo ferroprotoporfirina que tiene una estructura planar con un átomo de Fe alojado en el medio de un anillo de porfirina compuesto por cuatro moléculas de pirrol. El Fe posee dos sitios de enlace accesibles, también llamados centros de coordinación, uno por encima y otro por debajo del plano del grupo hemo. Por el centro de coordinación proximal, el grupo hemo se une a la enzima a través de un residuo de histidina, quedándose el centro distal vacío y expuesto al ataque del H₂O₂ durante las reacciones redox [Veitch, 2004].

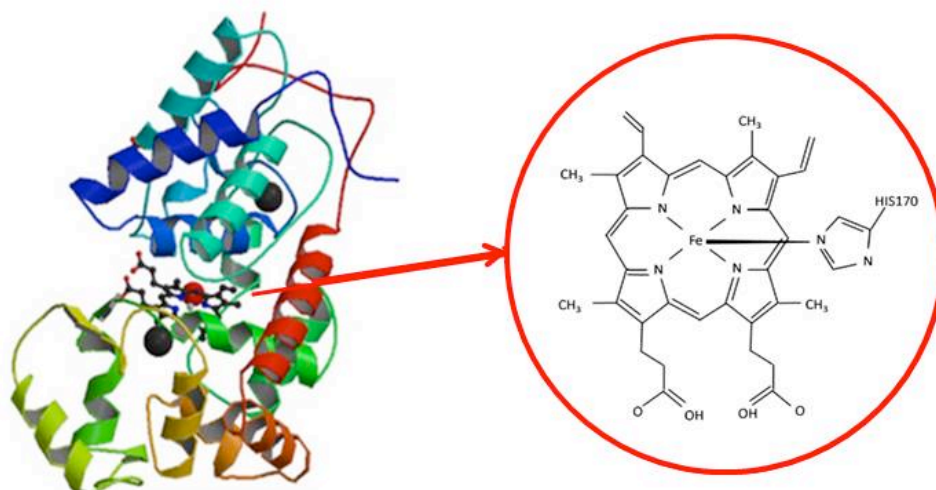


Figura 3.13. Estructura tridimensional de la enzima Peroxidasa de rábano y del grupo férrico de portoporfirina IX.

La accesibilidad al Fe del centro activo permite una buena conexión con las superficies modificadas de los electrodos y, consecuentemente, ésta es una de las enzimas más utilizadas en la construcción de biosensores de tercera generación [Shan, 2010b], [Xi, 2009], [Yin, 2009]. Sin embargo, la amplia aplicación electroanalítica de la HRP se debe a su capacidad de catalizar la descomposición del H_2O_2 , uno de los subproductos de muchas oxidasas [Ruzgas, 1996]. Otras propiedades que favorecen su empleo es el hecho de que es una proteína pequeña, estable, barata y que puede adquirirse con un alto grado de pureza [Song, 2006], además de generar señales analíticas en un corto periodo de tiempo.

Durante años han sido numerosos los biosensores electroquímicos desarrollados para el estudio de compuestos fenólicos en los que se inmovilizan tanto la enzima tirosinasa como la peroxidasa. Sin embargo, no se han descrito biosensores de HRP para la determinación de catecol y otros fenoles, en los que se utilicen nanomateriales híbridos basados en grafeno para la modificación superficial de los electrodos. En la **Tabla 3.4** se han recogido los biosensores electroquímicos para la detección de compuestos fenólicos basados en el empleo de Tyr y nanomateriales híbridos de grafeno.

Como se indica en la misma, Song y colaboradores desarrollaron un biosensor basado en GO conjugado con Tyr unido a AuNPs, obteniendo unas buenas características analíticas frente a catecol [Song, 2011]. Qu y colaboradores, desarrollaron un nanomaterial compuesto de grafeno y láminas de péptidos de seda

3. ANTECEDENTES

en el que inmovilizaron Tyr para de determinación de bisfenol A (PBA), fenol y catecol. Empleando un potencial de $-0.1V$, con el que se consiguió minimizar el efecto de las posibles interferencias de la muestras, obtuvieron unos límites de detección de 0.23, 0.35 and 0.72 nM para catecol, fenol y PBA respectivamente [Qu, 2013]. Por último Liu y colaboradores desarrollaron un biosensor para catecol, inmovilizando Tyr sobre una superficie en la que se generaron nanotubos de TiO_2 sobre el grafeno [Liu, 2014c], pero sin alcanzar tan buenos resultados como Qu y sus colaboradores.

Tabla 3.4. Biosensores electroquímicos de Tyr basados en materiales de grafeno, para la determinación de catecol y otros fenoles

Electrodo	Analito	E, V	LD, nM	Sensibilidad, mA/M cm ²	Intervalo lineal, μM	RSD, %	Referencia
Tyr–Au/PASE–GO/SPE	Catecol	– 0.2	24	160	0.083 – 23	5.1	[Song, 2011]
Tyr/SP–Grf/GCE	Catecol	– 0.1	0.23	7634	1 – 16910	4.6	[Qu, 2013]
Tyr/TNTs–Grf/GCE	Catecol	– 0.1	55	150	0.3 – 110	5.4	[Liu, 2014c]
Tyr/AAIL–Grf/GCE	Catecol	—	8	12.6	1 – 11	3.5	[Lu, 2014]
Tyr/AuNP–rGO/Au/PDMS	Fenol	—	100	136.91	0 – 0.4	–	[Liu, 2012]
Cs–Tyr/AuNPs–Grf/GCE	Bisfenol-A	0.47	1	3.59	0.025 – 3	7.3	[Pan, 2015]
Tyr–ZnOQDs/GO/GCE	OH-PCBs	—	150	821.7	2.8 – 17.9	3.2	[Rather, 2014]

Abreviaturas utilizadas: **AAIL:** Líquido iónico de aminoácido; **AuNPs:** Nanopartículas de Au; **Cs:** Chitosan; **Grf:** Grafeno; **GCE:** Electrodo de carbono vitrificado; **GO:** Óxido de grafeno; **OH-PCBs:** Bisfenilos policlorados hidroxilados; **PASE:** Ácido pirenbutanoico, éster succinimidilo; **PDMS:** Polidimetilsiloxano; **PPY:** polipirrol; **PTS:** ácido *p*-toluensulfónico; **SP:** Péptido de la seda; **SPE:** Electrodo serigrafiado; **TNTs:** Nanopartículas de TiO₂; **Tyr:** Tirosinasa; **ZnOQDs:** Quantum dots de ZnO.

3.3.2. GENOSENSORES BASADOS EN GRAFENO

El ácido desoxirribonucleico (DNA) es el principal componente del material genético de la inmensa mayoría de los organismos, junto con el ácido ribonucleico (RNA), siendo el componente químico primario de los cromosomas y el material con el que los genes están codificados. La función principal del DNA es mantener, a través del código genético, la información genética necesaria para crear un ser vivo idéntico a aquel del que proviene (o casi similar, en el caso de mezclarse con otra cadena como es el caso de la reproducción sexual o de sufrir mutaciones). Las cadenas polipeptídicas codificadas por el DNA pueden ser estructurales, como las proteínas de los músculos, cartílagos, pelo, etc., o bien funcionales, como las de la hemoglobina o las innumerables enzimas del organismo. La función principal de la herencia es la especificación de las proteínas, siendo el DNA una especie de plano o “receta” para nuestras proteínas.

A diferencia de las proteínas, el DNA es una molécula lineal compuesta por cuatro monómeros y con una estabilidad térmica y química mucho más significativa que las primeras. Además, su mecanismo de síntesis y ensamblado es rápido y sencillo, y puede enlazarse específicamente a través de enlaces de hidrógeno a otra molécula de DNA de secuencia complementaria para formar la doble hélice [Lu, 2006].

Desde el punto de vista químico, el DNA es un polímero de nucleótidos. Una secuencia de estos nucleótidos forma lo que se conoce como gen, el cual contiene la información necesaria para la síntesis de una macromolécula con función celular específica, generalmente proteínas y RNA. Cada nucleótido, a su vez, está formado por un azúcar (la 2-desoxirribosa) que se encuentra en forma de anillo furanósido y que se une por un enlace β -glicosídico en el carbono 1 a una base nitrogenada, que puede ser adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G). Finalmente encontramos un grupo trifosfato encargado de enlazar los nucleótidos mediante un enlace fosfodiéster. Lo que distingue un nucleótido de otro es, entonces, la base nitrogenada, y por ello la secuencia del DNA se especifica nombrando sólo la secuencia de sus bases. El acoplamiento de los nucleótidos se debe a la afinidad química existente entre las bases A–T y G–C (Figura 3.15).

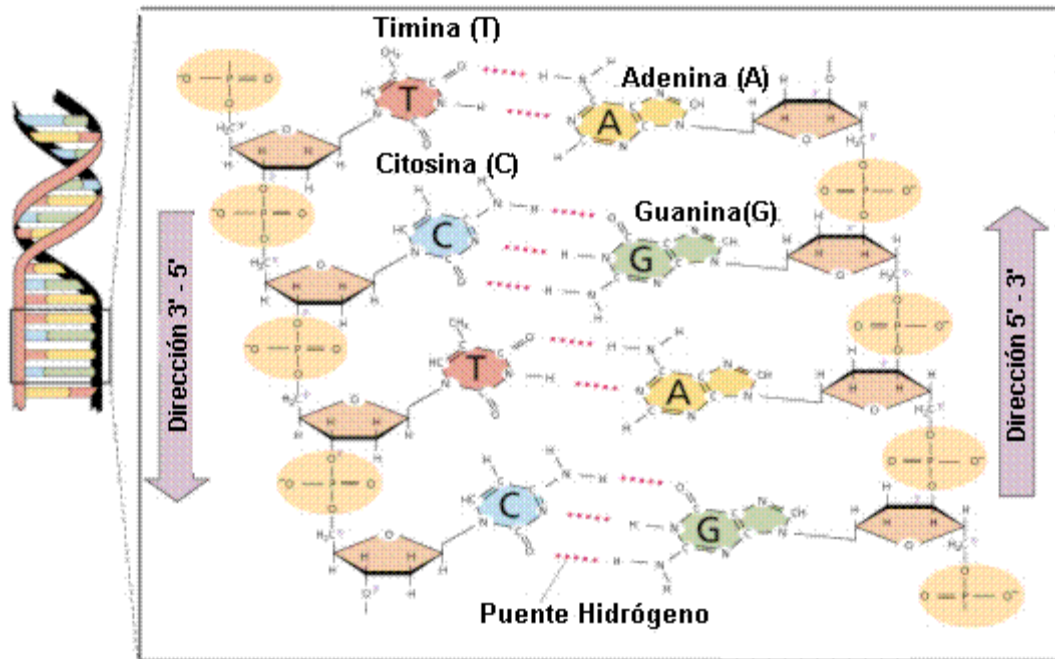


Figura 3.15. Estructura química de la doble hélice de DNA. Detalle de las cadenas de nucleótidos conectadas mediante enlaces de hidrógeno y la unión de los nucleótidos mediante un enlace fosfodiéster.

La reacción mediante la cual dos cadenas de DNA se unen para formar una doble cadena se denomina hibridación, y la reacción inversa, desnaturalización. Ambos procesos constituyen un equilibrio dinámico entre los dos estados de cadenas individuales en forma de ovillos estadísticos y las cadenas dobles en forma de hélice, dependiendo la estabilidad de las dobles cadenas de varios factores, como la temperatura y/o el pH.

La determinación de DNA es muy importante en diversos estudios, incluidos pruebas forenses, de bioseguridad, medioambientales y de alimentación, y en la investigación y desarrollo de medicamentos. En la última década, se han desarrollado varios procedimientos y aplicaciones con el fin de obtener dispositivos simples y portátiles para la detección de DNA. Los biosensores de DNA, también llamados **genosensores**, permiten la detección de los procesos de hibridación del DNA de una forma rápida, selectiva y sensible y, en muchos casos, es posible incluso reutilizarlos. Los **genosensores electroquímicos** son dispositivos capaces de proporcionar una señal analítica tras el proceso de hibridación del DNA. Combinan un agente de reconocimiento biológico selectivo (en este caso una hebra sencilla de DNA), que se inmoviliza en un transductor electroquímico, que confiere sensibilidad y que convierte el evento de reconocimiento en una señal medible [Lucarelli, 2004].

3. ANTECEDENTES

El genoma humano está sujeto a mutaciones durante el ciclo vital, debido a diversos tipos de cambios en el DNA. Algunas de las mutaciones afectan al fenotipo o a la salud pudiendo causar enfermedades como el cáncer y, por tanto, teniendo en cuenta el creciente número de casos diagnosticados en el mundo y el incremento de muertes debido a un diagnóstico tardío de la enfermedad, es importante entender los efectos de dichas mutaciones en el fenotipo **[Tothill, 2009]**.

El gen p53 es un supresor tumoral y uno de los factores de prescripción más importantes inducidos por el estrés, que desempeña un papel importante en apoptosis y control del ciclo celular, resultando esencial para inducir la respuesta de la célula ante el daño del DNA, deteniendo el ciclo celular en caso de mutación **[Němcová, 2010]**. Es un gen ubicuo, es decir, un gen que está presente en todos los tejidos y que codifica una proteína con el mismo nombre (p53). Se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17 y contiene un intrón muy grande (10 KB) situado entre los exones 1 y 2. A su vez, el exón 1 es siempre no-codificante. Se ha demostrado que esta región podría formar una estructura estable de lazo ("stem-loop") que une firmemente al alelo p53 silvestre pero no al alelo p53 mutante. Esta unión inhibe específicamente la traducción del mRNA p53 y podría proporcionar los medios para el control del nivel de la proteína p53 en la célula.

Un p53 defectuoso podría permitir que las células anormales proliferen dando por resultado la generación de un cáncer, de hecho, se ha encontrado con mutaciones en más del 50% de los casos de cáncer detectados en humanos **[Wang, 2009b]** y en muchos estudios se resalta la importancia de tener un pronóstico, ya que en muchas ocasiones es un factor crucial a la hora de determinar la respuesta del tumor a los tratamientos. En este sentido es importante mencionar que desde que el gen *TP53* mostró una pequeña diferencia de expresión entre los tejidos cancerosos y los sanos, es mucho más relevante que existan plataformas de DNA capaces de detectar mutación del gen en vez de la variación en la expresión genética **[Xie, 2004]**.

Muchas de las regiones del gen p53 han sido estudiadas empleando técnicas basadas en PCR o fluorescencia, secuenciación con tecnología microarray y ensayos inmunoenzimáticos. Estos métodos requieren tiempos largos de análisis y no proporcionan una buena sensibilidad **[Wang, 2011]**, además, requieren la utilización de equipos caros y personal altamente cualificado y, aun así, solo es posible

obtener la medida de TP53 total. Por ello, son muchos los esfuerzos realizados en el desarrollo de métodos rápidos y de bajo coste para la detección de mutaciones del gen p53 basados en biosensores y “chips” genéticos.

Como puede observarse en la **Tabla 3.5**, Altinta y colaboradores emplearon métodos piezoeléctricos **[Altinta, 2012]** alcanzando límites de detección del orden de 0.03 μM . Por otro lado, Wang y colaboradores emplean métodos ópticos y electroquímicos pudiendo llegar a detectar concentraciones del orden de los picomoles y obteniendo un rango lineal más amplio **[Wang, 2011]**. Dentro de los métodos electroquímicos cabe destacar que los mejores límites de detección (orden de femtomolar) se alcanzaron con biosensores en los que se emplearon nanomateriales de carbono como los MWCNTs en la superficie electródica **[Wang, 2013b]**, **[Fayazfar, 2014]**.

Mediante el empleo de MBs, se pueden realizar estudios en un tiempo de poco más de una hora **[Němcová, 2010]**, mientras que formando nanoláminas sobre un electrodo tiolado, Paleček y colaboradores desarrollaron un genosensor con el que podía llevar a cabo las medidas en tan solo 50 minutos y alcanzando unos límites de detección del orden de los picomoles **[Paleček, 2014]**.

De todos los estudios encontrados para la detección del gen p53, ninguno ha sido aplicado a la determinación del mismo en muestras reales, siendo uno de los objetivos propuestos en la realización del presente trabajo.

Tabla 3.5. Biosensores electroquímicos para el estudio del gen p53

Metodología	Técnica	Intervalo lineal	LD	Tiempo de ensayo*	Referencia
Genosensor basado en el empleo de electrodos de Au modificados con AuNPs y una sonda tiolada de DNA	DPV (0.0 – -0.6 V)	1 – 1000 nM	0.8 nM	14 h 15 min	[Luo, 2013]
Determinación simultánea de las proteína p53 silvestre y total, con un chip de SPR de doble canal, modificado con una doble hebra de DNA y un Ab monoclonal	SPR	—	10.6 pM y 1.06 pM	~7 h	[Wang, 2009b]
Plataforma de detección electroquimiluminiscente de estado sólido, basada en enzimas	ECL y CV (0.0 – 1.2 V)	0.2 – 200 pM	0.1 pM	2 días 9 h	[Wang, 2011]
Ensayo de DNA para la detección de una mutación en el gen <i>TP53</i> basado en la inmovilización de NeutrAvidin, mediante una unión amina, sobre una superficie tiolada, para capturar la sonda diana biotinilada	SPR y QCM	0.03 – 2 μ M	0.03 μ M	~13 h	[Altintas, 2012]
Biosensor electroquímico basado en nanofibras de MWCNTs funcionalizados con PA6 y PPy	DPV (-0.1 – -0.70 V)	0.1 – 100 pM	50 fM	140 min	[Wang, 2013b]
Captura de los complejos de DNA-p53 en MBs a través de anti-p53, seguido por la disociación, inducida por sal, de DNA lineal a partir de dicho complejo	ACV (-0.6 V, 230 Hz)	—	—	100 min	[Němcová, 2010]
Formación sobre electrodos modificados con tiol, de nanoláminas de compuestos p53-DNA con secuencia específica	CPS	—	picomoles	50 min	[Paleček, 2014]
Crecimiento electroquímico de AuNPs sobre MWCNTs alineados	EIS	1 fM – 0.1 μ M	0.01 fM	~15 h	[Fayazfar, 2014]

Tabla 3.5. Biosensores electroquímicos para el estudio del gen p53 (continuación)

Metodología	Técnica	Intervalo lineal	LD	Tiempo de ensayo*	Referencia
Biosensor electroquímico de DNA basado en MIP	CV	0.01 – 300 fM	0.62 μ A/fM	160 min	[Tiwari, 2012]
Biosensor electroquímico basado en un electrodo modificado con una sonda peptídica y preparado mediante la formación de monocapas autoensambladas de moléculas de PNA tioladas sobre electrodos de Au	DPV	0.001 – 0.010 μ M	682 pM	~12 h	[Raof, 2011]
Sensor electroquímico de la hibridación de DNA basado en la detección de marcadores enzimáticos enlazados a la sonda	CV	—	—	~6 h	[Gupta, 2011]
Genosensor electroquímico “Off-on” basado en la inmovilización de sonda de DNA tipo horquilla en electrodos de Au mediante una unión alcanotiol y marcaje con una sonda redox de azul de metileno	CV y DPV	1 – 80 nM	—	~1 día 4 h	[Farjami, 2011]
Inmunosensor tipo sándwich basado en el empleo de SPCE desechables consistentes en la modificación del electrodo de trabajo con grafeno-chitosan	CV y DPV	0.2 – 10 ng/mL	0.1 ng/mL	~4 h	[Xie, 2011]
Ensayo con estreptavidina marcada para la detección sensible y específica de una única mutación en <i>TP53</i>	SPR	—	40 pM	~3 h	[Šípova, 2011]

* Incluye la preparación del inmunoensayo y las medidas finales

Abreviaturas utilizadas: **ACV:** Voltamperometría de corriente alterna; **AuNPs:** Nanopartículas de Au; **CPS:** Redisolución cronopotenciométrico de corriente constante; **CV:** Voltamperometría cíclica; **DNA:** Ácido desoxirribonucleico; **DPV:** Voltamperometría diferencial de pulso; **ECL:** Electroquimioluminiscencia; **EIS:** Espectroscopia de impedancia electroquímica; **MBs:** Partículas magnéticas; **MIP:** Polímero de impresión molecular; **MWCNTs:** Nanotubos de carbono de pared múltiple; **PA6:** nailon 6; **PNA:** Ácido nucleico peptídico, **PPy:** Polipirrol; **QCM:** Microbalanza de cristal de cuarzo; **SPCE:** Electrodo de carbono serigrafiado; **SPR:** Resonancia de plasmón superficial.

4

PARTE EXPERIMENTAL

4.1. INSTRUMENTACIÓN

4.1.1. APARATOS

El estudio de la morfología de los materiales diseñados, así como de las distintas superficies electródicas se ha realizado mediante las siguientes técnicas:

- Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (**FE-SEM**) utilizando un microscopio JSM-6335F (JEOL Ltd., Japón),
- Microscopía de transmisión electrónica (**TEM**) empleando un microscopio JEM-2100 (JEOL Ltd., Japón),
- Microscopía de transmisión electrónica de alta resolución (**HR-TEM**) empleando un microscopio JEM-3000F (JEOL Ltd., Japón)
- Microscopía de fuerza atómica (**AFM**) utilizando un microscopio AFM multimode Nanoscope III A (Bruker)

El estudio estructural y composicional de los materiales objeto de este trabajo se llevaron cabo mediante:

- Difracción de rayos X (**XRD**) empleando un difractor X'Pert MRD (PANalytical B.V.).
- Análisis termogravimétrico (**TG/DTG**) empleando un instrumento modelo SDT-Q600 (TA Instruments, USA).
- Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (**FTIR**) empleando un espectrómetro FTIR Nicolet Nexus 670/870 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).
- Espectroscopia Raman empleando un espectrómetro Jobin Ivon HR460 (HORIBA scientific Ltd.).

La caracterización electroquímica de las superficies electródicas modificadas con los materiales sintetizados se llevó a cabo empleando las siguientes técnicas:

- Voltamperometría cíclica (**CV**) llevada a cabo empleando un potenciostato μ Autolab tipo III controlado por el software GPES 4.9 (Metrohm Autolab B.V., Holanda).
- Espectroscopia de impedancia electroquímica (**EIS**) realizada empleando un potenciostato μ Autolab tipo III controlado por el software FRA2 (Metrohm Autolab B.V., Holanda) (**Figura 4.1**).

4. PARTE EXPERIMENTAL



Figura 4.1: Potenciostato μ Autolab tipo III empleado para realizar las medidas de CV y EIS.

Las medidas amperométricas se han realizado empleando:

Un potenciostato de InBea Biosensores S.L. controlado por el software IbGraph 6.0 y un agitador magnético Microstirrer (VELP), para las medidas en disoluciones agitadas (**Figura 4.2**).

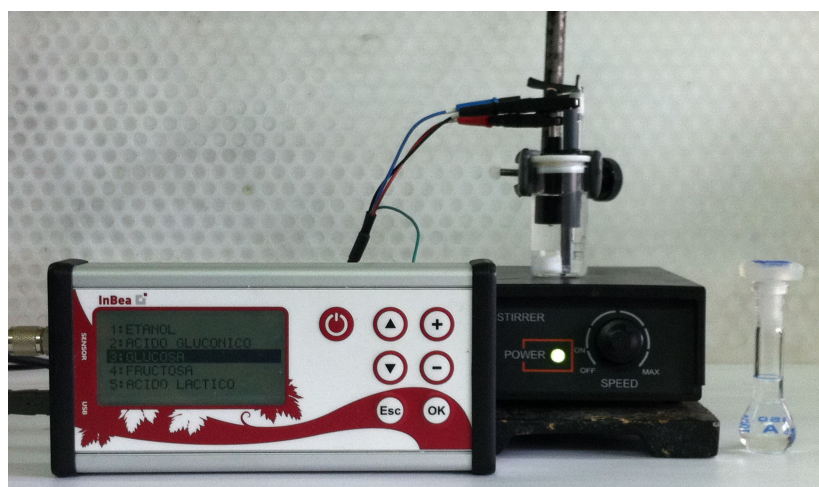


Figura 4.2: Potenciostato de InBea Biosensores S.L. y agitador magnético Microstirrer (VELP).

Un potenciostato ECO Chemie Autolab PGSTAT 101 (**Figura 4.3**) controlado mediante el software NOVA 1.7, para las medidas en gota sobre electrodos serigrafados. Como interfase entre los electrodos serigrafados de carbono (SPCEs) y el potenciostato se ha utilizado un cable conector específico DRP-CAC (Dropsens, S.L.).

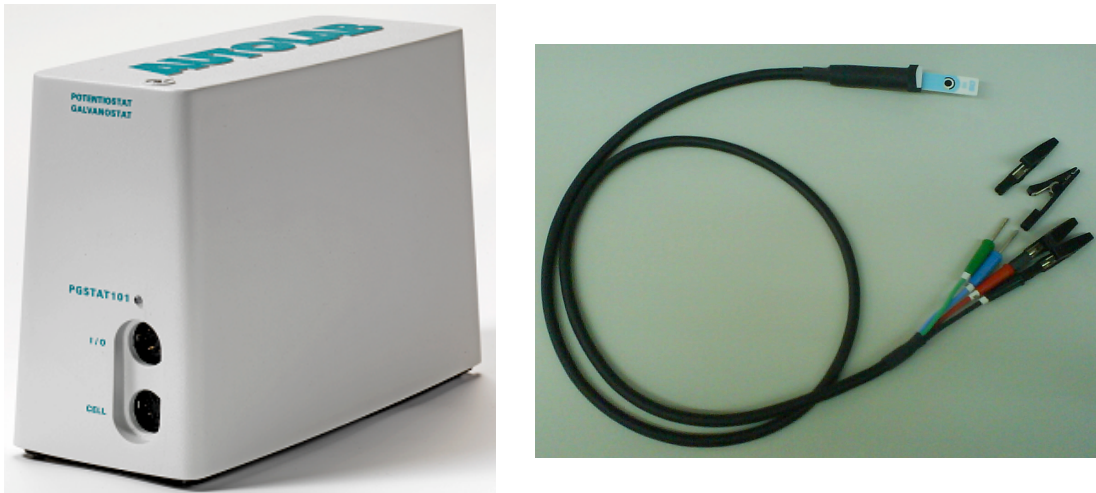


Figura 4.3: ECO Chemie Autolab PGSTAT 101 y cable conector específico DRP-CAC empleados en la realización de las medidas amperométricas con SPCEs

Para la extracción de RNA y la síntesis de cDNA se han empleado:

- Autoclave Trade (Raypa®) para la esterilización del material empleado.
- Cabina de seguridad microbiológica modelo AH-100 (Telstar biostar) para la manipulación de compuestos biológicos.
- Centrífuga refrigerada 1-15K (Sigma).
- Incubadora CO₂ infrarrojo (Forma Scientific)
- Calentador analógico SBH 130 (Stuart)

Para la validación mediante el método de Folin–Ciocalteu, se empleó un espectrofotómetro de absorción UV visible Varian Cary-3 Bio y cubetas de cuarzo de 1.0 cm de paso óptico

Para la cuantificación de RNA extraído de las líneas celulares se empleó un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc.).

Otros aparatos e instrumentos utilizados han sido:

- Balanza analítica (Sartorius) con una precisión de 0.0001 g para realizar las distintas pesadas de este trabajo.
- Baño de ultrasonidos P-Selecta (Scharlau) para homogeneizar y dispersar las suspensiones.
- Rotavapor® R-210 (Buchi) para la eliminación de disolventes volátiles en las distintas síntesis realizadas.
- Centrífuga MPW-65R para lavar los materiales sintetizados y separarlos de los disolventes poco volátiles.

4. PARTE EXPERIMENTAL

- Agitador Vortex AGT-9 (Bunsen) para homogeneizar las disoluciones con contenido biológico.
- Dispositivo Salivette (Sarstedt) para la recolección de muestras de saliva
- pH-metro de precisión Metrohm E-510 calibrado de forma usual con disoluciones reguladoras de pH 4.01, 7.02 y 9.00.
- Lámpara incandescente con filamento de wolframio.
- Membrana de diálisis SnakeSkin, 10000 MWCO (THERMO Scientific, USA) para la purificación de la carboximetilcelulosa.
- Papel de filtro PTFE con un tamaño de poro de 0.4 μm .

4.1.2. ELECTRODOS

Para realizar los estudios electroquímicos de los biosensores desarrollados se ha utilizado un sistema convencional de tres electrodos, en el que se ha utilizado un electrodo de carbono vitrificado (GCE, \varnothing 3.0 mm, CH Instruments Inc.) como electrodo de trabajo, un electrodo de Ag/AgCl/KCl (3 M, BAS MF 2063) como electrodo de referencia e hilo de platino como electrodo auxiliar (**Figura 4.4**).

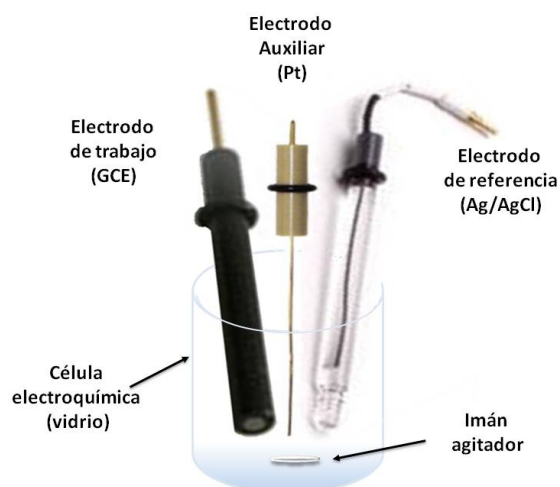


Figura 4.4: Sistema convencional de 3 electrodos (trabajo, referencia y auxiliar) empleado en las medidas electroquímicas.

En el caso del genosensor, se utilizan electrodos de trabajo SPCEs (DRP-110, 3.4 x 1.0 x 0.05 cm, \varnothing = 4 mm, A= 12.56 mm², Dropsens, S.L.). Cada tira incluye, además del electrodo de trabajo, un electrodo auxiliar de carbono y un electrodo de pseudoreferencia de Ag (**Figura 4.5**).

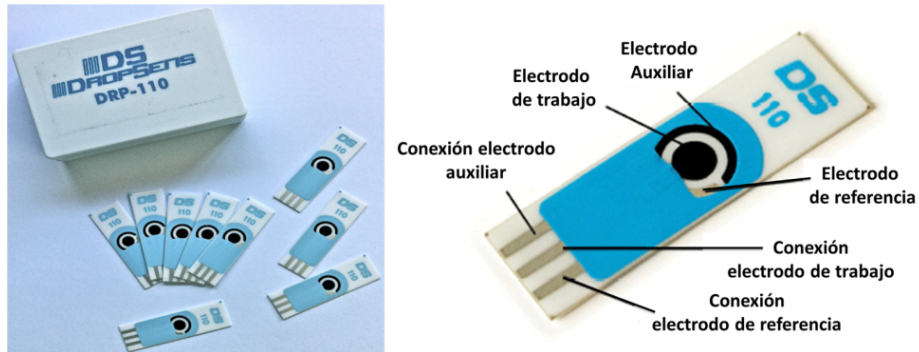


Figura 4.5: Electrodo serigrafados de carbono (SPCEs)

4.2. REACTIVOS

Todos los reactivos y disolventes empleados son de calidad para análisis. El agua empleada en todos los casos ha sido obtenida mediante procesos de purificación en un sistema Millipore Milli-Ro.

Reactivos empleados en la síntesis de los materiales híbridos

- Óxido de grafeno (**GO**, Nanolnova Technologies)
- Nanotubos de carbono de pared sencilla (**SWCNTs**, $\varnothing=2$ nm, longitud=5-10 μ m, WAKO)
- Aminopropiltrimetoxisilano (**APTES**, 99%, Sigma-Aldrich)
- (3-Glicidiloxipropil)trimetoxisilano (**GPTMS**, Sigma-Aldrich)
- Dendrímero de poliamidoamina con núcleo de etilendiamina de cuarta generación (**PAMAM G-4**, Dendritch, Inc.)
- Dendrímero de poliamidoamina con núcleo de cisteamina de cuarta generación (**PAMAM G-4 S-S**, Sigma-Aldrich)
- Sal sódica de carboximetilcelulosa de baja viscosidad (**CMC**, MW=2.96 \cdot 10⁴ Dalton, grado de sustitución 0.7, BDH)
- Peryodato sódico (**NaIO₄**, Sigma Aldrich)
- Etilenglicol (**C₂H₆O₂**, Merck)
- Etanol (**C₂H₆O**, 96% v/v, Panreac)
- 4-aminotiofenol (**4-ATF**, Sigma-Aldrich)
- Dodecilsulfato sódico (**SDS**, Fluka)
- Dimetilformamida (**DMF**, 0.01 %, Panreac)

4. PARTE EXPERIMENTAL

Reactivos empleados para la formación de nanopartículas metálicas

- Nanopartículas de Oro (**AuNPs**, $\varnothing=20$ nm, Sigma-Aldrich)
- Ácido hexacloroplatínico hexahidratado (**H₂PtCl₆ · 6H₂O**, Sigma-Aldrich)
- Borohidruro sódico (**NaBH₄**, >96%, Sigma-Aldrich)

Enzimas y conjugados enzimáticos

- Tirosinasa de champiñón (**Tyr**, 5370 U/mg, Sigma-Aldrich)
- Glucosa Oxidasa de *Aspergillus niger* Tipo X (**GOx**, 174 KU/mg, Sigma-Aldrich)
- Peroxidasa de rábano (**HRP**, 173 U/mg, Sigma-Aldrich)
- Conjugado enzimático estreptavidina-Peroxidasa (**Strep-HRP**, 500 U/mL, Roche)

Reactivos empleados para llevar a cabo las medidas electroquímicas

- D-(+)-Glucosa anhidra (**C₆H₁₂O₆**, Panreac)
- Catecol (**C₆H₄(OH)₂**, 99%, Sigma-Aldrich)
- Peróxido de hidrógeno (**H₂O₂**, 30% (w/w), Sigma-Aldrich)
- Disolución comercial de TMB-H₂O₂ K-Blue (**TMB**, Neogen).
- Hexacianoferrato (III) de potasio trihidratado (**K₃Fe(CN)₆**, 99.4%, Sigma-Aldrich)
- Hexacianoferrato (II) de potasio trihidratado (**K₄Fe(CN)₆**, 98.5-102,0%, Sigma-Aldrich)
- Cloruro de potasio (**KCl**, Scharlau)
- Dihidrógeno fosfato de sodio anhidro (**NaH₂PO₄**, Scharlau)
- Hidrógeno fosfato de sodio anhidro (**Na₂HPO₄**, Scharlau)
- Ácido 2-morfolinoetanosulfónico, (**MES**, Gerbu)
- Cloruro sódico (**NaCl**, Scharlau)

Sondas de DNA

- Sonda de captura de DNA de 33 bases en forma de horquilla (**lcpp53**): modificada con biotina en el extremo 5' y con un grupo amino (un modificador 3'-amino-C7) en el extremo 3' (secuencia de 20 bases) 5'-[Btn]GAG GTC ATG GTG GGG GCA GCG CCT CAC AAC CTC[AmC7]-3'.
- Sonda de captura de DNA de 20 bases en forma de horquilla truncada (**scpp53**): modificada con biotina en el extremo 5' y con un grupo amino (un modificador 3'-amino-C7) en el extremo 3' (secuencia de 20 bases) 5'-[Btn]GT TGT GCA GCG CCT CAC AAC[AmC7]-3'.

- Sonda diana de DNA de 28 bases (**TP53**) complementaria a la sonda de captura (secuencia de 28 bases) 5'-GAG GTT GTG AGG CGC TGC CCC CAC CAT G-3'.
- Sonda de DNA de 28 bases no complementaria (**1-mTP53**) a la sonda de captura (contiene una única mutación en el codón 175) 5'-GAG GTT GTG AGG CAC TGC CCC CAC CAT G-3'.

Reactivos empleados en el crecimiento celular y la extracción de RNA

- Medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)
- Medio de cultivo DMEM con alto contenido en glucosa (Ham's Nutrient Mixture F12 (1:1))
- Suero de bovino fetal (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
- Suero de caballo (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
- Penicilina (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
- Estreptomina (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
- L-glutamina (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
- Insulina humana (Sigma-Aldrich),
- Hidrocortisona (Sigma-Aldrich),
- Factor de crecimiento epidérmico (**EGF**), (QuadraTech Ltd).
- Toxina de cólera (QuadraTech Ltd).
- Reactivo Tri (Molecular Research Center, Inc.)

Reactivos empleados en el estudio de interferencias

- 3,4-dimetilfenol (Sigma-Aldrich)
- P-cresol (Sigma-Aldrich)
- M-cresol (Sigma-Aldrich)
- Fenol (Prolabo)
- Hidroquinona (Sigma-Aldrich)
- 4-Cloro-1-naftol (Sigma-Aldrich)
- Sacarosa (Sigma-Aldrich)
- Fructosa (Sigma-Aldrich)
- Ácido cítrico (Fluka)
- Ácido ascórbico (Fluka)
- Ácido úrico (Sigma-Aldrich)
- Cafeína (Sigma-Aldrich)

4. PARTE EXPERIMENTAL

Muestras

- Suero humano deficiente en progesterona (S7394, Sigma)
- Saliva humana (voluntarios del laboratorio)
- Bebida carbonatada azucarada (Pepsi®, contenido de azúcares de 106 g/L)
- Infusión de té verde con limón (Lipton)
- Infusión de menta (Lipton)
- Infusión de frutos rojos (Lipton)
- Kit enzimático colorimétrico de D-glucosa (Roche)

Otros reactivos

- Nitrito sódico (**NaNO₂**, Panreac)
- Ácido clorhídrico (**HCl**, LabKem)
- Glutaraldehído (25%, Sigma-Aldrich)
- Clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (**EDC**, Sigma-Aldrich)
- N-hidroxisuccinimida (**NHS**, Sigma-Aldrich)
- N-hidroxisulfosuccinimida (**sulfo-NHS**, Sigma-Aldrich)
- Caseína (Sigma-Aldrich)
- Polvo de alúmina Ø=0.3 µm (Metrohm)
- Caseína (Gerbu)
- Leche desnatada comercial UHT
- Reactivo de Folin & Ciocalteu, 2.0 N (Sigma)
- Carbonato sódico (**Na₂CO₃**, Scharlau)

4.3. DISOLUCIONES

Disoluciones empleadas en las síntesis de los materiales híbridos

Disolución de GPTMS al 1%: Se diluyen 250 µL del silano en 24.975 mL de etanol.

Disolución de APTES al 10%: Se diluyen 500 µL del silano en 49.5 mL de etanol.

Disolución de SDS al 0.1 % (p/v): Se disuelve 1 mg de SDS en 1 L de H₂O desionizada

Disoluciones reguladoras

Disolución reguladora de fosfato 1.0 M: se disuelven 8.4 g de Na₂HPO₄ y 112.9 g de NaH₂PO₄ en 1 L de agua desionizada.

Disolución reguladora de fosfato 10 mM (pH 5.0): se prepara por dilución de la disolución reguladora de fosfato 1.0 M ajustándose el pH con NaOH 2.0 M.

Disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 6.0): Se prepara por dilución de la disolución reguladora de fosfato 1.0 M ajustándose el pH con NaOH 2.0 M.

Disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 7.0): Se prepara por dilución de la disolución reguladora de fosfato 1.0 M, ajustándose el pH con NaOH 2.0 M.

Disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 7.5): Se prepara por dilución de la disolución reguladora de fosfato 1.0 M, ajustándose el pH con NaOH 2.0 M.

Disolución reguladora de fosfato salino (PBS) 10 mM (pH 7.2): Se prepara una disolución reguladora de fosfato 10 mM conteniendo NaCl 138 mM y KCl 2.7 mM.

Disolución reguladora de MES 25 mM (pH 5.0): Se disuelven 244 mg de MES en 25 mL de agua desionizada, ajustándose el pH con NaOH 2.0 M.

Disoluciones enzimáticas

Disolución de Tyr 10 mg/mL: Se pesa 1 mg de la enzima y se disuelven en 100 μ L de disolución reguladora de fosfato 0.1 M pH 6.0.

Disolución de GOx de 7.5 mg/mL: Se pesa 1 mg de la enzima y se disuelven en 130 μ L de disolución reguladora de fosfato 0.1 M pH 7.5.

Disolución de HRP de 0.5 mg/mL: Se pesa 1 mg de la enzima y se disuelven en 500 μ L de disolución reguladora de fosfato 0.1 M pH 6.5.

Disolución de Strep-HRP de 1:1000: Se diluye una parte del conjugado por cada 1000 de disolución reguladora PBS 10 mM (pH 7.2) conteniendo un 0.5% de caseína.

Disoluciones de las sondas de DNA

Todas las sondas fueron disueltas en agua libre de nucleasas para llevarlas a una concentración de 100 μ M y posteriormente alicuotadas en volúmenes más pequeños y almacenadas a -20 °C.

Disolución de scpp53: Se diluye el volumen deseado de la alícuota de 100 μ M en el volumen correspondiente de disolución reguladora MES 25 mM (pH 5.0).

Disolución de lcpp53: Se diluye el volumen deseado de la alícuota de 100 μ M en el volumen correspondiente de disolución reguladora MES 25 mM (pH 5.0).

Disolución de 1-mTP53: Se diluye el volumen deseado de la alícuota de 100 μ M en el volumen correspondiente de disolución reguladora PBS 10 mM (pH 7.2) y se adiciona caseína para que esté al 0.5%.

4. PARTE EXPERIMENTAL

Disolución de TP53: Se diluye el volumen deseado de la alícuota de 100 μM en el volumen correspondiente de disolución reguladora PBS 10 mM (pH 7.2) y se adiciona caseína para obtener una concentración final de 0.5%.

Disoluciones empleadas en las medidas electroquímicas

Disolución de catecol 1 M: Se disuelven 50 mg de catecol en 5 mL de agua desionizada.

Disolución de catecol 10 mM: Se prepara por dilución de la disolución de catecol 0.1 M.

Disolución de catecol 2 mM: Se disuelven 1.1 mg de catecol en 5 mL de agua desionizada.

Disolución de catecol 100 μM : Se prepara por dilución de la disolución de catecol 2 mM.

Disolución de glucosa 0.1 M: Se disuelven 90 mg de glucosa en 5 mL de agua desionizada.

Disolución de glucosa 10 mM: Se prepara por dilución de la disolución de glucosa 0.1 M.

Disolución de peróxido de hidrógeno 0.1 M: Se diluyen 51 μL de H_2O_2 en 10 mL de agua desionizada.

Disolución de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mM en KCl 0.1 M: Se pesan 16.5 mg de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 21 mg de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ y 74.4 mg de KCl y se disuelven en 10 mL de agua desionizada.

Disoluciones empleadas en los estudios de interferencias

Disolución de 3,4-xilenol 2 mM: Se disuelven 1.22 mg en 5 mL de agua desionizada.

Disolución de p-cresol 2 mM: Se disuelven 1.08 mg en 5 mL de agua desionizada.

Disolución de m-cresol 2 mM: Se disuelven 1.08 mg en 5 mL de agua desionizada.

Disolución de fenol 2 mM: Se disuelven 1.88 mg en 5 mL de agua desionizada.

Disolución de hidroquinona 2 mM: Se disuelven 1.10 mg en 5 mL de agua desionizada.

Disolución de 4-cloro-1-naftol 2 mM: Se disuelven 1.84 mg en 5 mL de agua desionizada.

Disolución de sacarosa 0.1 M: Se disuelven 171 mg del azúcar en 5 mL de agua desionizada.

Disolución de fructosa 0.1 M: Se disuelven 90 mg del azúcar en 5 mL de agua desionizada.

Disolución de ácido cítrico 0.1 M: Se disuelven 96.2 mg del ácido en 5 mL de agua desionizada.

Disolución de ácido ascórbico 0.1 M: Se disuelven 88 mg del ácido en 5 mL de agua desionizada.

Disolución de ácido úrico 0.1 M: Se disuelven 84 mg del ácido en 5 mL de agua desionizada.

Disolución de cafeína 0.1 M: Se disuelven 97 mg en 5 mL de agua desionizada.

Otras disoluciones

Disolución de $H_2PtO_6 \cdot 6H_2O$ 5 mM: Se disuelven 13 g en 5 mL de agua desionizada.

Disolución de $NaBH_4$: Se pesa 1 mg y se disuelve en 1 mL de agua desionizada.

Disolución de EDC/sulfo-NHS 50 mg/mL: Se disuelven 10 mg de EDC y 10 mg de sulfo-NHS en 400 μ L de MES 25 mM (pH 5.0).

Disolución del dendrímero PAMAM G-4-S-S: Se diluyen 10 μ L del dendrímero en 40 μ L de agua desionizada añadiendo una punta de espátula de $NaBH_4$

Disolución de $NaNO_2$ 0.2 mM: Se disuelven 13,8 mg de nitrito sódico en 1 mL de agua desionizada.

Disolución leche UHT 1:1: Se diluyen 100 μ L de leche en 100 μ L de disolución reguladora PBS 10 mM (pH 7.2).

Disolución carbonato sódico al 20% (w/v): se disuelven 10.0 g de la sal en 50 mL de agua ultrapura.

4.4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

4.4.1. PREPARACIÓN DE LOS MATERIALES HÍBRIDOS BASADOS EN GRAFENO Y POLÍMEROS

4.4.1.1. PREPARACIÓN DE PAMAM-Sil-rGO

Para llevar a cabo la silanización y funcionalización con grupos epóxido del óxido de grafeno, se dispersaron 50 mg del mismo en 250 mL de etanol durante 1h

4. PARTE EXPERIMENTAL

con ayuda de un baño de ultrasonidos. Pasado ese tiempo, se añadieron 25 mL de una disolución etanólica de (3-Glicidiloxipropil)trimetoxisilano (GPTMS) al 1% y la mezcla se agitó durante 12 h a una temperatura entre 60 y 65°C. Tras homogeneizar la dispersión resultante con el ultrasonidos, se añadió un exceso del dendrímero PAMAM-4G (2.5 mL) y la mezcla se agitó durante 12 h. Transcurrido el tiempo, se eliminó el etanol y el sólido obtenido se dejó secar a temperatura ambiente.

4.4.1.2. PREPARACIÓN DE CMCo_x-rGO

Para silanizar y funcionalizar con grupos amino el óxido de grafeno, se dispersaron 100 mg en 500 mL de EtOH durante 1h en un baño de ultrasonidos. Después, se adicionaron 50 mL de una disolución etanólica de aminopropiltrimetoxisilano (APTES) al 10% y se agitó la mezcla durante 12 h a una temperatura entre 60-65°C. Finalmente, se eliminó el disolvente, se lavó el producto con etanol y se dejó secar a temperatura ambiente.

Para llevar a cabo la oxidación de la CMC se disolvieron 500 mg del polímero en 100 mL de agua, se añadieron 540 mg de NaIO₄ y la mezcla se agitó durante 12 h en oscuridad. Posteriormente, se añadió 1 mL de etilenglicol y se mantuvo la agitación durante 1 h más. Tras dializar en ausencia de luz el polímero oxidado, se mezcló con el GO previamente silanizado y se dejó reaccionar durante 1 h bajo agitación constante. Después se añadieron 2.5 g de NaBH₄ y la mezcla de reacción se agitó durante 12 h. Transcurrido el tiempo se eliminó el disolvente, se lavó con una disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 6.0) y se dejó secar el producto obtenido.

4.4.1.3 PREPARACIÓN DE PAMAM-AuNPs-rGO

4.4.1.3.1. Método químico

El primer paso de esta síntesis consistió en la reducción química de óxido de grafeno, para lo que se dispersaron 100 mg del material de carbono en 100 mL de H₂O desionizada durante 15 minutos en un baño de ultrasonidos. Después, se añadieron 300 mg de NaBH₄ y se dejó reaccionar durante 3 h. Posteriormente, la mezcla se filtró y se lavó con H₂O desionizada. El GO obtenido se resuspendió en 100 mL de una disolución acuosa de SDS al 0.1 % (p/v).

La sal de diazonio se preparó mezclando 70 mg de 4-Aminotiofenol con 200 mg de NaNO₂ en 40 mL de H₂O desionizada a una temperatura entre 0 y 5 °C.

Seguidamente se adicionaron, gota a gota, 3 mL de una disolución de HCl 6 M, observándose un cambio gradual de coloración de incoloro a amarillo, lo que indicó la formación de la sal de diazonio. Posteriormente, la disolución de sal formada se adicionó, gota a gota y con agitación constante, sobre la suspensión de rGO a una temperatura comprendida entre 0 y 5 °C, y se dejó reaccionar durante 4h. Una vez transcurrido este tiempo, la mezcla se filtró, se lavó con H₂O desionizada y se resuspendió en DMF para eliminar los restos de SDS. Después, se lavó con EtOH para eliminar el DMF y el producto se dejó secar a temperatura ambiente.

Una vez seco el producto obtenido, se dispersó en 800 mL de H₂O desionizada y se añadieron 200 mg de NaBH₄, dejando agitar la reacción durante 1 h a temperatura ambiente para una completa reducción de los grupos tiol. Después se adicionaron 40 mL de AuNPs y se dejó reaccionar durante 1 h, lavando la mezcla final con H₂O desionizada una vez transcurrida la reacción. Finalmente se adicionaron 5 mL de PAMAM G-4 dejando que se produzca la reacción durante 30 minutos y lavando después el producto final con abundante H₂O desionizada y centrifugación para eliminar bien todos los restos de dendrímero.

4.4.1.3.2. Método electroquímico

El material por vía electroquímica se preparó directamente sobre el electrodo de carbono vitrificado, siguiendo los pasos descritos en el **apartado 4.4.4.5.2**.

4.4.2. PRETRATAMIENTO Y LIMPIEZA DE LOS ELECTRODOS DE CARBONO VITRIFICADO

Antes de llevar a cabo la modificación de la superficie electródica es necesario aplicar un pretratamiento de limpieza para asegurar que se tiene una superficie completamente limpia y reproducible. Para ello, se pulió el electrodo sobre una suspensión de polvo de alúmina de 0.3 µm durante 1 minuto, seguidamente se lavó con agua desionizada y se sumergió en un baño de ultrasonidos con agua desionizada durante 1 minuto, sucesivamente con etanol otro minuto, uno más con acetona y nuevamente con H₂O desionizada. Finalmente se secó la superficie del electrodo pasando una corriente de N₂.

4.4.3. REDUCCIÓN ELECTROQUÍMICA DEL ÓXIDO DE GRAFENO

Para reducir el GO electroquímicamente y que la superficie sea más conductora, se sumergió el electrodo de trabajo modificado con el nanomaterial de carbono, junto con el electrodo auxiliar y el de referencia, en una disolución reguladora de fosfato 10 mM pH 5.0 y se aplicaron 20 ciclos de voltamperometría cíclica entre 0.0 y -1.5 V a una velocidad de barrido de 100 mV/s [Jiang, 2012]. Finalmente se lavó el electrodo de trabajo con H₂O desionizada.

4.4.4. PREPARACIÓN DE ELECTRODOS NANOESTRUCTURADOS CON LOS MATERIALES HÍBRIDOS DE GRAFENO Y POLÍMEROS

4.4.4.1. ELECTRODO DE CARBONO MODIFICADO CON Tyr/CMCox-rGO PARA LA DETECCIÓN DE CATECOL

Sobre la superficie de un GCE previamente tratada según el procedimiento descrito en el **apartado 4.4.2.**, se depositaron 20 μ L de una dispersión acuosa de CMCox-rGO 0.5 mg/mL dejando que se secase bajo una lámpara incandescente. Una vez seco se procedió a la reducción electroquímica del GO tal y como se describe en el **apartado 4.4.3.**

Una vez reducido el material, se procedió a inmovilizar la enzima sobre el electrodo modificado, depositando 5 μ L de una disolución de tirosinasa 10 mg/mL y mezclándola con 5 μ L de una disolución de EDC/NHS 2 mg/mL. El electrodo se dejó incubar 12 horas a 4 °C y después se lavó sumergiéndolo en disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 6.0). El electrodo preparado se almacenó a 4 °C hasta su utilización.

4.4.4.2. ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE CARBONO MODIFICADOS CON cpp53/CMCox-rGO PARA LA DETECCIÓN DEL GEN p53

Con el objetivo de funcionalizar los SPCEs con el nanomaterial híbrido CMCox-rGO, se depositó sobre la superficie del electrodo de trabajo una alícuota de 10 μ L de una dispersión acuosa de CMCox-rGO 0.5 mg/mL y se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seca dicha superficie, para activar los grupos -COOH, se

depositó sobre ella una gota de 10 μL de mezcla EDC/sulfo-NHS 50 mg /mL y se dejó reaccionar durante 30 minutos, se lavó con disolución reguladora MES y se secó bajo una corriente de N_2 .

Para la inmovilización covalente de la sonda de captura (cp), se depositó en los electrodos activados una gota de 10 μL de una disolución de la correspondiente sonda de captura preparada en disolución reguladora MES con una concentración de 0.01 μM en el caso de la scpp53 y de 10 μM en el de la lcpp53 y se dejó incubar durante 30 minutos. Seguidamente, se lavó el electrodo modificado con disolución reguladora PBS (pH 7.2) para eliminar el DNA no inmovilizado y se secó bajo una corriente de N_2

Posteriormente, los grupos activados que no han reaccionado se bloquearon depositando sobre el electrodo de trabajo 10 μL de una disolución de leche UHT diluida 1:1 en disolución reguladora PBS (pH 7.2) e incubándolo durante 30 minutos. Tras lavar el electrodo con disolución reguladora PBS (pH 7.2) y secar bajo una corriente de N_2 , se llevó a cabo el proceso de hibridación incubando el SPCE modificado con la sonda de captura correspondiente, con 10 μL de una disolución de la muestra a estudiar (sonda diana TP53 en disolución reguladora PBS conteniendo un 0.5% de caseína, muestras biológicas o cDNA diluido) durante 30 minutos para los electrodos modificados con la scpp53 y 15 minutos para los modificados con lcpp53. Tras otro paso de lavado con disolución reguladora PBS (pH 7.2) y secado bajo una corriente de N_2 se depositaron 10 μL de una disolución del conjugado enzimático Strep-HRP (1:1000 preparada también en disolución reguladora PBS con un 0.5% de caseína) y se incubó durante 30 minutos.

Finalmente, los electrodos modificados se lavaron con disolución reguladora fosfato 0.1 M (pH 7.0) y se secaron bajo una corriente de nitrógeno antes de realizar las medidas electroquímicas.

Todos los pasos de incubación se realizaron a temperatura ambiente y en atmósfera húmeda con el propósito de evitar la evaporación de las gotas depositadas en el electrodo de trabajo.

4.4.4.3. ELECTRODO DE CARBONO MODIFICADO CON Tyr/PAMAM-Sil-rGO PARA LA DETECCIÓN DE CATECOL

La modificación del GCE se realizó depositando sobre la superficie, previamente tratada según el **apartado 4.4.2.**, 20 μL de una dispersión de rGO-PAMAM de 0.5

4. PARTE EXPERIMENTAL

mg/mL en H₂O desionizada, y se dejó secar bajo una lámpara incandescente. Una vez seca la superficie, se redujo el óxido de grafeno electroquímicamente como se describe en el **apartado 4.4.3.**

Sobre la superficie del GCE modificada con el material híbrido de grafeno, se depositaron 16 µL de una disolución de Tyr de 10 mg/mL y 4 µL de glutaraldehído al 25%, dejando incubar la mezcla durante 1 hora a 4°C. Finalmente, se lavó el electrodo sumergiéndolo en disolución reguladora de fosfato 0.1M (pH 6.0) y se almacenó a 4°C en atmósfera húmeda hasta su posterior utilización.

4.4.4.4. ELECTRODO DE CARBONO MODIFICADO CON GO_x/PtNPs/PAMAM-Sil-rGO PARA LA DETECCIÓN DE GLUCOSA

La modificación del GCE se realizó depositando sobre la superficie, previamente tratada según el **apartado 4.4.2.**, 20 µL de una dispersión de rGO-PAMAM de 0.5 mg/mL en H₂O desionizada, y se dejó secar bajo una lámpara incandescente. Una vez seca la superficie, se redujo el óxido de grafeno electroquímicamente como se describe en el **apartado 4.4.3.**

Sobre la superficie del electrodo se depositaron 20 µL de una disolución de H₂PtCl₆ · 6 H₂O 5 mM y se dejó reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 5 µL de una disolución de NaBH₄ 1 mg/mL y se dejó reaccionar nuevamente, durante otros 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se lavó el electrodo sumergiéndolo en agua desionizada y se procedió la inmovilización de la enzima, para lo cual se depositaron 16 µL de una disolución de GO_x de 7.5 mg/mL y 4 µL de glutaraldehído al 25% y la mezcla se dejó incubar durante 90 minutos a 4°C. Finalmente, se lavó el electrodo sumergiéndolo en una disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 7.5). El electrodo modificado se conservó sumergido en disolución reguladora fosfato 0.1 M (pH 7.5), a 4 °C hasta su posterior utilización.

4.4.4.5. ELECTRODO DE CARBONO MODIFICADO CON HRP/PAMAM-AuNPs-rGO PARA LA DETECCIÓN DE CATECOL

4.4.4.5.1. *Modificación del electrodo con el material obtenido mediante el método químico*

Sobre la superficie limpia del GCE se depositaron 20 μL de una dispersión acuosa del material PAMAM-AuNPs-rGO preparado previamente como se describe en el **apartado 4.4.1.3.1**. Tras dejar secar el material sobre la superficie electródica, se procedió a inmovilizar la enzima peroxidasa (HRP) mediante entrecruzamiento con glutaraldehído, para lo que se depositaron 12 μL de una disolución de HRP 0.5 mg/mL y 3 μL del entrecruzante al 25% en la superficie del electrodo. Tras un periodo de incubación de 90 minutos se lavó el electrodo con disolución reguladora fosfato 0.1 M (pH 6.5) y se almacenó el electrodo a 4 °C hasta su posterior utilización.

4.4.4.5.2. *Método electroquímico*

Una vez limpia la superficie del GCE (**Apartado 4.4.2.**), se depositaron 20 μL de una dispersión acuosa de GO 0.5 mg/mL y se dejó secar bajo una lámpara incandescente. Posteriormente, éste se redujo electroquímicamente (**Apartado 4.4.3.**) y se procedió a realizar la reacción de diazotación del *p*-aminotiofenol (4-ATF) con NaNO_2 en medio HCl, e injertado (*grafting*) electroquímico. Para ello se disolvieron 20 mg de 4-ATF en 2 mL de HCl 1 M enfriando en un baño de hielo. Seguidamente, se preparó la sal de diazonio adicionando gota a gota 380 μL de NaNO_2 0.2 mM, con agitación constante en un baño de hielo. A continuación, el electrodo modificado se sumergió en la célula electroquímica conteniendo 500 μL de la sal de diazonio formada y se realizaron 10 ciclos en voltamperometría cíclica entre 0.0 y -1.0 V, a 200 mV/s. Finalmente, se lavó el electrodo modificado con abundante H_2O desionizada y se dejó secar al aire.

Una vez seca la superficie electródica, se depositaron 10 μL de una disolución comercial de nanopartículas de Au y se dejó reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar el electrodo con H_2O desionizada, se dejó secar al aire para después depositar 10 μL de una disolución de dendrímero PAMAM G-4-S-S al 5% (p/v) y se dejó reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez más, se lavó el electrodo con agua y se dejó secar al aire para proceder a la inmovilización de la enzima HRP. La inmovilización se llevó a cabo mediante

4. PARTE EXPERIMENTAL

entrecruzamiento con glutaraldehído depositando 12 μL de una disolución de HRP 0.5 mg/mL y 3 μL del entrecruzante al 25%. Tras un periodo de incubación de 90 minutos se lavó el electrodo con disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 6.5) y se almacenó a 4 °C hasta su posterior utilización.

4.4.5. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS MATERIALES HÍBRIDOS DE GRAFENO Y LAS SUPERFICIES ELECTRÓDICAS

4.4.5.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE EMISIÓN DE CAMPO

La microscopía electrónica de barrido permite determinar de manera directa el tamaño de partícula o de grano de la muestra y analizar la microestructura de un material. En esta microscopía, un haz de electrones se enfoca sobre la muestra y barre una pequeña área rectangular de la misma. Los electrones que conforman el haz interactúan con la muestra produciendo electrones secundarios, corrientes internas, emisión de fotones, etc., que son apropiadamente detectados y utilizados para generar una imagen de la zona que barre el haz. Los electrones redispersados y los secundarios son los que constituyen las señales de más interés de esta técnica, ya que dependiendo de las diferencias topográficas de la superficie, el haz de electrones que incide sobre la muestra dará lugar a distintas intensidades de los mismos.

Para el estudio de la morfología de los materiales diseñados, así como de las distintas superficies electródicas, se ha utilizado un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (modelo JSM-6335F) provisto de un cañón de electrones de cátodo frío de emisión de campo y de un detector de electrones secundarios que cuenta con una resolución de 1.5 nm a 15 kV y de 5.0 nm a 1 kV (a 4 mm de distancia de trabajo), lo que permite una variación en el voltaje de aceleración de 0.5 a 30kV y una amplificación de 10 X a 500.000 X (trabajando a una distancia de 39 mm). En este trabajo, el voltaje empleado para las muestras fue de 10 kV excepto en la muestras de rGO-PAMAM-PtNPs para las que el voltaje fue 5 kV.

Las muestras a analizar se dispersaron en agua y una vez homogéneas, se depositaron unas gotas con ayuda de una pipeta sobre una superficie de carbono

y se dejaron secar. Posteriormente, se sometieron a un proceso de metalización para obtener una superficie conductora, llevado a cabo mediante evaporación y deposición a vacío de una capa de oro a una intensidad de corriente de 20 mA y durante 1 min, suficiente para eliminar los efectos de carga durante la observación.

4.4.5.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

La microscopía electrónica de transmisión se basa en un haz de electrones que manejado a través de lentes electromagnéticas, se proyecta sobre una muestra muy delgada situada en una columna de alto vacío de modo que, una parte de los electrones rebotan o son absorbidos por la muestra y otros la atraviesan. Se obtiene información estructural específica de la muestra según las pérdidas específicas de los diferentes electrones del haz. El conjunto de electrones que atraviesan la muestra son proyectados sobre una pantalla fluorescente formando una imagen visible o sobre una placa fotográfica registrando una imagen latente.

El estudio de los materiales empleando TEM se realizó en un microscopio electrónico JEM 2100 con un cañón de electrones termiónico de LaB₆, un voltaje de aceleración de 200 kV, una resolución entre puntos de 0.25 nm y un goniómetro de inclinación sencilla ± 42 . Las imágenes se adquirieron digitalmente con una cámara CDD ORIUS SC1000 (modelo 832).

Las muestras para realizar el análisis, se dispersaron en agua empleando un baño de ultrasonidos. Una gota de dicha suspensión fue depositada y evaporada en una rejilla de cobre recubierta con una capa de carbono.

4.4.5.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE ALTA RESOLUCIÓN

La microscopía electrónica de transmisión de alta resolución es un modo de trabajo de TEM que permite la formación de imágenes de la estructura cristalográfica de una muestra en una escala atómica.

Los estudios realizados empleando HR-TEM se llevaron a cabo con un microscopio electrónico JEM-3000F con un cañón de emisión de campo (FEG) tipo Schottky, un voltaje de aceleración de 300 kV, una resolución entre puntos de 0.17 nm en modo TEM, una aberración esférica $C_s=0.6$ nm y con un goniómetro que permite una inclinación de la muestra de $\pm 25^\circ$. La adquisición digital de las imágenes se realizó con una cámara CCD de multibarrido.

4. PARTE EXPERIMENTAL

Las muestras para realizar el análisis, se dispersaron en agua empleando un baño de ultrasonidos. Una gota de dicha suspensión fue depositada y evaporada en una rejilla de cobre recubierta con una capa de carbono.

La difracción de electrones del área seleccionada (SAED) se llevó a cabo en un microscopio electrónico JEM 2000FX con un voltaje de aceleración de 200 kV y una resolución entre puntos de 0.31 nm. Este microscopio está dotado de un portamuestras de doble inclinación que permite giros de $\pm 45^\circ$ en ambas direcciones y un sistema de microanálisis por dispersión de energía de rayos X (XEDS) OXFORD INCA.

4.4.5.4 MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA

La microscopía de fuerza atómica es una técnica de imagen del espacio real que puede producir imágenes topográficas de una superficie con resolución atómica en tres dimensiones, independientemente de las propiedades ópticas de la superficie de estudio. El principio de esta técnica consiste en la exploración de un área de la muestra con una punta afilada, casi a nivel atómico, generando entre ambas un campo electromagnético. El campo sufre alteraciones conforme a las variaciones de rugosidad de la superficie muestreada. Las variaciones electromagnéticas ocasionadas generan una información de corriente eléctrica que, debidamente tratada, reconstruye la imagen de la superficie observada.

El microscopio AFM multimode Nanoscope III A utilizado, está equipado con una punta TESP-SS de silicón y un radio de 2 a 5 nm, con un cantilever rectangular de 4 μm de grosor. Los estudios se han realizado en modo *tapping* a temperatura ambiente en aire, adquiriéndose los datos correspondientes con el software Nanoscope Control 5.30. Las imágenes fueron procesadas con el software Gwyddion 2.25.

La preparación de la muestra se realiza dispersando el material en agua con ayuda de un baño de ultrasonidos, después, sobre una superficie de mica previamente exfoliada con papel adhesivo, se depositan unas gotas de la suspensión mediante *spin-coating* a 1600 rpm.

4.4.5.5 DIFRACCIÓN DE RAYOS X

La identificación de las distintas fases cristalinas presentes en las muestras, se realizó mediante difracción de rayos X (XRD) a temperatura ambiente.

Esta técnica se basa en la reflexión de las ondas electromagnéticas incidentes por planos sucesivos de átomos en un cristal. Al incidir un haz de rayos X según un ángulo θ , parte de la radiación difracta constructivamente. La condición de reflexión establecida por W.H. Bragg y W.L. Bragg [Jenkins, 1996] indica que la diferencia de caminos recorridos es un múltiplo entero de la longitud de onda según la siguiente ecuación:

$$n\lambda = 2d \cdot \text{sen } \theta \quad \text{Ecuación 4.1}$$

donde λ es la longitud de onda de la radiación, d es el espaciado entre planos atómicos y θ es el ángulo del haz incidente.

Los patrones de difracción suministran información de la estructura cristalina. La posición angular de los máximos de difracción se relaciona con los parámetros de la celda unidad, mientras que las intensidades reflejan la simetría de la red y la densidad electrónica dentro de la celda unidad [Jenkins, 1996].

La identificación de las muestras se llevó a cabo en un difractómetro X'Pert MPD equipado con una fuente de Cu ($K_{\alpha 1}=1.54056 \text{ \AA}$ y $K_{\alpha 2}=1.54439 \text{ \AA}$). Las condiciones en las que se utilizó el difractómetro fueron 45 kV y 40 mA. Se realizó un barrido en el rango $1.3^\circ \leq 2\theta \leq 120.02^\circ$ con un tamaño de paso de 0.04° y un tiempo de recogida de 1 s/paso.

4.4.5.6 TERMOGRAVIMETRÍA

El análisis térmico diferencial (DTG) se basa en el registro de los cambios de temperatura, que con respecto a una sustancia de referencia térmicamente inerte, tienen lugar en una muestra cuando es calentada o enfriada a una velocidad constante en atmósfera controlada. La termogravimetría (TG) detecta variaciones de peso que se producen en las muestras, al someterlas a un tratamiento térmico, referido al mismo patrón. Estos análisis permiten obtener información acerca de la estabilidad térmica de las composiciones a estudiar. La variación de la masa con la temperatura puede ser debida a distintos procesos tales como: descomposición, sublimación, reducción, desorción, adsorción y vaporización [Mathot, 1994].

Las curvas TG-DTG se registraron en un equipo SDT-Q600 que incorpora un controlador de temperatura TASC 414/2 Netzsch para el horno. Para realizar los ensayos se utilizaron entre 3 y 5 mg de masa muestra que se depositaron sobre crisoles de platino, empleándose alúmina ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$) calcinada como material de

4. PARTE EXPERIMENTAL

referencia. Los análisis se realizaron en un intervalo de temperatura entre 0 y 400 °C bajo un flujo de N₂ de 100 mL/min y una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

4.4.5.7 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER

La espectroscopia de infrarrojos se basa en el estudio de la interacción de la radiación electromagnética, en el rango infrarrojo del espectro, con la materia, la cual, al absorber la radiación infrarroja produce un cambio en el estado de energía vibracional y rotacional de las moléculas. En el caso de muestras sólidas y líquidas, sólo se tienen en cuenta los cambios entre estados de energía vibracional lo que hace posible la caracterización de los principales grupos funcionales de la estructura molecular del compuesto.

La muestra sólida se mezcló con KBr puro y seco en un mortero de ágata hasta obtener un polvo fino. Con una pequeña porción del polvo obtenido, se hicieron pastillas empleando para ello una prensa (10 TN, 5 mins). Esta pastilla debe ser homogénea, finísima y es importante evitar la contaminación de la muestra y seguir las indicaciones sobre el uso de la prensa para hacer la pastilla. Una vez prensado el material se coloca en una placa para muestras y se procede a realizar las medidas, para lo que se utiliza un espectrofotómetro FTIR NICOLET NEXUS 670-870. Se realizan 32 barridos entre 400 y 4000 cm⁻¹.

4.4.5.8 ESPECTROSCOPIA RAMAN

La espectroscopia Raman se basa en la incidencia de un haz de luz monocromática de frecuencia ν_0 sobre la muestra, examinándose la interacción de la luz dispersada por la misma. La radiación dispersada con distinta frecuencia que la luz incidente (dispersión inelástica) es característica de la naturaleza química y estado físico de la muestra y es independiente de la radiación incidente; se conoce como dispersión Raman. En la dispersión Raman pueden darse dos fenómenos: *Stokes*, donde el fotón dispersado tiene una frecuencia menor a la del haz incidente y *Anti-Stokes* en el que la frecuencia es mayor. Las transiciones tipo *Stokes* son más probables que las *Anti-Stokes* por lo que generalmente se trabaja midiendo el efecto *Stokes*.

Los espectros se registraron con un espectrómetro Raman confocal de la firma BWTEK y el modelo Voyage™ BWS435-532, que está compuesto por un láser de banda estrecha, con el que se excita la muestra, que emite a 532.0 nm con una

potencia nominal máxima de 21.8 mW a la salida del láser y entre 15 y 21.8 mW en la plataforma donde se coloca la muestra. Las muestras se enfocaron utilizando un microscopio Olympus BX51 que dispone tres objetivos de 10x, 20x y 50x. Además, el equipo dispone de una cámara digital tipo PGR Chamaleon™ conectada por USB a un ordenador de control que permite monitorizar el punto exacto de incidencia de nuestro láser. El resto del dispositivo se controla mediante el software BWSpec™. El registro se realiza a temperatura ambiente, con 30 acumulaciones de espectros realizados en 80 s entre 1000 y 3500 cm⁻¹.

4.4.6. EXTRACCIÓN DE RNA Y SÍNTESIS DE cDNA

Para comprobar el funcionamiento del genosensor se seleccionaron dos líneas celulares de cáncer de mama, MCF-7 y SK-BR-3 conteniendo el gen *TP53* y el 1-mTP53, respectivamente y como control la línea de células epiteliales de mama sin tumor MCF-10A que contenía el gen *TP53*.

El crecimiento de las células se llevó a cabo de acuerdo con protocolos ya establecidos [Babel, 2011], [Peláez-García, 2013]. En el caso de las células cancerígenas, se utilizó DMEN con un 10 % de suero de bovino fetal, penicilina y estreptomina como medio de cultivo y glutamina 2.5 mM mientras que para las células no tumorales se empleó el medio de cultivo DMEN de alto contenido en glucosa con L-glutamina 2.5 mM, un 5% (v/v) de suero de caballo, estreptomina, insulina humana, hidrocortisona 0.5 mg/mL, un 10 % de factor de crecimiento epidérmico (EGF) y toxina de cólera 100 ng/mL. El RNA se extrajo de las líneas celulares empleando el reactivo Tri, de acuerdo con los protocolos establecidos [Campuzano, 2014] y posteriormente se cuantificó.

La síntesis del cDNA se realizó utilizando un kit de síntesis [Peláez-García, 2013] y su calidad se evaluó por PCR, utilizando cebadores específicos para gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa humana (GAPDH): El cebador directo empleado fue 5'-GGCTGAGAACGGGAAGCTTGT-3', mientras que el reverso 5'-CGGCCATCACGCCACAGTTTC-3' [Peláez-García, 2013]. Con los amplicones obtenidos en la PCR se realizó una electroforesis en gel donde se utilizó el gel agarosa al 1.5 % para comprobar que se obtuvieron los productos correctos en la PCR y ver así que la calidad de cDNA sintetizado era apropiada para realizar el resto de los experimentos.

4. PARTE EXPERIMENTAL

Para llevar a cabo la detección del gen *TP53* endógeno con el genosensor, el cDNA se diluyó con la disolución reguladora de hibridación hasta una concentración total de 5 ng/ μ L y se siguió el mismo procedimiento de hibridación, de marcaje y de detección que se describe en el **apartado 4.4.6.3**.

4.4.7. REALIZACIÓN DE LAS MEDIDAS ELECTROQUÍMICAS

Las medidas electroquímicas se han realizado utilizando un sistema de tres electros; un electrodo de referencia, un electrodo auxiliar y un electrodo de trabajo que será el que esté modificado con los distintos nanomateriales y en los que se inmovilizarán las biomoléculas de interés.

4.4.7.1. VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA

La voltamperometría cíclica es una técnica de gran importancia en el campo de la electroquímica, especialmente para estudios de procesos redox, mecanismos de reacción, propiedades electrocatalíticas, etc. No tiene igual relevancia para determinaciones cuantitativas, sin embargo mediante ensayos relativamente sencillos y rápidos es posible obtener una importante cantidad de información.

Esta técnica se basa en aplicar un barrido de potencial al electrodo de trabajo tanto en el sentido directo como en el inverso, es decir realizando lo que se denomina barrido triangular de potencial, y registrando la intensidad de corriente a cada uno de los potenciales.

Para la obtención de las curvas intensidad-potencial en el estudio de las distintas etapas de modificación de la superficie electródica, se sumergieron los electrodos en una disolución de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (5 mM cada uno) conteniendo KCl 0.1 M. En el caso de las curvas realizadas para comprobar el comportamiento de la plataforma biosensora frente a su sustrato correspondiente, los electrodos se sumergieron en la disolución reguladora correspondiente. En ambos casos, una vez sumergidos los electrodos, se realizó un barrido entre los potenciales seleccionados a una velocidad de barrido elegida.

4.4.7.2. ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA

La técnica de espectroscopia de impedancia electroquímica se utiliza, entre otras cosas, para reconocer la presencia de especies conductoras y/o no conductoras sobre una superficie electródica, lo que origina un cambio en el valor

de la resistencia a la transferencia de carga. Esta técnica es ampliamente utilizada para realizar un seguimiento de cada una de las etapas implicadas en la construcción de biosensores

Las medidas de EIS se realizaron después de depositar sobre la superficie electródica una alícuota de la disolución $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ (5 mM cada uno) conteniendo KCl 0.1 M. Estas medidas se realizaron al potencial de equilibrio (correspondiente a paso de corriente cero) del par $Fe(CN)_6^{4-}/Fe(CN)_6^{3-}$, con una amplitud de excitación sinusoidal $V_{rms} = 10$ mV. Las medidas se llevaron a cabo cinco veces a cada frecuencia y se promediaron durante el barrido. La impedancia se midió en el intervalo apropiado de frecuencias a 20 pasos por década.

4.4.7.3. AMPEROMETRÍA EN DISOLUCIONES AGITADAS

La amperometría se basa en la medida, a un potencial constante, de la corriente electrolítica producida por una reacción electroquímica en la que participa una especie electroactiva cuya concentración está relacionada con la corriente obtenida.

Los amperogramas en disoluciones agitadas se obtienen sumergiendo los electrodos, el de trabajo, el de referencia y el auxiliar, en la célula de medida que contiene 10 mL de la disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH adecuado en cada aplicación concreta agitándose mecánicamente de forma constante. Se aplica el potencial deseado y se espera hasta alcanzar la estabilización de la corriente de fondo. A continuación se añade el volumen adecuado de la disolución patrón del compuesto y se registra la corriente hasta que se alcanza el estado estacionario. Entre una experiencia y otra no es necesario aplicar ningún tratamiento al biosensor.

Para el cálculo de los parámetros cinéticos se efectúan adiciones sucesivas de la disolución patrón correspondiente, hasta no obtener variación apreciable en la intensidad de corriente en el estado estacionario, lo que confirma la saturación del biosensor.

4.4.7.4. AMPEROMETRÍA EN DISOLUCIONES NO AGITADAS

Las medidas amperométricas con los electrodos de carbono serigrafados se han realizado depositando sobre el SPCE modificado una gota de 45 μ L de disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 7.0) y aplicando un potencial de -0.10 V (frente a un electrodo de Ag de pseudoreferencia). Cuando la corriente base se

4. PARTE EXPERIMENTAL

estabilizó se añadieron 5 μL de una disolución de TMB- H_2O_2 en la superficie del electrodo de trabajo lo que provocó una variación en la corriente del estado estacionario. La señal analítica fue la corriente medida tras 200 s desde la adición del sustrato.

A menos que se indique lo contrario, los datos de las medidas corresponden a la media de al menos tres réplicas. Para cada medida se utilizó un SPCE nuevo.

4.4.8. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

4.4.8.1. MUESTRAS BIOLÓGICAS CONTAMINADAS

La detección del gen p53 en muestras biológicas (suero comercial sin tratar y saliva humana) se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el **apartado 4.4.4.2.**, sustituyendo la disolución reguladora de hibridación por las muestras biológicas de estudio (diluidas o sin diluir) contaminadas con la sonda diana y la determinación se realizó en disoluciones patrón siguiendo el protocolo descrito en el **apartado 4.4.6.3.**

4.4.8.2. MUESTRAS DE BEBIDA CARBONATADA AZUCARADA

Para la determinación de glucosa en bebida carbonatada azucarada se desgasifica la muestra en el ultrasonidos y se diluye en disolución reguladora de fosfato 0.1M (pH 7.5) a una concentración de 69.6 mM.

Los calibrados se realizaron en 5 mL de disolución reguladora de fosfato 0.1M (pH 7.5) y se realizaron adiciones de 25 μL de una disolución patrón de glucosa 0.1 M. En los calibrados de adiciones estándar se añadieron 50 μL de la disolución de la muestra en la disolución de medida en la célula antes de comenzar el calibrado con las adiciones de patrón de glucosa.

4.4.8.3. MUESTRAS DE INFUSIONES

Para la determinación de catecol en infusiones, primero se añaden 100 mL de H_2O desionizada en un matraz Erlenmeyer (uno por cada infusión), se introduce la bolsa de infusión y se calienta a 100°C durante 10 minutos. Posteriormente se retira la bolsa, se deja enfriar la infusión y finalmente se lleva cada disolución a un volumen final de 100 mL.

Los calibrados se realizaron en 5 mL de disolución reguladora de fosfato 0.1M (pH 6.5) y se realizaron adiciones de 50 μL de una disolución patrón de catecol 2

mM. En los calibrados de adiciones estándar se añadieron 50 μ L de la disolución de la muestra en la disolución de medida en la célula antes de comenzar el calibrado con las adiciones de patrón de catecol.

La cantidad de fenoles se calculó como masa de catecol por unidad de masa de infusión utilizada en la extracción, siendo 1,5899 g de té verde con limón, 1,0545 g de Menta y 1,9052 g de frutos rojos.

4.4.9. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES MEDIANTE EL MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU

El conjunto de los fenoles de las infusiones se oxida por el reactivo Folin-Ciocalteu, observándose una coloración azul directamente proporcional al contenido de fenoles y medible a 750 nm.

Para realizar el calibrado se introducen en un matraz aforado de 10.0 mL, y respetando el orden, 2 mL de agua destilada, la cantidad necesaria de patrón de catecol de 2 mM para realizar un calibrado entre 0 y 100 μ M, 0.5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu, 2.0 mL de la disolución de carbonato de sodio al 20% (w/v) y se enrasa con agua destilada. Se agita el matraz para homogenizar, se espera 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad y se mide la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm.

Para las muestras, se introducen en un matraz aforado de 10.0 mL, respetando el orden, 2 mL de agua destilada, 200 μ L de muestra, 0.5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu, 2.0 mL de la disolución de carbonato sódico al 20 % y se enrasa con agua destilada. Se agita el matraz para homogenizar, se espera 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad y se mide la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm.

4.5. CÁLCULOS

4.5.1. CURVAS DE CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

Los intervalos lineales de las curvas de calibrado se han estimado mediante regresión por mínimos cuadrados, considerando que no hay desviación de la linealidad cuando el coeficiente de correlación era mayor o igual de 0.998.

4. PARTE EXPERIMENTAL

El límite de detección obtenido se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{3 \cdot S_b}{m} \quad \text{Ecuación 4.2}$$

donde m es la pendiente de la curva de calibrado y S_b la desviación estándar de 10 señales amperométricas independientes para la concentración más baja de analito medida en el calibrado.

4.5.2. CONSTANTES CINÉTICAS DE LA REACCIÓN ENZIMÁTICA

La velocidad de una reacción enzimática depende de la concentración de enzima y cuando el sustrato está en exceso existe una relación entre dicha velocidad y la concentración de enzima. Para concentraciones bajas de sustrato, la velocidad V en los inicios de la reacción es proporcional a la concentración de sustrato y por lo tanto se establece un sistema de primer orden; sin embargo a medida que aumenta la concentración, la velocidad se vuelve de orden fraccionario y posteriormente de orden cero. En este último caso la velocidad es independiente de la concentración de sustrato, ya que la enzima alcanza su saturación. Si la reacción enzimática involucra un solo sustrato, puede ser formulada en general como:



A partir de este mecanismo y para una concentración de enzima fija, la velocidad de la reacción catalizada enzimáticamente viene dada por la ecuación de Michaelis-Menten:

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{(K_M + [S])} \quad \text{Ecuación 4.4}$$

dónde $V_{m\acute{a}x}$ es la velocidad máxima de la reacción y K_M es la constante de Michaelis-Menten, que corresponde a la concentración de sustrato para la cual la velocidad es igual a la mitad de la velocidad máxima.

La ecuación de Michaelis-Menten puede reagruparse matemáticamente al tomar su inverso, para obtener una nueva expresión:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{(V_{m\acute{a}x}[S])} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad \text{Ecuaci3n 4.5}$$

Con la ecuaci3n anterior, conocida como ecuaci3n de Lineweaver-Burk, se obtiene una lnea recta cuando se representa $1/V$ en funci3n de $1/[S]$, cuya pendiente y ordenada en el origen son $K_M/V_{m\acute{a}x}$ y $1/V_{m\acute{a}x}$, respectivamente [Badu3, 1999].

Desde un punto de vista anal3tico, cu3nto m3s alta es la constante de Michaelis-Menten menor es la sensibilidad del m3todo, pero mayor es el intervalo de linealidad. Por todo esto, un aspecto interesante a tener en cuenta cuando se trabaja con biosensores es el conocimiento de las variables cin3ticas de la reacci3n enzim3tica que tiene lugar, con el fin de obtener la velocidad de dicha reacci3n, as3 como el intervalo lineal que se puede alcanzar, lo que constituye una importante caracter3stica anal3tica para la aplicaci3n de los biosensores desarrollados [Pe3a, 2003].

Antes de calcular las constantes cin3ticas es preciso verificar si la reacci3n enzim3tica obedece una cin3tica de tipo Michaelis-Menten aplicando el an3lisis de Hill a los datos amperom3tricos obtenidos. La ecuaci3n de Hill para un biosensor que obedece el comportamiento de Michaelis-Menten es:

$$\log \left\{ \left(\frac{i_{m\acute{a}x}}{i} \right) - 1 \right\} = \log K_M^{ap} - n \cdot \log [S] \quad \text{Ecuaci3n 4.6}$$

donde el coeficiente de Hill, n , mide el grado de desviaci3n de la reacci3n enzim3tica respecto a la cin3tica de Michaelis-Menten. Valores de n pr3ximos a la unidad indican una cin3tica ideal de tipo Michaelis-Menten [Iwuoha, 1997].

4.5.3. ESTUDIO DEL EFECTO MATRIZ

El efecto matriz consiste en una disminuci3n o aumento de la respuesta instrumental del analito debido a la presencia de otros componentes en la muestra, provocando as3, un error sistem3tico dependiente de la concentraci3n de analito en la muestra.

Una posibilidad para corregir el efecto matriz es utilizar la t3cnica de las adiciones est3ndar [Miller, 2000], que consiste en la adici3n de cantidades conocidas y crecientes del analito a la propia muestra problema, la lectura de las correspondientes respuestas instrumentales y la posterior construcci3n de la recta de

4. PARTE EXPERIMENTAL

adiciones estándar. La posterior cuantificación del analito se realiza por extrapolación de la recta de calibrado al punto del eje de abscisas donde la respuesta es cero.

Para evaluar la posible existencia de efecto matriz en la muestra, se compara la pendiente de un calibrado externo, realizado con patrones, y la de un calibrado de adiciones estándar, aplicando el método test de la t de Student. Se dice que existe efecto matriz cuando el valor de la t de Student tabulada (t_{tab}) a un nivel de significancia de 0.05 es inferior al de la t calculada (t_{exp}). Para el cálculo de dicho valor de t se emplea aplicando la ecuación:

$$t_{exp} = \frac{|m_1 - m_2|}{\sqrt{S_1^2 + S_2^2}} \quad \text{Ecuación 4.7}$$

donde, m_1 y m_2 son las pendientes de los calibrados y S_1 y S_2 las desviaciones estándar de las pendientes de los calibrados.

5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. MATERIAL HÍBRIDO BASADO EN GO Y CMC

Como ya se ha comentado, es necesario llevar a cabo la modificación del grafeno para obtener un material con grupos funcionales en los que anclar biomoléculas. Esta modificación debe hacerse de manera controlada y evitando, en todo lo posible, la alteración de la estructura carbonácea del grafeno, así como de sus propiedades electroconductoras. Un método sencillo para funcionalizar grafeno consiste en su modificación con silanos. En este sentido, en esta Tesis Doctoral se ha desarrollado un material híbrido hidrodispersable de óxido de grafeno funcionalizado con (3-aminopropil)triatoxisilano (APTES) y el polímero carboximetilcelulosa oxidado (CMCox). El nanomaterial ha sido caracterizado empleando diversas técnicas fisicoquímicas observándose que presentaba propiedades compatibles y beneficiosas para la preparación de biosensores electroquímicos, empleándose por tanto, para el desarrollo de un biosensor enzimático para la detección de catecol y un sensor de DNA para la detección del gen *TP53*.

5.1.1. PREPARACIÓN DEL NANOMATERIAL HÍBRIDO CMCox-rGO.

La preparación de este nanomaterial híbrido se llevó a cabo mediante una estrategia en dos pasos sucesivos (**Figura 5.1**):

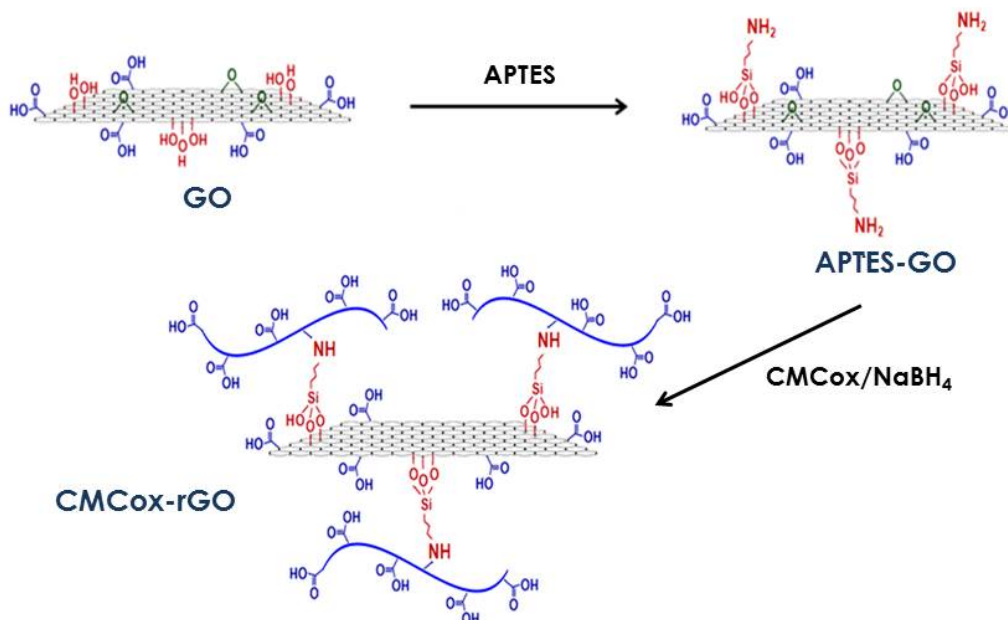


Figura 5.1. Preparación del nanomaterial híbrido CMCox-rGO.

En primer lugar, se silanizó el óxido de grafeno (GO) con APTES utilizando los grupos hidroxilo del plano basal del GO como puntos de anclaje dando lugar al

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

derivado silanizado APTES-GO, que contiene numerosos grupos amino donde podrá unirse el polisacárido.

En segundo lugar, se procedió a la inmovilización del polímero CMC, el cual fue previamente oxidado con NaIO_4 para dotarlo de grupos carbonílicos por los que tendrá lugar la unión al derivado de grafeno. Durante esta etapa, el polímero reacciona con los grupos amino libres del GO silanizado a través de una alquilación reductiva con NaBH_4 . Además, durante esta etapa también se produce la reducción de los grupos epóxido y carbonilo de las nanoláminas de GO. El producto oscuro resultante (CMCox-rGO) se dispersó fácilmente en agua, siendo dichas dispersiones, estables durante varios meses a temperatura ambiente.

5.1.2. CARACTERIZACIÓN DEL NANOMATERIAL HÍBRIDO CMCox-rGO

El nanomaterial híbrido fue caracterizado empleando varias técnicas fisicoquímicas como espectroscopia de infrarrojo, termogravimetría, difracción de RX, espectroscopia Raman, microscopía de fuerza atómica, microscopía de barrido de emisión de campo y microscopía electrónica de transmisión de alta resolución.

5.1.2.1. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO

El análisis mediante FTIR proporcionó el espectro que se muestra en la **Figura 5.2**. Como se puede observar, aparecen bandas a 3648 cm^{-1} y 3137 cm^{-1} que pueden atribuirse a la vibración fundamental de los grupos O-H libres y enlazados intermolecularmente por puentes de hidrógeno, respectivamente. Además el espectro del GO (**Figura 5.2.a**) muestra la banda característica de la vibración del enlace C=O a 1745 cm^{-1} , la banda de vibración de los dominios no oxidados del esqueleto aromático de grafeno a 1650 cm^{-1} , la banda de deformación del enlace O-H a 1441 cm^{-1} , las bandas de vibración de los enlaces C-OH a 1262 cm^{-1} y la del enlace C-O a 1105 cm^{-1} , valores que concuerdan con los encontrados en la bibliografía [Yang, 2010], [Xu, 2008].

La modificación del GO con APTES se confirmó tras la aparición de las bandas correspondientes a la vibración de los enlaces N-H y C-H a 3414 cm^{-1} y 2933 cm^{-1} respectivamente (**Figura 5.2.b**). Además se observaron las bandas de flexión de

dichos enlaces a 1570 cm^{-1} y 1480 cm^{-1} respectivamente y finalmente la banda de la vibración del enlace C–N a 1117 cm^{-1} .

La unión covalente del polímero CM Cox al derivado silanizado de GO funcionalizado con grupos amino, se evaluó por la presencia de las bandas características del polisacárido. De hecho, el espectro del CM Cox-rGO (**Figura 5.2.c**) mostró una banda ancha centrada a 3400 cm^{-1} correspondiente a la vibración del enlace de los grupos O–H. Además aparece un hombro a 2928 cm^{-1} que puede atribuirse a la vibración de enlace de los grupos C–H correspondientes al APTES y a la CMC. También se observa una banda ancha a 1625 cm^{-1} correspondiente a la vibración de enlace carbonilo de los grupos CO_2^- . Finalmente, hay que destacar las bandas de deformación de los enlaces O–H a 1400 cm^{-1} y C–O–C a 1066 cm^{-1} que aparecen claramente en el espectro del derivado de grafeno modificado con el polisacárido.

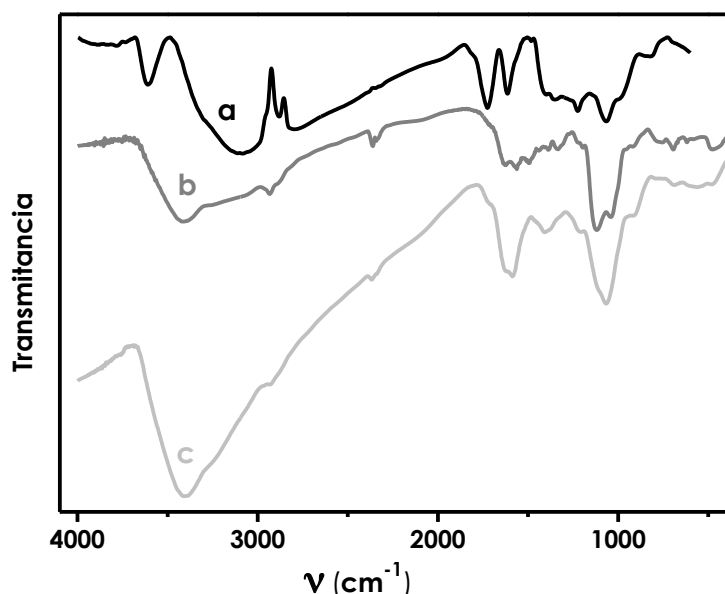


Figura 5.2. Espectro FTIR de (a) GO, (b) APTES-GO y (c) CM Cox-rGO.

5.1.2.2. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE TERMOGRAVIMETRÍA

La estabilidad térmica del derivado de grafeno se estudió mediante análisis termogravimétrico (**Figura 5.3**). En el termograma del GO se observan dos procesos de transformación térmica. El primero de ellos tiene lugar entre 25 y 150 °C (aprox. $14,3\%$) y es debido a la pérdida del agua residual, no estructural. El segundo tiene lugar entre 200 y 250 °C (aproximadamente $30,7\%$) y se debe a degradación de los grupos funcionales que contienen oxígeno y que se encuentran en las nanoláminas [Shen, 2009].

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras la modificación del grafeno con APTES, la estabilidad térmica disminuye, produciéndose la mayor pérdida de peso a una temperatura de 167 °C en lugar de 231 °C como ocurría en el GO. Además, esta modificación de los grupos hidroxilo con el silano, supuso una menor pérdida de peso (aproximadamente 10.5 %) en este proceso de descomposición, que incluyó, probablemente, tanto el oxígeno residual como los grupos amino primarios de los residuos del silano.

La unión covalente de las cadenas de CMCOx da lugar a un patrón termogravimétrico distinto con 3 procesos bien definidos. Este nanomaterial híbrido muestra una pérdida de peso de aproximadamente un 28 % a temperaturas superiores de 100 °C, que se puede atribuir a la desorción térmica de las moléculas de agua adsorbidas. Este alto contenido de agua residual puede justificarse por la alta hidrofiliicidad del polisacárido. La segunda transformación térmica se produjo a 182 °C y corresponde una pérdida de peso entorno a un 9.3 % debido probablemente a la descomposición de los grupos carboxilo remanentes de los bordes del rGO. Por último, la descomposición que tiene lugar entre 285 y 380 °C y que corresponde a una pérdida de peso aproximada del 7.7 %, es causada por la degradación del polisacárido y la pérdida de CO₂ [El-Sayed, 2001].

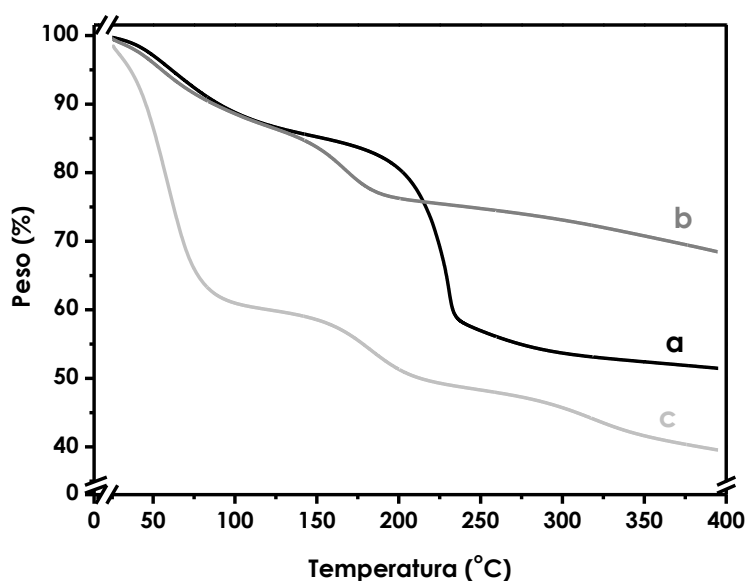


Figura 5.3. Termogramas para (a) GO, (b) APTES-GO y (c) CMCOx-rGO.

5.1.2.3. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Los derivados de grafeno resultantes en las distintas etapas de la preparación del material híbrido fueron caracterizados también mediante difracción de rayos X en polvo, obteniéndose los difractogramas mostrados en la **Figura 5.4**.

El GO mostró un patrón de difracción de una estructura de unas pocas láminas de grafeno, con un pico de difracción intenso a 12.30° correspondiente a una distancia interplanar de 7.19Å , debida a la presencia de grupos funcionales con oxígeno en los bordes y plano basal del GO y a la intercalación de moléculas de agua entre las láminas hidrofílicas [Park, 2009b], [Wang, 2012b]. Este pico, tras la silanización del GO, aparece con menos intensidad y desplazado a 11.50° con un distancia interplanar (d) de 7.76Å . Este aumento de la distancia se atribuye a la presencia de los grupos silano a ambos lados de plano basal de la lámina de GO.

La unión covalente del CMC hace que aumente la distancia interplanar en el derivado de grafeno, obteniéndose un valor de 9.04Å a partir del pico de difracción que aparece a 9.78° , hecho que puede justificarse por la intercalación entre las nanoláminas, del polisacárido que es voluminoso y que posee cadenas cargadas negativamente que producen repulsiones electrostáticas con otras láminas de GO modificado. El difractograma del CMCox-rGO también muestra un pico ancho y de poca intensidad centrado a 19.26° que equivale una distancia de 4.60Å , la cual es muy similar a la distancia d_{002} del grafito [Lu, 2009]. Este patrón, que es característico de la estructura del GO reducido, puede justificarse por la formación de regiones de carbono con estructura de grafito en el derivado de grafeno, debido a la reducción de los grupos epóxido y carbonilo durante el proceso de reducción alcalina con NaBH_4 , permitiendo el apilamiento parcial de las nanoláminas.

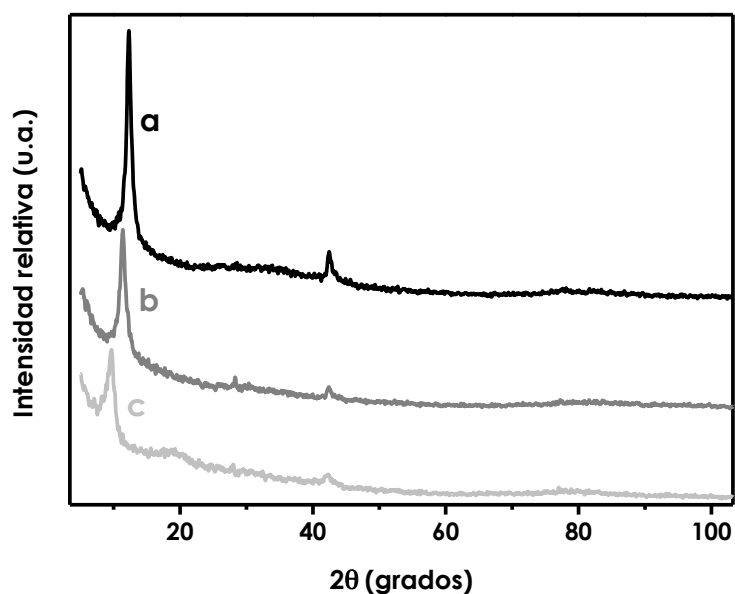


Figura 5.4. Difractograma de Rayos X de (a) GO, (b) APTES-GO y (c) CMCox-rGO.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1.2.4. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE ESPECTROSCOPIA RAMAN

El espectro Raman del GO (**Figura 5.5.a**) muestra dos bandas anchas a 1584 cm^{-1} (G) y 1344 cm^{-1} (D), siendo la primera, característica de la vibración en fase del enrejado de grafito y la segunda, de los bordes del grafito que presentan una estructura desordenada. Ambas bandas se desplazaron después de la silanización a valores de 1599 cm^{-1} y 1353 cm^{-1} respectivamente, aunque la relación de intensidad entre ellas (D/G), se mantuvo constante a un valor de 0.96 (**Figura 5.5.b**).

La unión del polisacárido CM Cox (**Figura 5.5.c**) provocó un desplazamiento de las bandas G y D hacia el rojo hasta unos valores de 1569 cm^{-1} y 1338 cm^{-1} , respectivamente, sugiriendo un restablecimiento de la red hexagonal de los átomos de carbono con defectos tras la reducción con NaBH_4 . La relación de intensidades D/G, en este caso, aumentó a un valor de 1.16, debido probablemente al incremento de la concentración de defectos en el material híbrido final CM Cox-rGO, en comparación con los derivados intermedio (APTES-GO) e inicial (GO) [Ramesha, 2009]. Además, se produjo un aumento considerable en la intensidad de la banda 2D, que aparece sobre 2492 cm^{-1} , lo que se debe al apilamiento parcial de las láminas de grafeno tras el tratamiento reductor [Hao, 2010], lo cual también se comprobó tras el análisis del material mediante XRD.

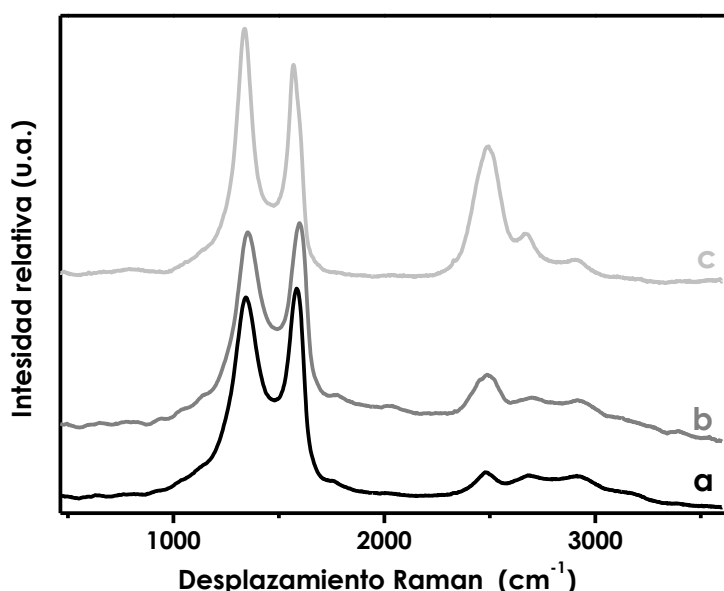


Figura 5.5. Espectro Raman de (a) GO, (b) APTES-GO y (c) CM Cox-rGO.

5.1.2.5. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA

El análisis por AFM nos da información topológica del nanomaterial. En la **Figura 5.6** se muestran las imágenes representativas y los análisis de las secciones de los distintos derivados del GO en cada etapa de la preparación.

En el caso del GO (**Figura 5.6.a**) se observó la estructura plana característica del grafeno laminar con un grosor sobre 0.8 y 1.0 nm, lo cual concuerda con los valores encontrados en la bibliografía [Lu, 2009].

El enlace de las moléculas de APTES en el plano basal del GO no produce una variación significativa en la morfología de este nanomaterial, pero el grosor se vio ligeramente incrementado a valores entre 0.8 y 1.2 nm debido a la presencia de los residuos de silano.

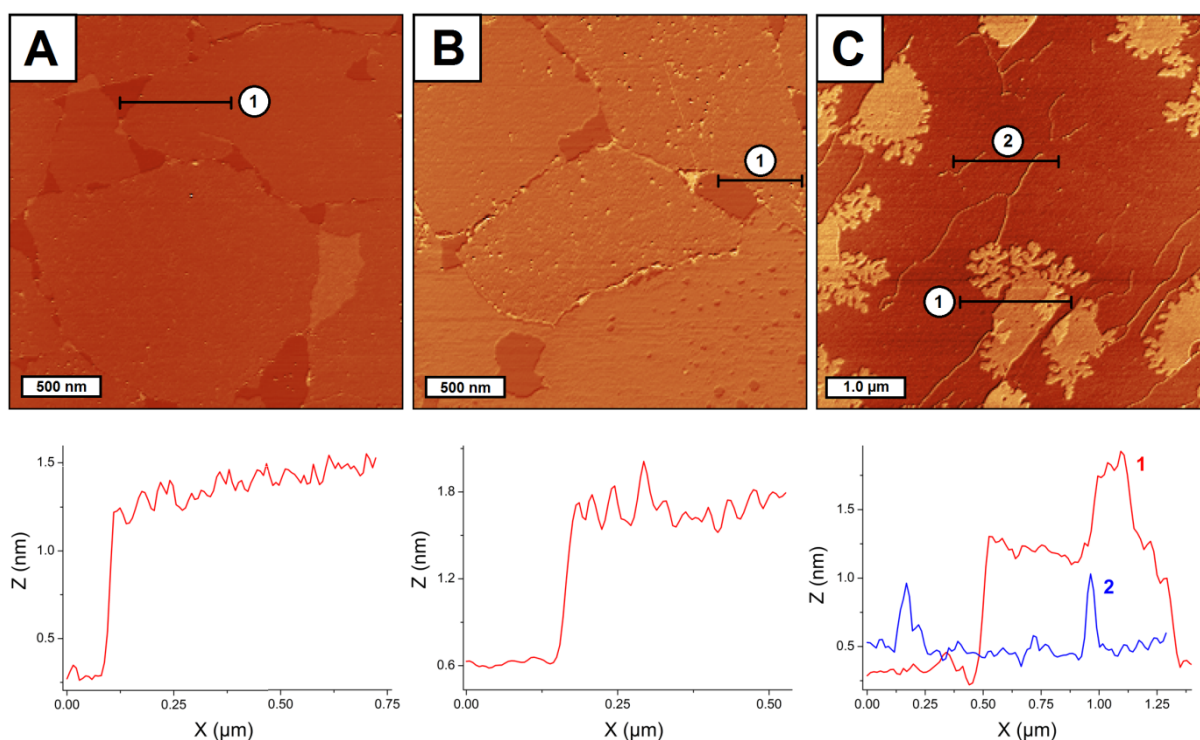


Figura 5.6. AFM y análisis de la sección topológica de (A) GO, (B) APTES-GO, (C) CMCox-rGO.

Por el contrario, tras la modificación del material con el polisacárido las láminas sufrieron una transformación drástica dando lugar a láminas con estructuras de tipo fractal en los bordes y estructuras colgantes con forma de hilos (**Figura 5.6.c**). Esta diferencia en la morfología se atribuye a la asociación de residuos de polisacárido, formando estructuras compactas de nanogel con geometría de tipo fractal y un rango de grosor entre 1.2 y 1.4 nm. Además, las estructuras de

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

nanohilos pueden estar constituidas por cadenas de CM Cox con una longitud monomolecular entre 0.5 y 0.7 nm, de manera análoga a lo observado tras la deposición del polisacárido sobre diferentes soportes [Ueno, 2007].

5.1.2.6. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE EMISIÓN DE CAMPO

La morfología de los distintos derivados de grafeno fue estudiada también por FE-SEM. En las **Figuras 5.7.A y B** se pudo observar como las muestras de GO y APTES-GO aparecían como láminas exfoliadas homogéneamente. Por el contrario, la modificación con CM Cox da lugar a estructuras parcialmente arrugadas (**Figura 5.7.C**) hecho que puede explicarse por la unión del polisacárido a una o varias láminas.

Aunque podría esperarse que esta asociación entre láminas de grafeno supusiera una disminución de la dispersabilidad del nanomaterial híbrido, el alto contenido de grupos hidroxilo y carboxilato que contiene el polímero de celulosa aseguran una alta hidrofiliicidad y un elevado radio hidrodinámico para el material híbrido resultante, dando lugar de este modo a dispersiones estables en agua.

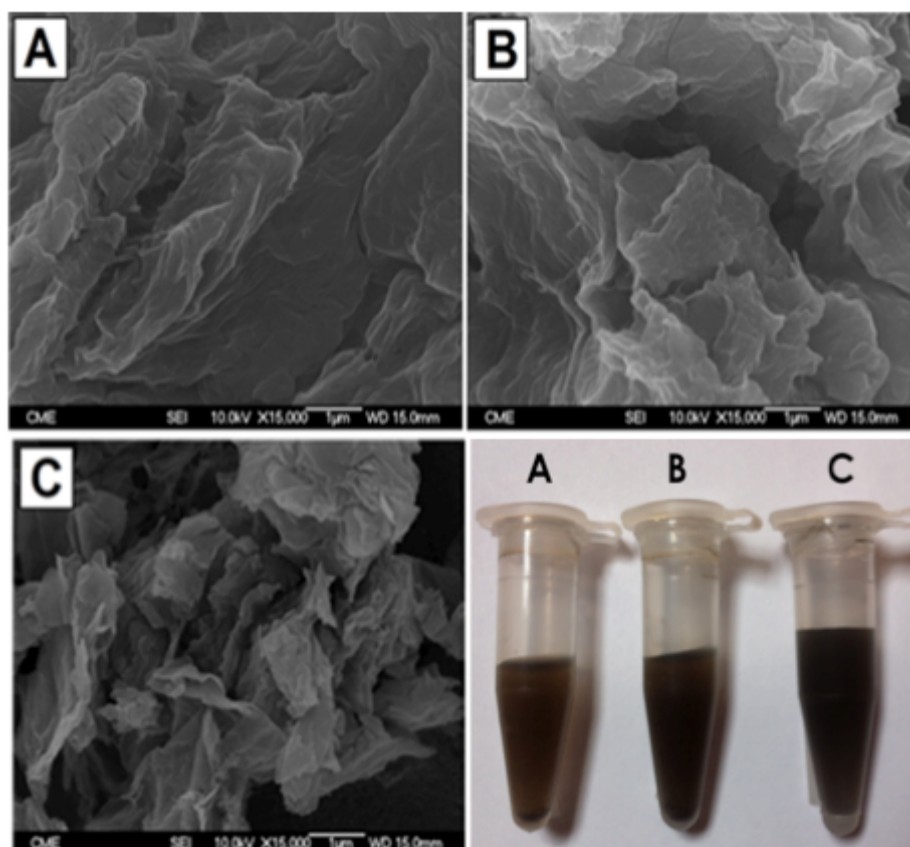


Figura 5.7. Imágenes de FE-SEM de (A) GO, (B) APTES-GO y (C) CM Cox-rGO y sus respectivas dispersiones en agua (0.5 mg/mL).

5.1.2.7. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE ALTA RESOLUCIÓN

Mediante microscopía electrónica de transmisión (**Figura 5.8**) también se observan láminas de grafeno parcialmente arrugadas con estructuras colgantes reticulares en los bordes. Estos hechos pueden justificarse por la unión multipuntual de las cadenas a los dos lados del plano del grafeno, causando que las láminas se doblen parcialmente y/o se enrollen.

Se determinó el espacio que existe entre las láminas vecinas, obteniéndose un valor de 0.470 nm, distancia mayor que la existente entre láminas en el grafito, pero similar a la determinado por XRD.

Por otro lado, el análisis localizado de difracción de electrones (SAED) del nanomaterial CMCo_x-rGO, mostró un patrón difuso y débil con simetría en forma de anillos, lo que podría indicar que las láminas de grafeno pierden gran parte de su ordenamiento atómico al ser modificado con el polisacárido (**Figura 5.8.C**).

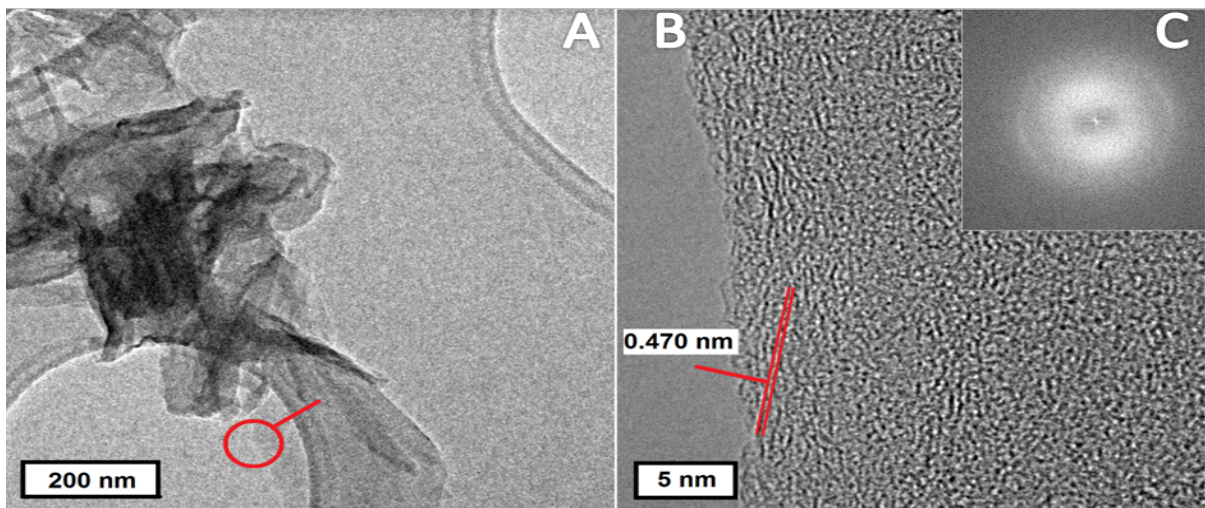


Figura 5.8. (A y B) Imágenes de HR-TEM del material híbrido CMCo_x-rGO y (C) SAED del nanomaterial.

5.1.3. APLICACIÓN AL DESARROLLO DE BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS

5.1.3.1. BIOSENSOR Tyr/CMCox-rGO/GCE

5.1.3.1.1 Preparación del electrodo enzimático

El nanomaterial híbrido CMCox-rGO fue empleado para el desarrollo de un biosensor electroquímico enzimático para la determinación de fenoles. En la **Figura 5.9** se muestra un esquema de las etapas implicadas en la fabricación del biosensor. En primer lugar, el material híbrido se inmovilizó sobre la superficie de un electrodo de carbono vitrificado (GCE) por simple adsorción. La inmovilización de la enzima modelo tirosinasa (Tyr) se realizó mediante enlace covalente, para lo cual se activaron los grupos carboxílicos de la CMCox empleando EDC y NHS, para poder llevar a cabo la inmovilización de la proteína a través de los grupos amino presentes en la misma.

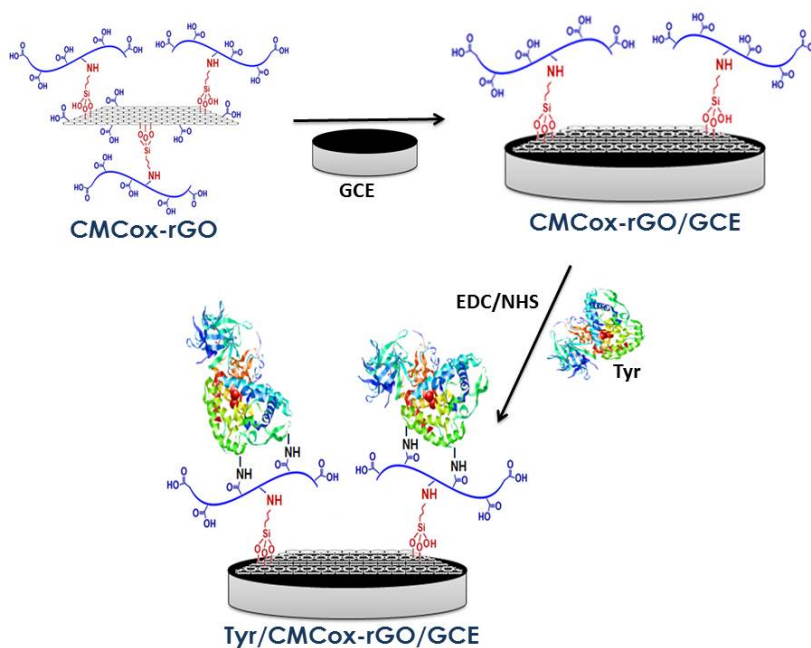


Figura 5.9. Representación esquemática de la preparación del electrodo enzimático Tyr/CMCox-rGO/GCE.

5.1.3.1.2 Caracterización de la superficie electródica

La superficie del electrodo modificada con el nanomaterial híbrido y la enzima se caracterizó empleando microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM). Como se puede observar en la **Figura 5.10**, el electrodo presentó

una morfología homogénea, en la que no se encontraron zonas de grafeno sin modificar con la proteína, lo que indica una alta concentración de enzima inmovilizada en la superficie del electrodo.

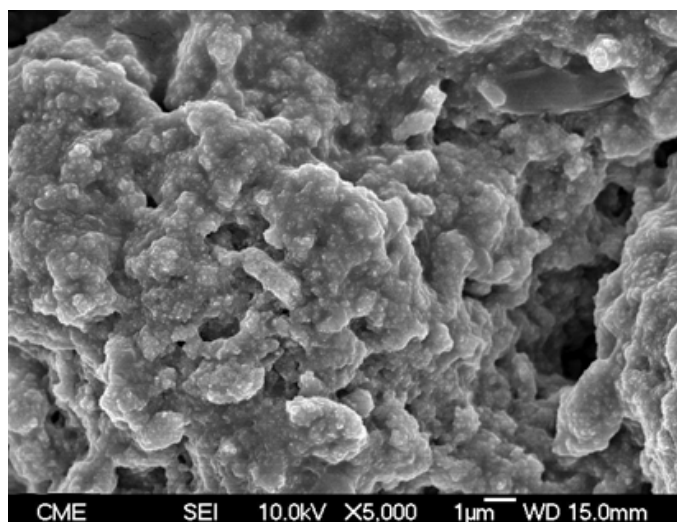


Figura 5.10. Imagen de FE-SEM de Tyr/CMCox-rGO/GCE.

Las distintas etapas del proceso de modificación de la superficie electródica se estudiaron mediante espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) y voltamperometría cíclica (CV) utilizando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ como par redox. En la **Figura 5.11** se comparan los gráficos de Nyquist correspondientes al biosensor Tyr/CMCox-rGO/GCE con los del electrodo CMCox-rGO/GCE y electrodo sin modificar.

El recubrimiento del electrodo con el nanomaterial híbrido provocó un aumento en la resistencia a la transferencia de carga ($R_{\text{TC}} = 7779 \Omega$) lo que se observa por un aumento en el diámetro del semicírculo en el diagrama de Nyquist con respecto al GCE sin modificar ($R_{\text{TC}} = 843 \Omega$). Este fenómeno se debe a las propiedades no conductoras y al elevado volumen hidrodinámico del CMC hidrocoloidal.

La resistencia a la transferencia de carga aumentó todavía más tras la inmovilización covalente de la enzima ($R_{\text{TC}} = 23300 \Omega$) debido a la mayor dificultad para la reacción electródica al incorporar la enzima a la superficie del electrodo. Estos resultados demuestran que el método utilizado para la preparación del biosensor hace posible una eficiente inmovilización de la enzima sobre la superficie electródica.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

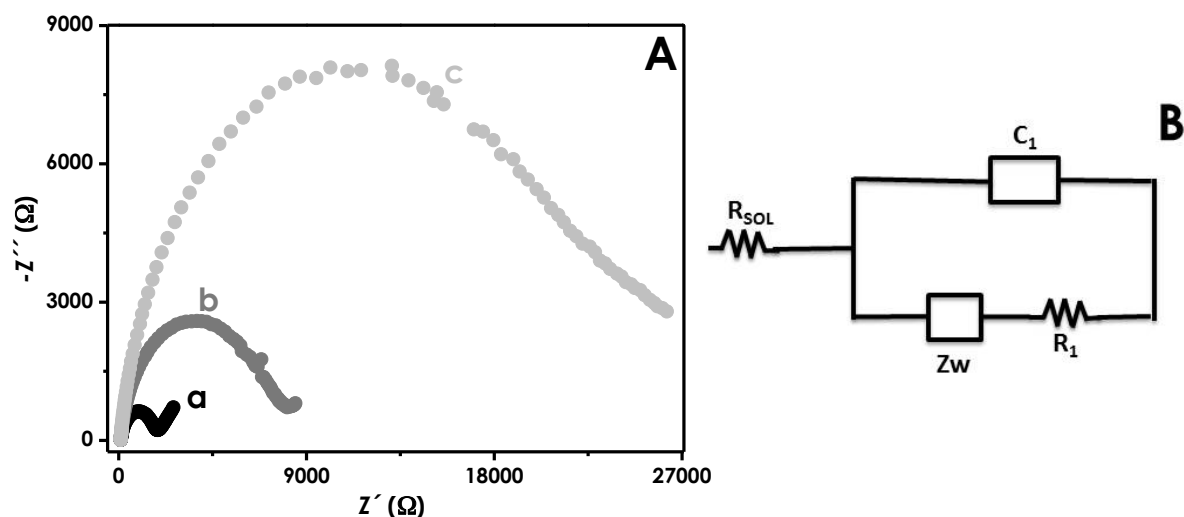


Figura 5.11. (A) Diagramas de Nyquist de (a) GCE, (b) CMCoX-rGO/GCE y (c) Tyr/CMCoX-rGO/GCE. Impedancias registradas en una disolución de KCl 0.1 M conteniendo K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] 5 mM (1:1). (B) Circuito equivalente de Randles.

Como puede observarse en la **Figura 5.12**, el voltamperograma cíclico para el GCE limpio (**Figura 5.12.a**) presenta un comportamiento *quasi* reversible, mostrando un pico catódico y uno anódico bien definidos, con una separación entre ellos de $\Delta E = 230$ mV.

Tras la deposición del híbrido CMCoX-rGO (**Figura 5.12.b**), se observa una disminución de la intensidad de los picos catódico y anódico, así como una mayor separación entre los potenciales de pico ($\Delta E = 390$ mV), debido a la disminución en la conductividad de la superficie electroda. Finalmente la inmovilización de la enzima (**Figura 5.12.c**) da lugar a un voltamperograma cíclico prácticamente irreversible, con señales de oxidación y de reducción de la sonda redox mucho peor definidos, lo que pone de manifiesto una mayor dificultad de la transferencia electrónica que concuerda totalmente con el diagrama de Nyquist de la **Figura 5.11.c**. Este hecho puede atribuirse a la capa aislante de proteína que dificulta el acceso de la sonda redox en disolución a la superficie del electrodo.

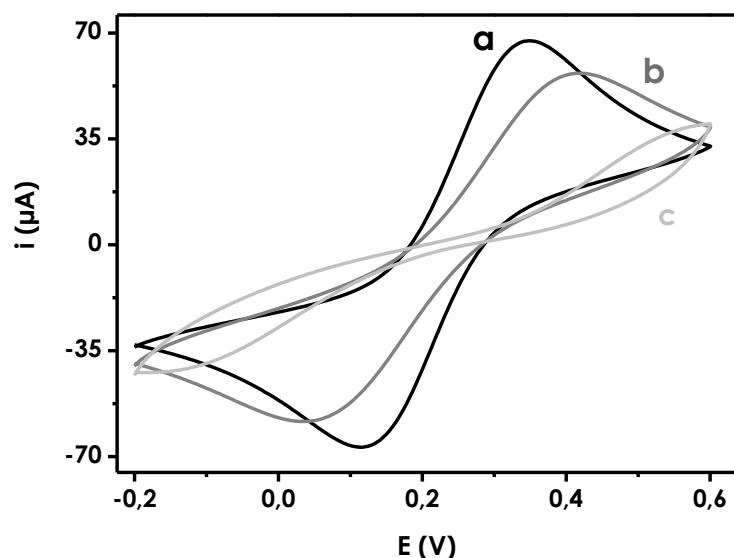


Figura 5.12. Voltamperogramas cíclicos sobre (a) GCE, (b) CMCoX-rGO/GCE y (c) Tyr/CMCoX-rGO/GCE empleando una disolución de KCl 0.1 M conteniendo $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 5 mM (1:1) a una velocidad de barrido de 50 mV/s.

Tras caracterizar la superficie de la plataforma biosensora, se evaluó su actividad electroquímica empleando catecol como sustrato enzimático modelo, según la reacción que se muestra en la **Figura 5.13**.

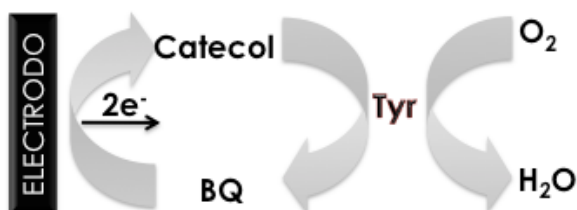


Figura 5.13. Esquema de la reacción enzimática de Tyr frente al sustrato catecol.

El comportamiento del electrodo Tyr/CMCoX-rGO/GCE frente al catecol fue estudiado mediante voltamperometría cíclica realizando medidas en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de catecol en la célula electroquímica. Como se puede observar en la **Figura 5.14**, se obtuvo una corriente catódica a bajos valores de potencial tras la adición del sustrato. Esta corriente está asociada con la reducción electroquímica de la 1,2-benzoquinona formada en la reacción de oxidación del catecol catalizada por la enzima Tyr en la superficie electródica. El pico catódico aumenta con la concentración de catecol, lo que demuestra el éxito de la catálisis enzimática en la transformación del sustrato sobre la superficie electródica modificada con el nanomaterial híbrido de grafeno.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

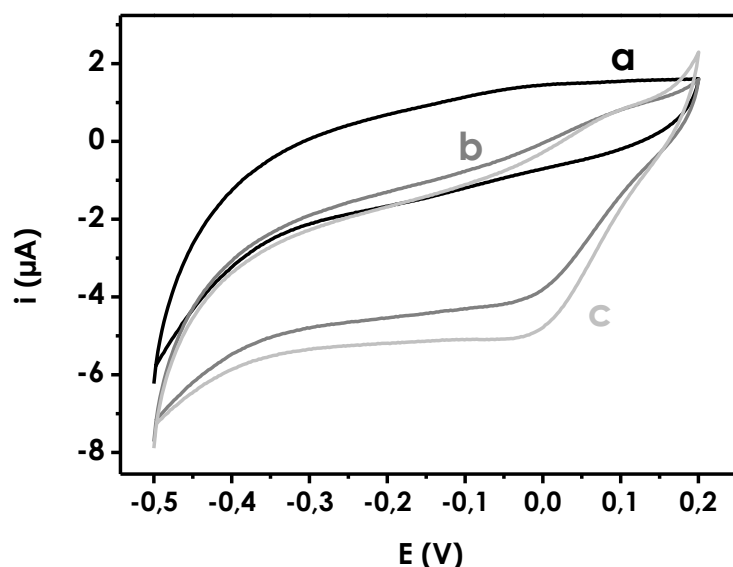


Figura 5.14. Voltamperogramas cíclicos obtenidos a una velocidad de barrido de 50 mV/s con el biosensor Tyr/rGO-CMC/GCE en disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 6.0) (a) en ausencia y en presencia de (b) 5 μM y (c) 10 μM de catecol.

En el caso particular del electrodo modificado con el nanomaterial híbrido, el proceso electroquímico puede estar favorecido por la afinidad del grafeno por compuestos aromáticos e hidrofóbicos tales como la 1,2-benzoquinona, que tiende a acumularse entre las láminas de grafeno, permitiendo una rápida transformación electroquímica. Además, el entorno altamente hidrofílico proporcionado tras la inmovilización del polímero de CMCo_x, permite que las moléculas del compuesto aromático difundan rápidamente hacia zonas más hidrofóbicas de la superficie de grafeno, contribuyendo así a la rápida reducción electroquímica sobre el electrodo modificado.

5.1.3.1.3. Optimización de las variables experimentales

Con el objetivo de obtener la mejor señal analítica, se optimizaron todos los parámetros experimentales involucrados en la construcción del biosensor, así como las condiciones de medida. Las optimizaciones se realizaron teniendo en cuenta la pendiente de los calibrados (m) obtenidos mediante amperometría en disoluciones agitadas en un rango de concentración de catecol entre 500 nM y 2 μM .

a) Optimización de la composición del biosensor

En primer lugar se optimizó la cantidad de CMCo_x-rGO depositado en la superficie del electrodo, observándose un aumento de la pendiente normalizada ($m/m_{\text{máx}}$), midiendo a un potencial de -0.15 V (vs. Ag/AgCl), al aumentar la

cantidad de nanomaterial desde 5 μg a 10 μg . Por el contrario, la pendiente normalizada fue menor para cantidades superiores a 10 μg , hecho que puede atribuirse a la baja estabilidad de la capa de nanomaterial. Por ello, se empleó una cantidad de nanomaterial de 10 μg para modificar la superficie electródica para estudios posteriores.

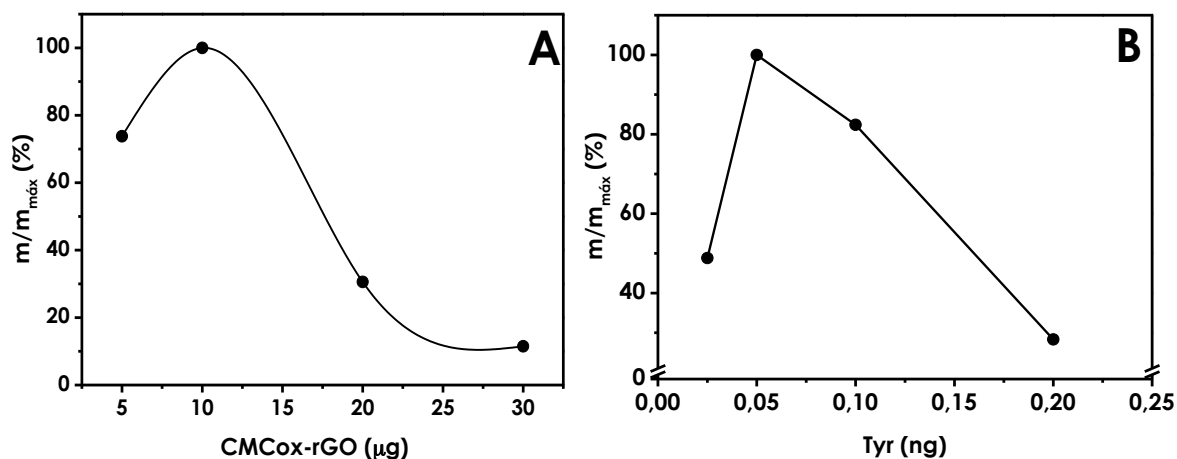


Figura 5.15. Influencia de la cantidad de (A) CMCoX-rGO y de (B) enzima, en las pendientes normalizadas de los calibrados de catecol en disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 6.0) $E_{\text{ap}} = -0.15$ V vs. Ag/AgCl).

El efecto de la cantidad de proteína inmovilizada en la superficie del electrodo también fue estudiado. Para ello, se procedió a evaluar la sensibilidad obtenida empleando diferentes biosensores fabricados con distintas cantidades de Tyr, comprendidas entre 25 y 200 ng. Se obtuvieron mayores pendientes normalizadas cuando se inmovilizaron 50 ng de proteína en la superficie electródica. Para mayores cantidades de enzima, dichas pendientes disminuyeron debido al bloqueo de la superficie electródica lo que impide una buena transferencia electrónica (**Figura 5.15**).

b) Selección del potencial aplicado

La elección del potencial de trabajo óptimo para el biosensor se llevó a cabo a partir de la representación de la pendiente normalizada de los calibrados ($m/m_{\text{máx}}$) construidos para catecol en el intervalo de concentraciones entre 500 nM y 2 μM en una disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 6.0, frente a diferentes valores del potencial aplicado, en el intervalo comprendido entre -0.2 y 0.1 V (**Figura 5.16**).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

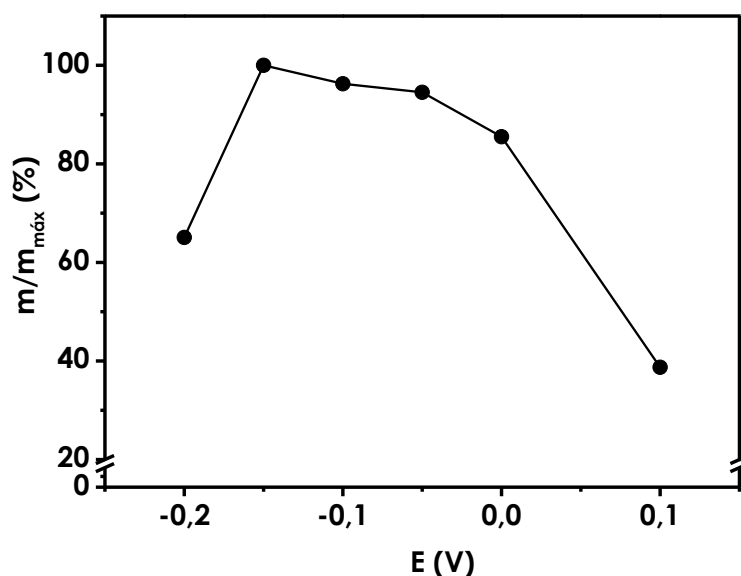


Figura 5.16. Efecto de la variación de la pendiente normalizada de los calibrados para el catecol en disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 6.0) con el potencial aplicado al biosensor de Tyr/CMCox-rGO/GCE.

Como puede observarse, se produce un aumento de la pendiente normalizada al variar el potencial hacia valores negativos, hasta -0.15 V, valor a partir del cual disminuye dicha pendiente. Además, se observó que tanto la corriente de fondo como el tiempo necesario para la estabilización de la línea base aumentaban a medida que el potencial se hacía más negativo, obteniéndose señales con más ruido y por tanto de peor calidad.

Con objeto de conseguir una detección sensible a los valores de potencial menos extremos posible y así minimizar el número de posibles interferentes capaces de reducirse sobre la superficie del electrodo, se seleccionó un potencial de medida de -0.15 V (vs Ag/AgCl).

c) Influencia del pH del medio de medida

La actividad de las enzimas depende en gran medida de la concentración de protones del medio, lo que afecta al grado de ionización de los aminoácidos del sitio activo, del sustrato, o del complejo enzima-sustrato; todo esto llega a influir en la afinidad que tenga la enzima por el sustrato.

Por esta razón, todas las enzimas presentan una máxima actividad catalítica a un cierto valor óptimo de pH, en un intervalo de 5 a 8 (a excepción de la pepsina del estómago, que tiene un pH óptimo de 1.8). Los valores extremos de pH causan la inactivación de las enzimas ya que se induce su desnaturalización [Badui, 1999].

Se estudió la influencia del pH sobre la pendiente normalizada de los calibrados para el catecol mediante amperometría en disoluciones agitadas en

estado estacionario en el intervalo de concentración entre 500 nM y 2 μ M. Para ello se han empleado disoluciones reguladoras de fosfato 0.1 M en el intervalo comprendido entre 5.0 y 7.5 (**Figura 5.17**).

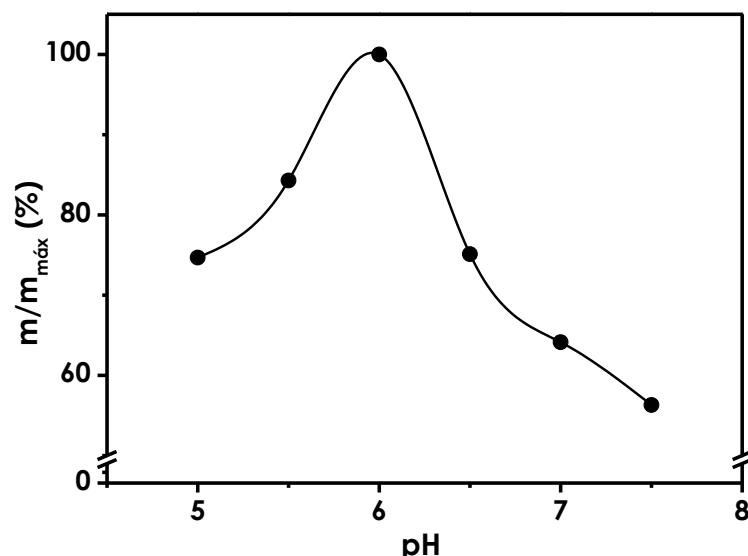


Figura 5.17. Variación de la pendiente normalizada de los calibrados de catecol con el pH del medio de medida para el biosensor de Tyr/CMCox-rGO/GCE en disolución reguladora de fosfato 0.1 M; $E_{cp} = -0.15$ V (vs Ag/AgCl).

Como se puede observar, se obtiene un valor máximo de pendiente normalizada ($m/m_{máx}$) para un valor de pH de 6.0. Para valores de pH inferiores y superiores a éste, se produjo una acusada disminución de dicha pendiente, como consecuencia de la pérdida de la actividad enzimática. Los resultados obtenidos están de acuerdo con el pH óptimo descrito en la bibliografía para la tirosinasa en disolución de 6.5 [Ortega, 1994].

De acuerdo con estos resultados, se seleccionó tampón fosfato 0.1 M de pH 6.0 para estudios posteriores.

5.1.3.1.4. Características analíticas del biosensor

En las condiciones experimentales seleccionadas y empleando amperometría en disoluciones agitadas, se obtuvieron curvas de calibrado para catecol en el intervalo de concentración comprendido entre 20 nM y 109 μ M. En la **Figura 5.18** se ha representado la variación de la corriente medida tras sucesivas adiciones de catecol. El biosensor presenta una respuesta rápida tras la adición del sustrato, obteniéndose el 95% de la corriente en el estado estacionario solo 5 segundos después de la adición del analito.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

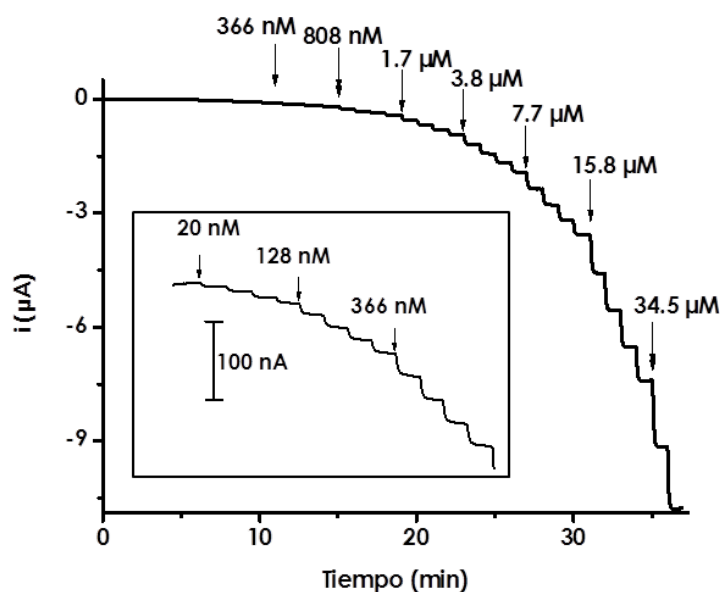


Figura 5.18. Curva de intensidad-tiempo obtenida con el biosensor Tyr/CMCox-rGO/GCE para adiciones sucesivas de catecol en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 6.0, $E_{ap} = -0.15$ V vs Ag/AgCl.

El intervalo lineal se estimó mediante regresión por mínimos cuadrados, considerando que no existe desviación de la linealidad cuando el coeficiente de correlación (r) es mayor o igual de 0.998. Así resultó un calibrado lineal para el catecol (**Figura 5.19**) en el intervalo de concentración comprendido entre 20 nM y 56 μ M ($r = 0.999$), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$i \text{ (mA)} = 270 \cdot [\text{Catecol}] \text{ (M)} + 3 \cdot 10^{-7} \quad \text{Ecuación 5.1}$$

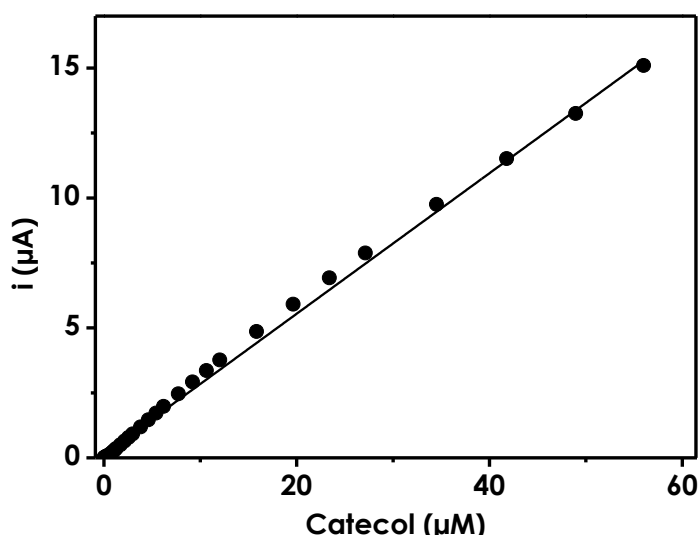


Figura 5.19. Curva de calibrado obtenida para la detección amperométrica de catecol empleando el biosensor Tyr/CMCox-rGO/GCE en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 6.0, $E_{ap} = -0.15$ V vs Ag/AgCl.

El intervalo lineal obtenido fue más amplio que los reportados previamente en la bibliografía para otros biosensores de tirosinasa [Ameer, 2009], [Apetrei, 2011], [Díez, 2012], [Rajesh, 2004b], [Villalonga, 2012].

Además, el biosensor presentó una elevada sensibilidad para catecol, con un valor de pendiente del calibrado de 270 mA/M, el cual es notablemente mayor a los encontrados en la bibliografía [Apetrei, 2011], [Campuzano, 2003], [Chen, 2008], [Rajesh, 2004b], [Villalonga, 2012].

El límite de detección alcanzado con el biosensor fue de 0.2 nM, valor calculado como se explica en el apartado 4.5.1, siendo la desviación estándar (S_b) la correspondiente a 10 señales amperométricas para catecol 20 nM. Este valor es inferior a los obtenidos para otros biosensores encontrados en la bibliografía [Ameer, 2009], [Apetrei, 2011], [Campuzano, 2003], [Chen, 2008], [Rajesh, 2004b], [Villalonga, 2012], [Wang, 2008].

En la siguiente tabla se recogen los resultados obtenidos para otros biosensores descritos en la bibliografía (Tabla 5.1)

Tabla 5.1. Comparación de los parámetros analíticos de biosensores de Tyr

ELECTRODO	SENSIBILIDAD, mA/M	INTERVALO LINEAL, μ M	LD, nM	REFERENCIA
Tyr/PAMAM-AuNPs/AuE	19	0.05–10	20	[Villalonga, 2012]
Tyr/Fe ₃ O ₄ @APTES-CD/CPE	12	0.1–12	22	[Díez, 2012]
Tyr/Ppy/PtE	–	1.0–16	1000	[Ameer, 2009]
Tyr/PAPCP/ITO	3.46	5.6–74.3	1500	[Rajesh, 2004b]
Tyr/PO ₄ -Ppy/PtE	47	10–120	840	[Apetrei, 2011]
Tyr/ZnO-NRs/GCE	2.14	10–400	4000	[Chen, 2008]
Tyr/MPA/AuE	34.2	0.2–1000	110	[Campuzano, 2003]
Tyr/Fe ₃ O ₄ NPs/Cs/GCE	514	0.083–70	25	[Wang, 2008]

Abreviaturas: @: Recubrimiento; AuE: Electrodo de Au; APTES: Aminopropiltriétoxilano; AuNPs: Nanopartículas de Au; CD: Ciclodextrina; CPE: Electrodo de pasta de carbono; Cs: Quitosano; Fe₃O₄NPs: Nanopartículas de ferrita; GCE: Electrodo de carbono vitrificado; ITO: Óxido de indio y estaño; MPA: Ácido mercaptopropiónico; PAMAM: Dendrímico de poliamidoamina; PAPCP: poli(N-3-aminopropil pirrol-co-pirrol); Ppy: Polipirrol; PtE: Electrodo de Pt; Tyr: Tirosinasa; ZnO-NRs: Nanorods de ZnO.

Uno de los aspectos más importantes que hay que estudiar cuando se desarrolla un biosensor electroquímico es su capacidad de proporcionar medidas reproducibles en las distintas condiciones posibles de operación. Para ello, se han evaluado tres aspectos relacionados:

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Repetibilidad de las medidas llevadas a cabo con un mismo biosensor.
- Reproducibilidad de las medidas efectuadas con biosensores distintos.
- Tiempo de vida útil.

a) Repetibilidad de las medidas

Para estudiar la repetibilidad entre medidas, se construyeron 10 calibrados sucesivos para catecol en el intervalo de concentración de 100 a 400 nM empleando el mismo biosensor. Considerando el valor medio y la desviación estándar de los valores obtenidos para la pendiente de dichos calibrados, resulta un valor de desviación estándar relativa (R.S.D.) de 2.7%. Este valor, inferior al 10%, refleja la buena repetibilidad de las medidas llevadas a cabo con el biosensor sin necesidad de aplicar ningún proceso de pretratamiento o limpieza entre ellas.

b) Reproducibilidad en la fabricación del biosensor

La reproducibilidad de las señales analíticas obtenidas con diferentes biosensores contruidos de la misma manera, es un aspecto esencial a evaluar con objeto de asegurar la utilidad práctica de este diseño.

Se compararon los valores de medidas independientes para catecol 1 μM , empleando 10 biosensores diferentes preparados siguiendo el mismo protocolo de trabajo. El valor obtenido de R.S.D. calculado fue de 9.1%, indicando una aceptable reproducibilidad y fiabilidad del procedimiento de fabricación del biosensor.

c) Tiempo de vida útil del biosensor

Los biosensores pueden clasificarse en desechables, con los que sólo es posible realizar una medida, y biosensores reutilizables, diseñados para llevar a cabo varias medidas. El biosensor desarrollado en este trabajo pertenece al segundo grupo, por lo que, con vistas a un ahorro de tiempo y costes, es importante saber cuánto tiempo puede funcionar proporcionando señales reproducibles.

Para llevar a cabo este estudio se fabricaron varios biosensores y se almacenaron en atmósfera seca a 4 °C. Los biosensores mostraron una completa capacidad electroanalítica tras una semana almacenado en las condiciones ya indicadas. Este hecho puede deberse al entrecruzamiento de las moléculas de

proteína con las cadenas del polisacárido y al entorno hidrofílico causado por las moléculas de CMC en la estructura tridimensional activa de la enzima.

5.1.3.1.5. Cinética de la reacción enzimática

El cálculo de los parámetros cinéticos se llevó a cabo registrando los correspondientes amperogramas en disoluciones agitadas en un rango de concentración de catecol comprendido entre 5.4 M y 109 μM . En la **Figura 5.20** se muestra la representación de la inversa de la corriente medida en el estado estacionario frente a la inversa de la concentración de sustrato en el medio de trabajo.

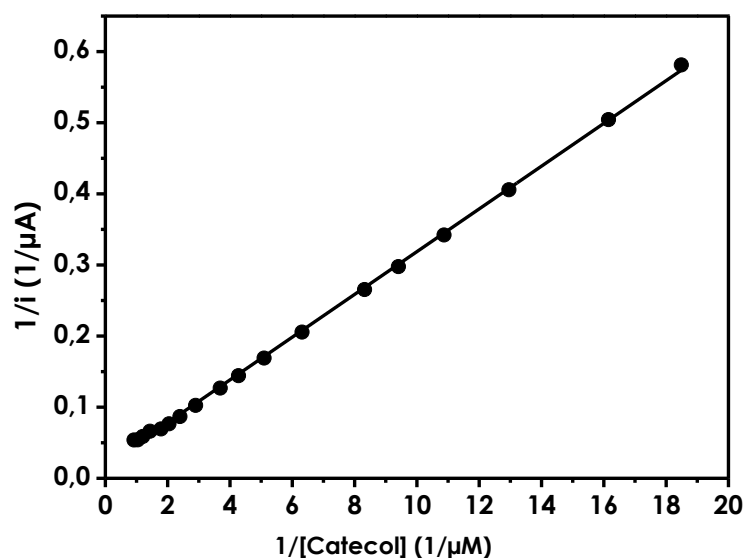


Figura 5.20. Representación de la ecuación de Lineweaver-Burk obtenida para catecol en disolución reguladora de fosfato 0.1M (pH 6.0) con el biosensor Tyr/CMCox-rGO/GCE, $E_{ap} = -0.15 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl).

La constante cinética aparente para la transformación catalítica de catecol en 1,2-benzohidroquinona en la superficie electródica nanoestructurada, se determinó mediante la ecuación de Lineweaver-Burk tal y como se explica en el **apartado 4.5.2**, obteniéndose un valor de $i_{m\acute{a}x}$ de 0.8 mA y una K_M^{ap} de 2.5 mM. El valor obtenido para la constante aparente es aproximadamente 100 veces menor que el reportado para la enzima libre (240 mM) [Smith, 1962] lo que sugiere un microentorno favorable de la biomolécula tras su inmovilización en el nanomaterial híbrido CMCox-rGO, lo que se traduce en una elevada afinidad de la enzima por el sustrato.

A pesar del hecho de que la CMC es un polímero no conductor y que el recubrimiento del electrodo con dicho polímero provoca un aumento de la

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

resistencia a la transferencia electrónica, el biosensor amperométrico mostró unas excelentes características analíticas. Esto puede justificarse por la amplificación de la respuesta amperométrica inducida por los ciclos sucesivos de oxidación enzimática del catecol y la reducción electroquímica de la quinona [Cosnier, 1999].

Sin embargo, un gran inconveniente inherente a los biosensores basados en la tirosinasa es la inactivación de la enzima por la o-quinona generada. En este material, el entrecruzamiento de las moléculas de enzima con las cadenas hidrofílicas de CMC debe conferir estabilidad estructural a la tirosinasa evitando la modificación y consiguiente inactivación por parte de la molécula generada en la reacción. También cabe destacar que la estructura plana de GO y la cobertura parcial con moléculas APTES deben asegurar la unión controlada de las cadenas de CMC, produciendo de ese modo derivados con contenido relativamente bajo de polisacárido tal y como sugiere el estudio termogravimétrico. Por tanto, dicha composición debe favorecer la difusión y la rápida reducción de las moléculas de 1,2-benzoquinona en la superficie del electrodo.

5.1.3.2. BIOSENSOR DE DNA c_{pp53}/CMCox-rGO/SPCE PARA LA DETECCIÓN DEL GEN p53

El nanomaterial híbrido CMCox-rGO se ha utilizado para modificar la superficie de electrodos serigrafados de carbono (SPCEs) e inmovilizar posteriormente dos sondas de captura de DNA con diferentes longitudes (20 bases, sc_{pp53} y 33 bases, lc_{pp53}). Estas plataformas se utilizaron para la determinación directa de la secuencia genética *TP53* que, como se ha explicado en el **apartado 3.3.2**, es un importante biomarcador de cáncer. Empleando las bioplataformas desarrolladas fue posible diferenciar entre secuencias de DNA sanas y secuencias que contienen una mutación, incluso utilizando muestras biológicas complejas.

En la **Tabla 5.2** se recogen las secuencias de las sondas de DNA empleadas. Las sondas de captura se modificaron en el extremo 3' con un modificador C7-amino (AmC7), gracias a lo cual fue posible su inmovilización sobre material de grafeno y en el 5' con biotina (Btn), que se utilizó para llevar a cabo la detección electroquímica empleando el conjugado Strep-HRP.

Tabla 5.2. Oligonucleótidos empleados en el desarrollo del genosensor

Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')
Sonda de captura larga (lcpp53)	5'-[Btñ]GAG GTC ATG GTG GGG GCA GCG CCT CAC AAC CTC[AmC7]-3'
Sonda de captura corta (scpp53)	5'-[Btñ]GT TGT GCA GCG CCT CAC AAC[AmC7]-3'
Sonda diana (TP53)	5'-GAG GTT GTG AGG CGC TGC CCC CAC CAT G-3'
Sonda con base desapareada (1-mTP53)	5'-GAG GTT GTG AGG C <u>A</u> C TGC CCC CAC CAT G-3'

La secuencia de la sonda diana se corresponde con una región del gen en estado natural (wtTP53) y la secuencia del genotipo TP53 mutado contiene una única mutación (SNP) en el codón 175 (exón 5) que consiste en el cambio de una guanina por una adenina (G →A). Esta mutación produce la inactivación de la proteína supresora del tumor (proteína p53) que es la responsable de la regulación del ciclo celular [Farjami, 2011].

5.1.3.2.1. Preparación de los genosensores

Tras recubrir la superficie del SPCE con el nanomaterial CMCox-rGO se activaron los grupos carboxílicos utilizando EDC/sulfo-NHS y posteriormente se inmovilizó covalentemente la sonda de captura correspondiente en su forma plegada a través del grupo amino del extremo 3'. Una vez llevada a cabo la etapa de hibridación de las sondas de DNA diana, se incubó el electrodo con el conjugado enzimático Strep-HRP para llevar a cabo la detección amperométrica empleando H₂O₂ como sustrato enzimático y TMB como mediador redox. (Figura 5.21).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

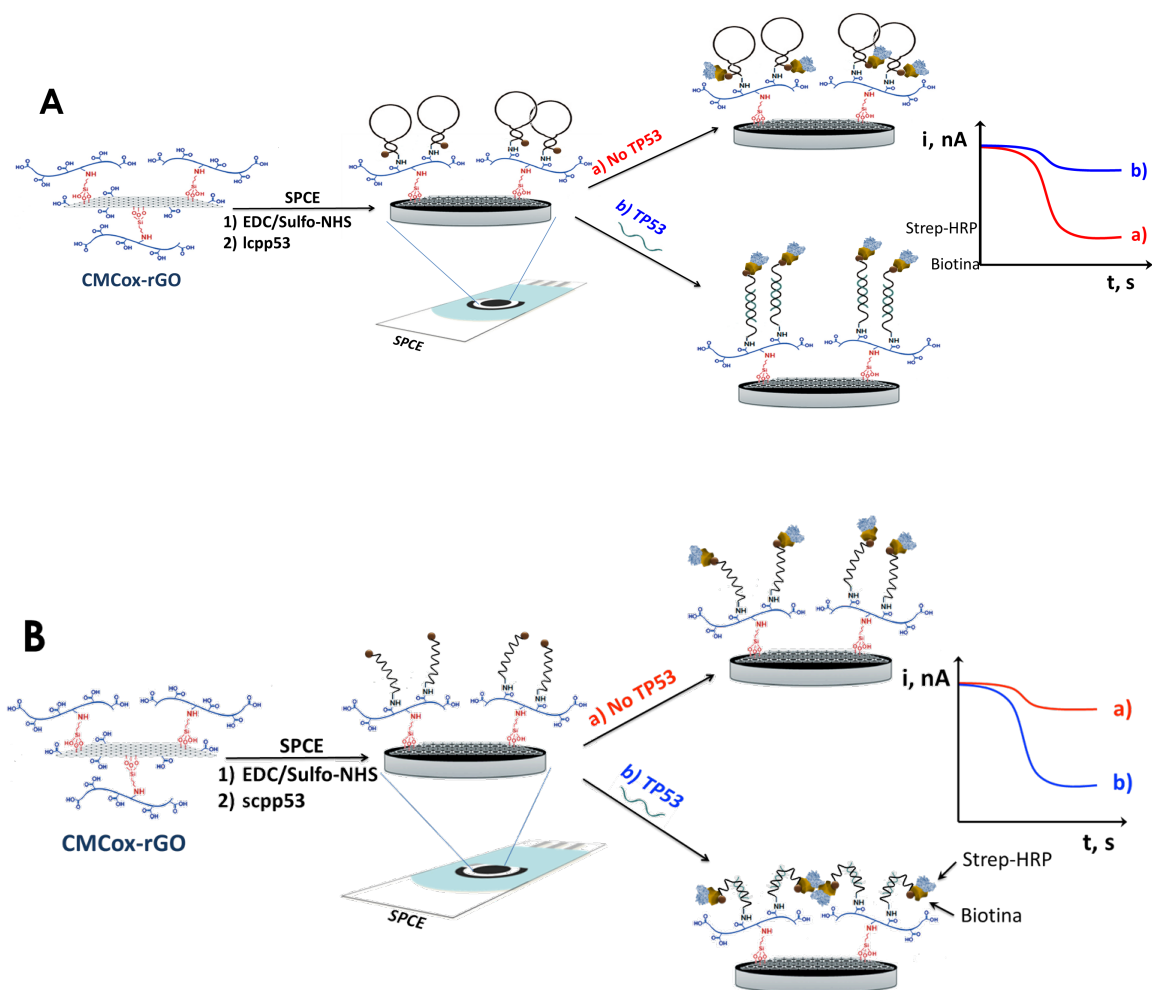


Figura 5.21. Representación esquemática de las etapas involucradas en la preparación del biosensor electroquímico de DNA para la detección de TP53 empleando el nanomaterial híbrido CMCox-rGO sobre SPCE y dos sondas de captura diferentes: **(A)** larga (lcpp53) y **(B)** corta (scpp53) y empleando el marcaje Strep-HRP para realizar la detección electroquímica.

Tras la hibridación de la sonda diana con la sonda de captura larga (lcpp53) se observó un cambio "on-off" en la señal electroquímica medida, como consecuencia del incremento considerable de la distancia entre el conjugado enzimático Strep-HRP y la superficie electródica, dificultando la transferencia electrónica. Por el contrario, empleando la sonda de captura corta (scpp53), la respuesta electroquímica fue de tipo "off-on", debido probablemente, a la menor dificultad en la transferencia de electrones hacia la superficie atribuible a la reducción de efecto estérico como consecuencia de una menor longitud de cadena.

Como se muestra en la **Figura 5.22**, las plataformas biosensoras desarrolladas presentan respuestas amperométricas antes y después de la hibridación de la sonda diana de DNA, lo que concuerda con el comportamiento observado

previamente con sondas de captura tioladas y marcadas con azul de metileno (MB) [Fajarmi, 2011].

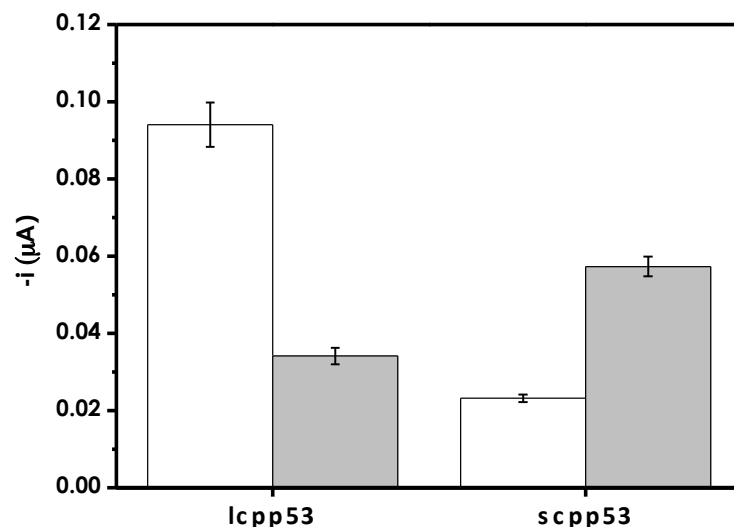


Figura 5.22. Respuestas amperométricas obtenidas con las plataformas electroquímicas desarrolladas antes (barras blancas) y después (barras grises) de la hibridación con la sonda diana *TP53* a un nivel de concentración de 100 nM en disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 7.0). $E_{ap} = -0.10$ V vs. Ag.

Se comparó la respuesta amperométrica obtenida empleando ambas plataformas biosensoras con la registrada en experimentos control, en los que solo uno de los pasos de la preparación fue omitido cada vez (**Tabla 5.3**). Se observó que no existían diferencias en las medidas amperométricas obtenidas en ausencia (i_0) o en presencia ($i_{0.1}$) de la sonda diana sintética *TP53*, a un nivel de concentración de 100 nM, cuando se inmoviliza la sonda de captura en la superficie del SPCE sin modificar, cuando se inmoviliza la sonda de captura sobre la superficie electródica nanoestructurada pero no activada o cuando no se inmoviliza ninguna sonda de captura en la superficie electródica nanoestructurada y activada. De este modo se demostró que ni la sonda diana ni el marcador enzimático, se absorbían inespecíficamente en ninguno de los tres casos estudiados.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 5.3. Relación de los valores de corriente medidos en ausencia (blanco, i_0) y presencia de 100 nM (señal, $i_{0.1}$) de la sonda diana sintética TP53 en las diferentes plataformas sensoras desarrolladas.

Electrodo control	scpp53	lcpp53
	$i_{0.1}/i_0$	$i_0/i_{0.1}$
CMCox-rGO/SPCEs + EDC/Sulfo-NHS + cp	3.0	3.2
SPCEs + EDC/Sulfo-NHS + cp (No CMCox-rGO)	1.0	1.1
CMCox-rGO/SPCEs + cp (No EDC/Sulfo-NHS)	0.9	0.9
rGO-CMCox/SPCEs + EDC/Sulfo-NHS (No cp)	1.1	1.0

También se comparó el comportamiento electroquímico de los genosensores fabricados con el material híbrido CMCox-rGO con biosensores fabricados modificando la superficie electródica con rGO o nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs). Los resultados obtenidos cuando se empleó la sonda de captura scpp53 (**Figura 5.23**) muestran que la respuesta amperométrica obtenida con los CMCox-rGO/SPCEs es considerablemente mayor que la registrada sobre rGO/SPCEs o MWCNTs/SPCEs, lo que pone de manifiesto las ventajas únicas de CMCox-rGO/SPCEs como una nueva plataforma para la preparación de biosensores electroquímicos de DNA. Este incremento en la respuesta amperométrica puede atribuirse a que el nanomaterial funcionalizado con el que se ha modificado la superficie electródica permite incrementar considerablemente la cantidad de sonda de captura inmovilizada, como consecuencia del gran número de grupos carboxílicos superficiales que presenta el material, dejando espacio suficiente para que la hibridación del DNA sea óptima [Wu, 2010].

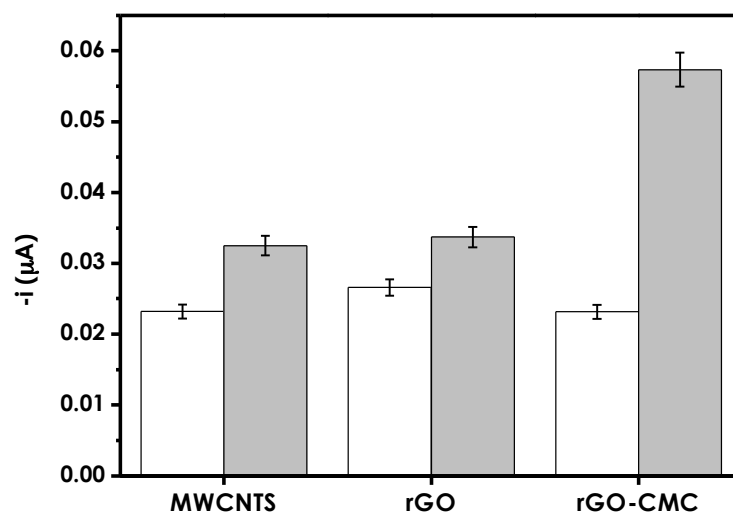


Figura 5.23. Comparación de la eficiencia del proceso de hibridación (barras grises) y las señales de los blancos (barras blancas) para 100 nM de *TP53* en presencia de la sonda de captura *scpp53* inmovilizada en CMCoX-rGO/SPCEs, rGO/SPCEs o MWCNTs/SPCEs. Las medidas se han realizado a un potencial de -0.10 V (vs. Ag) empleando una disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 7.0).

5.1.3.2.2. Optimización de las variables experimentales

Se optimizaron todas las variables experimentales implicadas en la preparación y funcionamiento de ambas plataformas genosensoras, tomando como valores óptimos aquellos que proporcionaron una mejor relación entre las respuestas amperométricas obtenidas en presencia (señal, $i_{0,1}$) y en ausencia (blanco i_0) de la sonda diana sintética *TP53* empleando una concentración de 0.1 μM. Para simplificar, y habida cuenta de las diferentes señales producidas con ambas sondas de captura, los valores de la relación $i_0/i_{0,1}$ e $i_{0,1}/i_0$ se utilizaron para evaluar los resultados obtenidos con las sondas *lcpp53* y *scpp53*, respectivamente. La concentración de sonda diana fue elegida porque permitía obtener una señal de corriente que difería significativamente de la del blanco con ambas plataformas biosensoras.

El potencial de detección (-0.10 V frente a un electrodo de pseudoreferencia de Ag) y el volumen de la mezcla TMB/H₂O₂ (5 μL) que se han utilizado fueron los mismos que los optimizados anteriormente en el grupo de investigación utilizando el mismo sistema de detección electroquímico [Esteban-Fernández de Ávila, 2013].

a) Optimización de la cantidad de nanomaterial

La optimización de la cantidad de CMCoX-rGO inmovilizada en la superficie electródica se llevó a cabo utilizando la sonda de captura corta. Como se puede observar en la **Figura 5.24**, se producía un aumento de la relación de intensidad de

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

corriente al aumentar la cantidad de nanomaterial desde 0 μg a 5 μg , apreciándose una notable disminución de la misma para cantidades superiores a este valor, lo que puede atribuirse a la baja estabilidad de la capa de nanomaterial en estas condiciones. En vista de estos resultados, se seleccionó la cantidad de 5 μg de CMCo x -rGO para estudios posteriores.

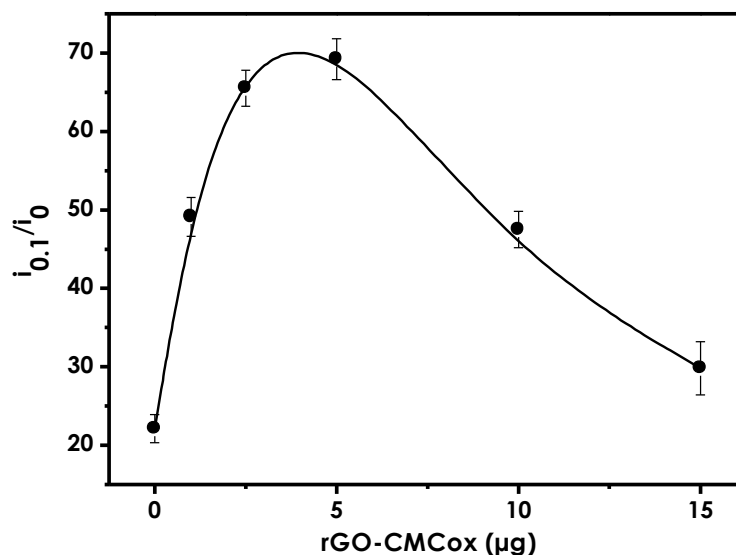


Figura 5.24. Influencia de la cantidad de nanomaterial inmovilizado en la superficie electródica sobre la relación de intensidades entre la señal amperométrica medida en presencia y ausencia de la sonda TP53 diana. Las medidas se han realizado a un potencial de -0.10 V (vs. Ag) empleando una disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 7.0).

b) Optimización de la concentración de las sondas de captura

La cantidad de sonda de captura inmovilizada sobre la superficie nanoestructurada CMCo x -rGO/SPCEs adquiere una gran importancia en la preparación del genosensor ya que afecta en gran medida al funcionamiento del mismo [Loaiza, 2007].

Con el fin de optimizar esta variable, se estudió la dependencia de las respuestas amperométricas proporcionadas por el genosensor cuando se inmovilizaban distintas cantidades de sonda de captura, llevándose a cabo el estudio en un intervalo de concentraciones comprendido entre 0 y 0.5 μM en el caso de la sonda de captura scpp53 y entre 0 y 25 μM para la sonda de captura lcpp53. Tal y como puede observarse en la **Figura 5.25.a**, el aumento de la concentración de sonda de captura lcpp53 produjo un aumento de la relación señal-blanco hasta un valor de 10 μM , a partir del cual se observaba una disminución de la misma, debido probablemente, a que el exceso de sonda de captura sobre la superficie obstaculizaba la hibridación por impedimento estérico.

Teniendo en cuenta que la mejor relación entre la señal y el blanco se obtuvo para una concentración de la sonda de captura lcpp53 de 10 μM , se seleccionó esta concentración para estudios posteriores.

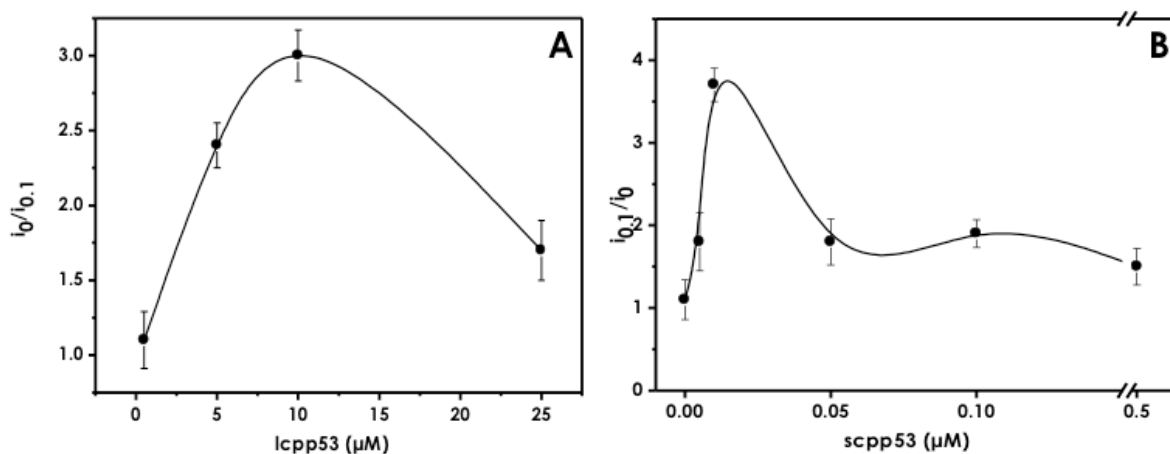


Figura 5.25. Influencia de la concentración de la sonda de captura (A) larga lcpp53 y (B) corta scpp53 inmovilizada en la superficie electródica sobre la relación de intensidades entre la señal amperométrica medida en presencia y ausencia de la sonda diana TP53. Condiciones experimentales: E_{ap} : -0.10 V (vaga), electrolito soporte: disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 7.0).

Un comportamiento similar se observó para la sonda de captura corta (scpp53) (Figura 5.25.b). En este caso la mejor relación de intensidades se obtuvo empleando una concentración de sonda de captura de 0.01 μM .

Los resultados concuerdan con resultados publicados previamente, en los que se reportaba una baja eficiencia de hibridación cuando se empleaban elevadas concentraciones de sonda de captura [Steel, 1998], [Huang, 2001], [Fayazfar, 2014].

Las diferencias en la concentración óptima de la sonda de captura pueden atribuirse al diferente empaquetamiento adoptado sobre una superficie, dependiendo de la longitud de la cadena. Las sondas más cortas de 24 bases tienen una tendencia a organizarse en configuraciones altamente extendidas para las que el recubrimiento superficial es altamente independiente de la longitud del oligonucleótido. Por el contrario, las sondas más largas (> de 24 bases) se organizan en empaquetamientos menos ordenados y más flexibles, supuestamente reflejando un comportamiento cada vez más polimérico en el que el recubrimiento disminuye notablemente con la longitud de la sonda. Este comportamiento puede explicar porqué se requiere una concentración mucho más alta de lcpp53 (33 pares de bases) para conseguir un recubrimiento eficiente que cuando se usa scpp53 (20 pares de bases). Es importante señalar que una

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

concentración 0.01 μM de lcpp53 no daba lugar a diferencias significativas en la respuesta del biosensor en ausencia o en presencia de 100 nM de TP53 sintético.

c) Optimización del tiempo de inmovilización de las sondas de captura

Otra de las variables estudiadas fue el tiempo necesario para llevar a cabo la inmovilización covalente de las sondas de DNA en la superficie electrónica nanoestructurada.

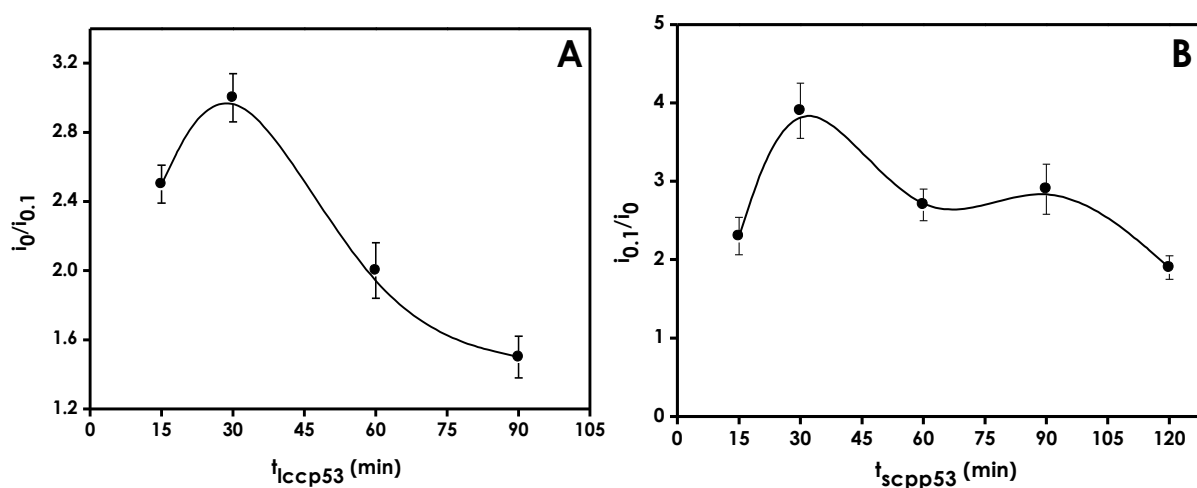


Figura 5.26. Influencia del tiempo de inmovilización de la sonda de captura (A) larga lcpp53 y (B) corta scpp53, sobre la relación de intensidades entre la señal amperométrica medida en presencia y ausencia de la sonda diana TP53. Condiciones experimentales: E_{ap} : -0.10 V (vs. Ag), electrolito soporte: disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 7.0).

Como puede observarse en la **Figura 5.26**, para ambas plataformas sensoras se ha obtenido una mayor relación de intensidad utilizada como señal analítica para un tiempo de inmovilización de 30 minutos.

d) Optimización del tiempo de hibridación

Es sumamente importante el tiempo necesario para que tenga lugar el proceso de hibridación de las dos sondas de DNA. Por lo tanto, se ha estudiado la influencia del tiempo de hibridación en la respuesta amperométrica medida en un intervalo comprendido entre 0 y 90 minutos y entre 15 y 120 minutos para las sondas de captura lcpp53 y scpp53, respectivamente.

Como se muestra en la **Figura 5.27**, la relación máxima de intensidad se obtuvo para un tiempo de hibridación de 15 minutos para la sonda de captura lcpp53, mientras que este proceso requiere un tiempo de 30 minutos en el caso de la plataforma modificada con la sonda de captura scpp53.

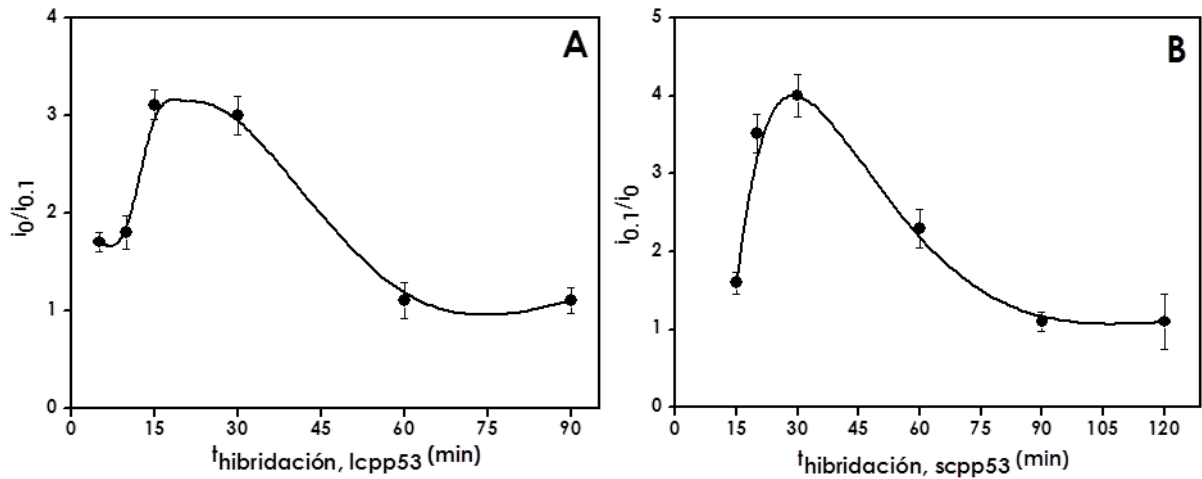


Figura 5.27. Optimización del tiempo de hibridación de la sonda diana *TP53* en la plataforma sensora en la que se inmoviliza la sonda de captura **(A)** larga lcpp53 y **(B)** corta scpp53. Condiciones experimentales: E_{ap} : -0.10 V (vs. Ag), electrolito soporte: disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 7.0).

5.1.3.2.3. Características analíticas del biosensor

Las características analíticas de las plataformas sensoras lcpp53/CMCox-rGO/SPCEs y scpp53/CMCox-rGO/SPCEs fueron evaluadas construyendo curvas de calibrado empleando la sonda diana sintética *TP53* y utilizando las condiciones de trabajo optimizadas en el apartado anterior.

Las curvas de calibrado obtenidas para ambas plataformas se muestran en la **Figura 5.28**, y las características analíticas obtenidas se resumen en la **Tabla 5.4**.

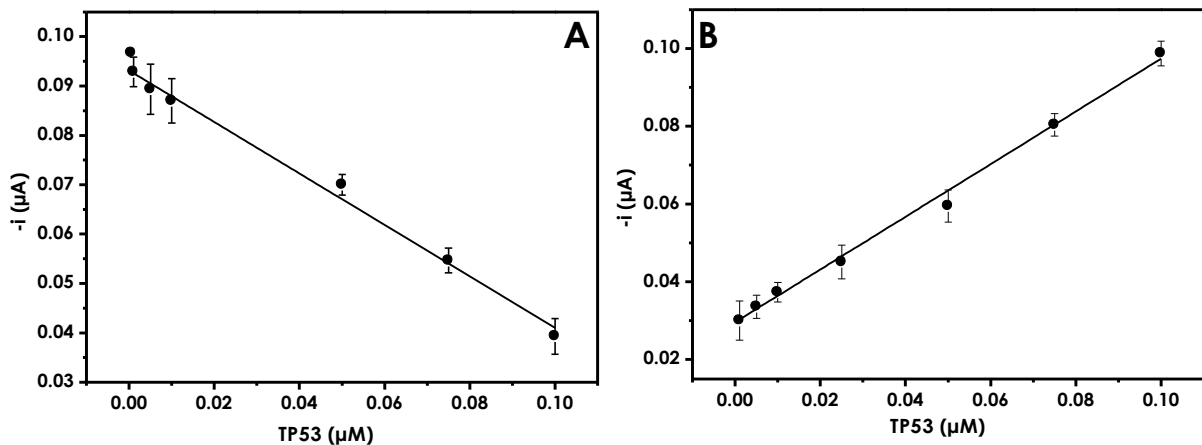


Figura 5.28. Curvas de calibrado obtenidas para la detección del gen p53 empleando la sondas de captura **(A)** larga lcpp53 y **(B)** corta scpp53. Condiciones experimentales: E_{ap} : -0.10 V (vs. Ag), electrolito soporte: disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 7.0).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 5.4. Características analíticas obtenidas en la detección de la sonda diana sintética TP53 empleando las plataformas electroquímicas desarrolladas.

	lcpp53	sccp53
Sensibilidad, $\mu\text{A}/\text{M}$	-0.52	0.68
Ordenada, A	9.31×10^{-8}	2.96×10^{-8}
Intervalo lineal, μM	0.01–0.1	0.01–0.1
r	0.996	0.998
LD, nM	2.9	3.4
LQ, nM	11.2	9.6
RSD_{n=10}, %	6.1	4.3

Los límites de detección se calcularon como se explica en el **apartado 4.5.1**, donde s_b es la desviación estándar de 10 medidas de la señal del blanco y m el valor de la pendiente de la curvas de calibrado. Como puede observarse, se obtuvieron unos límites de detección muy bajos (2.9 y 3.4 nM, lo que corresponde a 29 y 34 fmol en 10 μL de muestra) sin necesidad de emplear ningún sistema de amplificación de la señal medida. Por otro lado, los límites de determinación (LQ) se calcularon de acuerdo al criterio $10 \cdot s_b/m$.

Aunque hay que señalar que los valores de los límites de detección son mayores que algunos encontrados en la bibliografía con otros diseños de sensores electroquímicos, la mayoría de ellos requieren de la utilización de numerosos reactivos complejos y largos protocolos de trabajo que incluyen estrategias de amplificación [Fayazfar, 2014], [Luo, 2013], [Raouf, 2011], [Wang, 2011], [Wang, 2013]. Además, no es necesario el marcaje previo de la sonda diana para llevar a cabo la determinación, lo que constituye asimismo un ventaja práctica muy importante de la metodología implementada.

Por otro lado, empleando las plataformas sensoras desarrolladas, se ha demostrado una gran selectividad como se comenta más adelante. En comparación con los sensores de DNA desarrollados por Fajarmi y colaboradores [Fajarmi, 2011], utilizando sondas de captura tioladas y con la misma secuencia de nucleótidos, las nuevas plataformas desarrolladas en esta Tesis Doctoral, proporcionan una sensibilidad parecida pero una selectividad mucho mayor y en ensayos realizados en un tiempo muchísimo menor (2.5 h frente a 28 h).

a) Reproducibilidad en la fabricación de los genosensores

También se evaluó la reproducibilidad de las respuestas obtenidas con 10 sensores de DNA diferentes contruidos siguiendo el mismo protocolo y para una concentración de sonda diana TP53 de 100 nM. Como se muestra en la **Tabla 5.3**, se obtuvieron valores de la desviación estándar relativa (RSD) de 6.1 y 4.3 % para las plataformas lcpp53/CMCox-rGO/SPCEs y scpp53/CMCox-rGO/SPCEs, respectivamente. Estos resultados confirman que el proceso de fabricación de estos genosensores, incluyendo la inmovilización de la sonda de captura, la hibridación de la sonda diana y el marcaje de la misma, así como las medidas amperométricas fue fiable y reproducible.

b) Tiempo de vida útil de los genosensores

La estabilidad de almacenamiento de los sensores DNA fue estudiada preparando varias plataformas cpp53/CMCox-rGO/SPCEs el mismo día, secándolas y almacenándolas a 4 °C. Periódicamente se controló la respuesta obtenida para concentraciones de sonda diana TP53 de 0 y 100 nM. Se construyeron los correspondientes gráficos de control tomando como valor central la media de las 10 relaciones de intensidades entre la señal y el blanco ($i_0/i_{0.1}$ en el caso de la sonda de captura lcpp53, o $i_{0.1}/i_0$ en el caso de la scpp53) obtenidas en el primer día de estudio. Los límites de control superior e inferior se establecieron para ± 3 veces la desviación estándar de esas 10 medidas (**Figura 5.29.**)

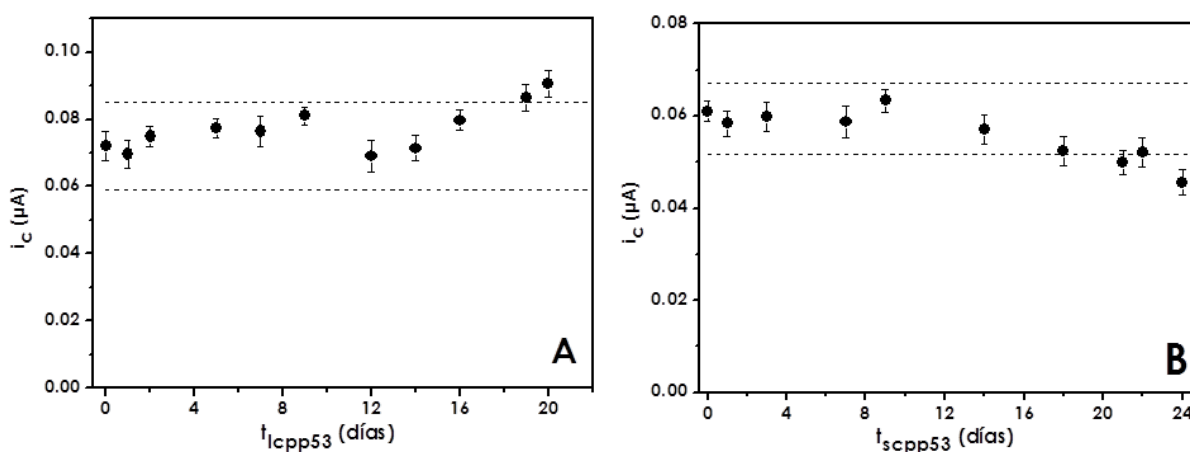


Figura 5.29 Gráficos de control contruidos para evaluar la estabilidad de almacenamiento de las plataformas sensoras (A) lcpp53/CMCox-rGO/SPCEs y (B) scpp53/CMCox-rGO/SPCEs a 4 °C en atmósfera seca. E_{ap} : -0.10 V (vs. Ag), electrolito soporte: disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 7.0).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de las relaciones de intensidades obtenidos para ambas plataformas sensoras se mantienen dentro de los límites de control durante 15 días, lo que demuestra una aceptable estabilidad de almacenamiento de los sensores de DNA preparados.

5.1.3.2.4. Selectividad de los genosensores

La selectividad de las nuevas plataformas fue estudiada llevando a cabo experimentos de control de hibridación para el blanco (en ausencia de sonda de captura), para la sonda diana *TP53* y para la sonda mutada con una base desapareada (1-m $TP53$)

Los resultados obtenidos (**Figura 5.30**) demostraron que no se producía hibridación en presencia de la sonda diana no complementaria (no se muestra por ser una señal que no es significativamente diferente a la del blanco) y que existía una fuerte discriminación entre la hibridación de la sonda diana complementaria *TP53* y la sonda con una base desapareada (1-m $TP53$) cuando se empleaba la plataforma sensora *lcpp53/CMCox-rGO/SPCEs*. Esta discriminación también existió trabajando con la plataforma *scpp53/CMCox-rGO/SPCEs*. En este caso, aunque la señal obtenida para la sonda complementaria no fue tan alta, se obtuvo una señal para la secuencia de DNA mutada que era significativamente diferente de la obtenida en ausencia de sonda de captura (señal del blanco).

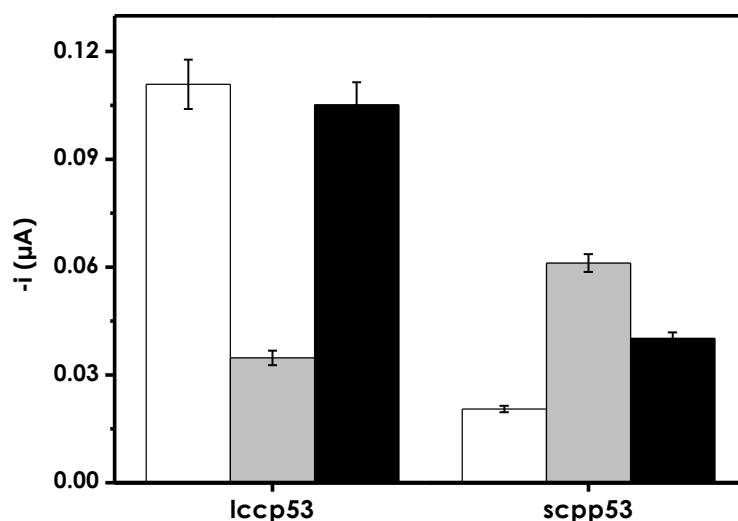


Figura 5.30. Estudio de la selectividad utilizando las plataformas *lcpp53/CMCox-rGO/SPCEs* y *scpp53/CMCox-rGO/SPCEs*. Los valores de corriente fueron medidos en ausencia de sonda de captura (barras blancas), en presencia de 100 nM de la sonda diana *TP53* (barras grises) y en presencia de la secuencia mutada 1-m $TP53$ (barras negras). E_{ap} : -0.10 V (vs. Ag), electrolito soporte: disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 7.0).

De acuerdo con los resultados obtenidos la selectividad que proporcionó el genosensor fabricado con la sonda de captura lcpp53 es mayor que la obtenida cuando se emplea la sonda de captura scpp53, permitiendo una completa discriminación entre *TP53* y 1-*mTP53*. Es importante resaltar que trabajando en las mismas condiciones, se ha podido obtener una discriminación del 65.7 % empleando la sonda de captura scpp53.

Estudios adicionales empleando la sonda de captura corta demostraron que es posible mejorar la discriminación empleando tiempos de hibridación más cortos (**Figura 5.31**), lo que concuerda con los estudios descritos previamente por otros autores [**Fajarmi, 2011**].

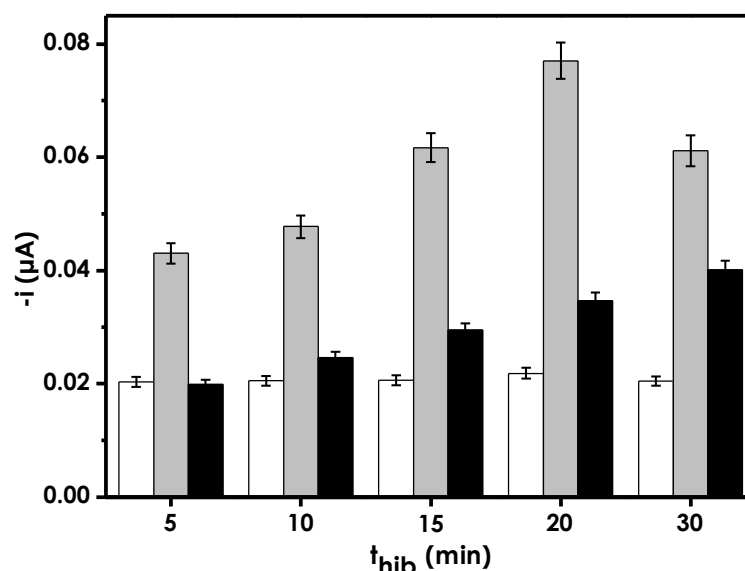


Figura 5.31. Influencia del tiempo de hibridación en la selectividad para la secuencia mutada 1-*mTP53* utilizando la plataforma scpp53/CMCox-rGO/SPCEs en ausencia de sonda de captura (barras blancas), en presencia de 100 nM de sonda diana *TP53* (barras grises) y de 100 nM de sonda mutada 1-*mTP53* (barras negras). E_{ap} : -0.10 V (vs. Ag), electrolito soporte: disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 7.0).

Como se ha mencionado anteriormente, es importante destacar que la discriminación conseguida en este trabajo es mucho mejor que la descrita utilizando la sonda linear *TP53* [**Jiang, 2005**], [**Wilson, 2005**] y también es mejor que la conseguida anteriormente por Fajarmi y colaboradores utilizando la misma sonda diana pero tiolada en el extremo 5' y marcada con azul de metileno en el extremo 3' [**Fajarmi, 2011**]. Por último, también hay que destacar que empleando las plataformas construidas siguiendo la metodología desarrollada, no ha sido necesario ningún proceso de lavado que precisara un control de temperatura ni tiempos de análisis largos.

5.1.3.2.5. Detección electroquímica de la sonda diana sintética TP53 en muestras biológicas complejas

La aplicación del genosensor desarrollado se llevó a cabo realizando la detección en muestras biológicas reales de suero humano y saliva. Éstas son muestras biológicas complejas que contienen numerosos componentes que pueden adsorberse inespecíficamente en la superficie electródica interfiriendo en la hibridación del DNA y/o aumentando la señal de fondo. Puesto que los mejores resultados de selectividad se obtuvieron empleando la sonda de captura lcpp53, solo se realizaron estos estudios utilizando la plataforma lcpp53/CMCox-rGO/SPCEs.

En un primer paso se comparó la respuesta amperométrica obtenida para la detección de la sonda diana TP53 a un nivel de concentración de 100 nM en ambas muestras biológicas con la obtenida en la disolución reguladora de hibridación (PBS con 0.5 % de caseína). Como se puede observar en la **Figura 5.32**, aunque con una menor sensibilidad, es posible medir la sonda diana TP53 a un nivel de concentración de 100 nM con discriminación de una mutación individual en muestras sin tratar de suero y saliva humanos. Estos resultados demuestran que no existe adsorción significativa de los diferentes componentes de ambas matrices biológicas sobre el lcpp53/CMCox-rGO/SPCEs.

Debe destacar que este nuevo sensor ofrece la posibilidad de llevar a cabo la detección directa de la sonda sintética TP53 en muestras de suero y saliva humano sin necesidad de pasos previos de tratamiento y/o dilución de la muestra. Además, empleando la metodología desarrollada, no es necesario marcar previamente la sonda diana. Ambos aspectos suponen importantes ventajas prácticas para este sensor con respecto a otros previamente reportados en la literatura **[Fajarmi, 2011]**.

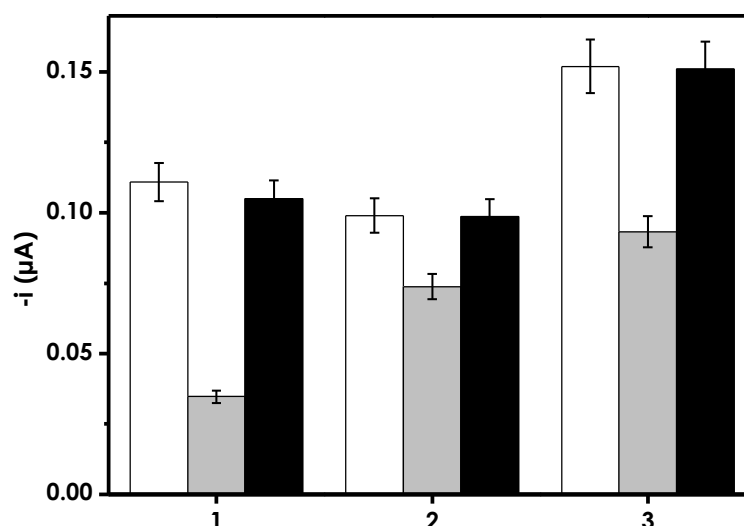


Figura 5.32. Comparación de las señales obtenidas empleando la plataforma sensora lcpp53/CMCox-rGO/SPCEs en (1) disolución reguladora de hibridación, (2) suero humano sin diluir y (3) saliva sin diluir. Los valores de las corrientes amperométricas se midieron en ausencia de sonda diana *TP53* (barras blancas), en presencia de 100 nM de sonda diana *TP53* (barras grises) y en presencia de la sonda mutada 1-m*TP53* (barras negras). E_{ap} : -0.10 V (vs. Ag), electrolito soporte: disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 7.0).

5.1.3.2.6. Detección del estado del gen *TP53* en cDNAs de células tumorales de cáncer de mama.

Para demostrar la aplicabilidad clínica real del sensor de DNA desarrollado, la metodología implementada se aplicó al análisis del estado del gen *TP53* endógeno presente en diferentes líneas celulares humanas. La metodología utilizada implica la síntesis de cDNA mediante RT-PCR a partir del RNA total extraído previamente, tal y como se ha descrito en la Sección Experimental (**apartado 4.4.6**) La **Figura 5.33** muestra los resultados obtenidos para tres líneas celulares de mama, MCF-10A, MCF-7 y SK-BR-3. La primera es una línea celular epitelial no tumorigénica mientras que las otras dos son líneas celulares cancerígenas. Aunque se ha descrito que el gen salvaje *TP53* está presente en las células MCF-10A y MCF-7 [Alkhalaf, 2003], la línea celular SK-BR-3 contiene una mutación en el codón 175 (al igual que la de la sonda utilizada para demostrar la selectividad con la metodología desarrollada en esta Tesis Doctoral: G→A) [Lacroix, 2006], [Runnebaum, 1991]. Los resultados que se muestran en la **Figura 5.33** concuerdan claramente con estos antecedentes ya que la respuesta del sensor relacionada con la mutación individual ocurre solamente para las células SK-BR-3. Es importante mencionar que, de acuerdo con la bibliografía, las mutaciones en los codones 175, 245, 248, 273, y 282 son las más comunes tanto en los tumores esporádicos

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

como en los hereditarios, aunque la cantidad encontrada es distinta dependiendo el tipo de cáncer [Rivlin, 2011].

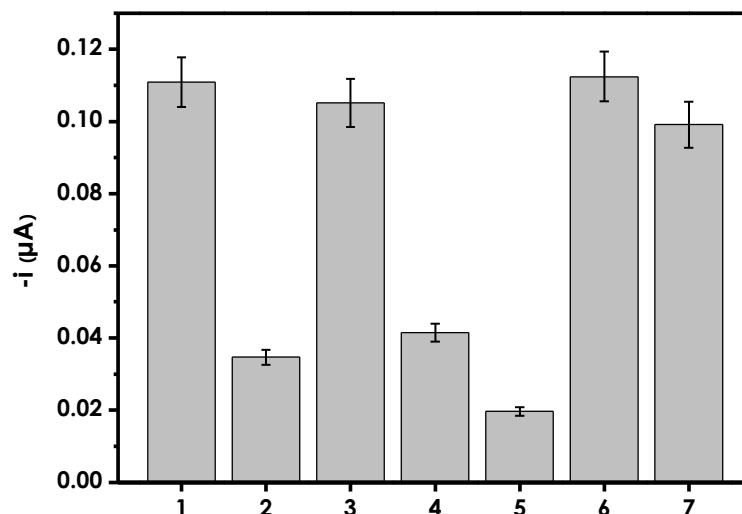


Figura 5.33. Comparación de las señales amperométricas obtenidas (1) en ausencia de sonda diana, (2) 100nM de la sonda diana sintética TP53, y (3) de 1-mTP53 y con las obtenidas en la detección del gen TP53 endógeno en cDNA 5 ng/μL de las líneas celulares (4) MCF-10A, (5) MCF-7 y (6): SK-BR-3, utilizando (7) un control de cDNA en concentración 5 ng/μL. E_{ap} : -0.10 V (vs. Ag), electrolito soporte: disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 7.0).

También debe destacarse que como el gen TP53 solo mostró una pequeña diferencia de expresión en los tejidos cancerosos y sanos, es mucho más relevante desarrollar plataformas de DNA capaces de detectar mutación de este gen en vez de la variación en su expresión genética [Xie, 2004].

Los biosensores de DNA con los que se comparan los resultados obtenidos en el presente trabajo se recogen en la **Tabla 3.5** del capítulo 3 de esta memoria.

5.2. *MATERIAL HÍBRIDO BASADO EN GO Y PAMAM*

Se ha desarrollado un material híbrido de óxido de grafeno reducido con un dendrímero de PAMAM, que ha sido caracterizado mediante diversas técnicas fisicoquímicas y electroquímicas. El nanomaterial híbrido preparado se ha utilizado como andamiaje para el desarrollo de biosensores electroquímicos aplicables a la detección de catecol y de glucosa.

5.2.1. PREPARACIÓN DEL NANOMATERIAL HÍBRIDO PAMAM-Sil-rGO

La preparación del nuevo material se ha realizado en dos etapas tal y como se esquematiza en la **Figura 5.34**.

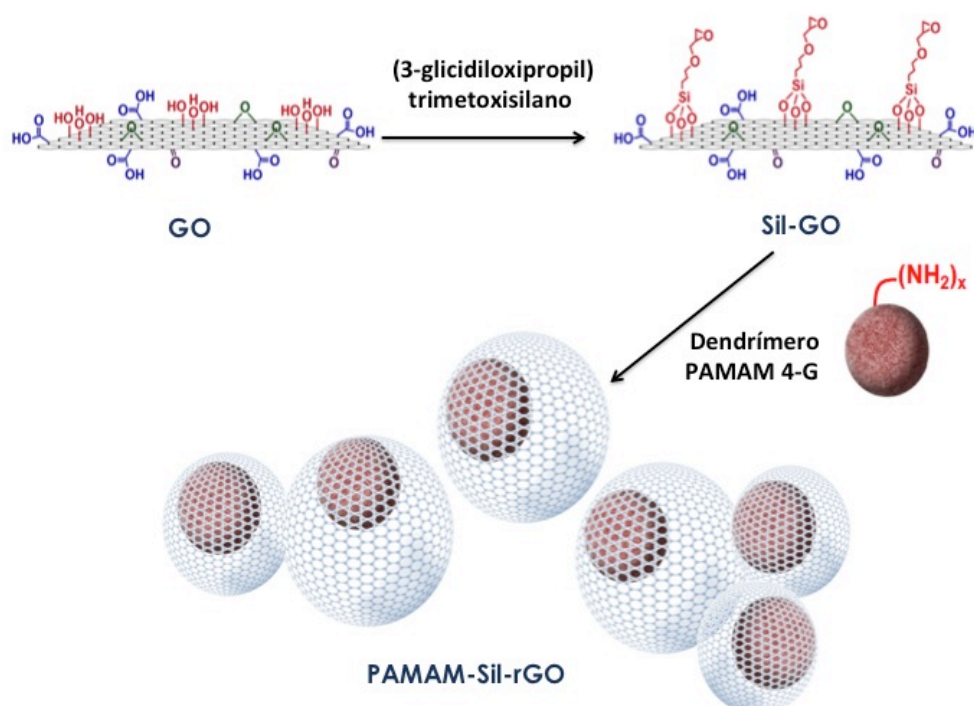


Figura 5.34. Diagrama esquemático que muestra las etapas implicadas en la preparación del nanomaterial híbrido PAMAM-Sil-rGO.

En una primera etapa el GO se enriqueció con grupos epóxido altamente reactivos por tratamiento con (3-glicidiloxipropil) trimetoxisilano (GPTMS), usando los grupos hidroxilo de la superficie del nanomaterial como puntos de anclaje [Scheible, 2010]. Seguidamente, el óxido de grafeno silanizado (Sil-GO) se modificó con las moléculas del dendrímero poliaminado (PAMAM 4-G) a través de la formación de enlaces amino secundarios estables de acuerdo con las reacciones que se muestran en la **Figura 5.35**, obteniendo un producto oscuro fácilmente dispersable en disoluciones acuosas (PAMAM-Sil-rGO).

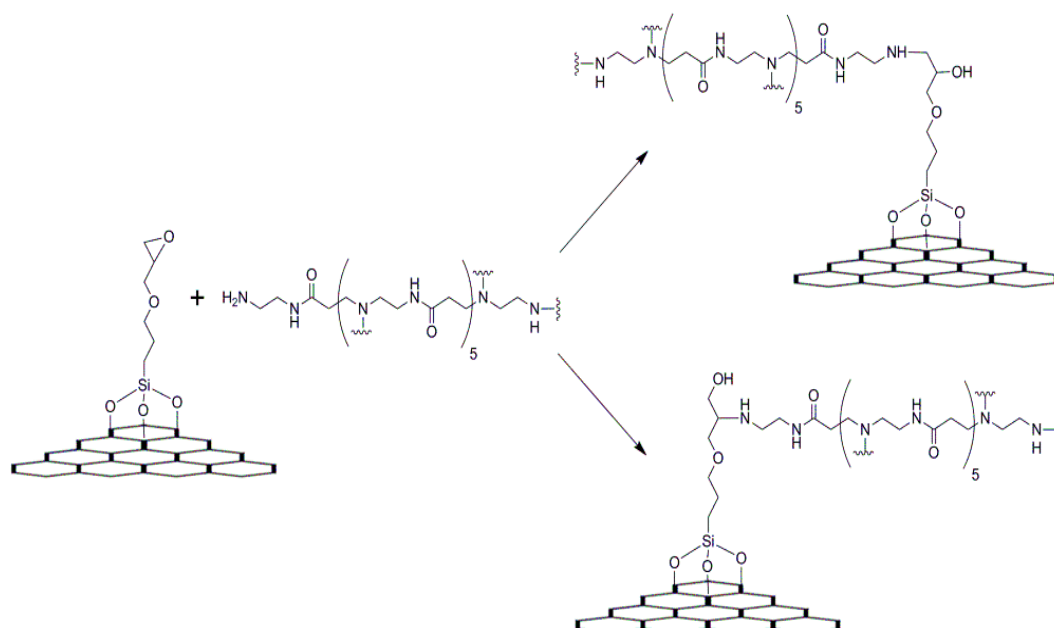


Figura 5.35. Reacción de anclaje del dendrímero al Si-GO por medio de un enlace amino con los grupos epóxido.

El dendrímero PAMAM fue elegido para la modificación de GO por sus características nanométricas y de monodispersidad, exhibiendo una arquitectura tridimensional regular y altamente ramificada, así como una elevada homogeneidad estructural y movilidad en las cadenas [Vögtle, 2009]. Este nanomaterial “blando” también posee una alta densidad de grupos amino en su superficie, lo que favorece la unión multipuntual con las láminas de GO activadas previamente.

5.2.2. CARACTERIZACIÓN DEL NANOMATERIAL HÍBRIDO PAMAM-Sil-rGO

El nuevo material híbrido de óxido de grafeno y dendrímero PAMAM, así como todos los derivados intermedios obtenidos en cada etapa de la preparación, se caracterizaron empleando diferentes técnicas fisicoquímicas.

5.2.2.1. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO

La **Figura 5.36** muestra los espectros FTIR correspondientes a los derivados de grafeno obtenidos en las diferentes etapas de la preparación de nanomaterial. El GO presenta bandas agudas y anchas centradas en 3607 cm^{-1} y 3090 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones del enlace O-H de los grupos hidroxilo libres y de

los enlaces de hidrógeno intermoleculares respectivamente. Además el espectro muestra bandas a 1353 cm^{-1} y 1230 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones de los grupos C-OH y C-O-C. Las bandas observadas a 1730 cm^{-1} y 1065 cm^{-1} pueden deberse a la vibración de los grupos C=O y C-O respectivamente. La banda que se observa a 1608 cm^{-1} estaría asociada con las vibraciones de los dominios del esqueleto grafítico no oxidado, así como con agua adsorbida [Shen, 2009].

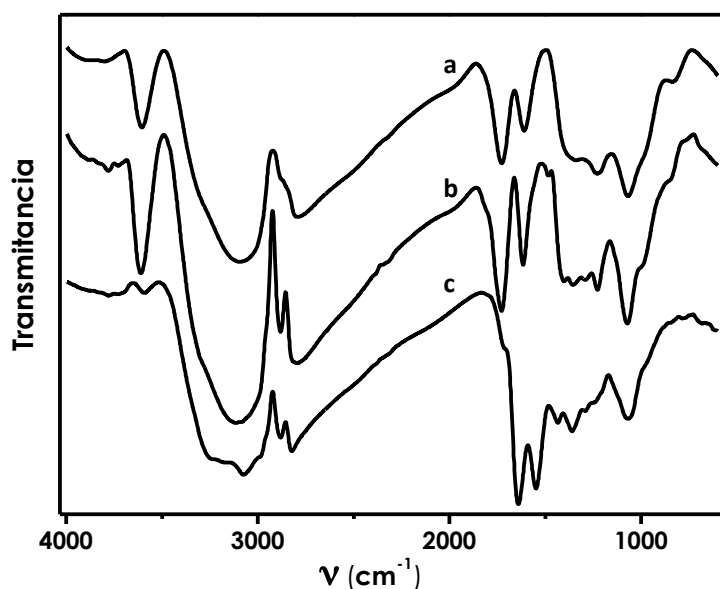


Figura 5.36. Espectro FTIR correspondiente a (a) GO, (b) Sil-GO y (c) PAMAM-Sil-rGO.

La presencia de los residuos de silano en la superficie del Sil-GO se confirma con las bandas obtenidas a 2880 cm^{-1} y 1410 cm^{-1} , las cuales pueden atribuirse a la vibración y la flexión de los enlaces de los grupos metileno de las moléculas de (3-glicidiloxipropil) trimetoxisilano, respectivamente. Adicionalmente, la banda que aparece a 986 cm^{-1} puede asociarse con la vibración de los grupos Si-O.

El espectro del derivado PAMAM-Sil-rGO muestra que la intensidad de las bandas correspondientes a la vibración de los grupos C=O a 1730 cm^{-1} , de los grupos O-H libres a 3607 cm^{-1} , de los grupos C-O-C a 1230 cm^{-1} y de los C-O a 1065 cm^{-1} , disminuye de manera significativa y algunos de ellos desaparecen completamente. Este hecho sugiere que la mayoría de los grupos funcionales con oxígeno de la muestra de Sil-GO se reducen durante la reacción para unir covalentemente las moléculas de PAMAM. La unión de los residuos dendríticos se confirma con la aparición de un pico a 1541 cm^{-1} que se puede atribuir a la flexión del enlace N-H.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La banda ancha que aparece de 2930 a 3506 cm^{-1} puede asociarse con la vibración de los grupos N-H y O-H, así como con el agua adsorbida. Además ese patrón de múltiples bandas también sugiere la formación de sales de amonio primarias entre el dendrímero unido y los grupos carboxilato que quedan en los bordes de las láminas de grafeno.

5.2.2.2. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE TERMOGRAVIMETRÍA

En el análisis termogravimétrico se puede observar como ocurren dos transformaciones térmicas para el GO (**Figura 5.37.a**). La primera de ellas tiene lugar entre 25 y 150 $^{\circ}\text{C}$ (aprox. 14,3 %) y es debido a la pérdida del agua residual, no estructural. La segunda tiene lugar entre 200 y 250 $^{\circ}\text{C}$ (aproximadamente 30,7%) y se debe a degradación de los grupos funcionales que contienen oxígeno y que se encuentran en las nanoláminas [Shen, 2009].

Tras la modificación del GO con GPTMS ocurren los mismos procesos de descomposición pero esta vez a temperaturas ligeramente mayores, lo que indica que el derivado Sil-GO es térmicamente más estable (**Figura 5.37.b**).

Asimismo, la unión covalente del PAMAM produjo un derivado que exhibe una transformación térmica a una temperatura relativamente baja (entre 100 y 230 $^{\circ}\text{C}$) debido a la descomposición del dendrímero (**Figura 5.37.c**).

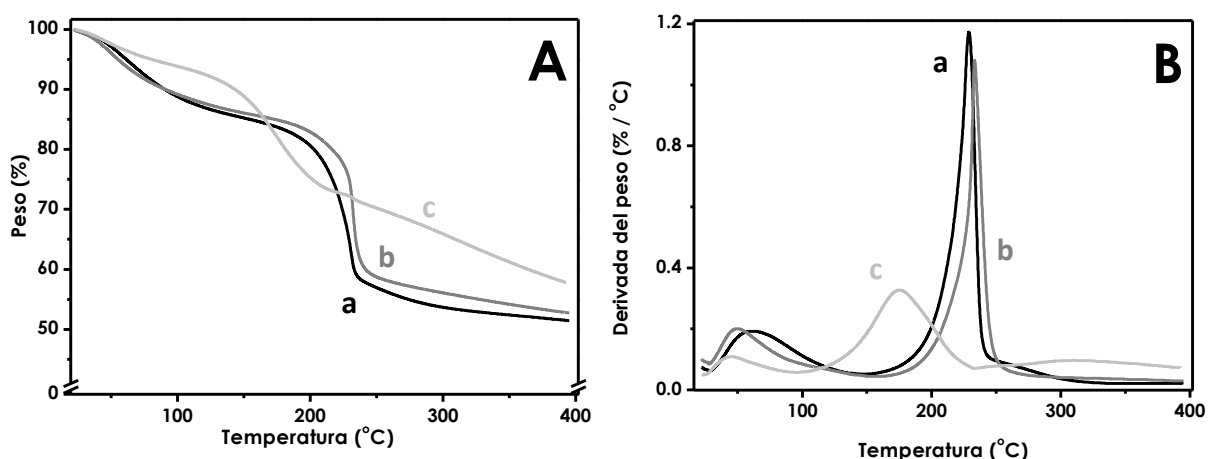


Figura 5.37. Análisis termogravimétrico mediante (A) TG y (B) DTG para (a) GO, (b) Sil-GO y (c) PAMAM-Sil-rGO.

5.2.2.3. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE DIFRACCIÓN DE RAYOS X

La **Figura 5.38** muestra los difractogramas de rayos X (RXD) obtenidos para el GO (**Figura 5.38.a**) y los derivados Sil-rGo (**Figura 5.38.b**) y PAMAM-Sil-rGO (**Figura 5.38.c**). En el primer caso, aparece un pico intenso a 12.35° correspondiente a una

distancia (d) de unos 7.16 Å. Esta distancia entre capas es debida a la presencia de oxígeno en los grupos funcionales del GO y a las moléculas de H_2O atrapadas entre las láminas hidrofílicas [Park, 2009]. La intensidad de este pico decrece tras la modificación covalente del GO, y se desplaza a 11.50° (7.69 Å) y 10.23° (8.65 Å) después del tratamiento con GPTMS y PAMAM respectivamente. El incremento en la distancia entre las láminas puede atribuirse a las moléculas de silano y dendrímico que deben estar intercaladas entre las capas del nanomaterial.

El difractograma de PAMAM-Sil-rGO también muestra un pico ancho y de baja intensidad sobre 20.13° (4.41 Å), distancia interplanar bastante cercana a la distancia interplanar del grafito d_{002} (3.35 Å). Esta pequeña distancia interplanar puede atribuirse a la reducción parcial de GO que se produce en la reacción con el PAMAM que permite que las láminas reducidas estén más próximas que en el nanomaterial inicial.

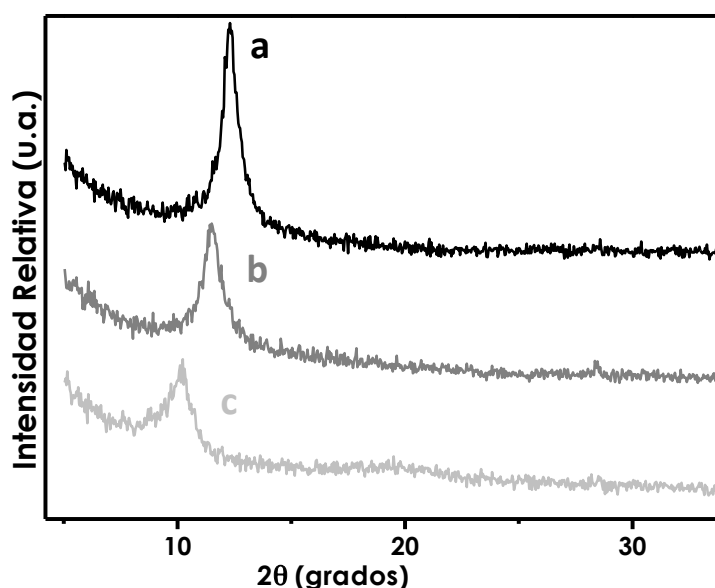


Figura 5.38. Difractograma de Rayos X de (a) GO, (b) Sil-GO y (c) PAMAM-Sil-rGO.

5.2.2.4. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE ESPECTROSCOPIA RAMAN

En la **Figura 5.39** se muestran los espectros Raman de los derivados obtenidos durante la transformación del GO, pudiendo apreciarse cambios estructurales debidos a las modificaciones sucesivas.

El GO (**Figura 5.39.a**) mostró un espectro similar al reportado anteriormente en la **Figura 5.5**, con bandas G y D anchas a 1584 cm^{-1} y 1344 cm^{-1} respectivamente. Dichas bandas solo sufrieron un ligero desplazamiento a 1580 y 1348 cm^{-1} , tras la modificación del GO con el derivado de silano (**Figura 5.39.b**), manteniéndose la

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

relación de intensidades D/G igual a 0.96. Sin embargo, el aumento observado para la intensidad de la banda 2D, que aparece a 2482 cm^{-1} en el caso del GO y a 2644 cm^{-1} en el del Sil-GO, sugiere la formación de agregados entre láminas de GO modificado, lo cual pudiera atribuirse al entrecruzamiento interlaminar que se da mediante reacción de los grupos epóxido en una lámina y los grupos hidroxilo remanentes en otra.

Un mayor desplazamiento e incremento de la relación de intensidades de las bandas G y D se observó en el espectro del derivado de GO modificado con el dendrímero. El nanohíbrido mostró bandas G y D a 1590 y 1350 cm^{-1} , respectivamente, con un valor de 1.05 para la relación de intensidades D/G. Este patrón espectral sugiere un alto grado de interacción química entre las moléculas de PAMAM y las láminas de rGO.

La preparación de este nanohíbrido implicó una reducción parcial del GO por interacción con los grupos amino del dendrímero, como se evidencia en los experimentos de EIS descritos en el **apartado 5.2.3.1.2**. Sin embargo, este proceso de reducción implicó la desaparición de la banda 2D en el espectro de este nanomaterial híbrido (**Figura 5.39.c**), lo cual puede justificarse por el gran tamaño y carga de las moléculas del dendrímero, los cuales evitan el apilamiento de las láminas de grafeno mediante procesos de repulsión electrostática e impedimento estérico.



Figura 5.39. Espectros Raman correspondientes a (a) GO, (b) Sil-GO y (c) PAMAM-Sil-rGO.

5.2.2.5. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA

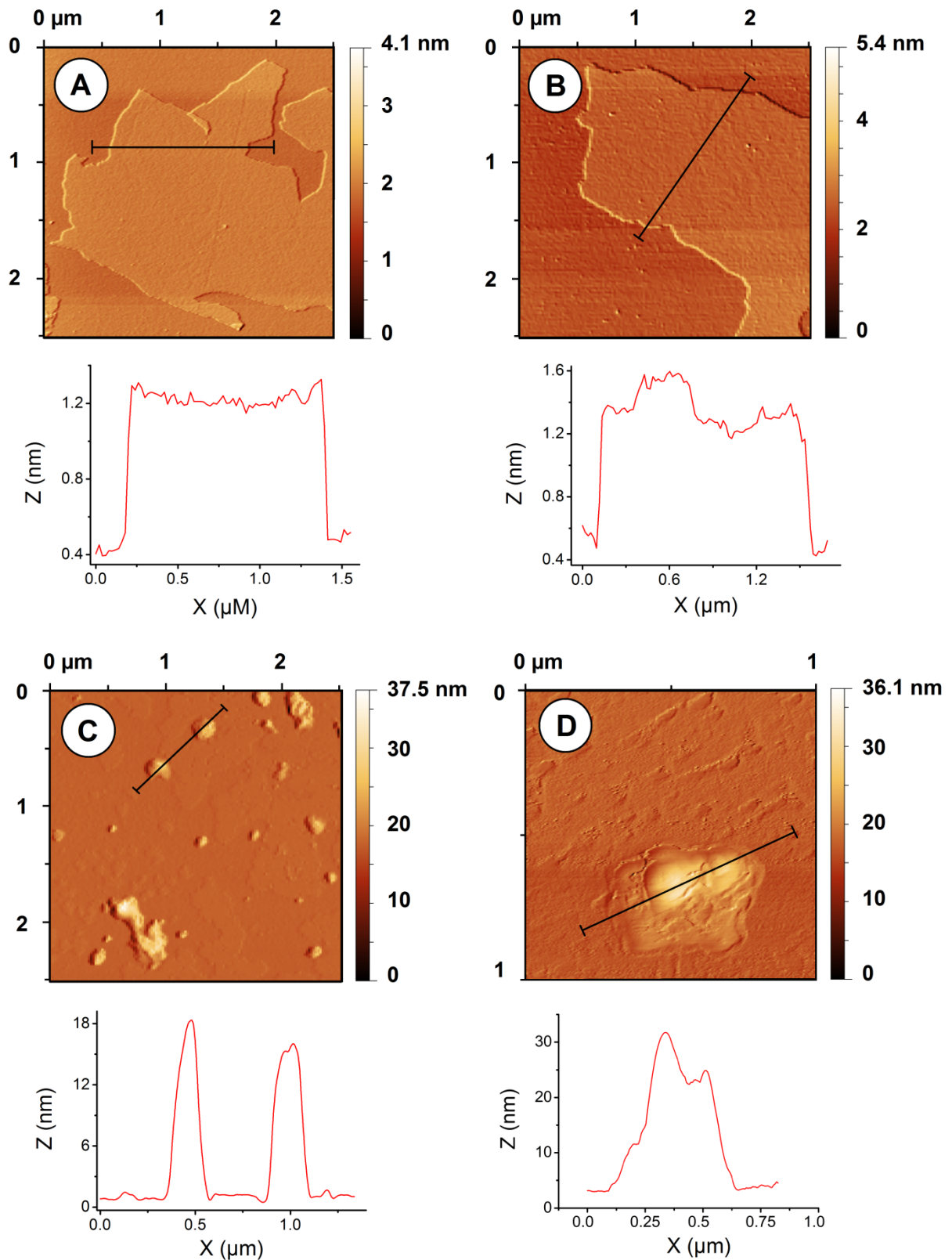


Figura 5.40. AFM y análisis de la sección topológica correspondientes a (A) GO, (B) SiI-GO, (C) y (D) PAMAM-Sil-rGO.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La muestra de GO inicial (**Figura 5.40.A**) muestra láminas que en su mayoría tienen un grosor de entre 0.8 y 1.0 nm, lo cual concuerda con los datos encontrados en la bibliografía [**Stankovich, 2006b**]. Como se esperaba, al silanizar el GO el grosor del nanomaterial aumenta ligeramente observándose valores de entre 0.8 y 1.2 nm, debido probablemente a la presencia de las moléculas de GPTS unidas covalentemente a ambos lados del plano del GO original (**Figura 5.40.B**). Al estudiar el PAMAM-Sil-rGO se observa un patrón topológico distinto caracterizado por la presencia de estructuras coloidales con varios tamaños y formas. Principalmente se observaron nanopartículas arrugadas, aunque también se observaron agregados voluminosos y láminas de grafeno dobladas (**Figuras 5.40.C y D**).

5.2.2.6. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

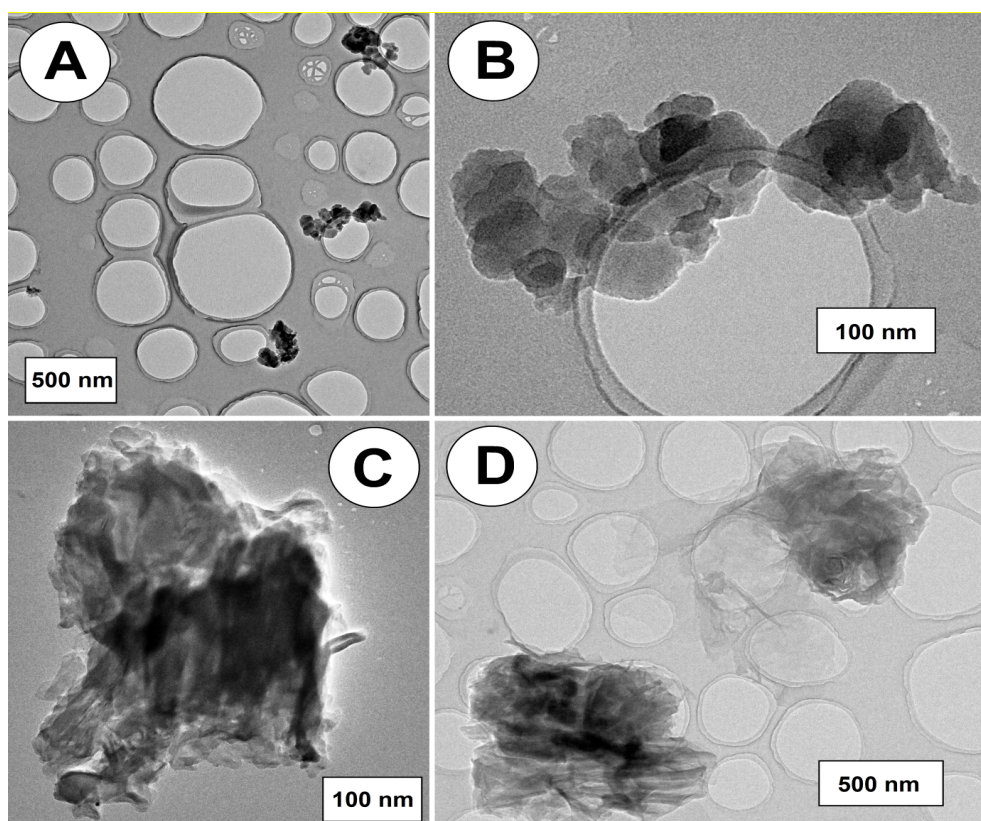


Figura 5.41. Imágenes TEM de PAMAM-Sil-rGO a (**A y D**) bajo y (**B y C**) alto aumento.

El estudio de los derivados de grafeno empleando microscopía de transmisión electrónica (TEM) muestra y confirma que tras la modificación covalente con el dendrímero, las láminas de grafeno se arrugan en nanoestructuras tridimensionales. Las formas de estos nanomateriales varían desde nanopartículas compactas (**Figura**

5.41.A y B) a estructuras menos ordenadas (**Figura 5.41.C y D**) observándose en algunos casos láminas de grafeno con arrugas y otras láminas plegadas. Las nanopartículas de grafeno muestran una alta polidispersidad con unos diámetros comprendidos entre 100 y 850 nm siendo el diámetro más común 420 nm.

5.2.2.7. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE ALTA RESOLUCIÓN

En el TEM de alta resolución (HR-TEM) (**Figuras 5.42.A y B**) se observó la existencia de una estructura en forma de hilos en los bordes del PAMAM-Sil-rGO debido a que las láminas se doblan y/o enrollan. Se determinó que la distancia entre los distintos lados de la lámina doblada era de 0,472 nm, más grande que la distancia interplanar existente en el grafito (0,340 nm) [Lu, 2009], pero parecidas a las estimadas mediante XRD, confirmando por tanto, que es un material híbrido de grafeno. Este hecho se atribuyó a la presencia de moléculas de silano y dendrímero en el plano basal de las láminas de óxido de grafeno reducido.

Por otro lado, el análisis localizado de difracción de electrones (SAED) de estas nanopartículas (**Figura 5.42.C**) mostró un patrón difuso de simetría hexagonal indicando así una baja cristalinidad del óxido de grafeno silanizado y modificado con PAMAM.

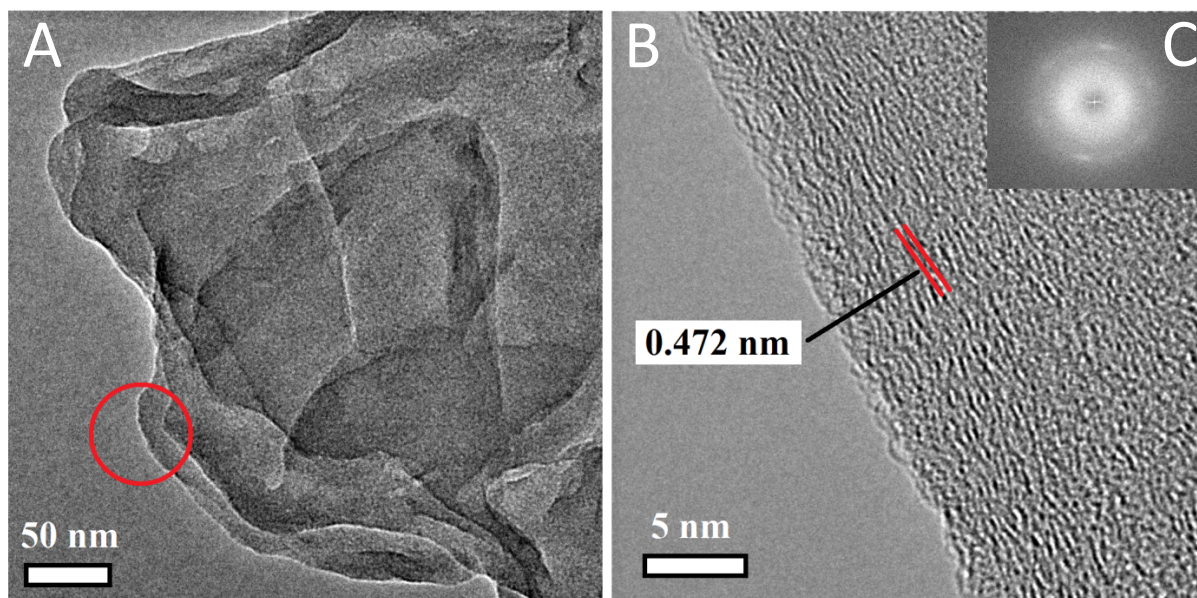


Figura 5.42. (A y B) Imágenes de HR-TEM de las nanopartículas arrugadas de PAMAM-Sil-rGO y (C) SAED del material.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.2.2.8. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE EMISIÓN DE CAMPO

Mediante esta técnica también se confirmó la morfología arrugada (**Figura 5.43.A**) de las nanopartículas de PAMAM-Sil-rGO y además reveló que dicha morfología puede deberse bien a una lámina de grafeno arrugada (**Figura 5.43.B**) o a la asociación de estos nanomateriales (**Figura 5.43.C**). En algunos casos, parece que una sola lámina puede estar involucrada en la formación de dos o más nanopartículas dando lugar a estructuras condensadas complejas y más grandes, hecho que puede contribuir a la elevada polidispersidad comentada anteriormente (**Figura 5.43.D**). También debe resaltarse que el óxido de grafeno preparado por el método de Hummers [Hummers, 1958] es un material altamente polidisperso con unas láminas de tamaño comprendido entre los cientos de nanómetros y varios micrómetros [Kim, 2011] por lo que es de esperar la gran variedad de diámetros que presenta el derivado de grafeno.

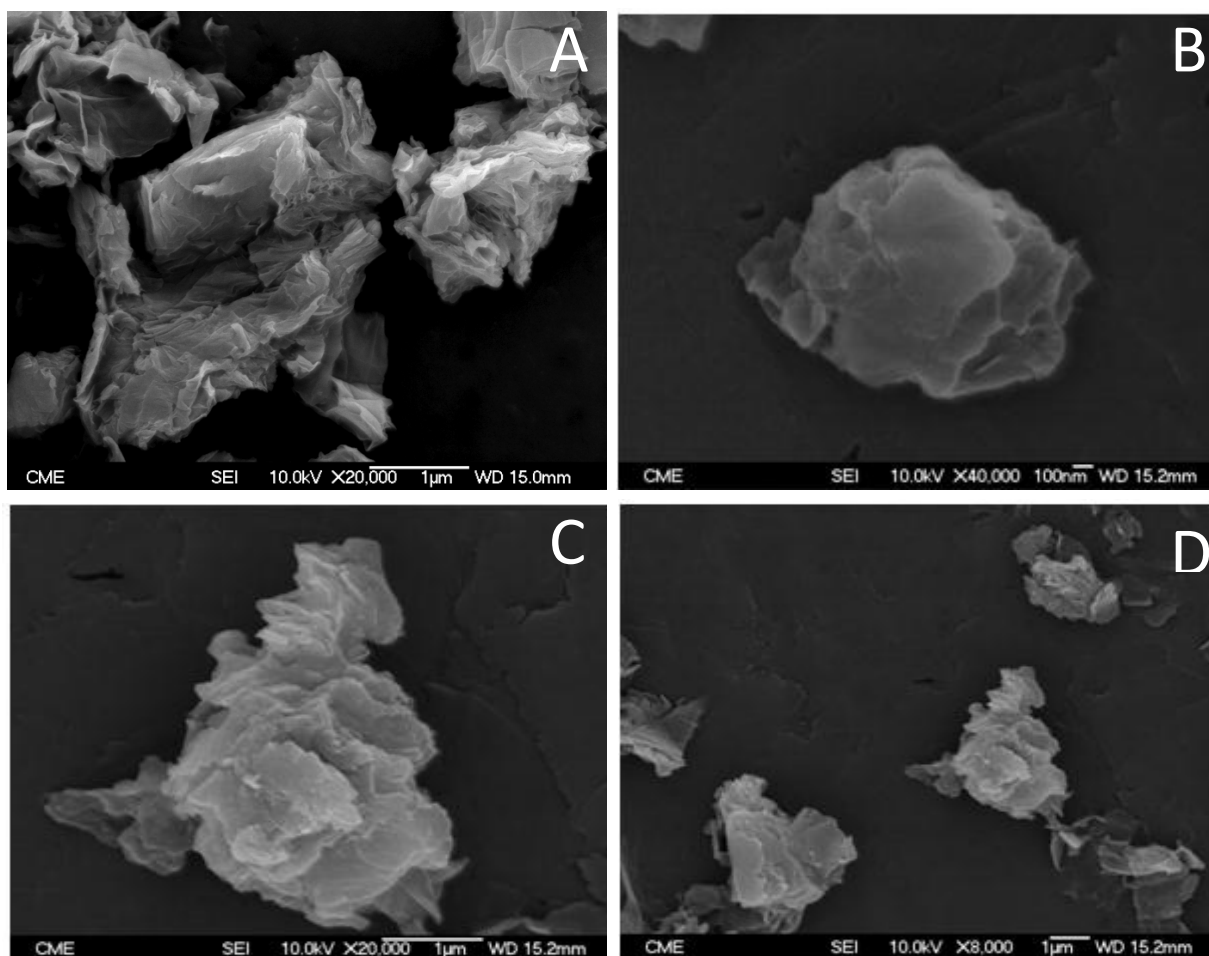


Figura 5.43. Imágenes de FE-SEM del nanomaterial híbrido PAMAM-Sil-rGO

Se propone que la derivatización multipuntual del Sil-GO con el dendrímero poliaminado da lugar, probablemente, a que las láminas carbonáceas se arruguen y se doblen sobre el PAMAM, proporcionando nanoestructuras tridimensionales con una polidispersidad de tamaños, mostrando dimensiones menores que las láminas originales de grafeno. Además de este mecanismo covalente de plegado, las nanopartículas de grafeno pueden estabilizarse mediante interacciones electrostáticas entre los grupos carboxilato que quedan libres en los bordes de las láminas de grafeno y los grupos amino primarios de la superficie del dendrímero. Cabe resaltar que el PAMAM se une aleatoriamente a ambos lados del plano del Sil-GO, asegurando así la presencia de residuos de dendrímero en la superficie de las nanopartículas. Este revestimiento hidrofílico rico en grupos amino proporciona estabilidad al nanomaterial en dispersiones acuosas así como la posibilidad de funcionalizarlo con biomoléculas para bioaplicaciones avanzadas.

5.2.3. APLICACIÓN EN EL DESARROLLO DE BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS

5.2.3.1. BIOSENSOR Tyr/PAMAM-Sil-rGO/GCE

5.2.3.1.1 Preparación del electrodo enzimático

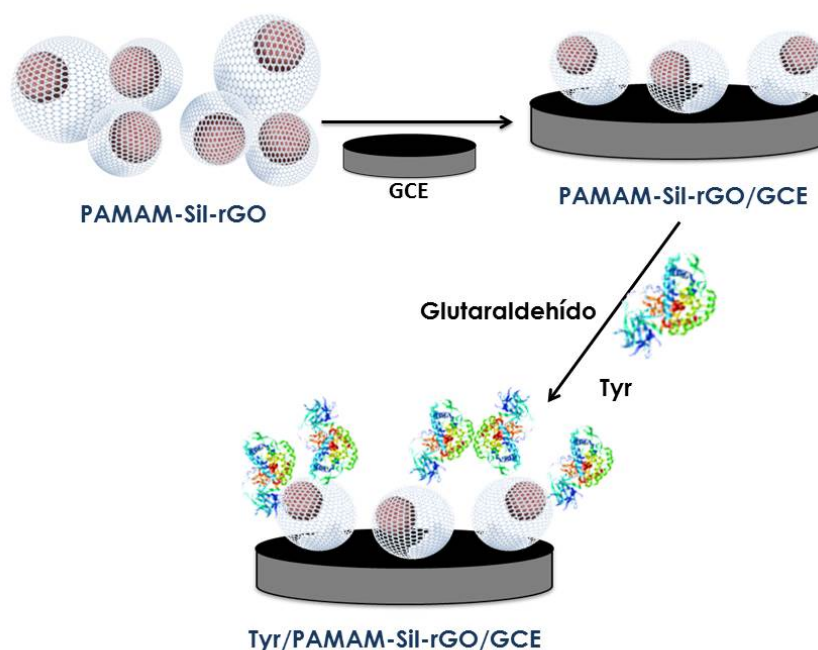


Figura 5.44. Representación esquemática de la preparación del electrodo enzimático Tyr/PAMAM-Sil-rGO/GCE.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Figura 5.44** se muestra un esquema de la utilización del nanomaterial híbrido para desarrollar un biosensor enzimático electroquímico para la detección de catecol.

Tras depositar el nanomaterial híbrido en la superficie limpia de un electrodo de carbono vitrificado, se realizó la reducción del derivado de grafeno mediante un ciclado de potencial como se describe en el **apartado 4.4.3**. Posteriormente, se inmoviliza la enzima en la superficie del electrodo modificado con el material, activando los grupos amino del mismo con glutaraldehído.

Con el objetivo de reducir completamente el óxido de grafeno en la superficie del electrodo, se optimizó el número de voltamperogramas cíclicos realizado, de manera que se consideró como óptimo el ciclo a partir del cual el hábito del voltamperograma se mantenía constante. De este modo y como se observa en la **Figura 5.45**, tras realizar 20 ciclos pudo inferirse que se había reducido todo el nanomaterial de carbono.

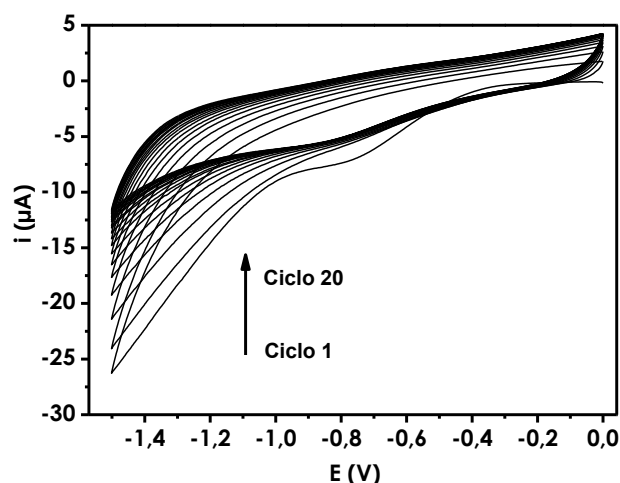


Figura 5.45. Ciclado de potencial entre 0.0 y -1.5V a una velocidad de 100 mV/s para llevar a cabo la reducción del GO.

5.2.3.1.2. Caracterización de la superficie electródica

Tras la inmovilización de la enzima, se caracterizó la superficie electródica mediante FE-SEM. Como se muestra en la **Figura 5.46**, se observó una morfología más homogénea y suave que en las obtenidas antes de la inmovilización de la proteína (**Figura 5.41**). Además no se aprecian zonas de grafeno sin recubrir, lo que sugiere un elevado recubrimiento de la superficie electródica.

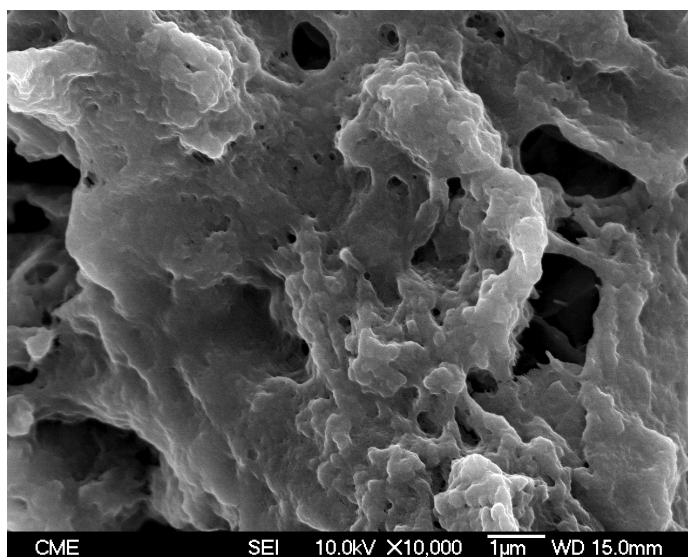


Figura 5.46. Imagen FE-SEM de Tyr/PAMAM-Sil-rGO/GCE.

Cada etapa del proceso de modificación del electrodo de carbono vitrificado se estudió mediante espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) utilizando el par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ (**Figura 5.47.A**). El recubrimiento del electrodo de carbono con el GO y el Sil-GO produce un notable incremento en la resistencia a la transferencia de carga (R_{TC}), desde 256 a 1202 Ω , lo cual está en concordancia con las propiedades electroconductoras de estos derivados. Sin embargo, cuando el electrodo se modificó con PAMAM-Sil-rGO, se observó un semicírculo de diámetro pequeño a altas frecuencias ($R_{TC} = 92 \Omega$), lo que indica la existencia de un proceso rápido de transferencia de electrones. Esta observación puede justificarse por la recuperación parcial de las características electroconductoras características del grafeno después de la unión covalente del PAMAM al Sil-GO ya que la mayoría de los grupos funcionales con oxígeno de la muestra de Sil-GO se reducen durante la reacción con las aminas primarias del dendrímero **[Dreyer, 2010]**.

Esta resistencia disminuye todavía más ($R_{TC} = 24 \Omega$), tras la reducción electroquímica del PAMAM-Sil-rGO depositado sobre la superficie electródica **[Jiang, 2012]**, sugiriendo que la unión covalente del dendrímero PAMAM al GO silanizado solo produce la reducción parcial del nanomaterial, como se revela también con la espectroscopia FTIR y con el análisis XRD (**apartados 5.2.2.1 y 5.2.2.3**, respectivamente). Todos los datos experimentales de la espectroscopia de impedancia electroquímica fueron obtenidos mediante el ajuste a un circuito equivalente de Randles convencional (**Figura 5.47.B**).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

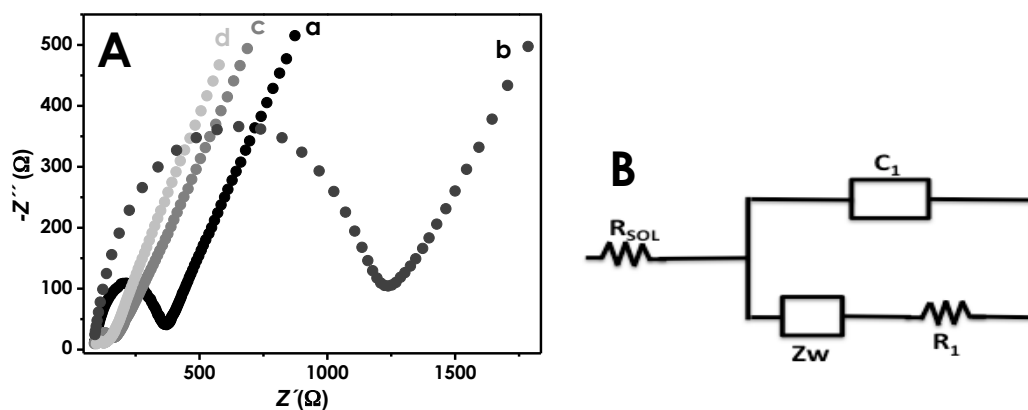


Figura 5.47. (A) Diagrama de Nyquist correspondiente a (a) GCE, (b) Sil-GO/GCE, (c) PAMAM-Sil-rGO/GCE y (d) PAMAM-Sil-rGO/GCE reducido electroquímicamente. Impedancias realizadas en una disolución de KCl 0.1 M conteniendo $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 5 mM (1 : 1). (B) Circuito equivalente de Randles.

Tras la inmovilización de la enzima tirosinasa sobre el electrodo modificado con el derivado de grafeno, se observó un notable incremento en la resistencia a la transferencia de carga (R_{TC}) con un valor de 7837Ω (Figura 5.48.A) como consecuencia de la inmovilización de la proteína, indicando una elevada concentración de enzima anclada en la superficie electrónica modificada. En este caso, es necesario emplear un circuito equivalente modificado para ajustar los datos experimentales (Figura 5.48.B) [Tang, 2006], [Wu, 2009a].

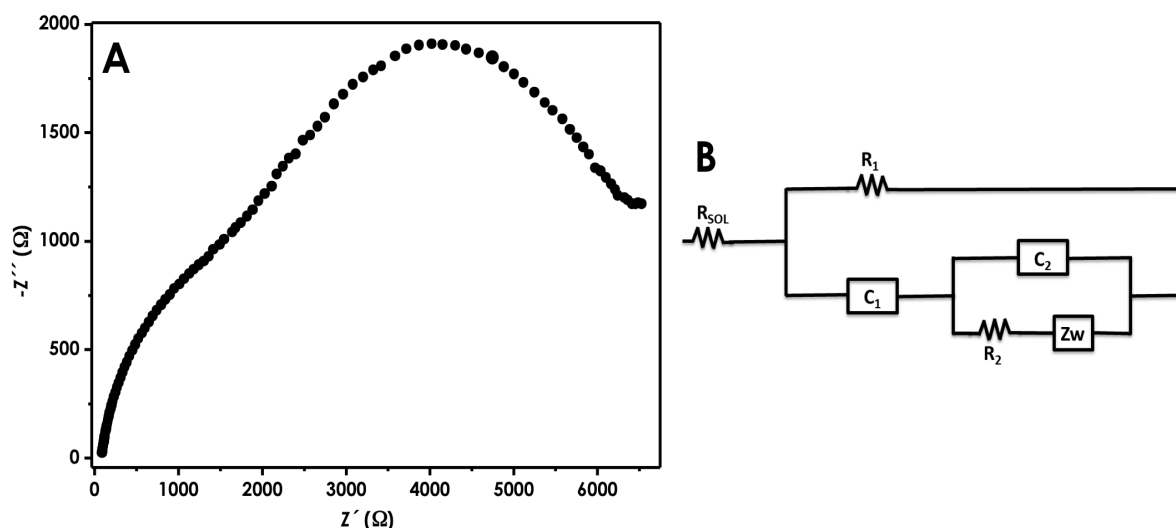


Figura 5.48. (A) Diagrama de Nyquist correspondiente a Tyr/PAMAM-Sil-rGO/GCE. Impedancias realizadas en una disolución de KCl 0.1 M conteniendo $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 5 mM (1 : 1). (B) Circuito equivalente modificado para electrodos recubiertos con proteínas.

Una vez preparado el electrodo enzimático, se evaluó su comportamiento utilizando catecol como sustrato de la tirosinasa según la reacción que se muestra en la Figura 5.49.

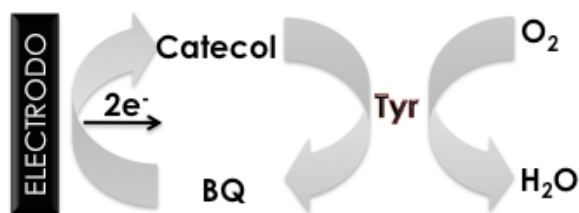


Figura 5.49. Esquema de la reacción enzimática de Tyr empleando catecol.

Dicho comportamiento se evaluó mediante voltamperometría cíclica realizando medidas en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de catecol. Como se puede observar (**Figura 5.50**), la corriente catódica, asociada con la reducción electroquímica de la 1,2-benzoquinona formada en la reacción enzimática en la superficie electródica, aumenta con la concentración de catecol adicionada, lo que demuestra la catálisis enzimática en la transformación del sustrato sobre la superficie electródica modificada con el nanomaterial híbrido de grafeno.

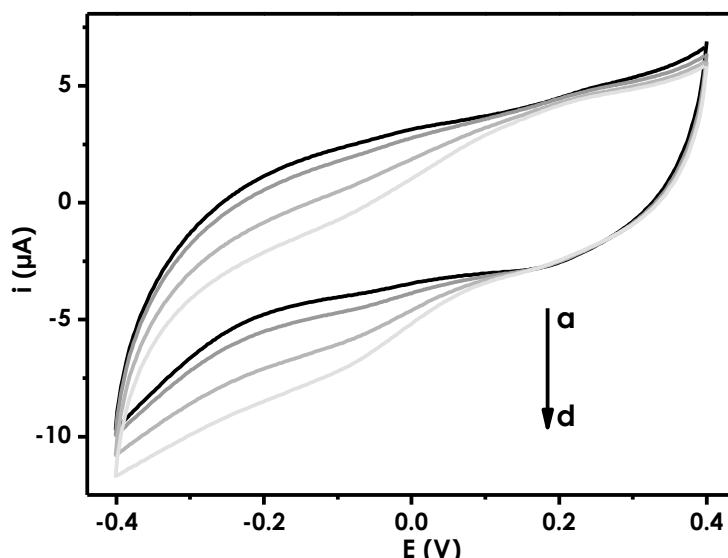


Figura 5.50. Voltamperogramas cíclicos registrados sobre Tyr/PAMAM-Sil-rGO/GCE en disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 6.0) a 50 mV/s en ausencia (**a**) y presencia de (**b**) 5 μ M, (**c**) 10 μ M y (**d**) 15 μ M de catecol.

Asimismo, la respuesta amperométrica obtenida tras aplicar un potencial de -0.15 V (vs. Ag/AgCl) en presencia de catecol 100 nM se comparó con la medida sobre varios electrodos control, en los que se omitió uno de los pasos de la preparación en cada caso (**Figura 5.51**).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

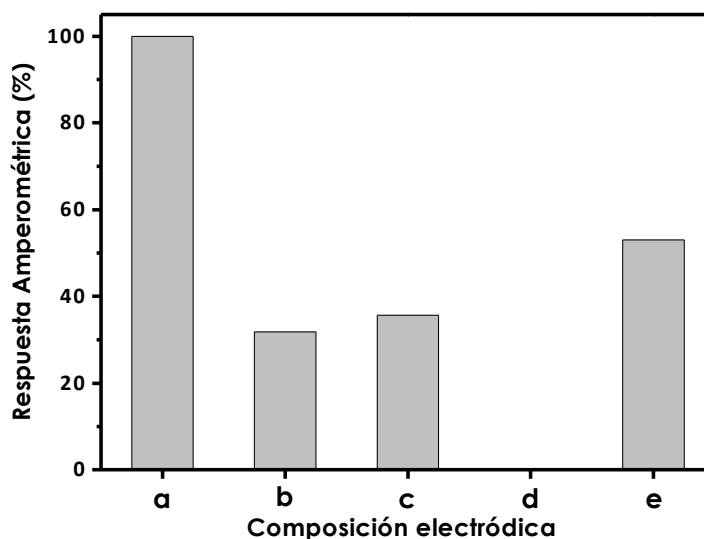


Figura 5.51. Influencia de la composición del electrodo en la respuesta amperométrica para catecol 100 nM correspondiente a **(a)** Tyr/PAMAM-Sil-rGO/GCE, **(b)** Tyr/PAMAM-Sil-rGO/GCE sin glutaraldehído, **(c)** Tyr/Sil-rGO/GCE, **(d)** PAMAM-Sil-rGO/GCE y **(e)** Tyr/GCE, en disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 6.0), $E_{ap} = -0.15$ V vs. Ag/AgCl.

Como era de esperar, no se obtuvo respuesta con el electrodo nanoestructurado sin enzima, lo que demuestra que la oxidación del catecol a 1,2-benzoquinona no es electrocatalizada en la superficie del electrodo PAMAM-Sil-rGO/GCE. Con el electrodo en el que la enzima se inmovilizó sin glutaraldehído se obtuvo sólo un 30% de la señal obtenida con el electrodo completo, lo que indica que el entrecruzamiento covalente aumenta la cantidad de tirosinasa inmovilizada sobre la superficie electródica. También se obtuvieron señales muy bajas cuando la enzima se inmovilizó directamente sobre el GCE limpio y sobre el GCE recubierto de Sil-rGO. Por tanto, estos resultados apoyan el diseño propuesto de Tyr/PAMAM-Sil-rGO/GCE para ser empleado como biosensor enzimático.

5.2.3.1.3. Optimización de las variables experimentales

Las variables experimentales involucradas en la preparación del bioelectrodo se optimizaron teniendo en cuenta la pendiente (m) de los calibrados en un rango de concentraciones de catecol entre 100 nM y 500 nM.

a) Optimización de la composición del biosensor

En primer lugar se optimizó la cantidad de PAMAM-Sil-rGO depositada en la superficie del electrodo observándose un aumento de la pendiente normalizada ($m/m_{máx}$), midiendo a un potencial de -0.15 V, al aumentar la cantidad de nanomaterial desde 2.5 mg a 10 mg. Por el contrario, la sensibilidad del biosensor

fue menor para cantidades superiores a 10 mg, hecho atribuible a la baja estabilidad de la capa de nanomaterial para elevadas cantidades. El efecto de la variación de la cantidad de enzima inmovilizada también fue estudiado así como del tiempo de incubación. Se obtuvo una mayor pendiente normalizada cuando se emplearon 200 μg de proteína y 60 minutos de tiempo de inmovilización de la misma. Para mayores cantidades de enzima y un tiempo de incubación más largo, se obtuvieron pendientes más pequeñas, debido al impedimento de la transferencia electrónica por el bloqueo de la superficie electródica. Además, también se optimizó la concentración de glutaraldehído utilizado para entrecruzar las moléculas de tirosinasa en la superficie del electrodo modificado con PAMAM-Sil-rGO, obteniéndose la mejor pendiente normalizada para una concentración del 4% (v/v) (Figura 5.52).

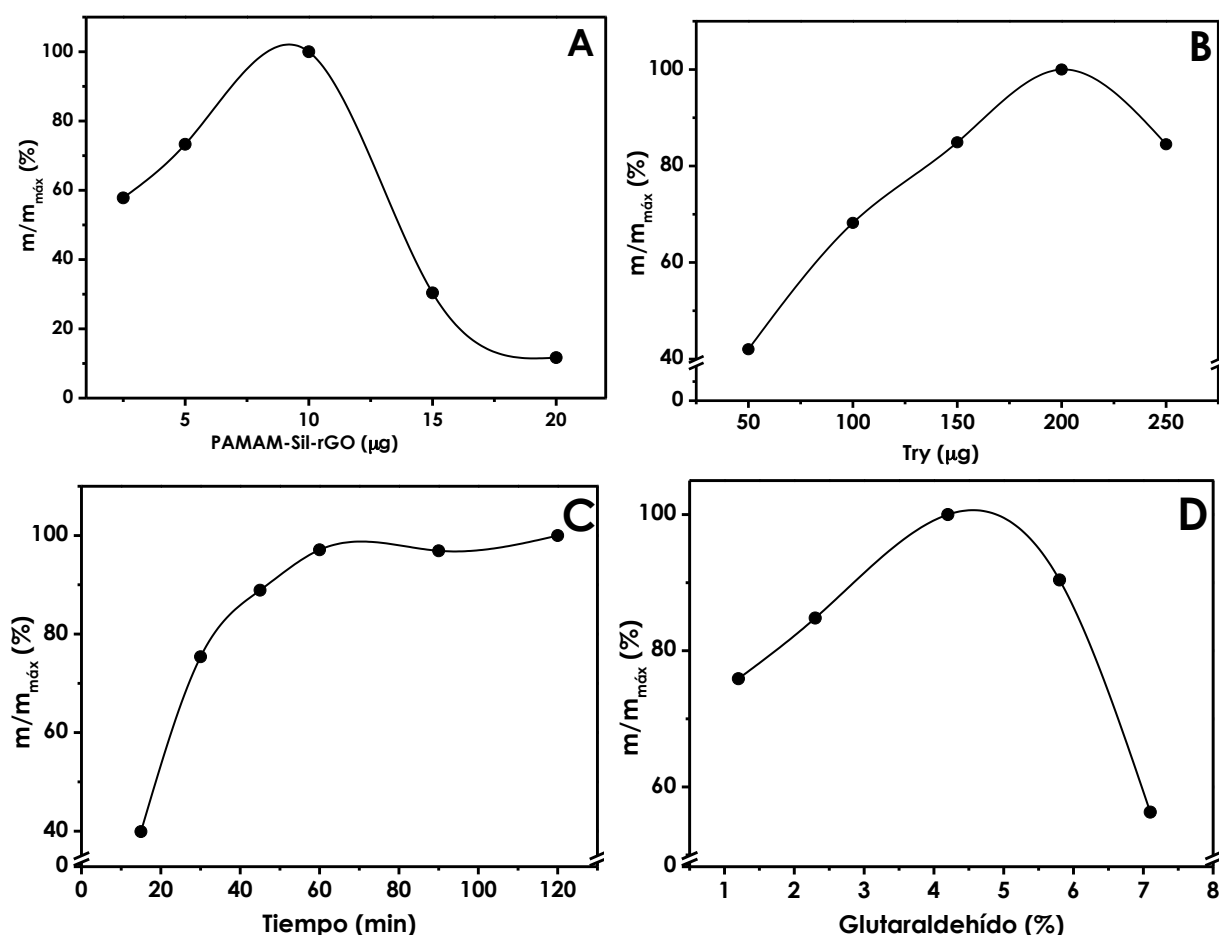


Figura 5.52. Influencia de la cantidad de (A) PAMAM-Sil-rGO, (B) enzima Tyr, (C) tiempo de incubación de la enzima y (D) cantidad de glutaraldehído en la pendiente normalizada de los calibrados para catecol (en un rango de concentración comprendido entre 100 y 500 nM) en disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 6.0) y aplicando un potencial de -0.15 V vs. Ag/AgCl.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

b) Selección del potencial aplicado

La elección del potencial aplicado al biosensor se efectuó a partir de la representación de las pendientes normalizadas ($m/m_{m\acute{a}x}$) frente a diferentes valores del potencial en el intervalo comprendido entre -0.25 V y 0.05 V, para un rango de concentración de catecol entre 100 nM y 500 nM, en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 6.0 (**Figura 5.53**).

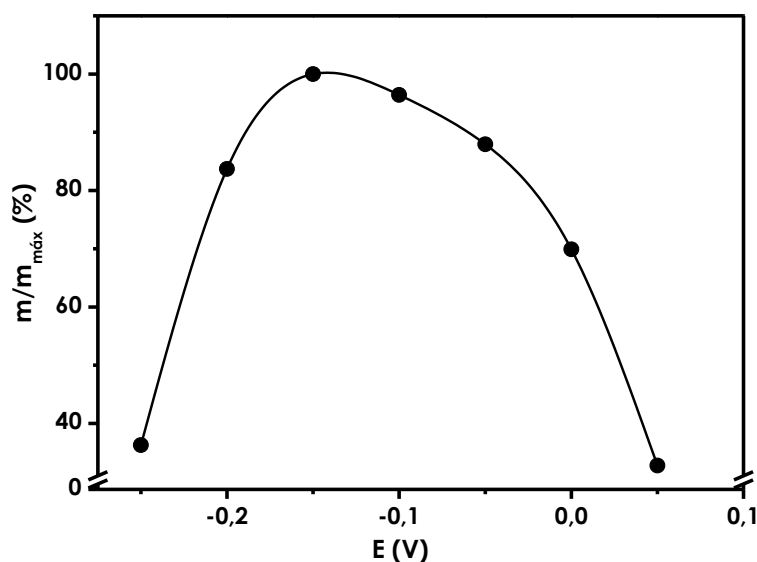


Figura 5.53. Variación de la pendiente normalizada de los calibrados para catecol con el potencial aplicado al biosensor de Tyr/PAMAM-Sil-rGO/GCE en disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 6.0).

Como puede observarse, se produce un aumento de la pendiente normalizada al pasar de 0.05 a -0.15 V, ya que a potenciales bajos aumenta la velocidad de reducción de la quinona generada en las reacción enzimática [Wang 2000] y disminuye drásticamente cuando se aplican potenciales más negativos, hecho que puede deberse a la polimerización de esta o-quinona a potenciales muy negativos [Serra, 1999], [Peña, 2001].

De acuerdo con estos resultados, se seleccionó un potencial de -0.15 V, con objeto de conseguir una detección sensible a un valor de potencial poco extremo y así minimizar el número de posibles interferentes capaces de reducirse sobre el electrodo. Además, tanto la corriente de fondo como el tiempo necesario para la estabilización de la línea base aumentaban a medida que el potencial se hacía más negativo, fenómeno también observado por otros autores [Peña 2001], [Serra, 2002], [Campuzano, 2003].

c) Influencia del pH del medio de medida

Se estudió la influencia que ejercía el pH de la disolución de medida sobre la pendiente normalizada ($m/m_{m\acute{a}x}$) obtenida para el catecol en un intervalo de concentración comprendido entre 100 nM y 500 nM. Para ello se han empleado disoluciones reguladoras de fosfato 0.1 M a distintos valores de pH, preparadas como se indica en el **apartado 4.3.2**. El pH de trabajo se evaluó en el intervalo de 5.0 a 7.5, y los resultados se muestran en la **Figura 5.54**.

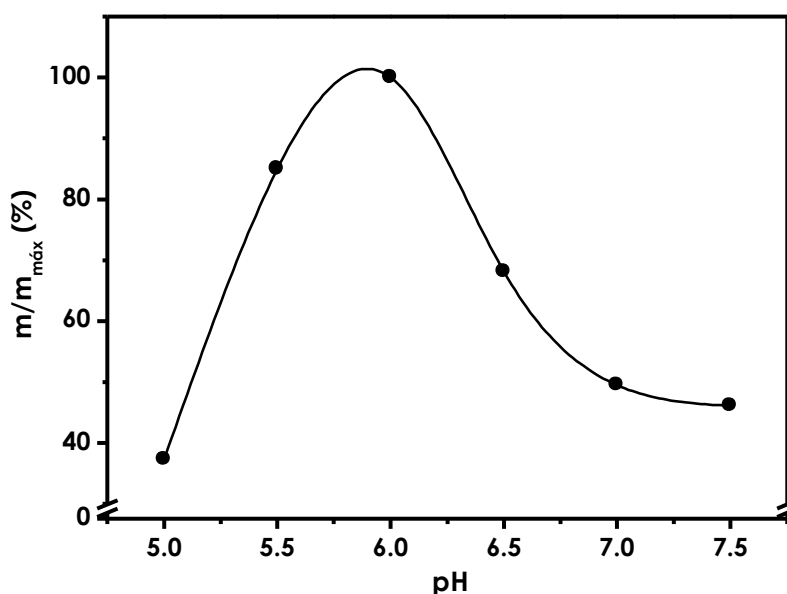


Figura 5.54. Variación de la pendiente del calibrado para catecol normalizada con el pH del medio de medida para el biosensor de Tyr/PAMAM-Sil-rGO/GCE en disolución reguladora de fosfato 0.1 M. $E_{ap} = -0.15$ V (vs. Ag/AgCl).

Como se puede observar, se obtiene una sensibilidad mayor para un valor de pH entre 5.5 y 6.0, presentando una acusada disminución para valores de pH fuera de este rango, como consecuencia de la pérdida de actividad enzimática que ocurre a pH inferior a 4.5 y superior a 9.3 [Lui, 2000]. Este fenómeno pudiera estar condicionado por cambios en el grado de ionización de residuos de aminoácidos involucrados en la catálisis enzimática o en el mantenimiento de la estructura tridimensional activa de la proteína. Los resultados obtenidos están de acuerdo con el pH óptimo descrito en la bibliografía para la tirosinasa en disolución, 6.5 [Ortega, 1994].

De acuerdo con estos resultados, se seleccionó tampón fosfato 0.1 M de pH 6.0 para estudios posteriores.

5.2.3.1.4. Características analíticas del biosensor

En las condiciones experimentales seleccionadas y midiendo mediante amperometría en disoluciones agitadas, se obtuvieron las curvas de calibrado para el catecol en el intervalo de concentración comprendido entre 10 nM y 72.3 μ M. En la **Figura 5.55** se muestran las respuestas amperométricas para adiciones continuas de catecol. El biosensor mostró una rápida respuesta analítica alcanzándose el 95% de la corriente en estado estacionario en 5 segundos después de la adición del sustrato.

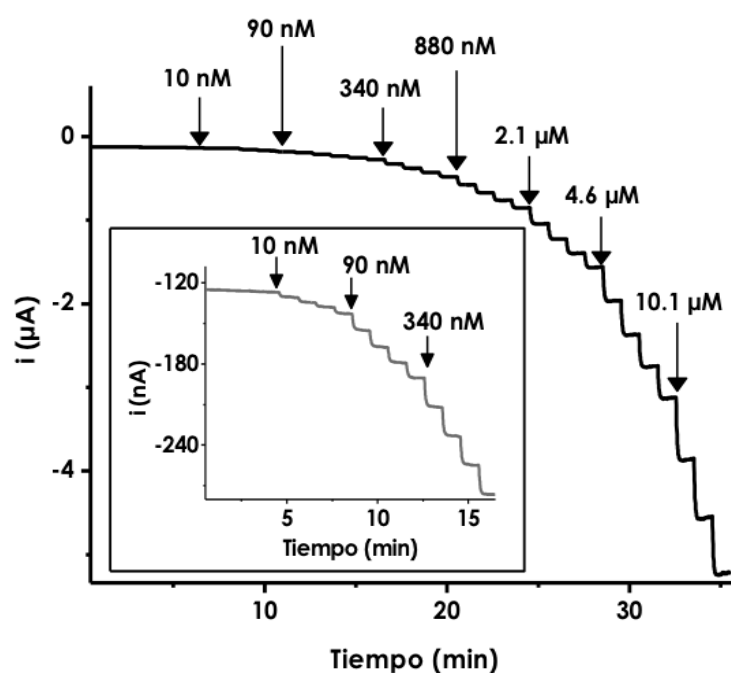


Figura 5.55. Curva de intensidad-tiempo obtenida con el biosensor Tyr/PAMAM-Sil-rGO/GCE para diferentes concentraciones de catecol. Disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 6.0 $E_{ap} = -0.15$ V vs Ag/AgCl.

El intervalo lineal para catecol (**Figura 5.56**) se ha obtenido en el margen de concentraciones comprendido entre 10 nM y 22 μ M ($r = 0.998$), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$i \text{ (mA)} = 424 \cdot [\text{Catecol}] \text{ (M)} - 3.7 \cdot 10^{-5} \quad \text{Ecuación 5.2}$$

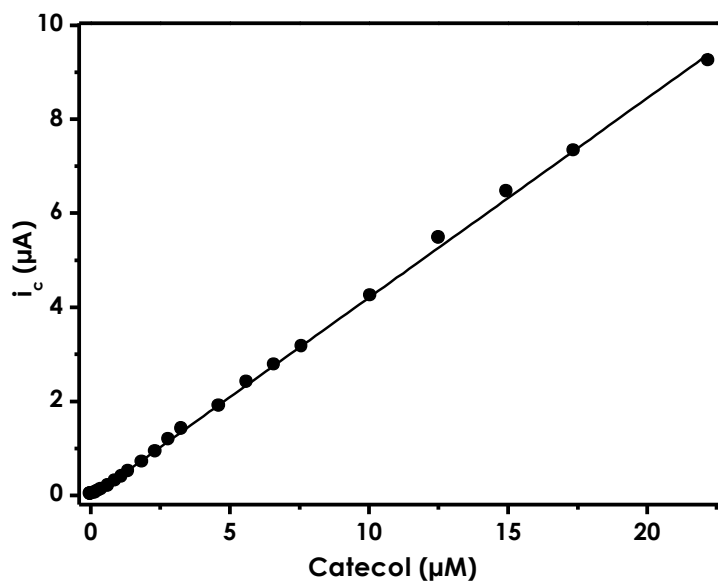


Figura 5.56. Calibrado para la detección amperométrica de catecol empleando biosensor Tyr/PAMAM-Sil-rGO/GCE.

Este intervalo lineal es más amplio que los reportados para biosensores de tirosinasa que utilizan una película de polipirrol dopada con fosfato sobre un electrodo de Pt (10 µM – 120 µM) [Apetrei, 2011], una película de polipirrol dopada con p-tolueno sulfonado sobre un electrodo de carbono vitrificado (5.6 µM – 74.3 µM) [Rajesh, 2004], nanopartículas magnéticas recubiertas con ciclodextrina sobre un electrodo de carbono vitrificado (100 nM – 12 µM) [Díez, 2012], una película de polipirrol sobre un electrodo de Pt (1.0 µM – 16 µM) [Ameer, 2009] y una red de nanopartículas de oro recubiertas con un dendrón de poliamidoamina sobre electrodos de Au (50 nM – 10 µM) [Villalonga, 2012]. Además, el intervalo lineal del biosensor es similar pero en un margen diferente de concentraciones del obtenido con biosensores de tirosinasa construidos con nanopartículas magnéticas y quitosano (83 nM – 70 µM) [Wang, 2008] y el basado en polianilina, líquido iónico y nanofibras de carbono (0.4 nM -2.1 µM) [Zhang, 2009].

El biosensor construido mostró una sensibilidad muy alta con un valor de la pendiente del calibrado de 424 mA/M, el cual es similar al reportado para un biosensor de tirosinasa basado en un electrodo de carbono vitrificado modificado con quitosano y nanopartículas de Ni recubiertas con C (514 mA/M) [Yang, 2012], pero significativamente mayor que las obtenidas con biosensores Tyr/nanovarillas de ZnO/GCE (2.14 mA/M) [Chen, 2008], Tyr/poly(N-3-aminopropil pirrol-co-pirrol)/ITO (3.46 mA/M) [Rajesh, 2004b], Tyr/polipirrol dopado con fosfato/Pt (47 mA/M)

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

[Apetrei, 2011], Tyr/PAMAM-nanopartículas de oro/Au (19 mA/M) [Villalonga, 2012] y Tyr/ácido 3-mercaptopropiónico/Au (34.2 mA/M) [Campuzano, 2003].

El límite de detección obtenido para catecol, 6 nM, se calculó de acuerdo con el criterio $3s_b/m$, siendo s_b la desviación estándar ($n = 10$) calculada a partir de las respuestas amperométricas medidas para una concentración de catecol 10 nM. Este valor fue inferior a los obtenidos para biosensores construidos con Tyr/ácido 3-mercaptopropiónico/Au (110 nM) [Campuzano, 2003], Tyr/PAMAM-nanopartículas de oro/Au (20 nM) [Villalonga, 2012], Tyr/nanopartículas de Fe_3O_4 /quitosano/GCE (25 nM) [Wang, 2008], Tyr/nanovarillas de ZnO/GCE (4 μ M) [Chen, 2008], Tyr/polipirrol dopado con fosfato/Pt (840 nM) [Apetrei, 2011], Tyr/polipirrol dopado con p-tolueno sulfonato/GCE (1.5 μ M) [Rajesh, 2004b] y Tyr/polipirrol/Pt (1.0 μ M) [Ameer, 2009].

El biosensor desarrollado se ha empleado también para la determinación de otros compuestos fenólicos como 3,4-xilenol, *p*-cresol, *m*-cresol, fenol, hidroquinona y 4-cloro-1-naftol. En la **Tabla 5.5** se recogen las características analíticas correspondientes a las curvas de calibrados de los distintos compuestos. Se observa que se alcanza muy buena sensibilidad para compuestos como el *p*-cresol como era de esperar para compuestos fenólicos con al menos una posición *orto* libre [Campuzano, 2003], [Espín, 1998].

Tabla 5.5. Características analíticas del biosensor Tyr/PAMAM-Sil-rGO/GCE para distintos compuestos fenólicos

COMPUESTO	INTERVALO LINEAL, μ M	SENSIBILIDAD, mA/M	r	LD, nM
3,4-Xilenol	0.05 – 0.6	24.4	0.9980	50
<i>p</i> -Cresol	0.01 – 0.14	337	0.9874	10
<i>m</i> -Cresol	0.25 – 1.0	47.2	0.9880	250
Fenol	0.1 – 0.5	54.1	0.9940	100
Hidroquinona	2.5 – 58.8	1.0	0.9769	2500
4-Cloro-1-naftol	—	—	—	—

a) Repetibilidad de las medidas

El estudio de la repetibilidad de las medidas se llevó a cabo realizando 10 calibrados sucesivos para catecol en el intervalo de concentración comprendido entre 100 nM y 3.3 μ M empleando el mismo biosensor. A partir de las pendientes resultantes se calculó la media y la desviación estándar a partir de los cuales se obtuvo un valor de R.S.D. ($n=10$) de 6.8%.

Este valor de la desviación estándar relativa, refleja la buena repetibilidad de las medidas analíticas obtenidas con el biosensor sin necesidad de aplicar al electrodo ningún pretratamiento o limpieza entre ellas.

b) Reproducibilidad en la fabricación del biosensor

Se evaluó la reproducibilidad del proceso de fabricación del biosensor. Para ello se compararon los valores de las pendientes de los calibrados realizados para catecol en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0.1 y 0.5 μM , empleando 10 biosensores distintos preparados de la misma manera. El valor obtenido de R.S.D. fue de 9.4% lo cual indicó también una buena reproducibilidad en la fabricación del biosensor.

c) Tiempo de vida útil del biosensor

Un aspecto importante a estudiar en la caracterización del biosensor es el tiempo que puede estar almacenado. Trabajando en condiciones de atmósfera húmeda (disolución reguladora de fosfato 0.1 M y pH 6.0) o en condiciones de atmósfera seca a 4°C, se observó que tras 25 días no se producía pérdida apreciable de actividad catalítica y que a los 30 días se retenía un 96% de la actividad enzimática inicial almacenando el biosensor en atmósfera seca y un 78% en atmósfera húmeda (**Figura 5.57**).

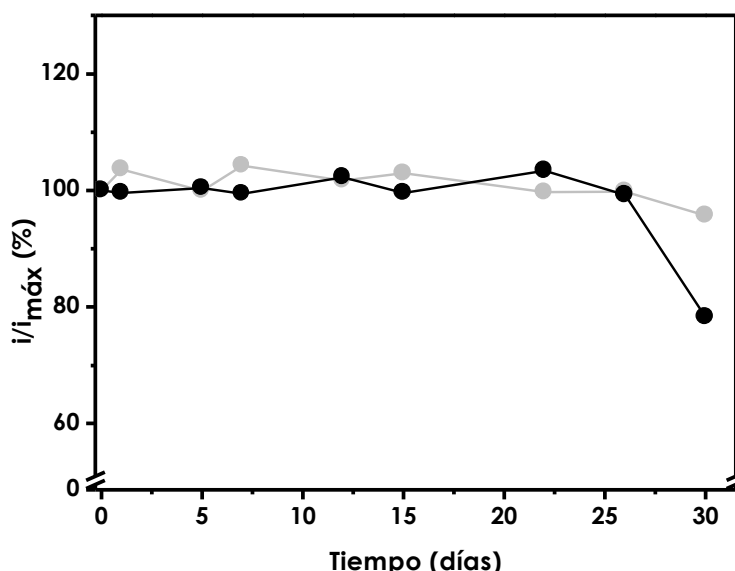


Figura 5.57. Respuestas amperométricas con un biosensor Tyr/PAMAM-Sil-rGO/GCE biosensor para 2.0 μM de catecol en función del tiempo de almacenamiento a 4°C en atmósfera seca (•) y húmeda (◐) en disolución reguladora de fosfato 0.1M (pH 6.0), $E_{ap} = -0.15$ V vs. Ag/AgCl.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este excelente comportamiento indica que la inmovilización covalente de la tirosinasa en el derivado de grafeno-PAMAM es apropiada y permite que la proteína se retenga fuertemente sin una apreciable pérdida de la conformación activa bajo las condiciones y tiempo estudiados.

5.2.3.1.5. Cinética de la reacción enzimática

Para el cálculo de los parámetros cinéticos, se registraron los correspondientes amperogramas en disoluciones agitadas en un rango de concentración de catecol comprendido entre 140 nM y 121 μM . En la **Figura 5.58** se muestra la gráfica de Lineweaver-Burk correspondiente.

La constante cinética aparente para la transformación catalítica de catecol en 1,2-benzohidroquinona en la superficie electrodo nanoestructurada, se determinó tal y como se explica en el **apartado 4.5.2**, obteniéndose un valor para $i_{\text{máx}}$ de 12.8 μA y una K_{M}^{ap} de 37.1 mM. El valor obtenido para la constante aparente es aproximadamente 10 veces menor que el de la enzima libre (240 mM) [Smith, 1962] lo que sugiere que la enzima tiene un microentorno favorable tras la inmovilización en el nanomaterial híbrido PAMAM-Sil-rGO.

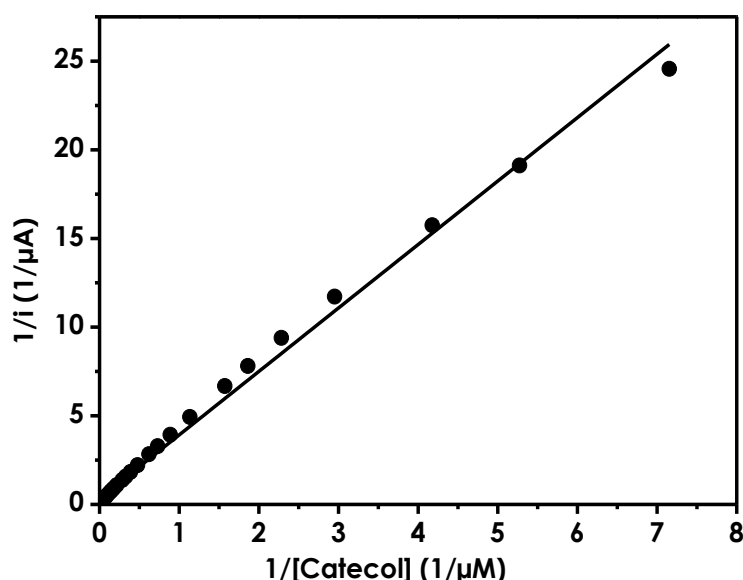


Figura 5.58. Representación de la ecuación de Lineweaver-Burk obtenida para catecol en disolución reguladora de fosfato 0.1M (pH 6.0), $E_{\text{ap}} = -0.15$ V (vs. Ag/AgCl).

Los biosensores de Tyr con los que se comparan los resultados obtenidos en el presente trabajo se recogen en la **Tabla 5.1** de este capítulo de la memoria.

5.2.3.2. BIOSENSOR $\text{GOx/PtNPs/PAMAM-Sil-rGO/GCE}$ PARA LA DETECCIÓN DE GLUCOSA

Teniendo en cuenta la capacidad de los dendrímeros de PAMAM de estabilizar nanopartículas metálicas tanto en su interior como en su superficie, se ha utilizado este mismo material para preparar un novedoso nanomaterial híbrido orgánico-inorgánico decorando el derivado de PAMAM-Sil-rGO con nanopartículas de platino. Este nanomaterial híbrido se ha empleado para la nanoestructuración de un electrodo de carbono vitrificado que ha servido como soporte para la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa, con el fin de construir un biosensor de tercera generación para glucosa.

5.2.3.2.1. Preparación del electrodo enzimático

En la **Figura 5.59** se ilustran las etapas llevadas a cabo para la fabricación del biosensor. En primer lugar, el nanomaterial híbrido PAMAM-Sil-rGO, se depositó sobre la superficie de un electrodo de carbono vitrificado (GCE) y tras llevar a cabo la reducción electroquímica del GO, se formaron nanopartículas de Pt reduciendo químicamente el H_2PtCl_6 con NaBH_4 . Para finalizar, se inmovilizó la enzima glucosa oxidasa (GOx) mediante entrecruzamiento con glutaraldehído.

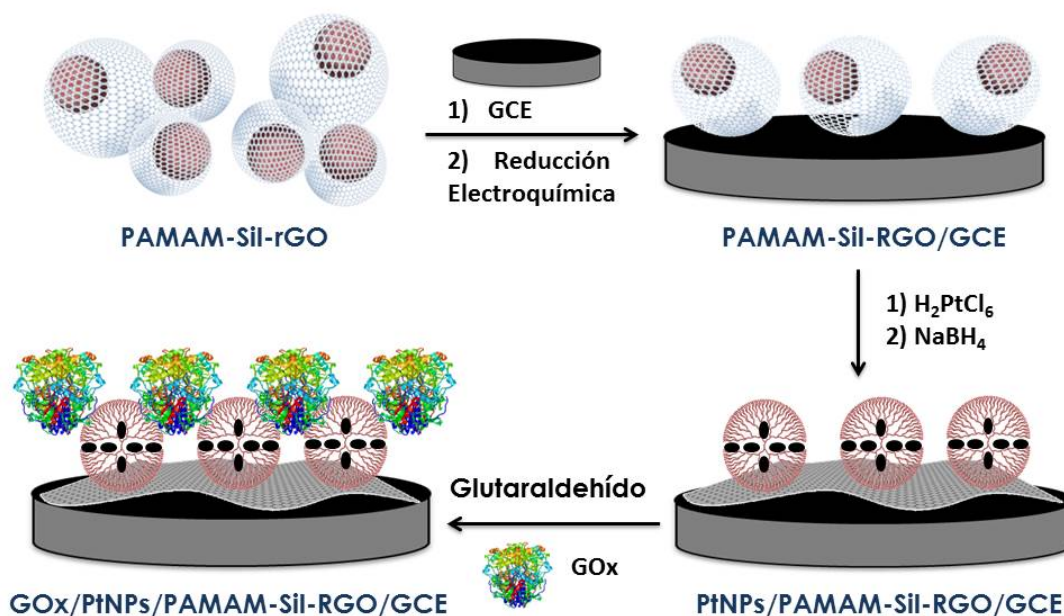


Figura 5.59. Representación esquemática de la preparación del electrodo enzimático $\text{GOx/PtNPs/PAMAM-Sil-rGO/GCE}$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El funcionamiento de biosensor se basa en el esquema de reacciones que se muestra en la **Figura 5.60**.

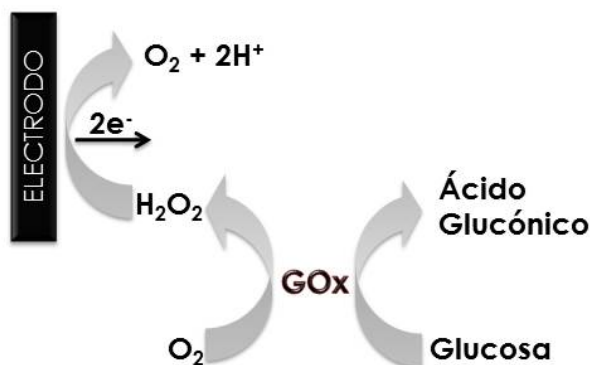


Figura 5.60. Esquema de la reacción enzimática de GOx frente al sustrato glucosa.

5.2.3.2.2. Caracterización de la superficie electródica

El análisis por TEM (**Figura 5.61.A y B**) reveló la formación de pequeñas nanopartículas de Pt no esféricas, con un tamaño medio de 3.3 ± 0.7 nm. Tanto en las micrografías de TEM como de FE-SEM se observó que estas nanopartículas se dispusieron principalmente en forma de racimos sobre las láminas del grafeno. La formación de tales disposiciones tridimensionales se puede atribuir a la inclusión de las nanopartículas en los espacios intersticiales del PAMAM, estabilizadas por interacciones de atracción entre los coloides y los diferentes grupos amino del dendrímero. La formación de estructura similares de dendrímero-NPs han sido previamente descritas en la literatura [**Crooks, 2001**], [**Scott, 2005**].

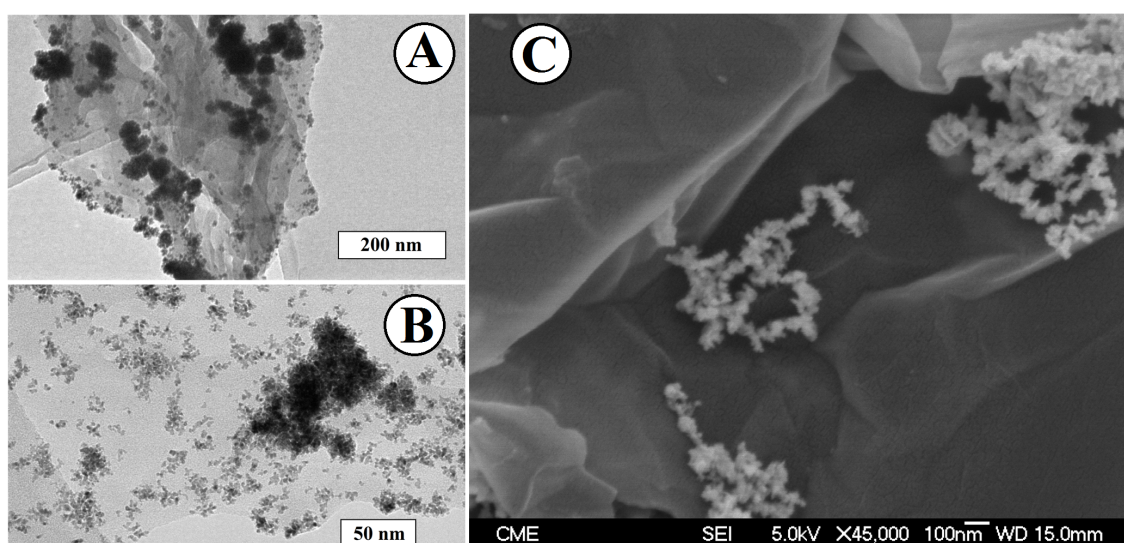


Figura 5.61. Imágenes (A y B) TEM y (C) FE-SEM de GOx/PtNPs/PAMAM-Sil-rGO/GCE.

Se observó también que las nanoláminas PtNPs/PAMAM-Sil-rGO están menos arrugadas que el nanomaterial híbrido inicial (**Figura 5.39**), lo que sugiere que la inclusión de las nanopartículas de Pt en el dendrímero causa una expansión del nanomaterial. Este cambio en la morfología del material basado en el grafeno podría estar también asociado al proceso de reducción con NaBH_4 .

Se estudiaron las propiedades interfaciales de la superficie electrodo después de cada paso de la modificación mediante EIS utilizando el par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ (**Figura 5.62.A**). Como era de esperar, la resistencia a la transferencia de carga del electrodo sin modificar (84Ω) se redujo drásticamente tras el recubrimiento con PAMAM-Sil-rGO ($R_{TC} = 2 \Omega$) debido al carácter electroconductor del nanohíbrido. Además se observó que a bajas frecuencias predominaba una línea recta con una pendiente próxima a la unidad. Por otro lado, tras añadir las nanopartículas de Pt se produjo un aumento de la R_{TC} a un valor de 90Ω debido al efecto de la disminución de la permeabilidad del material híbrido al intercalarse las nanopartículas metálicas. No obstante, hay que resaltar que la resistencia a la transferencia electrónica que se observó en el PtNPs/PAMAM-Sil-rGO/GCE, fue similar a la obtenida con el GCE limpio, demostrándose así las elevadas propiedades electroconductoras del nanomaterial híbrido inorgánico-orgánico.

Tras la inmovilización de la enzima GOx se produjo un aumento significativo del diámetro del semicírculo del diagrama de Nyquist hasta un valor de 244Ω , debido al recubrimiento con las moléculas de proteína aislantes.

Todos los datos experimentales de la espectroscopia de impedancia electroquímica fueron obtenidos mediante el ajuste a un circuito equivalente de Randles convencional (**Figura 5.62.B**).

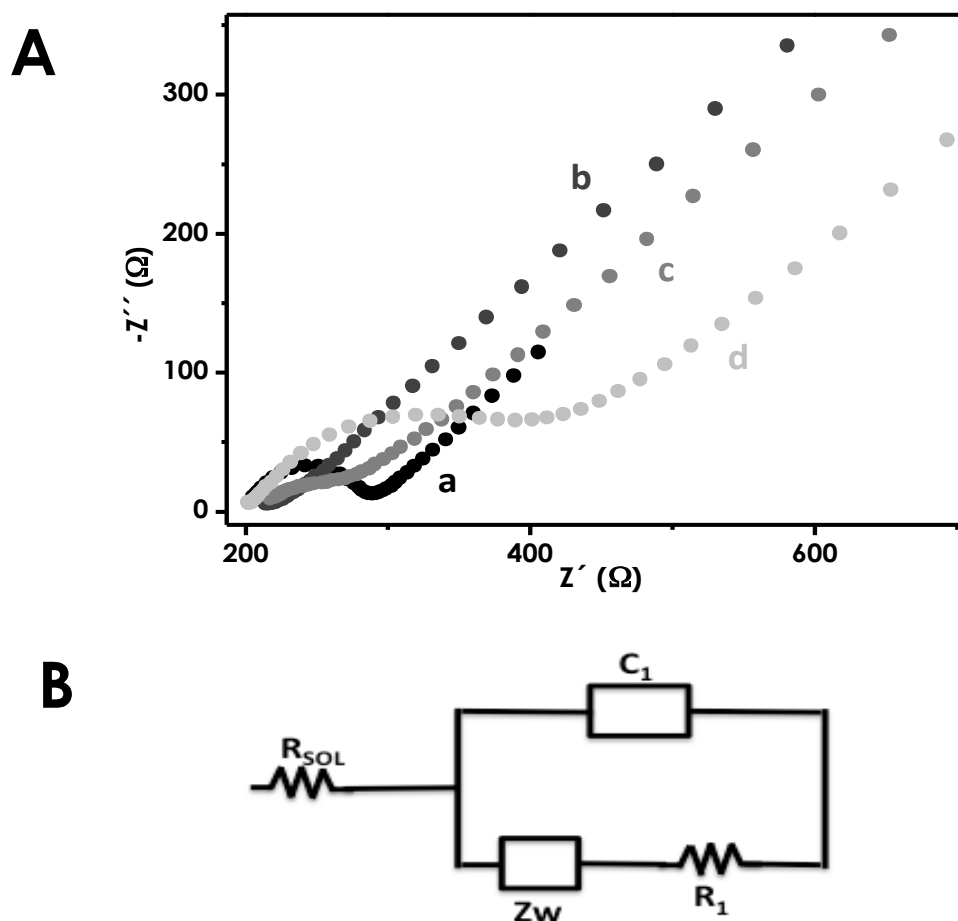


Figura 5.62. (A) Diagramas de Nyquist para (a) GCE, (b) PAMAM-Sil-rGO/GCE, (c) PtNPs/PAMAM-Sil-rGO/GCE y (d) GOx/PtNPs/PAMAM-Sil-rGO/GCE. Impedancias realizadas en una disolución de KCl 0.1 M conteniendo $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 5 mM (1:1). (B) Circuito equivalente de Randles.

El proceso de la modificación del electrodo también se estudió por voltamperometría cíclica, realizando las medidas en una disolución de KCl 0.1 M conteniendo iones $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ 5 mM. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 5.63**, donde se puede observar que los voltamperogramas de todas las etapas de modificación del electrodo mostraron patrones *quasi* reversibles con picos anódicos y catódicos bien definidos, lo que sugiere unas buenas propiedades electroconductoras para las diferentes superficies, que permiten la difusión rápida de la sonda electroquímica hacia el electrodo.

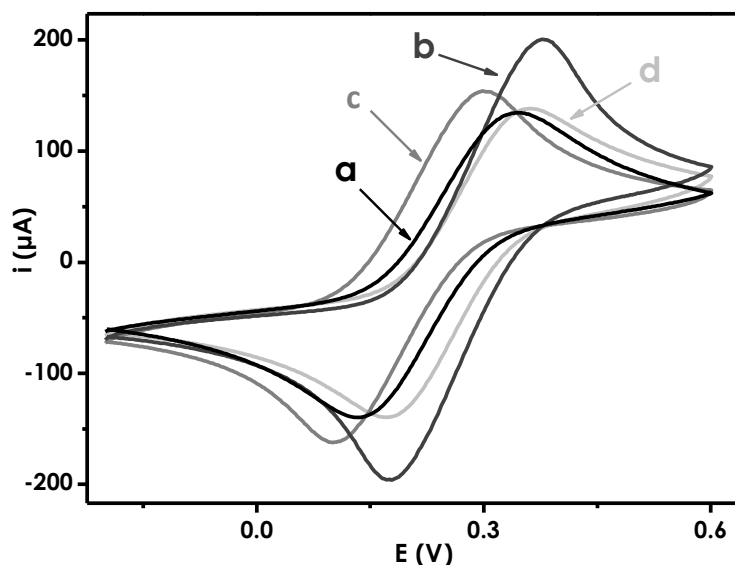


Figura 5.63. Voltamperogramas cíclicos sobre (a) GCE, (b) PAMAM-Sil-rGO/GCE, (c) PtNPs/PAMAM-Sil-rGO/GCE y (d) GOx/PtNPs/PAMAM-Sil-rGO/GCE una disolución de KCl 0.1 M conteniendo $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 5 mM (1:1) a una velocidad de barrido de 50 mV/s.

Este hecho se confirmó cuantitativamente a partir de parámetros como la diferencia de potencial entre el pico anódico y el catódico (ΔE), la relación entre las intensidades de dichos picos (i_a/i_c) y el área superficial electroquímica (A) cuyos valores se recogen en la **Tabla 5.6**.

Tabla 5.6. Parámetros electroquímicos obtenidos mediante voltamperometría cíclica.

Electrodo	ΔE , mV	A , mm ²	i_a/i_c
GCE	181	7.08	1.09
PAMAM-Sil-rGO	169	8.93	1.06
PtNPs/PAMAM-Sil-rGO/GCE	171	7.64	0.99
GOx/PtNPs/PAMAM-Sil-rGO/GCE	236	4.81	1.02

El área superficial electroquímica de los electrodos resultantes tras las diversas etapas de modificación se evaluó mediante la ecuación de Randles-Sevcik. El recubrimiento del electrodo de carbono vitrificado con PAMAM-Sil-rGO dio lugar a un aumento del área electroquímica desde 7.08 mm² a 8.93 mm², debido a las buenas propiedades electroconductoras del derivado de grafeno y a la permeabilidad de las moléculas de PAMAM. La posterior decoración del material con PtNPs redujo el área superficial electroquímica hasta un valor de 7.64 mm². Este hecho puede justificarse por la disminución de la permeabilidad del nanomaterial

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

debido a que las nanopartículas de Pt ocupan los espacios intersticiales de las moléculas de dendrímero. Finalmente la inmovilización de la enzima GOx reduce todavía más el área electroquímica a 4.81 mm^2 debido a las características no conductoras de las moléculas de proteína.

El comportamiento voltamperométrico del biosensor GOx/PtNPs/PAMAM-Sil-rGO/GCE en ausencia y en presencia de glucosa se muestra en la **Figura 5.64**. Como puede observarse, el nanomaterial híbrido orgánico-inorgánico muestra una alta actividad electrocatalítica ante la descomposición de H_2O_2 , como era de esperar debido al elevado número de nanopartículas de Pt inmovilizadas en el nanomaterial de grafeno y a la naturaleza catalítica de este metal.

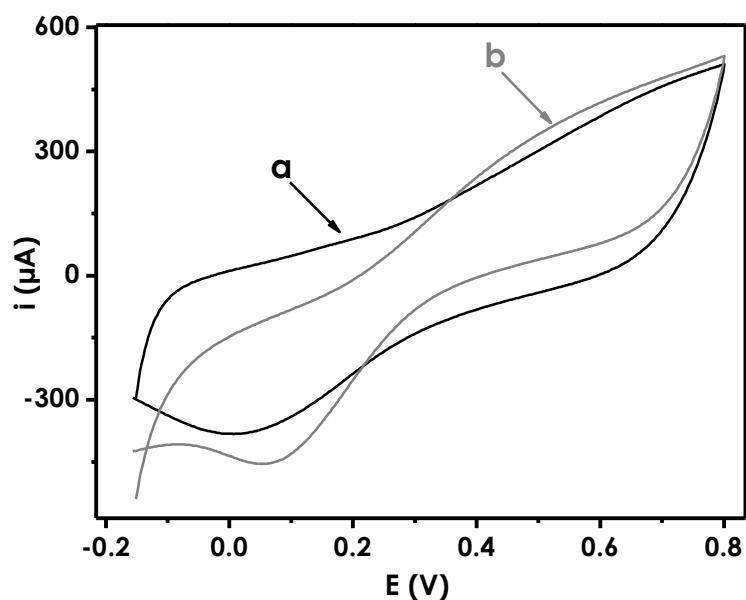


Figura 5.64. Voltamperogramas cíclicos obtenidos con el biosensor GOx/PtNPs/PAMAM-Sil-rGO/GCE en disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 7.5) empleando una velocidad de barrido de 50 mV/s (a) antes y (b) después de adicionar glucosa.

Para confirmar la existencia de efecto electrocatalítico, se fabricaron biosensores en los que se inmovilizó la enzima GOx en las diferentes superficies obtenidas tras las diferentes etapas de la construcción de la plataforma electródica y se compararon las señales amperométricas obtenidas con las distintas configuraciones, aplicando un potencial de 0.4 V y a un nivel de concentración de glucosa de 1 mM.

No se obtuvieron respuestas amperométricas para los bioelectrodos preparados en ausencia de PtNPs, lo que confirmó que estas nanopartículas metálicas jugaban un papel fundamental en la descomposición electrocatalítica del H_2O_2 , generado en la superficie del electrodo tras la reacción enzimática de la glucosa.

Para confirmar esto, las diferentes superficies electródicas obtenidas tras cada etapa de la fabricación del biosensor fueron también evaluadas tras adiciones sucesivas de una disolución 1 mM de H₂O₂. La **Figura 5.65** muestra la variación en los valores de las pendientes de los correspondientes calibrados obtenidos para H₂O₂ en el intervalo de concentraciones entre 1 y 4 mM.

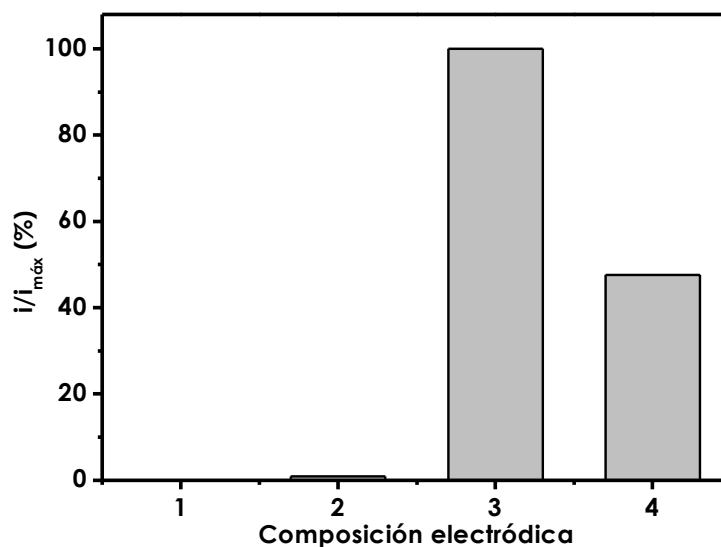


Figura 5.65. Influencia de la composición del electrodo sobre el valor de la pendiente (normalizada frente al valor más alto) del calibrado correspondiente obtenido para H₂O₂, (1) GCE, (2) PAMAM-Sil-rGO/GCE, (3) PtNPs/PAMAM-Sil-rGO/GCE, (4) GOx/PtNPs/PAMAM-Sil-rGO/GCE, en disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 7.5).

Como puede observarse, la sensibilidad alcanzada con el electrodo PtNPs/PAMAM-Sil-rGO/GCE (**Figura 5.65.3**) fue casi el doble de la obtenida con el bioelectrodo GOx/PtNPs/PAMAM-Sil-rGO/GCE (**Figura 5.65.4**). Además, la sensibilidad de los electrodos preparados sin nanopartículas de Pt (**Figura 5.65.2**) fue menos del 1% que la alcanzada cuando se añadieron las partículas metálicas, lo que confirma que las PtNPs están implicadas en la descomposición electrocatalítica de peróxido de hidrógeno sobre la superficie nanoestructurada. Asimismo, resulta evidente que la inmovilización de la enzima reducía la capacidad del nanomaterial híbrido para descomponer H₂O₂, probablemente enmascarando las nanopartículas de Pt situadas en la superficie de las moléculas de dendrímero PAMAM.

Estos resultados apoyan el diseño propuesto de GOx/PtNPs/PAMAM/Sil-rGO/GCE para ser empleado como biosensor enzimático.

5.2.3.2.3. Optimización de las variables experimentales

Se optimizaron las distintas variables experimentales que afectan a la respuesta amperométrica del biosensor nanoestructurado empleando glucosa como sustrato enzimático.

Todas las optimizaciones se han realizado a partir de las señales amperométricas (i) registradas para glucosa 1 mM, normalizando la respuesta obtenida frente al valor más alto ($i/i_{máx}$).

a) Optimización de la composición del biosensor

En primer lugar se optimizó la cantidad de PAMAM-Sil-rGO depositada en la superficie del electrodo de carbono vitrificado, obteniéndose un aumento de la intensidad normalizada ($i/i_{máx}$) al aumentar la cantidad de nanomaterial desde 5 μg hasta 12.5 μg (**Figura 5.66.A**), valor a partir del cual se observó una disminución de la respuesta obtenida. Un aumento de la cantidad de nanomaterial depositado supuso una disminución de la respuesta analítica, probablemente debido a la formación de multicapas sobre la superficie electródica, lo que causa un impedimento estérico para la inmovilización de la enzima y por tanto reduce la cantidad de GOx activa en la interfase del biosensor. Por todo ello se ha elegido como cantidad óptima de PAMAM-Sil-rGO 12.5 μg .

Por otro lado, la respuesta electroquímica del biosensor aumenta progresivamente con la cantidad de GOx inmovilizada en la superficie electródica nanoestructurada, alcanzando el valor máximo con 150 μg de enzima (**Figura 5.66.B**). Este comportamiento se puede justificar por la unión progresiva de una capa de enzima catalíticamente activa sobre el PAMAM. Al aumentar más la cantidad de enzima inmovilizada disminuye la respuesta electroanalítica, debido probablemente, a la formación de una segunda capa de proteína sobre la superficie electródica que puede formar aductos enzimáticos con menor actividad catalítica debido a efectos estéricos.

En el caso de la concentración de glutaraldehído se observó que la mayor respuesta amperométrica se obtenía cuando se empleaba una concentración del reactivo de 4% (v/v) (**Figura 5.66.C**). Podría esperarse que un aumento de la concentración de entrecruzante permitiera la inmovilización de mayor cantidad de enzima, sin embargo, una elevada cantidad del mismo puede provocar uniones entre moléculas de enzima dando lugar a conformaciones proteicas más rígidas y

con menor actividad catalítica [Migneault, 2004]. Además, una alta concentración de glutaraldehído puede inactivar la enzima debido a la modificación de residuos de aminoácidos del centro activo de la GOx.

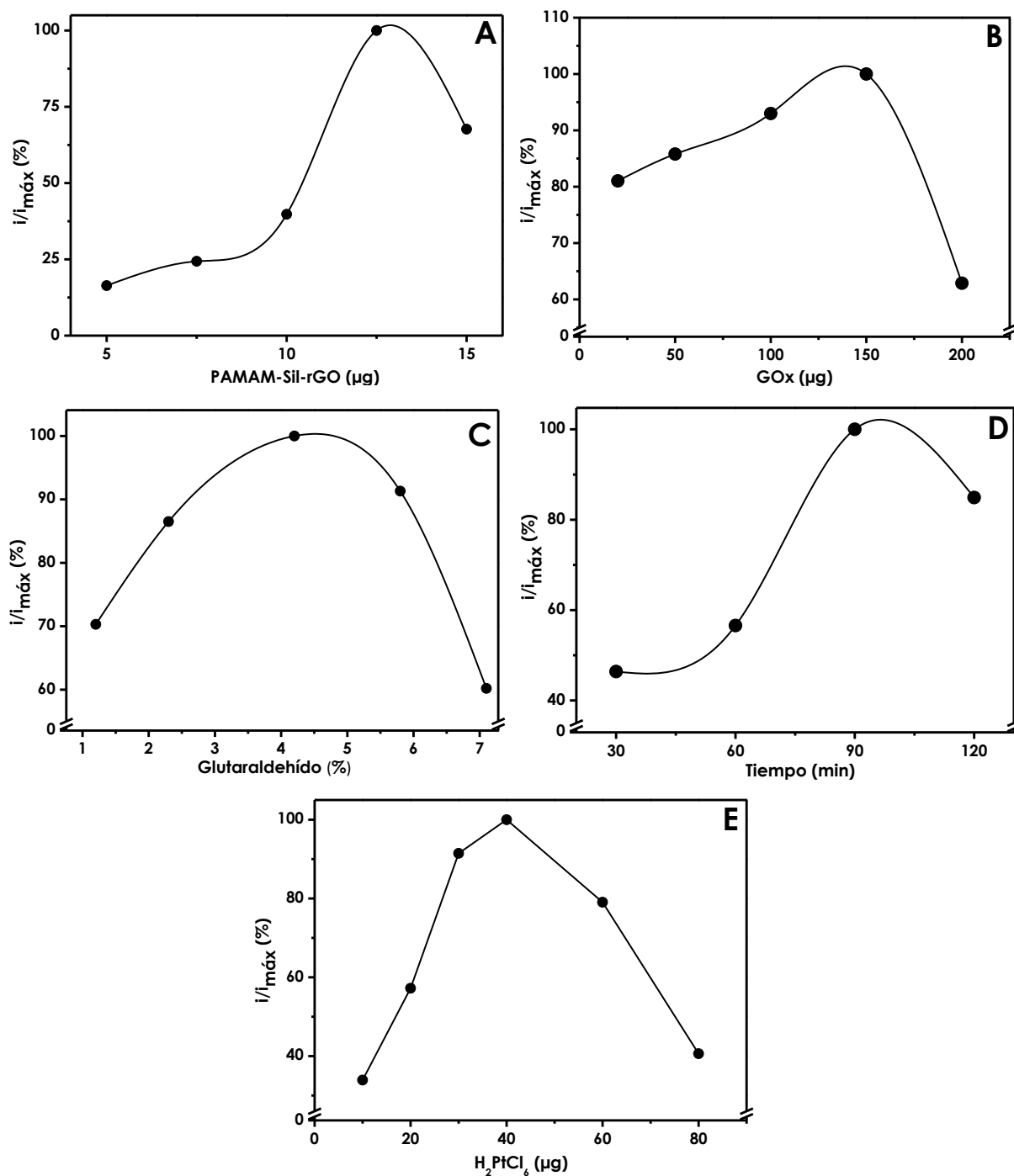


Figura 5.66. Influencia de la cantidad de (A) PAMAM-Sil-rGO, (B) enzima GOx, (C) glutaraldehído (D) tiempo de incubación de la enzima y (E) cantidad de H_2PtCl_6 sobre la respuesta amperométrica normalizada del electrodo GOx/PtNPs/PAMAM-Sil-rGO/GCE empleando una concentración de glucosa 1 mM en disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 7.5) y $E_{ap} = 0.4$ V vs Ag/AgCl.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Otra variable experimental estudiada ha sido el tiempo de inmovilización de la enzima. Como se puede observar en la **Figura 5.66.D**, se obtuvo una respuesta amperométrica máxima cuando se deja que el entrecruzamiento tenga lugar durante 90 minutos a 4 °C. A mayores tiempos de reacción se obtiene menor respuesta analítica debido, probablemente, a la inactivación parcial de la enzima por exhaustivo tratamiento con el agente de entrecruzamiento.

Por último se evaluó la influencia de la cantidad de H_2PtCl_6 , eligiendo como óptima la cantidad de 40 μg para asegurar la obtención de la mayor respuesta analítica (**Figura 5.66.E**). Es esperable que las nanopartículas de Pt se estabilicen en el nanomaterial híbrido PAMAM-Sil-rGO mediante interacciones electrostáticas con los distintos grupos amino del dendrímero [Crooks, 2001], [Scott, 2005]. Si se hubiera utilizado mayor cantidad de H_2PtCl_6 , una gran cantidad de grupos amino habrían estado involucrados en la estabilización de las nanopartículas, por lo que no estarían disponibles para la inmovilización de las moléculas de GOx lo que provocaría una disminución de la cantidad de enzima activa en la superficie electródica y por consiguiente, una disminución de la respuesta amperométrica, tal y como se puede observar en la **Figura 5.66.E**.

b) Selección del potencial aplicado

La elección del potencial óptimo para el biosensor se realizó a partir de la representación de la intensidad de corriente normalizada ($i/i_{\text{máx}}$), frente a diferentes valores del potencial aplicado, en el intervalo comprendido entre 0.2 V y 0.5 V, para glucosa 1 mM en una disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7.5 (**Figura 5.67**).

Cabe resaltar que solamente se estudiaron potenciales anódicos debido a que se obtenían señales con elevada corriente e inestables al medir la reducción de H_2O_2 con los bioelectrodos preparados.

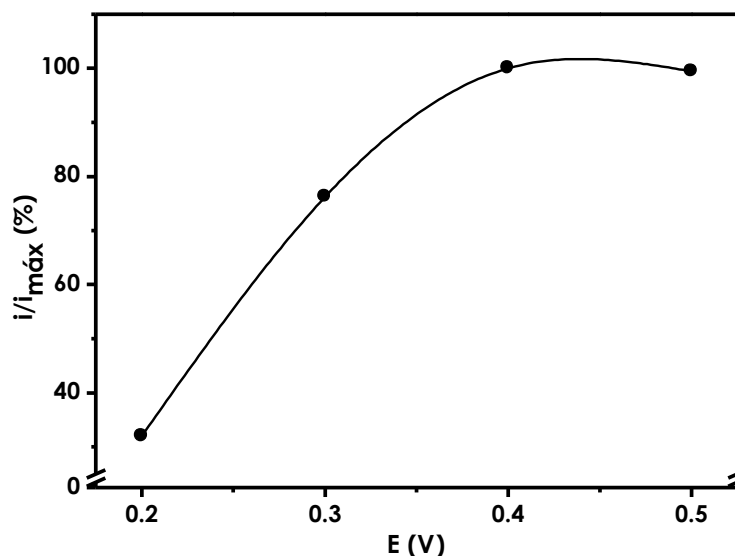


Figura 5.67. Variación de la intensidad de corriente normalizada con el potencial aplicado al biosensor de GOx/PtNPs/PAMAM-Sil-rGO/GCE empleando glucosa 1 mM como sustrato enzimático en disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 7.5).

Como puede observarse, se produce un aumento de la intensidad normalizada al aumentar el potencial hacia valores positivos hasta 0.4 V, manteniéndose estable para potenciales más positivos. De acuerdo con estos resultados, se seleccionó un potencial de 0.4 V, con objeto de conseguir una detección sensible al potencial menos extremo y así minimizar el número de posibles interferentes capaces de oxidarse sobre el electrodo.

c) Influencia del pH del medio de medida

Se estudió la influencia del pH sobre la intensidad de corriente normalizada ($i/i_{máx}$) para glucosa 1 mM. Para ello se emplearon disoluciones reguladoras de fosfato 0.1 M en el intervalo de pH comprendido entre 5.5 y 9.0.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

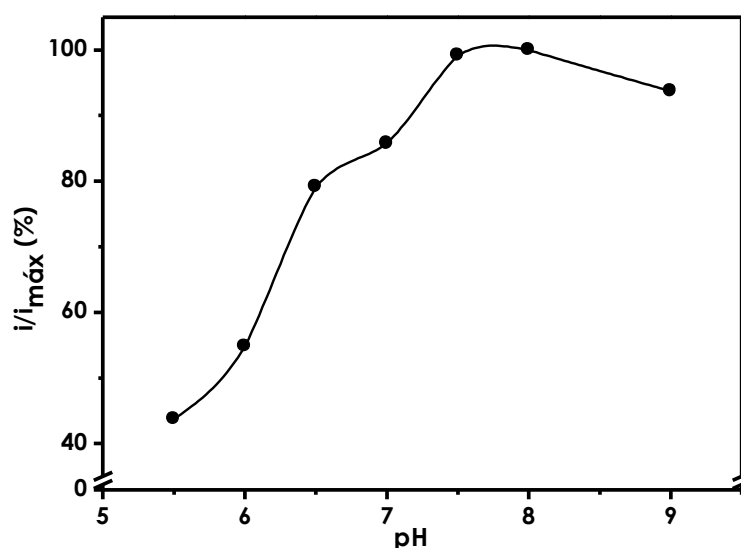


Figura 5.68. Variación de la intensidad de corriente en estado estacionario normalizada con el pH del medio de medida para el biosensor GOx/PtNPs/PAMAM-Sil-rGO/GCE para glucosa 1 mM en disolución reguladora de fosfato 0.1 M y $E_{\text{ap}} = 0.4$ V vs Ag/AgCl.

Como se puede observar en la **Figura 5.68**, se obtuvo un valor máximo de señal normalizada para un pH de 7.5. Para valores más ácidos se produjo una acusada disminución de la respuesta analítica como consecuencia de la pérdida de la actividad enzimática. Sin embargo, para valores superiores a 7.5 la disminución de la respuesta no fue tan acusada. De acuerdo con estos resultados, se seleccionó tampón fosfato 0.1 M de pH 7.5 para estudios posteriores.

5.2.3.2.4. Características analíticas del biosensor

En las condiciones experimentales seleccionadas y trabajando con amperometría en disoluciones agitadas, se obtuvieron los amperogramas típicos para adiciones sucesivas de glucosa tal y como se muestra en la **Figura 5.69**. El biosensor mostró una rápida respuesta analítica alcanzándose el 95% de la corriente en estado estacionario en 4 segundos después de la adición del sustrato.

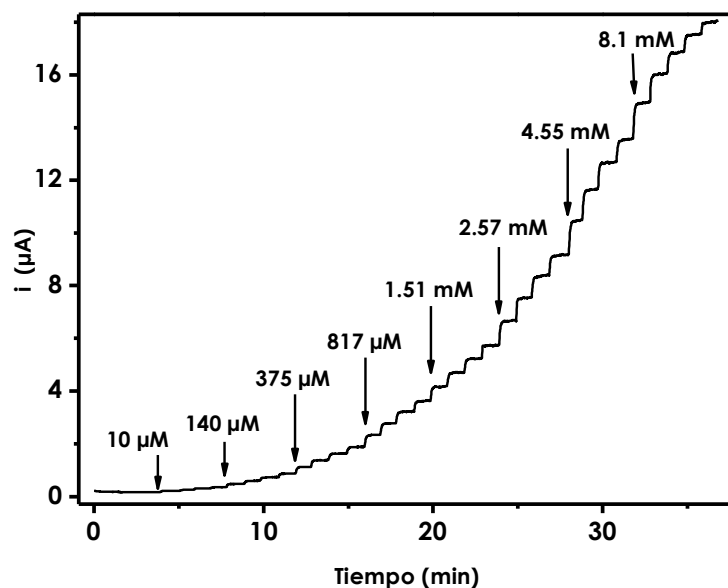


Figura 5.69. Curva de intensidad-tiempo obtenida con el biosensor GOx/PtNPs/PAMAM-Sil-rGO/GCE para concentraciones crecientes de glucosa. Medidas realizadas en disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 7.5) y $E_{ap} = 0.4$ V vs Ag/AgCl.

La curva de calibrado resultante (**Figura 5.70**) muestra un intervalo lineal en un intervalo muy amplio de concentraciones, 10 μ M - 8.1 mM ($r = 0.998$), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$i_c (\mu\text{A}) = 1.76 \cdot [\text{glucosa}] (\text{mM}) - 0.007 \quad \text{Ecuación 5.3}$$

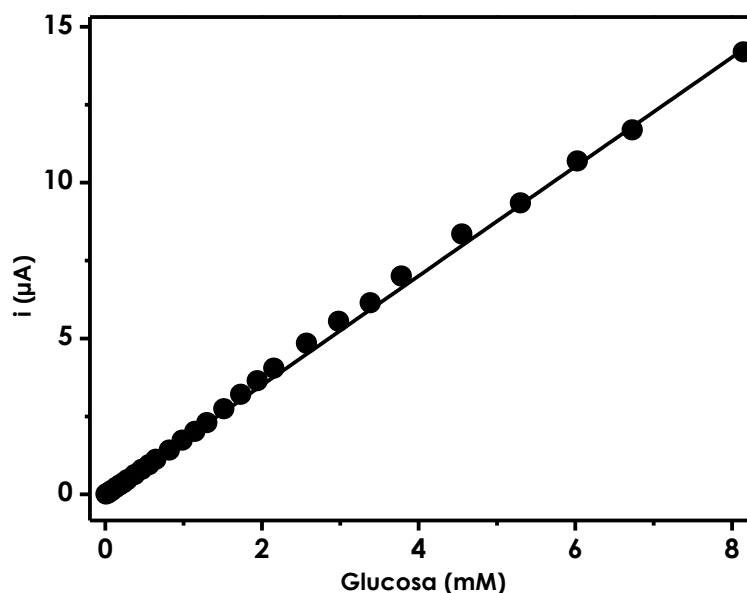


Figura 5.70. Calibrado para la detección amperométrica de glucosa empleando el biosensor GOx/PtNPs/PAMAM-Sil-rGO/GCE. $E_{ap} = 0.4$ V.

El biosensor mostró una elevada sensibilidad, 24,6 mA/M cm^2 , que fue calculada utilizando el área superficial electroactiva del GOx/PtNPs/PAMAM-Sil-rGO/GCE, y

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

que puede atribuirse a la gran superficie electroactiva del electrodo modificado, al efecto electrocatalítico sinérgico de las PtNPs y del rGO sobre la oxidación del H₂O₂ y a que se produce una rápida transferencia electrónica entre la enzima y la superficie electródica debida a las propiedades electroconductoras de la estructura 3D del nanomaterial híbrido.

El límite de detección alcanzado con el biosensor para glucosa fue de 0.8 μM, valor calculado como se explica en el **apartado 4.5**, siendo la desviación estándar (S_b) la correspondiente a 10 señales amperométricas para una concentración 10 μM de glucosa.

Cuando se comparan estas características analíticas con las reportadas para otros sensores de glucosa basados en electrodos modificados con grafeno (**Tabla 3.3**), puede decirse que, en general, el biosensor desarrollado en este trabajo presenta un comportamiento analítico similar e incluso mejor que otros biosensores reportados previamente [**Baby, 2010**], [**Bai, 2013**], [**Jang, 2012**], [**Liu, 2010**], [**Liu, 2011**], [**Qiu, 2011**], [**Razmi, 2013**], [**Shan, 2010**]. Aunque los biosensores construidos por inmovilización de la GOx en una película de grafeno-polidopamina [**Ruan, 2013**] y en grafeno con quitosano y nanopartículas de paladio [**Zeng, 2012**], presentan una sensibilidad ligeramente mejor, cabe resaltar que el potencial de trabajo con estos biosensores fue mucho más alto, 0.7 V, lo cual tiene un efecto negativo en la selectividad del biosensor. Por otro lado, cuando se preparó el biosensor inmovilizando la enzima sobre nanopelículas de PdNPs/Grafeno/quitosano [**Wu, 2009b**], se obtuvo un intervalo lineal ligeramente mejor, pero el límite de detección alcanzado era mayor que el del biosensor de GOx/PtNPs/PAMAM-Sil-rGO/GCE trabajando en condiciones operacionales similares.

a) Repetibilidad de las medidas

El estudio de la repetibilidad de las medidas efectuadas con un mismo biosensor se llevó a cabo realizando 10 adiciones independientes y sucesivas de glucosa 1 mM. El valor de R.S.D. fue 5.8%, lo que refleja una buena repetibilidad de las medidas analíticas obtenidas con el biosensor sin necesidad de aplicar al electrodo ningún pretratamiento o limpieza entre ellas.

b) Reproducibilidad en la fabricación del biosensor

También se evaluó la reproducibilidad del proceso de fabricación del biosensor. Para ello se llevaron a cabo medidas para la misma concentración de glucosa mencionada anteriormente con 10 electrodos distintos preparados de la misma manera. El valor obtenido de R.S.D. 10.3 %, indica una aceptable reproducibilidad en la fabricación del biosensor.

d) Tiempo de vida útil del biosensor

Un aspecto importante a estudiar en la caracterización del biosensor es el tiempo que puede estar almacenado en atmósfera seca a 4°C. Los electrodos almacenados se utilizaron periódicamente para construir calibrados con 4 adiciones consecutivas de glucosa 20 mM. Se observó que el biosensor retenía más de un 95% de la actividad enzimática inicial después de una semana de almacenamiento, pero tras tiempos más largos se producía una pérdida progresiva alcanzando un 52% de actividad inicial tras dos semanas de almacenamiento (**Figura 5.71**).

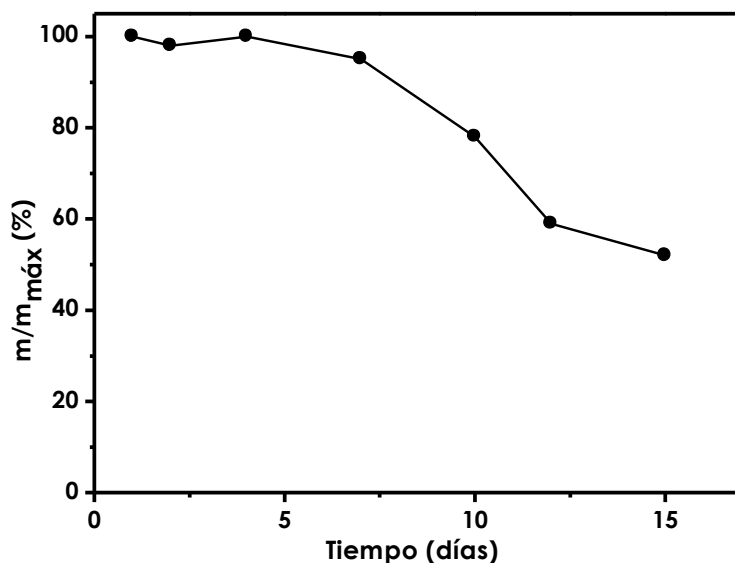


Figura 5.71. Pendiente normalizada de los calibrados construidos para glucosa con el biosensor GOx/PtNPs/PAMAM-Sil-rGO/GCE en función del tiempo de almacenamiento a 4°C en atmósfera seca en disolución reguladora de fosfato 0.1M (pH 7.5). $E_{ap} = 0.4$ V vs. Ag/AgCl.

5.2.3.2.5. *Cinética de la reacción enzimática*

El cálculo de los parámetros cinéticos se realizó registrando los correspondientes amperogramas en disoluciones agitadas en un rango de concentración de glucosa

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

comprendido entre 10 μM y 12 mM. En la **Figura 5.72** se muestra la gráfica de Lineweaver-Burk obtenida.

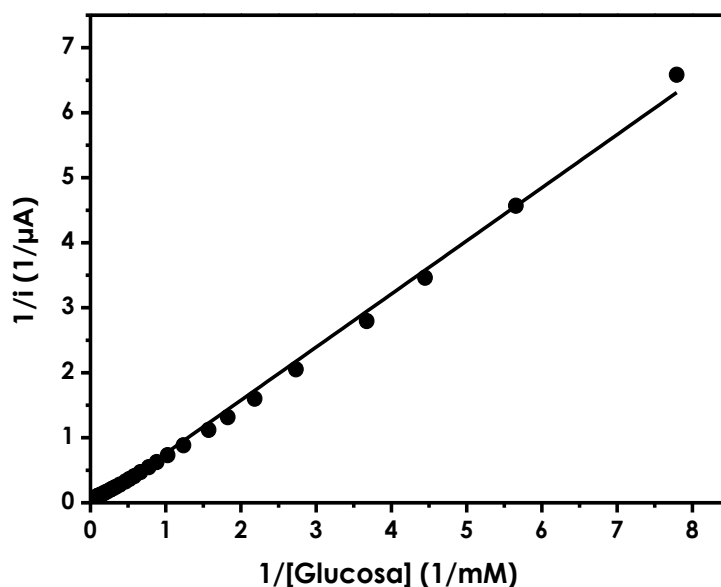


Figura 5.72. Representación de la ecuación de Lineweaver-Burk obtenida para glucosa en disolución reguladora de fosfato 0.1M (pH 7.5) $E_{ap} = 0.4 \text{ V vs Ag/AgCl}$.

Las constantes cinéticas para la oxidación catalizada del H_2O_2 en la superficie electródica nanoestructurada, se determinó como se explica en el **apartado 4.5.2**. Se obtuvo un valor de $i_{m\acute{a}x}$ de 16 μA y una constante aparente de Michaelis-Menten, K_M^{ap} de 6.9 mM. Este valor de K_M^{ap} es inferior al reportado para la enzima en disolución (21 - 33 mM) [Mousty, 2001], lo que demuestra una muy buena afinidad de la enzima entrecruzada con glutaraldehído por la glucosa. Además, el valor obtenido para la constante aparente es similar al reportado para la enzima inmovilizada en el electrodo modificado con películas de grafeno y polidopamina (6.77 mM) [Ruan, 2013], pero superior que el obtenido al recubrir el electrodo de carbono cerámico con la enzima inmovilizada en puntos cuánticos (0.76 mM) [Razmi, 2013], y con GCE recubiertos con la enzima inmovilizada en nanopelículas de PdNPs/Grafeno/quitosano (1.2 mM) [Wu, 2009b].

Los biosensores de GOx con los que se comparan los resultados obtenidos en el presente trabajo se recogen en la **Tabla 3.3** del capítulo de Antecedentes de esta memoria.

5.2.3.2.6. Selectividad del biosensor

Para verificar la selectividad del biosensor desarrollado se estudió el efecto que ejercía la presencia de una serie de compuestos potencialmente interferentes que están presentes normalmente en las muestras analizadas, como son fructosa, sacarosa, cafeína, ácido cítrico, ácido úrico y ácido ascórbico.

En presencia de una concentración de glucosa 0.5 M, se observó que la fructosa, la sacarosa, la cafeína y el ácido cítrico no interferían en la respuesta amperométrica cuando se encontraban en una concentración de 500 μM . Sin embargo, el ácido ascórbico y el úrico se oxidan fácilmente en la superficie del electrodo, dando lugar a un aumento en la corriente medida del 6.4% y 17% respectivamente, para una concentración de 1.0 μM .

5.2.3.2.7. Determinación de glucosa en muestras reales

Según la metodología descrita en el **apartado 4.4.8.2**, el biosensor enzimático se aplicó a la determinación de glucosa en una muestra de bebida carbonatada azucarada. En primer lugar se evaluó la posible existencia de efecto matriz comparando los valores de las pendientes del calibrado con patrones y del calibrado construido mediante adiciones estándar en la muestra.

A partir de las pendientes de estos calibrados y de sus desviaciones estándar, se calculó la t_{exp} aplicando la **Ecuación 4.7 (Tabla 5.7)**.

Tabla 5.7. Valor de t de Student obtenido para la comparación de las pendientes del calibrado externo y de adiciones estándar.

Calibrado	m , $\mu\text{A/M}$	s , $\mu\text{A/M}$	t_{exp}	t_{tab} (95%)
Externo	1760	6.5	68.112	2.306
Adiciones estándar	128.1	7.1		

Como puede observarse, el valor calculado para t_{exp} es mayor que el valor de la t de Student tabulada, confirmándose así la existencia de efecto matriz y por tanto la determinación de glucosa en la muestra se realizó utilizando la metodología de adiciones estándar.

Se obtuvo una concentración de glucosa de (34 ± 2) g/L ($n=3$), valor que es inferior al proporcionado por el fabricante (106 g/L) puesto que éste último es de

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

cantidad total de azúcares presentes en la muestra (fructosa, sacarosa, etc.) mientras que con el biosensor, al ser más selectivo, sólo se obtiene la cantidad de glucosa.

Para validar la metodología desarrollada, se determinó glucosa en la muestra empleando un kit enzimático comercial, con el que se obtuvo una concentración de glucosa de (32.4 ± 0.5) g/L ($n=3$). Estos resultados no muestran una diferencia estadística para un nivel de significación del 95%, lo que demuestra la fiabilidad analítica del dispositivo electroquímico propuesto, para cuantificar glucosa en muestras reales.

5.3. MATERIAL HÍBRIDO BASADO EN GO, AuNPs y PAMAM

Uno de los métodos más empleados para la preparación de derivados de grafeno se basa en su reacción con sales de diazonio generadas "in situ" y la consiguiente formación de enlaces tipo C-C entre los anillos aromáticos y el nanomaterial mediante un proceso de anclaje (*grafting*) en una sola etapa. A partir de estos procesos se obtienen nanoderivados altamente funcionalizados, a diferencia de los métodos de silanización reportados en esta tesis (**Figura 5.73**).



Figura 5.73. Esquema de la reacción de diazotación y el posterior anclaje al grafeno.

La modificación de grafeno con sales de diazonio puede realizarse por vía química [Kumar, 2013], [Peng, 2013] o electroquímica [Eissa, 2012], [Ma, 2013], [Wang, 2013c]. Ambos procedimientos han sido ampliamente utilizados en la preparación de nanohíbridos para su uso en el diseño de sistemas sensores y biosensores con detección electroquímica. Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito un estudio comparativo que demuestre cuál de las dos estrategias de derivatización de grafeno es más efectiva para estos fines electroanalíticos.

Con este objetivo, en este trabajo se ha planteado la preparación de un nanomaterial híbrido de óxido de grafeno con AuNPs y dendrones de PAMAM, empleando como intermediarios derivados obtenidos mediante *grafting* químico (q) o electroquímico (e) del nanomaterial de carbono, tal y como se describe en el **apartado 4.4.1.3**. Estos materiales se caracterizaron mediante diversas técnicas microscópicas, espectroscópicas y electroquímicas, y finalmente se emplearon como andamiaje para la construcción de biosensores electroquímicos enzimáticos.

Como enzima modelo para este estudio se empleó la HRP, y los electrodos enzimáticos nanoestructurados se evaluaron para la determinación de catecol.

5.3.1. PREPARACIÓN DEL NANOMATERIAL HÍBRIDO PAMAM –AuNPs–rGO

En la **Figura 5.74**, se representan los pasos seguidos para la preparación del material híbrido mediante diazotación química (**Figura 5.74.A**) y electroquímica (**Figura 5.74.B**) con cloruro de *p*-mercaptofenil diazonio. En el primer caso se procedió a la diazotación del GO, en medio acuoso, con la sal de diazonio formada a partir de 4- aminotiofenol (4-ATF) en medio reductor y presencia de dodecilsulfato sódico (SDS). Este surfactante fue empleado como dispersante para asegurar la estabilidad coloidal del óxido de grafeno y su derivado diazotado en medio acuoso. En este paso se consigue la funcionalización del GO con grupos tiol, a los que se unirán las AuNPs mediante enlaces de quimisorción tipo Au-S (AuNPs–rGO).

Posteriormente, y mediante el mismo tipo de enlace, se une el dendrón de PAMAM G-4 con núcleo de cisteamina para dar el derivado PAMAM–AuNPs–rGO^a, dotando así al material de un elevado número de grupos funcionales amino sobre los que poder inmovilizar proteínas.

Por otra parte, todos los pasos involucrados en la estrategia de preparación electroquímica (**Figura 5.74.B**), se realizaron sobre la superficie de un electrodo de carbono vitrificado (GCE). Inicialmente se procedió a la adsorción del GO sobre la superficie del electrodo de carbono y la posterior reducción electroquímica, en la que se restauran las propiedades electroconductoras del grafeno. El siguiente paso fue la reacción de diazotación, que a diferencia de la metodología anterior, se realiza mediante voltamperometría cíclica sumergiendo el electrodo en la disolución de la sal de diazonio. La inmovilización de las nanopartículas y del dendrón de PAMAM se produce también mediante enlace tipo Au-S, dando lugar, finalmente al material PAMAM–AuNPs–rGO^e.

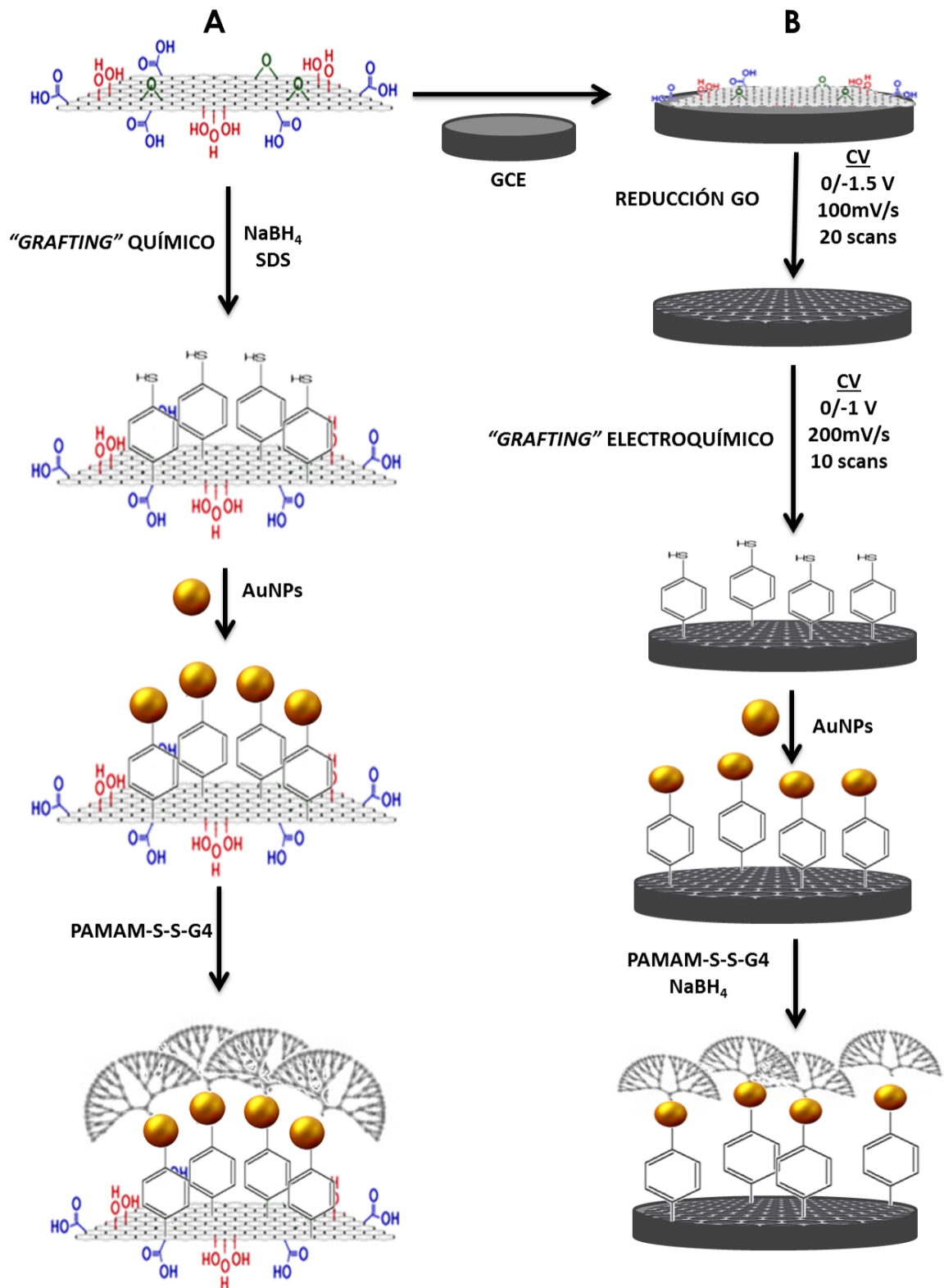


Figura 5.74. Representación esquemática de la preparación del material híbrido PAMAM-AuNPs-rGO por (A) vía química, (B) electroquímica.

5.3.2. CARACTERIZACIÓN DEL NANOMATERIAL HÍBRIDO PAMAM-AuNPs-rGO

5.3.2.1. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO

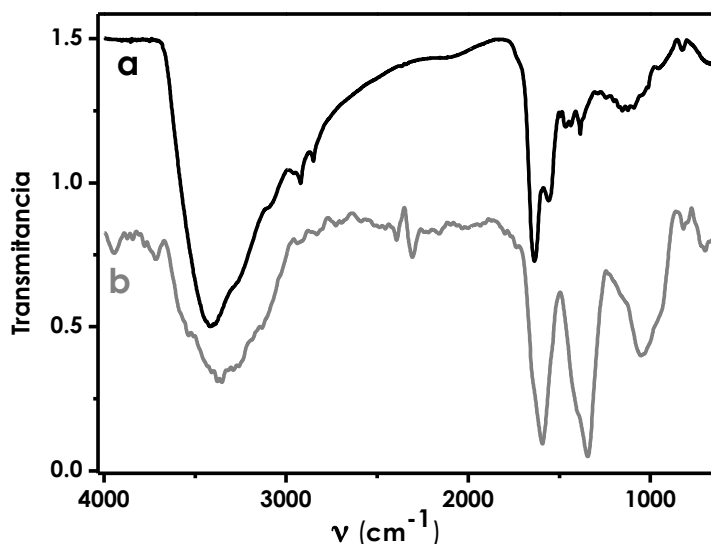


Figura 5.75. Espectro FTIR de (a) PAMAM-AuNPs-rGO^a y (b) PAMAM-AuNPs-rGO^e.

En la **Figura 5.75**, se muestran los espectros infrarrojos con transformada de Fourier de los nanomateriales híbridos obtenidos por ambas vías sintéticas. En ambos materiales se comprueba la presencia de las moléculas de dendrones de PAMAM a partir de las bandas amida a $1630\text{--}1588\text{ cm}^{-1}$, así como la presencia de las bandas de vibración de los grupos C-N alifáticos a $1120\text{--}1046\text{ cm}^{-1}$. Por otra parte, las bandas anchas centradas a 3410 y 3367 cm^{-1} pueden asignarse a la superposición de las vibraciones de los grupos N-H del dendrón, así como a la de los grupos O-H correspondientes a los grupos carboxilo en los bordes del grafeno y de las moléculas de agua adsorbidas sobre el nanomaterial.

La efectividad de los procesos de diazotación química y electroquímica fue asimismo confirmada por la presencia de las bandas a $1380\text{--}1348\text{ cm}^{-1}$, correspondientes a las vibraciones de los grupos C-N aromáticos.

Sin embargo, y de manera general, la intensidad de las señales de IR en el espectro del derivado obtenido por vía química fueron menores que las correspondientes al derivado preparado mediante el método electroquímico, lo

que parece sugerir un menor grado de modificación en el derivado preparado a partir de la diazotación química del GO.

5.3.2.2. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

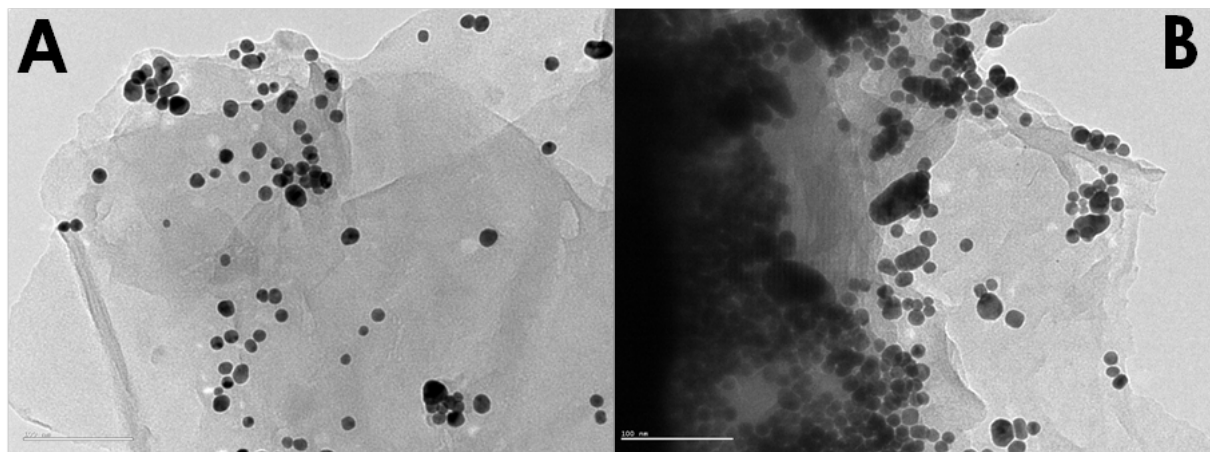


Figura 5.76. Imágenes TEM de (A) PAMAM-AuNPs-rGO^a y (B) PAMAM-AuNPs-rGO^e.

El análisis mediante microscopía de transmisión electrónica confirmó la presencia de láminas de grafeno en estos nanomateriales, como se observa en la **Figura 5.76**. Asimismo, se apreció un mayor grado de apilamiento de estas láminas carbonáceas fue apreciado en el nanohíbrido obtenido por vía electroquímica.

En ambos nanomateriales se observa la presencia de las AuNPs, localizadas sobre las láminas de grafeno. Este patrón permite sugerir que dichas partículas se encuentran fuertemente unidas al nanomaterial de carbono, probablemente a través de enlaces tipo Au-S con los residuos de *p*-tiofenol injertados sobre las estructuras bidimensionales de rGO. Sin embargo, la densidad de AuNPs sobre el derivado obtenido por vía electroquímica fue mucho mayor que la observada en el derivado obtenido mediante diazotación química. Este hecho puede estar condicionado por un mayor grado de diazotación electroquímica, lo cual aumenta la densidad de grupos tioles sobre la superficie del grafeno, permitiendo así un mayor grado de decoración posterior con las nanopartículas metálicas.

5.3.2.3. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE EMISIÓN DE CAMPO

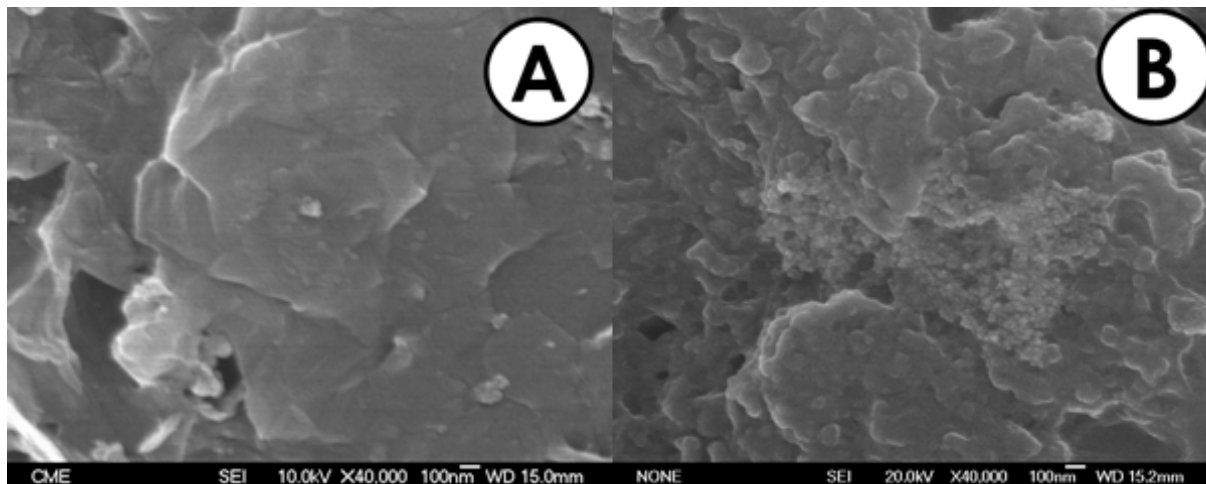


Figura 5.77. Imágenes FE-SEM de PAMAM-AuNPs-rGO^a (A) y PAMAM-AuNPs-rGO^e (B).

El estudio morfológico de ambos derivados mediante FE-SEM permitió llegar a conclusiones similares. Como se aprecia en la **Figura 5.77**, ambos nanomateriales mostraron una morfología caracterizada por la presencia de estructuras laminares de grafeno apiladas en agregados tridimensionales de tamaño micrométrico.

Estas microestructuras están decoradas con partículas nanométricas distribuidas sobre toda su superficie. Sin embargo, y tal como se apreció en los estudios por TEM, la densidad de estas nanopartículas fue significativamente mayor en el derivado obtenido mediante diazotación electroquímica que en el obtenido por vía química.

5.3.3. APLICACIÓN AL DESARROLLO DE BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS

5.3.3.1. BIOSENSOR HRP/PAMAM-AuNPs-rGO/GCE

5.3.3.1.1 Preparación de los electrodos enzimáticos

Con el objetivo de evaluar la influencia del método de *grafting* sobre la efectividad de estos materiales como elementos de transducción electroquímica, los nanohíbridos se emplearon como material modificador de electrodos de carbono vitrificado (GCE) y posteriormente como base para la inmovilización de la enzima modelo peroxidasa de rábano (HRP). Los electrodos enzimáticos obtenidos se emplearon para construir biosensores para la determinación de catecol,

empleando H_2O_2 como segundo sustrato de la reacción catalizada por la enzima, según el esquema de reacción representado en la **Figura 5.78**.

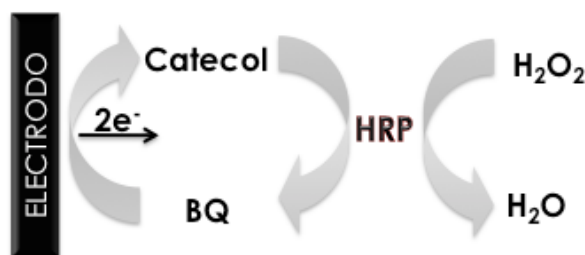


Figura 5.78. Esquema de la reacción enzimática de HRP frente al sustrato catecol. (BQ: 1,2-Benzoquinona).

En la **Figura 5.79** se muestran las curvas de calibrado en las que se representan la corriente de reducción de la 1,2-benzoquinona frente a la concentración de catecol, obtenidas a partir de medidas amperométricas en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M (pH 6.5), empleando -0.1 V como potencial de trabajo. Los electrodos empleados en este estudio comparativo fueron preparados mediante la inmovilización de la misma cantidad de HRP ($6 \mu\text{g}$) sobre la superficie nanoestructurada de los electrodos.

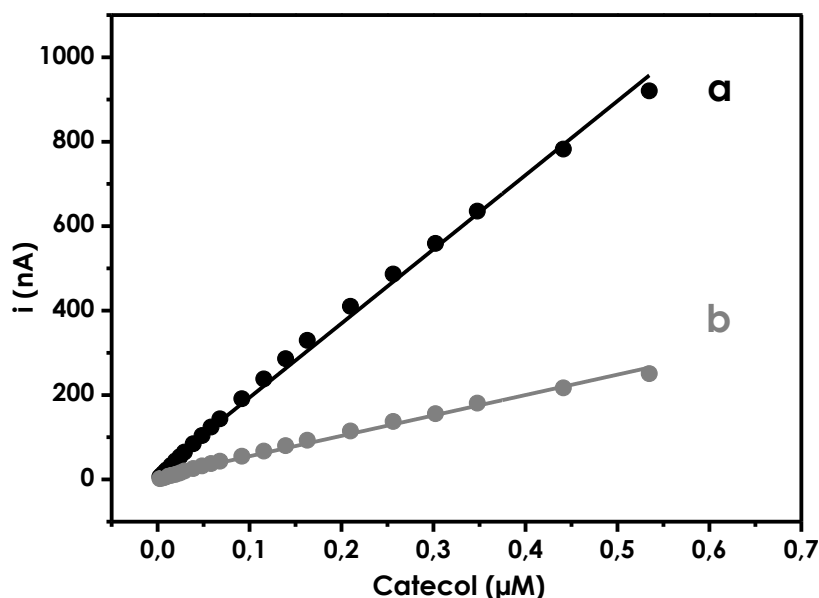


Figura 5.79. Comparación de las respuestas amperométricas de las plataformas biosensoras (a) HRP/PAMAM-AuNPs-rGO^e/GCE y (b) HRP/PAMAM-AuNPs-rGO^a/GCE para catecol utilizando H_2O_2 ($100 \mu\text{M}$) como segundo sustrato y medidas en disolución reguladora de fosfato sódico 0.1 M (pH 6.5), $E_{\text{ap}} = -0.1$ V vs. Ag/AgCl.

Como puede apreciarse, ambos biosensores mostraron valores similares de intervalo de respuesta lineal. Sin embargo, el electrodo preparado con el

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

nanohíbrido sintetizado mediante *grafting* electroquímico mostró una sensibilidad, aproximadamente 3.5 veces superior a la del otro bioelectrodo.

Esta diferencia puede estar provocada por un menor grado de inmovilización enzimática sobre la interfase electroquímica en el biosensor preparado con el nanohíbrido obtenido por *grafting* químico. Tal fenómeno pudiera estar relacionado con una menor disponibilidad de grupos amino primarios sobre la superficie electródica, causada por un menor grado de diazotación lo cual limita la cantidad de AuNPs en el nanomaterial híbrido, y por consiguiente, una menor densidad de dendrones ensamblados sobre estas nanoestructuras metálicas.

Estos resultados concuerdan con los análisis realizados mediante microscopías TEM y FE-SEM. Una posible explicación a este menor grado de modificación pudiera estar relacionado con el uso de SDS como agente dispersante del GO, el cual se adsorbe sobre las láminas de grafeno, reduciendo así la difusión y posterior reacción de las sales de diazonio con este nanomaterial debido a efectos estéricos. Asimismo, estas sales de diazonio pudieran sufrir interacciones electrostáticas con los grupos sulfónicos del surfactante, limitando así su difusión hacia los átomos de carbono en el nanomaterial.

Tomando en consideración estos hechos experimentales, podemos concluir que el método de diazotación electroquímica empleado permite obtener nanohíbridos de PAMAM-AuNPs-rGO más funcionalizados, los cuales mostraron ser más adecuados para su uso como elementos de transducción electroquímica para la construcción de biosensores enzimáticos.

5.3.3.1.2 Caracterización de la superficie electródica HRP/PAMAM-AuNPs-rGO^e/GCE

Tomando en consideración los resultados descritos anteriormente, se desarrolló una plataforma electroanalítica para la determinación de catecol basada en el nanomaterial híbrido PAMAM-AuNPs-rGO^e. Las distintas etapas de ensamblaje de la superficie electródica enzimática se siguieron mediante espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) utilizando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ como par redox. En la **Figura 5.80.A** se muestran los diagramas de Nyquist correspondientes a este estudio.

El recubrimiento del electrodo con el GO y la posterior reducción electroquímica del nanomaterial disminuye significativamente la resistencia a la transferencia de carga de esta interfase, lo cual se evidencia por la disminución del

radio de las semicircunferencias obtenidas a altos valores de frecuencia. Este cambio fue cuantificado mediante el ajuste de los datos experimentales al circuito equivalente de Randles mostrado en la **Figura 5.80.B**, obteniéndose una disminución de R_{TC} de 273 a 22 Ω .

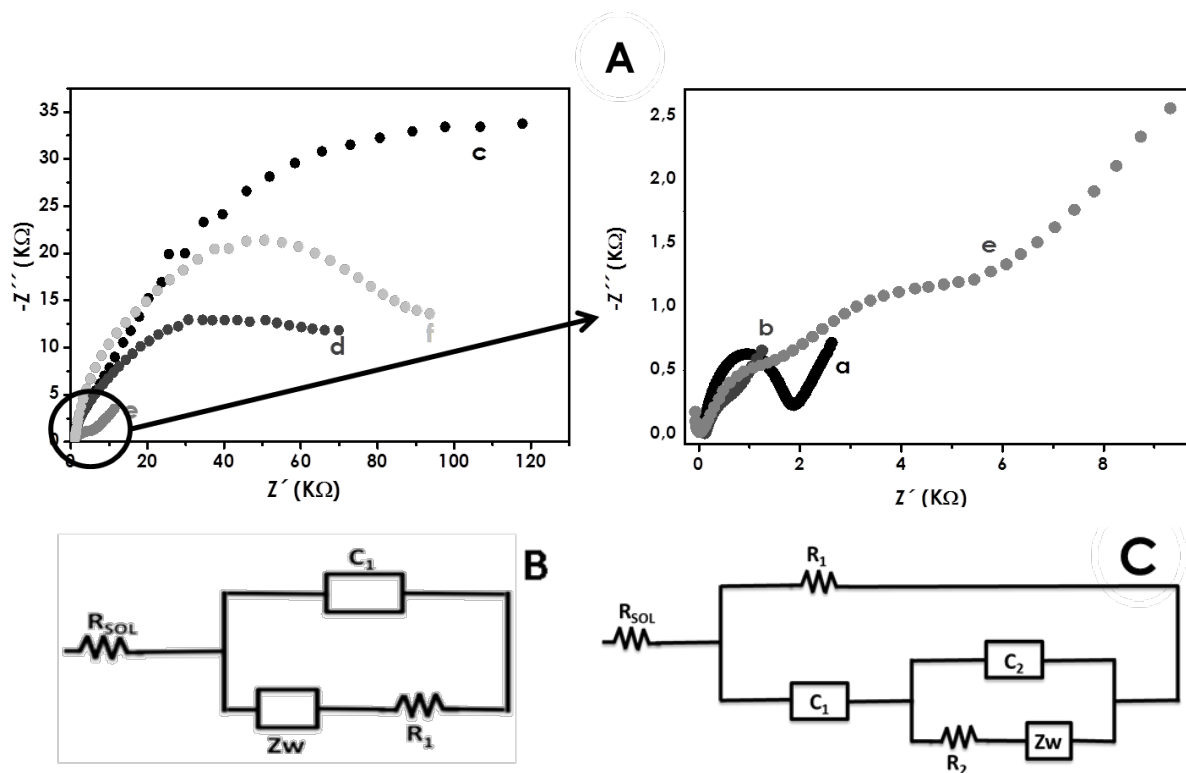


Figura 5.80. (A) Diagrama de Nyquist para (a) GCE, (b) rGO/GCE, (c) diazo-rGO/GCE, (d) AuNPs-rGO/GCE, (e) PAMAM/AuNPs-rGO/GCE y (f) HRP/PAMAM/AuNPs-rGO/GCE. Impedancias realizadas en una disolución de KCl 0.1 M conteniendo $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 5 mM (1:1), (B) circuito equivalente de Randles y (C) circuito equivalente modificado para electrodos recubiertos con proteínas.

Como era de esperar, se observó un notable aumento en la resistencia a la transferencia de carga ($R_{TC} = 52089 \Omega$) tras la diazotación electroquímica del nanomaterial, lo cual sugiere que esta modificación origina una monocapa menos conductora sobre la interfase electródica. La posterior decoración de esta superficie con las AuNPs provocó una disminución en el valor de R_{TC} hasta 17615 Ω , lo cual se debe a las conocidas propiedades electroconductoras de estas nanopartículas metálicas. Todavía se observó una mayor disminución en la resistencia a la transferencia de carga ($R_{TC} = 7906 \Omega$) tras la modificación con los dendrones de PAMAM, lo que se atribuye tanto a la carga positiva de estas macromoléculas como a su estructura tridimensional, lo cual favorece la atracción

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

electrostática de los iones $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ hacia la interfase y su difusión a la superficie electródica a través de las moléculas del dendrón.

Sin embargo, la resistencia a la transferencia de carga aumentó notablemente tras la inmovilización covalente de la HRP ($R_{TC} = 26783 \Omega$), confirmando que se ha producido un elevado recubrimiento de la superficie electródica con las moléculas no conductoras de la enzima.

En general, los valores de resistencia obtenidos son más elevados de lo esperado. Esto es debido a que la modificación del grafeno mediante esta estrategia de *grafting* afecta a la estructura del mismo pudiendo disminuir sus propiedades electroconductoras.

5.3.3.1.3. Optimización de las variables experimentales

Las variables experimentales involucradas en la preparación del bioelectrodo se optimizaron teniendo en cuenta la pendiente de los calibrados (m) en un rango de concentración de catecol entre $49 \mu\text{M}$ y 0.19 mM

a) Optimización de la composición del biosensor

En primer lugar se optimizó la cantidad de GO depositado en la superficie del electrodo (**Figura 5.81.A**), observándose un aumento de la pendiente normalizada ($m/m_{\text{máx}}$), midiendo a un potencial de -0.1 V , al aumentar la cantidad de nanomaterial desde $2.5 \mu\text{g}$ a $12.5 \mu\text{g}$. Por el contrario, la sensibilidad del biosensor fue menor para cantidades superiores a $12.5 \mu\text{g}$, observándose además, un desprendimiento del nanomaterial durante las medidas.

En segundo lugar se optimizó la concentración de 4-ATF de partida para la formación de la sal de diazonio correspondiente con la que se realizará la diazotación por vía electroquímica. Como se observa en la **Figura 5.81.B**, la mayor pendiente normalizada se obtiene para un valor de 0.8 mg/mL de 4-ATF. Para valores inferiores no se consigue suficiente modificación del rGO y por tanto no se dispone de muchos grupos funcionales, lo que conlleva una baja inmovilización de enzima. El aumento de la concentración de 4-ATF produce un recubrimiento tan elevado de la superficie electródica que impide una transferencia electrónica eficiente.

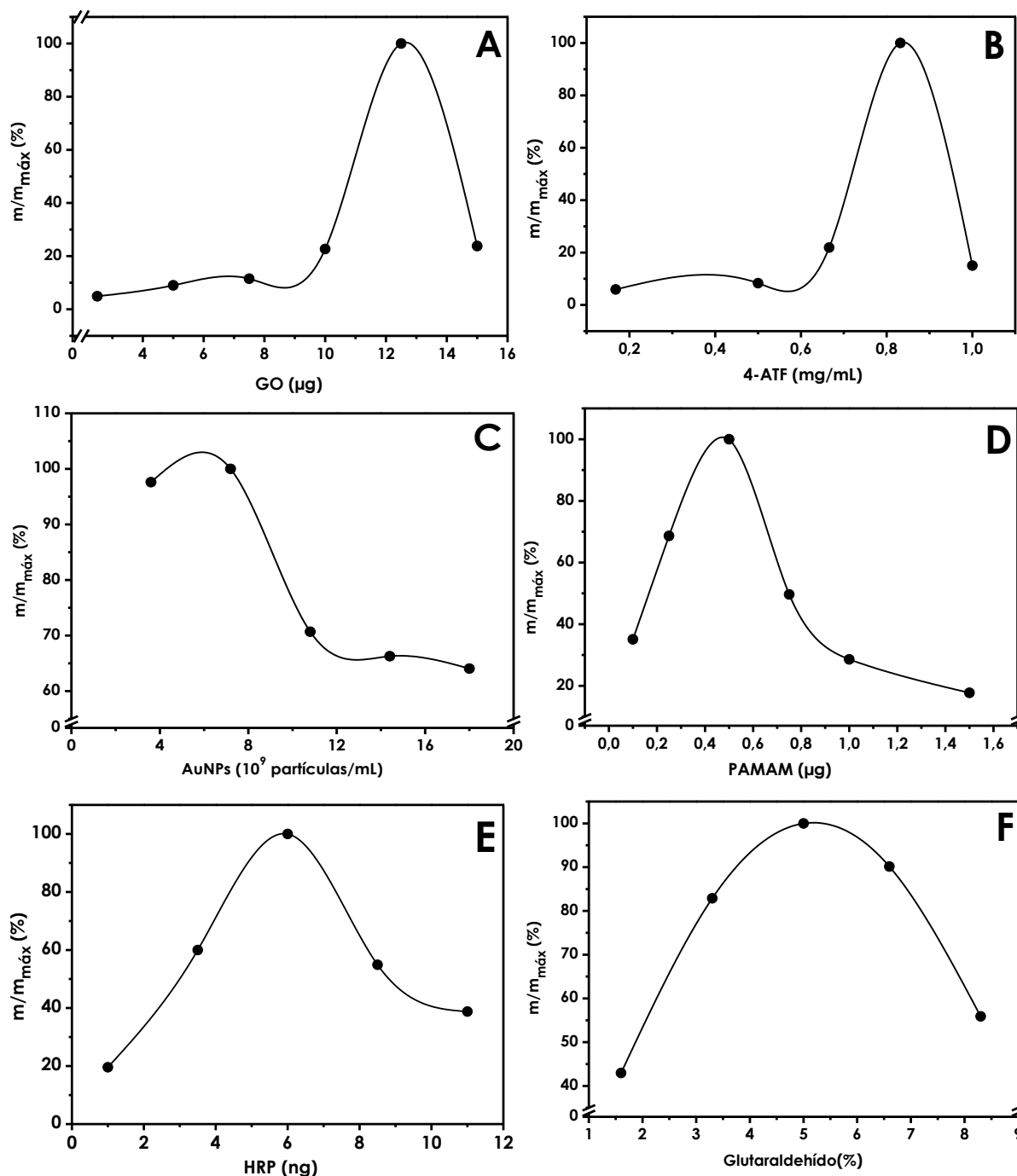


Figura 5.81. Influencia de (A) la cantidad de GO, (B) la concentración de 4-ATF, (C) la cantidad de AuNPs depositadas, (D) cantidad de dendrímtero PAMAM, (E) cantidad de enzima inmovilizada y (F) concentración de glutaraldehído empleada para el entrecruzamiento, sobre la pendiente normalizada de los calibrados de catecol ($49 \mu\text{M}$ y 0.19 mM) en disolución reguladora de fosfato 0.1 M ($\text{pH } 6.5$) con $100 \mu\text{M}$ de H_2O_2 , $E_{\text{ap}} = -0.1 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl .

La cantidad de AuNPs también se optimizó, obteniendo la mayor pendiente normalizada con $7.2 \cdot 10^9$ partículas/mL por lo que se utilizó este valor para el resto de estudios realizados (Figura 5.81.C).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la optimización tanto de la cantidad de dendrímero PAMAM como la de enzima inmovilizada se observa la misma tendencia. Se produce un aumento de la pendiente normalizada del calibrado al aumentar la cantidad tanto de PAMAM como de HRP hasta llegar a un máximo (0.5 μg de dendrímero y 6 μg de enzima) a partir del cual disminuye dicha pendiente puesto que en la superficie electródica se encuentra una gran cantidad de material no conductor y por tanto la transferencia electrónica se encuentra impedida (**Figura 5.81.D y E**).

Por último, se estudió la concentración de glutaraldehído, eligiendo como valor óptimo 5% ya que es al que se ha obtenido mayor pendiente normalizada (**Figura 5.81.F**). Como ya se ha visto en otros trabajos incluidos en esta memoria, al aumentar la cantidad de entrecruzante, podría esperarse la inmovilización de mayor cantidad de enzima, sin embargo, una elevada cantidad del mismo puede provocar uniones entre moléculas de enzima dando lugar a conformaciones proteicas más rígidas y con menor actividad catalítica.

b) Selección del potencial aplicado

La elección del potencial aplicado al biosensor se efectuó a partir de la representación de la pendiente normalizada del calibrado ($m/m_{\text{máx}}$) frente a diferentes valores del potencial en el intervalo comprendido entre -0.5 V y 0.0 V , en una disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 6.5 (**Figura 5.82**).

Como puede observarse, se produce un aumento de la pendiente normalizada del calibrado al variar el potencial hacia valores negativos, hasta -0.4 V , valor a partir del cual la pendiente normalizada disminuye. A pesar de obtener mayor pendiente normalizada a -0.4 V se escogió -0.1 V para el resto de estudios ya que, de este modo es posible evitar interferencias de especies susceptibles de reducirse a potenciales menores. Además, a ese valor de potencial de trabajo se obtuvo una mejor relación señal/ruido.

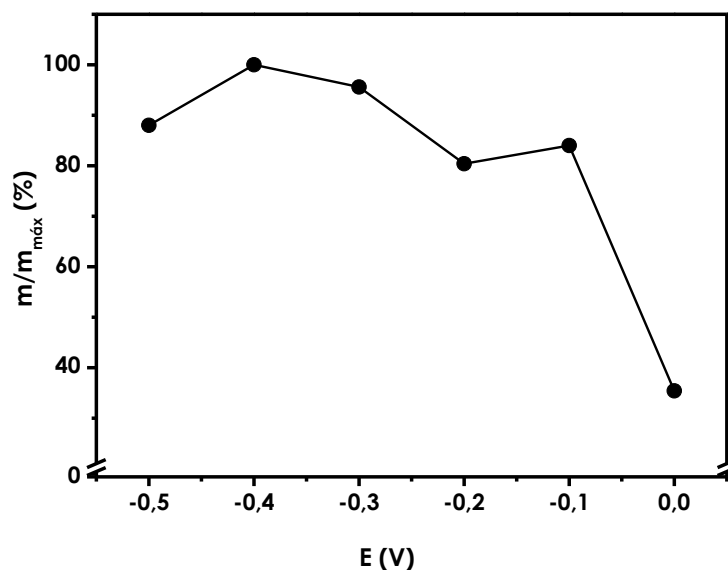


Figura 5.82. Variación de la pendiente normalizada con el potencial aplicado al biosensor de HRP/PAMAM-AuNPs-rGO/GCE para catecol en disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 6.5) con 100 μM de H_2O_2 , $E_{\text{ap}} = -0.1$ V vs. Ag/AgCl.).

c) Influencia del pH del medio de medida

Con el fin de obtener la mejor señal amperométrica, se estudió la influencia del pH sobre la pendiente normalizada de los calibrados ($m/m_{\text{máx}}$) para el catecol en el intervalo de concentración mencionado anteriormente. Para ello se han empleado disoluciones reguladoras de fosfato 0.1 M a distintos valores de pH, preparadas como que se indica en el **apartado 4.3.2**. El pH de trabajo se evaluó en el intervalo de 5.0 a 9.0, y los resultados se muestran en la **Figura 5.83**.

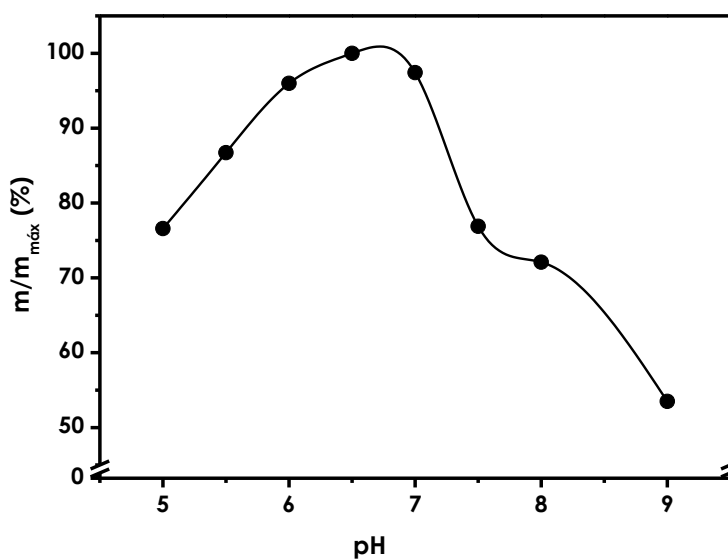


Figura 5.83. Variación de la pendiente normalizada de los calibrados con el pH del medio de medida para el biosensor de HRP/PAMAM-AuNPs-rGO/GCE frente a catecol en disolución reguladora de fosfato 0.1 M con 100 μM de H_2O_2 , $E_{\text{ap}} = -0.1$ V vs. Ag/AgCl.).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se puede observar, se obtiene un valor máximo de pendiente normalizada para un valor de pH de 6.5. Para valores de pH inferiores y superiores a éste, se produce una acusada disminución de la respuesta amperométrica como consecuencia de la pérdida de la actividad enzimática.

De acuerdo con estos resultados, se seleccionó tampón fosfato 0.1 M de pH 6.5 para estudios posteriores.

5.3.3.1.4. Características analíticas del biosensor

En las condiciones experimentales seleccionadas y trabajando mediante amperometría en disoluciones agitadas, se obtuvieron los amperogramas para adiciones sucesivas de catecol que se muestran en la **Figura 5.84**.

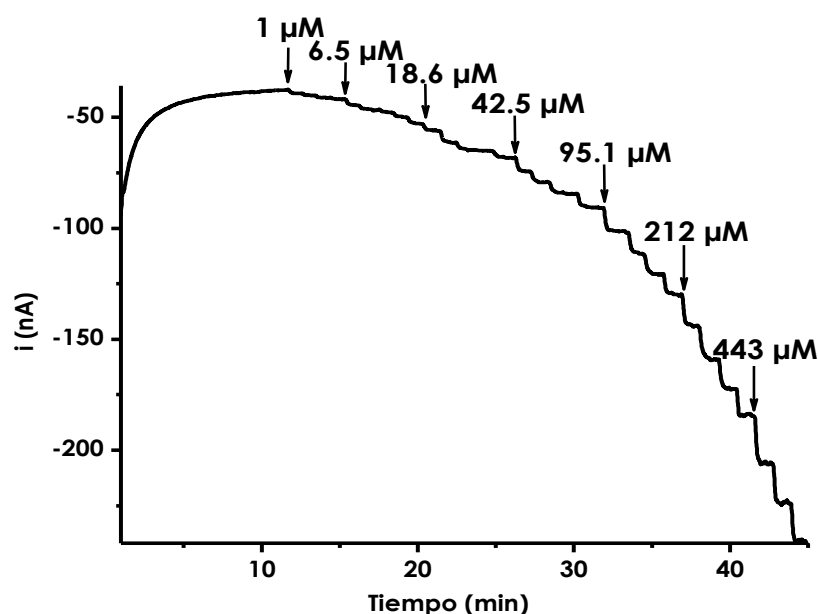


Figura 5.84. Curva de intensidad-tiempo obtenida con el biosensor HRP/PAMAM-AuNPs-rGO^e/GCE para diferentes adiciones de catecol en disolución reguladora de fosfato 0.1M (pH 6.0): 100 μM de H_2O_2 , $E_{\text{ap}} = -0.1$ V vs. Ag/AgCl.

El intervalo lineal se estimó mediante regresión por mínimos cuadrados, considerando que no hay desviación de la linealidad cuando el coeficiente de correlación era mayor o igual de 0.99. Así resultó un calibrado lineal para catecol (**Figura 5.85**) en el intervalo de concentración comprendido entre 1.0 y 722 μM ($r = 0.997$), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$i (\mu\text{A}) = 815 \cdot [\text{Catecol}] (\text{M}) + 6.37 \quad \text{Ecuación 5.4}$$

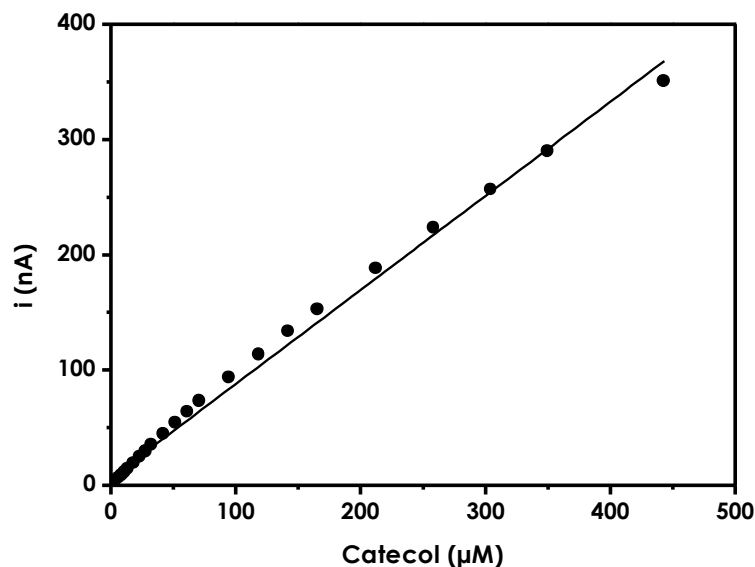


Figura 5.85. Calibrado para catecol obtenido por amperometría a $E_{ap} = -0.1$ V vs. Ag/AgCl con el biosensor HRP/PAMAM-AuNPs-rGO^e/GCE.

La sensibilidad mostrada por el biosensor enzimático fue de $815 \mu\text{A}/\text{M}$ y el límite de detección alcanzado fue de $0.7 \mu\text{M}$, valor calculado tal y como se explica en el **apartado 4.5**, siendo la desviación estándar (S_b) la correspondiente a 10 señales amperométricas para $1 \mu\text{M}$ de catecol.

El biosensor desarrollado se ha empleado también para la determinación de otros compuestos fenólicos como 3,4-xilenol, *p*-cresol, fenol, hidroquinona y 4-cloro-1-naftol. En la **Tabla 5.8** se recogen las características analíticas correspondientes a las curvas de calibrados de los distintos compuestos, observándose una mayor sensibilidad en el caso de la hidroquinona.

Tabla 5.8. Características analíticas del biosensor HRP/PAMAM-AuNPs-rGO^e/GCE para distintos compuestos fenólicos.

COMPUESTO	INTERVALO LINEAL, μM	SENSIBILIDAD, $\mu\text{A}/\text{M}$	r	LD, μM
3,4-Xilenol	3.9 - 316.5	304	0.991	3.2
<i>p</i> -Cresol	6.64 - 429.3	214	0.992	2.7
Fenol	3.9 - 470.1	173	0.995	3.2
Hidroquinona	0.59 - 76.7	2806	0.990	0.6
4-Cloro-1-naftol	5.31 - 169.3	223	0.990	9.1

a) Repetibilidad de las medidas

El estudio de la repetibilidad de las medidas se llevó a cabo realizando 10 medidas sucesivos para catecol $40 \mu\text{M}$ empleando el mismo biosensor. Se obtuvo un valor de R.S.D. ($n=10$) de 8.4%, lo que refleja la buena repetibilidad de las medidas

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

amperométricas llevadas a cabo con el biosensor sin necesidad de aplicar al electrodo ningún pretratamiento o limpieza entre ellas.

b) Reproducibilidad en la fabricación del biosensor

También se evaluó la reproducibilidad del proceso de fabricación de los bioelectrodos. Para ello se compararon los valores de medidas independientes de catecol 10 μM con 10 biosensores distintos preparados de la misma manera. El valor de R.S.D. 9.8% indicó también, una aceptable reproducibilidad en la fabricación del biosensor.

c) Tiempo de vida útil del biosensor

Un aspecto importante a estudiar en la caracterización del biosensor es el tiempo que puede estar almacenado. Dicho almacenamiento se realizó en condiciones de atmósfera húmeda (disolución reguladora de fosfato 0.1 M y pH 6.5) y a 4 °C. Como se muestra en la **Figura 5.86**, se observó que durante los 3 primeros días solo se producía una disminución del 11% de la actividad catalítica y tras 7 todavía se mantenía más de 75% de la misma.

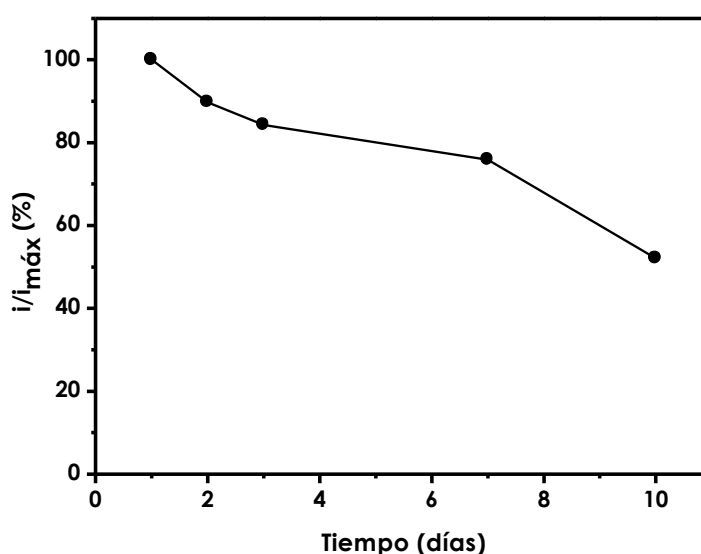


Figura 5.86. Respuesta amperométrica con el biosensor HRP/PAMAM-AuNPs-rGO^e/GCE biosensor para 2.0 μM de catecol en función del tiempo de almacenamiento a 4°C en atmósfera húmeda en disolución reguladora de fosfato 0.1M (pH 6.5), $E_{\text{ap}} = -0.1$ V vs. Ag/AgCl.

5.3.3.1.5. *Cinética de la reacción enzimática*

Para el cálculo de los parámetros cinéticos, se registraron los correspondientes amperogramas en disoluciones agitadas en un rango de concentración de catecol

comprendido entre 95 μM y 1.6 mM. En la **Figura 5.87** se muestra la correspondiente representación de Lineweaver-Burk.

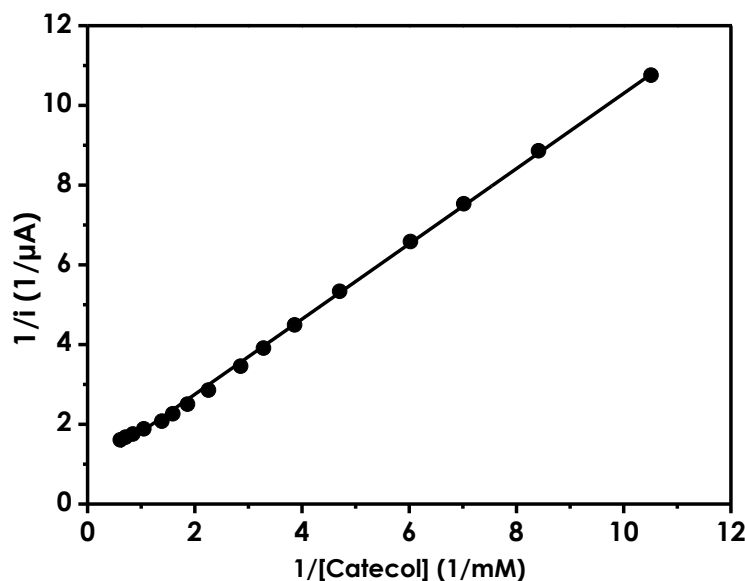


Figura 5.87. Representación de la ecuación de Lineweaver-Burk obtenida para catecol en disolución reguladora de fosfato 0.1M (pH 6.5), con 100 μM de H_2O_2 , $E_{\text{ap}} = -0.1$ V (vs. Ag/AgCl).

La constante cinética aparente para la transformación catalítica de catecol en 1,2-benzohidroquinona en la superficie electródica nanoestructurada, se determinó a partir de dicha representación como se explica en el **apartado 4.5.2**, obteniéndose un valor de $i_{\text{máx}}$ de 1.1 μA y una K_M^{ap} de 1.09 mM. El valor obtenido para la constante aparente es aproximadamente 10 veces menor que el valor descrito en bibliografía para la HRP en disolución ($K_M^{\text{ap}} = 11$ mM [Xiao, 1999b], [Liu, 2002]), lo que indica que las moléculas de enzima, inmovilizadas en el híbrido PAMAM-AuNPs-rGO^e, tienen una gran afinidad por el catecol, lo que sugiere que la enzima tiene un microentorno favorable tras la inmovilización en el nanomaterial híbrido PAMAM-AuNPs-rGO.

5.3.3.1.6. Determinación de la cantidad de fenoles totales en muestras reales

Según la metodología descrita en el **apartado 4.4.9**, se realizó la determinación de la cantidad de fenoles totales en tres muestras distintas de infusión. En primer lugar se estudió la existencia de efecto matriz comparando las pendientes de los calibrados externos para catecol y de los construidos utilizando adiciones estándar para cada muestra. A partir de los cuales se calculó la t_{exp} aplicando la **Ecuación 4.7**.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 5.9. Valor de t de Student obtenido para la comparación de las pendientes del calibrado externo y de adiciones estándar.

Calibrado	Muestra	m, nA/mM	s, nA/mM	t _{exp}	t _{tab} (95%)
Externo	-	815	10,1	-	
Adiciones estándar	Menta	1529	43,2	8.3366	2,1788
	Té verde con limón	1142	4,0	15.9248	
	Frutos rojos	733	30,4	2.2427	

Como puede observarse en la **Tabla 5.9**, el valor calculado para t_{exp} es mayor que el valor de la t de Student tabulada en los tres casos, confirmándose así la existencia de efecto matriz y por tanto, la determinación de la cantidad de fenoles en las muestras se realizó utilizando la metodología de adiciones estándar.

El contenido de fenoles de estas muestras, expresado en mg/g de catecol, se comparó con los resultados obtenidos por el método de Folin-Ciocalteu. En la **Tabla 5.10**, se recogen los valores obtenidos por ambos métodos.

Tabla 5.10. Cantidades de fenoles totales obtenidos para las distintas muestras con el biosensor desarrollado y el método de Folin-Ciocalteu a un valor de significancia del 95%(n=3).

Muestra	Biosensor HRP/PAMAM-AuNPs-rGO ^e /GCE (mg/g)	Método de Folin-Ciocalteu (mg/g)
Té verde con limón	13.9 ± 0.7	23.7 ± 0.9
Menta	19 ± 1	22.5 ± 0.4
Frutos rojos	7.7 ± 0.5	8.7 ± 0.6

Como es de esperar y teniendo en cuenta la diferente metodología analítica que emplean ambos métodos, los valores obtenidos de fenoles son diferentes, debido a que cada uno de los fenoles presentes en las infusiones tienen diferente estructura y, por lo tanto, una distinta sensibilidad obteniéndose valores sobreestimados por el método espectrofotométrico. Esta sobreestimación se ha encontrado en otros trabajos en los que se determinaban fenoles en muestras de vino [Gamella, 2010].

6

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos y descritos en la memoria de esta Tesis Doctoral, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. La modificación covalente del óxido de grafeno con derivados silanizados permite la incorporación de grupos altamente reactivos sobre la superficie del nanomaterial, sin afectar sensiblemente sus propiedades estructurales y electroconductoras. Estos grupos reactivos pueden ser empleados como centros de modificación para el posterior anclaje covalente de polímeros aniónicos o catiónicos de estructura lineal o dendrítica que aportan diversos grupos funcionales para la posterior inmovilización de biomoléculas. A lo largo de esta Tesis Doctoral se prepararon diferentes nanomateriales híbridos mediante esta estrategia, los cuales presentaron alta capacidad de dispersión en soluciones acuosas, así como alta densidad de grupos funcionales lo cual favorece la inmovilización estable de biomoléculas.
2. El nanohíbrido de CMCo_x-rGO preparado mediante silanización inicial de GO con APTES y posterior alquilación reductiva con CMC oxidada presentó una morfología de láminas con estructuras tipo fractal en los bordes y ramificaciones colgantes con forma de hilos. Este nanomaterial fue empleado como elemento de transducción para el diseño de un biosensor enzimático para la detección amperométrica de catecol, mediante inmovilización covalente de la enzima tirosinasa. El biosensor presentó excelentes propiedades analíticas y de estabilidad. Asimismo, el nanomaterial se utilizó en el diseño de un genosensor desechable para la detección del gen p53, uno de los marcadores tumorales de mayor relevancia. Este genosensor fue evaluado en muestras reales complejas sin necesidad de realizar un pretratamiento previo a la muestra, pudiendo detectar la presencia del gen p53 a muy bajos niveles de concentración, así como discriminar mutaciones de un solo nucleótido en este marcador.
3. Se prepararon nanopartículas arrugadas de grafeno mediante unión covalente de PAMAM G-4 a GO silanizado. Este nanohíbrido fue empleado en el diseño de un biosensor amperométrico para catecol, el cual mostró alta sensibilidad, estabilidad y bajo límite de detección. La posterior decoración de este material con PtNPs permitió desarrollar un biosensor para la detección de glucosa sin necesidad de emplear mediador electroquímico. Ambos biosensores

6. CONCLUSIONES

presentaron una buena reproducibilidad, alta sensibilidad, bajos límites de detección, así como un rápido tiempo de respuesta. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la utilidad de este nuevo nanomaterial híbrido para la preparación y desarrollo de biosensores enzimáticos.

4. Se estudió comparativamente la influencia del *grafting* químico y electroquímico del rGO sobre las propiedades estructurales y funcionales de los nanohíbridos resultantes. Tomando como modelos el material híbrido PAMAM-AuNPs-rGO y la enzima HRP, se concluyó que el método de *grafting* electroquímico produce un mayor grado de modificación estructural. Este hecho permitió una mayor funcionalización con otros materiales, así como una mejor respuesta electroanalítica del biosensor enzimático construido con este nanohíbrido.
5. Todos los resultados obtenidos demuestran la utilidad analítica y la versatilidad de los biosensores desarrollados. Los valores de las desviaciones estándar relativas, tanto para la repetibilidad de las medidas como para la reproducibilidad entre distintos biosensores, han resultado ser en todos los casos inferiores al 10%, lo que demuestra la fiabilidad del proceso de fabricación de cada uno de los biosensores.

7

BIBLIOGRAFÍA

A

[Agüí, 2008]: Agüí, L.; Yanez-Sedeno, P.; Pingarrón, J.M. *Anal. Chim. Acta*, 622 (2008) 11-47.

[Alkhalaf, 2003]: Alkhalaf, M.; El-Mowafy A. M. *Journal of Endocrinology*, 179 (2003) 55-62.

[Allen, 2010]: Allen, M.J.; Tung, V.C.; Kaner, R.B. *Chem. Rev.* 110 (2010) 132-145.

[Altintas, 2012]: Altintas, Z.; Tohill, I. E. *Sens. Actuators B*, 169 (2012), 188-194.

[Ameer, 2009]: Ameer, Q.; Adeloju, S. B. *Sens. Actuators, B* 140 (2009) 5-11.

[Apetrei, 2011]: Apetrei, C.; Rodríguez-Méndez, M. L.; De Saja, J. A. *Electrochim. Acta*, 56 (2011) 8919-8925.

[Aravind, 2011]: Aravind, S. S. J.; Baby, T. T.; Arockiadoss, T.; Rakhi, R. B.; Ramaprabhu, S. *Thin Solid Films*, 519 (2011) 5667-5672.

B

[Baar, 1994]: Baar, A.; Kulicke, W. M. *Macromol. Cell. Phys.*, 195 (1994) 1483-1492.

[Baby, 2010]: Baby, T. T.; Aravind, S. S. J.; Arockiadoss, T.; Rakhi, R. B.; Ramaprabhu, S. *Sensor Actuat. B Chem*, 145 (2010) 71-77.

[Badui, 1999]: Badui, S. "Química de los Alimentos". Ed. Pearson Educación. México (1999).

[Bai, 2012]: Bai, S.; Shen, X. *RSC Advances*, 2 (2012) 64-98.

[Bai, 2013]: Bai, X.; Chen, G.; Shiu, K. K. *Electrochim. Acta*, 89 (2013) 454-460.

[Babel, 2011]: Babel, I.; Barderas, R.; Diaz-Urriarte, R.; Moreno, V.; Suarez, A.; Fernandez-Acenero, M.J.; Salazar, R.; Capella, G.; Casal, J. I. *Molecular & Cellular Proteomics.*, 10 (2011) 1-10.

[Badui, 1999]: Badui, S. "Química de los Alimentos". Ed. Pearson Educación. México (1999).

[Berger, 2004]: Berger, C. J. *Phys. Chem. B*, 108 (2004) 19912-19916.

[Bethune, 1993]: Bethune, S.; Klang, C. H.; de Vries, M. S.; Gorman, G.; Savoy, -R.; Vasquez, J.; Beyers, R. *Nature* 363 (1993) 605-607.

[Bo, 2011]: Bo, Y.; Yang, H.; Hu, Y.; Yao, T.; Huang, S. *Electrochim. Acta*, 56 (2011) 2676-2681.

[Bourlinos, 2009]: Bourlinos, A.B.; Georgakilas, V.; Zboril, R.; Steriotis, T. Stubos, A.K. *Small*, 5 (2009) 1841-1845.

[Brownson, 2010]: Brownson, D.A.C.; Banks, C.E. *Analyst*, 135 (2010) 2768-2778.

C

[Cai, 2011]: Cai, X.; Tan, S.; Xie, A.; Lin, M.; Liu, Y.; Zhang, X.; Lin, Z.; Wu, T.; Mai, W. *Material Research Bulletin*, 46 (2011) 2353-2358.

[Campuzano, 2003]: Campuzano, S.; Serra, B.; Pedrero, M.; Villena, F. J. M.; Pingarrón, J. M. *Anal. Chim. Acta.*, 494 (2003) 187-197.

[Campuzano, 2004]: Campuzano, S. Tesis Doctoral. *Universidad Complutense de Madrid*, (2004).

[Campuzano, 2014]: Campuzano, S.; Torrente-Rodríguez, R.M.; López-Hernández, E.; Conzuelo, F.; Granados, R.; Sánchez-Puelles, J.M.; Pingarrón, J.M. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53 (2014) 6168–6171.

[Cao, 2013a]: Cao, S.; Zhang, L.; Chai, Y.; Yuan, R. *Biosens. Bioelectron.*, 42 (2013) 532–538.

[Cao, 2013b]: Cao, S.; Zhang, L.; Chai, Y.; Yuan, R. *Talanta*, 109 (2013) 167–172.

[Chaturvedi, 2014]: Chaturvedi, P.; Vanegas, D. C.; Taguchi, M.; Burrs, S. L.; Sharma, P.; Mc Lamore, E.S. *Biosens. Bioelectron.*, 58 (2014) 179–185.

[Chen, 2008]: Chen, L.; Gu, G.; Zhu, B.; Wu, Y.; Liu, S.; Xu, C. *J. Electroanal. Chem.*, 617 (2008) 7-13.

[Chen, 2013a]: Chen, D.; Zhang, H.; Liu, Y.; Li, J. *Energy Environ. Sci.*, 6 (2013) 1362–1387.

[Chen, 2013b]: Chen, X.; Wu, G.; Jiang, Y.; Wang, Y.; Chen, X. *Analyst*, 136 (2011) 4631–4640.

[Chen, 2013c]: Chen, M.; Meng, Y.; Zhang, W.; Zhou, J.; Xie, J.; Diao, G. *Electrochimica Acta*, 108 (2013) 1–9.

[Cheng, 2013]: Cheng, Y.; Feng, B.; Yang, X.; Yang, P.; Ding, Y.; Chen, Y.; Fei, J. *Sens. Actuators, B: Chem.* 182 (2013) 288–293.

[Chiumiento, 2006]: Chiumiento, A.; Dominguez, A.; Lamponi, S.; Villalonga, R. Barbucci, R. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 17 (2006) 427–435.

[Clark, 1962]: Clark, M.; Lyons, C. *Ann. NY. Acad. Sci.* 102 (1962) 29.

[Cohen, 2001]: Cohen, M.L. *Mater. Sci. Eng. C*, 15 (2001) 1–11.

[Cosnier, 1999]: Cosnier, S; Fombon, J. J.; Labbe, P.; Limosin, D. *Sens. Actuators B*, 59 (1999) 134–139.

[Crooks, 2001]: Crooks, R.M.; Zhao, M.; Sun, L.; Chechik, V.; Yeung, L.K. *Acc. Chem. Res.* 34 (2001) 181-190.–

D

[Damar, 2011]: Damar, K.; Demirkol, D. O. *Talanta*, 87 (2011) 67-73.

[Darias, 2002]: Darias, R.; Herrera, I.; Fragoso, A.; Cao, R.; Villalonga, R.; *Biotechnol. Lett.*, 24 (2002) 1665-1668.

[Darias, 2009]: Darias, R.; Herrera, I.; Fragoso, A.; Cao, R.; Villalonga, R. *Biotech. Lett.*, 24 (2002) 1665-1668.

[Díez, 2012]: Díez, P; Villalonga, R.; Villalonga M. L.; Pingarrón, J. M. *J. Colloid Interface Sci.* 386 (2012) 181-188.

[Dikin, 2007]: Dikin, D.A.; Stankovic, S.; Zimney, E.J.; Piner, R.D.; Dommett, G.H.B.; Evmenenko, G.; Nguyen, S.T.; Ruoff, R.S. *Nature*, 448 (2007) 457-460.

[Dreyer, 2010]: Dreyer, D.R.; Park, S.; Bielawski, C.W.; Ruoff, R.S.; Daniel R.S. *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 228-240.

[Du, 2004]: Du, X.S. ; Xiao, M.; Meng, Y.Z.; Hay, A.S. *Synth.Met.*, 143 (2004) 129–132.

E

[Eguílaz, 2011]: Eguílaz, M.; Villalonga, R.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J. M. *Anal. Chem.* 83 (2011) 7807–7814.

[Eissa, 2012]: Eissa, S.; Tlili, C.; L'Hocine, L.; Zourob, M. *Biosens. Bioelectron.*, 38 (2012) 308–313.

[El-Sayed, 2001]: El-Sayed, S.; Mahmoud, K.H.; Fatah, A.A.; Hassen, A.; *Physica B*, 406 (2011) 4068-4076.

[Espín, 1998]: Espín, J. C.; García-Ruiz, P. A.; Tudela J.; García-Cánovas, F. *Biochem. J.* 331 (1998) 547-551.

[Esteban-Fernández de Ávila, 2013]: Esteban-Fernández de Ávila, B.; Escamilla-Gómez, V.; Campuzano, S.; Pedrero, M.; Pingarrón, J.M. *Electroanalysis*, 25 (2013) 51–58.

F

[Fajarmi, 2011]: Farjami, E.; Clima, L.; Gothelf, K.; Ferapontova, E. E. *Anal. Chem.*, 83 (2011) 1594–1602.

[Fayazfar, 2014]: Fayazfar, H.; Afshar, A.; Dolati, M.; Dolati, A. *Anal. Chim. Acta*, 836 (2014) 34–44.

7. BIBLOGRAFÍA

[Frederick, 1990]: Frederick, K. R.; Tung, J.; Emerick, R. S.; Masiarz, F. R.; Chamberlain, S. H.; Vasavada, A.; Rosenberg, S.; Chakraborty, S.; Schopfer, L. M.; Massey, V. J. *Biol. Chem.*, 265 (1990) 3793-3802.

G

[Gamella, 2010]: Gamella, M. Tesis Doctoral. *Universidad Complutense de Madrid*, (2010).

[Gao, 2011]: Gao, W.; Majunder, M.; Alemany, L.B.; Narayanan, T.N.; Ibarra, M.A.; Prandhan, B. K.; Ajayan, P.M. *Appl. Mater. Interfaces*, 3 (2011) 1821-1826.

[Gao, 2015]: Gao, H.; Duan, H. *Biosens. Bioelectro*, 65 (2015) 404-419.

[Geim, 2007]: A. K. Geim, K. S. Novoselov, *Nat. Mater.* 6 (2007) 183-191.

[Gómez, 2006]: Gómez, L. Ramírez, H. L.; Villalonga, M. L.; Hernández, J.; Villalonga, R. *Enzyme and Microbial Tech.*, 38 (2006) 22-27.

[Gong, 2014]: Gong, C.; Guo, C.; Jiang, D.; Tang, Q.; Liu, C.; Ma, X. *Mat. Science Engineering C*, 39 (2014) 281-287.

[Gooding, 2005]: Gooding, J.J. *Electrochim. Acta*, 50 (2005) 3049-3060.

[Grosso, 2011]: Grosso, D.; Ribot, F.; Boissiere, C.; Sánchez, C. *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 829-848.

[Guo, 2009]: Guo, S.; Dong, S. *Trends Anal. Chem.* 28 (2009) 96-109.

[Gupta, 2011]: Gupta, G.; Atanassov, P. *Electroanalysis*, 23 (2011) 1615-1622.

H

[Hao, 2010]: Hao, Y.; Wang, Y.; Wang, L.; Ni, Z.; Wang, Z.; Wang, R.; Koo, C.K.; Shen, Z.; Thong, J.T. *Small*, 6 (2010) 195-200.

[Hsu, 2012]: Hsu, Y.W.; Hsu, T. K.; Sun, C. L.; Nien, Y. T.; Pud, N. W.; Ger, M. D. *Electrochimica Acta*, 82 (2012) 152-157.

[Hsueh, 2003]: Hsueh, H. B.; Chen, C. Y. *Polymer*, 44 (2003) 1151-1161.

[Huang, 2001]: Huang, E.; Satjapipat, M.; Han, S. B.; Zhou, F. M. *Langmuir*, 17 (2001) 1215-1224.

[Huang, 2011]: Huang, X.; Yin, Z.; Wu, S.; Qi, X.; He, Q.; Zhang, Q.; Yan, Q.; Boey, F.; Zhang, H. *Small*. 7 (2011) 1876-1902.

[Huang, 2012]: Huang, X.; Qi, X.; Boey, F.; Zhang, H. *Chem Soc Rev.* 41 (2012) 666-686.

[Huang, 2013]: Huang, K.; Wang, L.; Wang, H.; Gan, T.; Wu, Y.; Li, J.; Liu, Y. *Talanta*, 114 (2013) 43-48.

[Huang, 2014]: Huang, K.; Liu, Y.; Wang, H.; Wang, Y. *Electrochem. Acta*, 118 (2014) 130–137.

[Hummers, 1958]: Hummers, W. S.; Offeman, R. E. *J. Am. Chem. Soc.* 80 (1958) 1339.

[Hwa, 2014]: Hwa, K. Y.; Subramani, B. *Biosens. Bioelectronics*, 62 (2014) 127–133.

I

[Iijima, 1991]: Iijima, S. *Nature* 354 (1991) 56–58.

[Iijima, 1993]: Iijima, S.; Ichihashi, T. *Nature* 363 (1993) 603–605.

[Iwuoha, 1997]: Iwuoha, E.I.; Saenz de Villaverde, D.; Peña, N.; Smyth, M.R.; Pingarrón, J.M. *Biosens. Bioelectron.* 12 (1997) 749–761.

J

[Jang, 2009]: Jang, J. Y.; Kim, M. S.; Jeong, H. M.; Shin, C. M. *Compos. Sci. Technol.*, 69 (2009) 186–190.

[Jang, 2012]: Jang, H. D.; Kim, S. K.; Chang, H.; Roh, K. M.; Choi, J. W.; Huang, J. *Biosens. Bioelectron.* 38 (2012) 184–188.

[Jariwala, 2013]: Jariwala, D.; Sangwan, V. K.; Lauhon, L. J.; Marks, T. J.; Hersam, M. C. *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 2824–2860.

[Jayakumar, 2012]: Jayakumar, K.; Rajesh, R.; Dharuman, V.; Venkatasana, R.; Hahnc, J.H.; Pandian S. K. *Biosens. Bioelectron.*, 31 (2012) 406–412.

[Jenkins, 1996]: Jenkins, R.; Snyder, R. “Introduction to X-ray powder diffractometry”. Ed. J.W.Sons. New York (1996).

[Jiang, 2005]: Jiang, T.; Minunni, M.; Wilson, P.; Zhang, J.; Turner, A.P.F.; Mascini, M. *Biosens. Bioelectron.*, 20 (2005) 1939–1945.

[Jiang, 2012]: Jiang, B.; Wang, M.; Chen, Y.; Xie, J.; Xiang, Y. *Biosens. Bioelectron.* 32 (2012) 305–308.

[Jong, 2000]: Jong, K. P.; Geus, J. W. *Catalysis Reviews: Science and Engineering*, 42 (2000) 481–510.

K

[Kamide 1985]: Kamide, K.; Okajima, K.; Kowsaka, K.; Matsui, T.; Nomura, S.; Hikichi, K. *Polymer J.*, 17 (1985) 909–918.

[Kim, 2007]: Kim, H.; Hahn, H. T.; Viculis, L. M.; Gilje, S.; Kaner, R. B. *Carbon*, 45 (2007) 1578–1582.

7. BIBLOGRAFÍA

[Kim, 2009]: Kim, S.; Do, I.; Drzal, L. T. *Polym. Compos.*, 31 (2009) 755–761.

[Kim, 2010]: Kim, S.; Drzal, L. T. *Compos. Part. A*, 41 (2010) 581–587.

[Kim, 2011]: Kim, J. E.; Han, T. H.; Lee, S. H.; Kim, J. Y.; Ahn, C. W.; Yun, J. M.; Kim, S. O. *Angew. Chem., Int. Ed.* 50 (2011) 3043–3047.

[Kornmann, 2001]: Kornmann, X. PhD thesis. *Lulea Tekniska Universitet*, Sweden (2001).

[Kroto, 1985]: Kroto, H. W.; Heath, J. R.; O'Brien, S. C.; Curl, R. F.; Smalley, R. E. *Nature* 318 (1985) 162–163.

[Kuilla, 2012]: Kuilla, T.; Bhadra, S.; Yao, D.; Kim, N. K.; Bose, S.; Lee, J. H. *Progress in Polymer Science*, 35 (2010) 1350–1375.

[Kumar, 2013]: Kumar, M.; Singh, K.; Dhawan, S. K.; Tharanikkarasu, K.; Chung, J. S.; Kong, B.; Kim, E. J.; Hur, S. H. *Chem. Engin. J.* 231 (2013) 397–405.

L

[Lacroix, 2006]: Lacroix, M.; Toillon, R.-A.; Leclercq, G. *Endocrine-Related Cancer* 13 (2006) 293–325.

[Lawal, 2015]: Lawal, A.T. *Talanta*, 131 (2015) 424–443.

[Lee, 2008]: Lee, C.; Wei, X.; Kysar, J.W.; Hone, J. *Science*, 321 (2008) 385–388.

[Lee, 2009]: Lee, Y. R.; Raghu, A. V.; Jeong, H. M.; Kim, B. K.; *Macromol. Chem. Phys.*, 210 (2009) 1247–1254.

[Li, 2013a]: Li, Z.; Huang, Y.; Chen, L.; Qin, X.; Huang, Z.; Zhou, Y.; Meng, Y.; Li, J.; Huang, S.; Liu, Y.; Wang, W.; Xie, Q.; Yao, S. *Sens. Actuators B*, 181 (2013) 280–287.

[Li, 2013b]: Li, Y.; Li, K.; Song, G.; Liu, J.; Zhang, K.; Ye, B. *Sens. Actuators B*, 182 (2013) 401–407.

[Liang, 2008]: Liang, C.; Li, Z.; Dai, S., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47 (2008) 3696–3717.

[Liang, 2009]: Liang, J.; Huang, Y.; Zhang, L.; Wang, Y.; Ma, Y.; Guo, T. *Adv. Funct. Mater.*, 19 (2009) 2297–2302.

[Lin, 2009]: Lin, W. J.; Liao, C. S.; Jhang, J. H.; Tsai, Y. C. *Electrochem. Commun.*, 11 (2009) 2153–2156.

[Linting, 2012]: Linting, Z.; Ruiyi, L.; Zaijun, L.; Qianfang, X.; Yinjun, F.; Junkang, L. *Sens. Actuators B*, 174 (2012) 359–365.

[Liu, 2000]: Liu, Z.; Deng, J.; Li, D. *Anal. Chim. Acta*, 407 (2000) 87–96.

[Liu, 2008]: Liu, Z.; Robinson, J. T.; Sun, X. M.; Chen, X. Y.; Dai, H. J. *J. Am. Chem. Soc.*, 130 (2008) 10876–10877.

[Liu, 2010]: Liu, Y.; Yu, D.; Zeng, C.; Miao, Z.; Dai, L. *Langmuir*, 26 (2010) 6158–6160.

- [Liu, 2011]:** Liu, T.; Su, H.; Qu, X.; Ju, P.; Cui, L.; Ai, S. *Sensor Actuat. B Chem.* 160 (2011) 1255–1261.
- [Liu, 2012]:** Liu, Y.; Dong, X.; Chen, P. *Chem. Soc. Rev.*, 41 (2012) 2283–2307.
- [Liu, 2013]:** Liu, W.; Xiao, J.; Wang, C.; Yin, H.; Xie, H.; Cheng, R.; Liu, W.; Xiao, J.; Wang, C.; Yin, H.; Xie, H.; Cheng, R. *Materials Letters*, 100 (2013) 70–73.
- [Liu, 2014a]:** Liu, Y.; Wang, G.; Li, C.; Zhou, Q.; Wang, M.; Yang, L. *Mater. Sci. Engineering C*, 35 (2014) 253–258.
- [Liu, 2014b]:** Liu, H.; Duan, C.; Su, X.; Dong, X.; Shen, W.; Zhu, Z. *Ceramics International*, 40 (2014) 9867–9874.
- [Liu, 2014c]:** Liu, X.; Yan, R.; Zhu, J.; Zhang, J.; Liu, X. *Sens. Actuators B: Chemical*, (2014).
- [Loaiza, 2007]:** Loaiza, O. A.; Campuzano, S.; Pedrero, M.; Pingarrón, J. M. *Talanta*, 73 (2007) 838–844.
- [Loh, 2010]:** Loh, K. P.; Bao, Q.; Ang, P. K.; Yang, J. X. *J. Mater. Chem.*, 20 (2010) 2277–2289.
- [Lomeda, 2008]:** Lomeda, J. R.; Doyle, C. D.; Kosynkin, D. V.; Hwang, W. F.; Tour, J. M. *J. Am. Chem. Soc.*, 130 (2008) 16201–16206.
- [Lu, 2006]:** Lu, Y.; Yu, J. *Curr. Opin. Biotech.* 17 (2006) 580–588.
- [Lu, 2009]:** Lu, G.; Mao, S.; Park, S.; Ruoff, R. S.; Chen, J. *Nano Res.* 2 (2009) 192–200.
- [Lu, 2011]:** Lu, L.; Li, H.; Qub, F.; Zhanga, X.; Shena, G.; Yu, R. *Biosens. Bioelectron.*, 26 (2011) 3500–3504.
- [Lu, 2013]:** Lu, L.; Zhang, O.; Xu, J.; Wen, Y.; Duan, H.; Yu, H.; Wu, L.; Nie, T. *Sens. Actuators B*, 181 (2013) 567–574.
- [Lu, 2014]:** Lu, X.; Wang, X.; Jin, J.; Zhang, Q.; Chen, J. *Biosens. Bioelectron.*, 62 (2014) 134–139.
- [Lucarelli, 2004]:** Lucarelli, F.; Marrazza, G.; Turner, A. P. F.; Mascini, M. *Biosens. Bioelectron.* 19 (2004) 515–530.
- [Luo, 2012]:** Luo, Z.; Yuwen, L.; Han, Y.; Tian, J.; Zhu, X.; Weng, L.; Wang, L. *Biosens. Bioelectron.*, 36 (2012) 179–185.
- [Luo, 2013]:** Luo, X-W.; Du, F-J.; Wu, Y.; Gao, L-J.; Li, X-X. *Chinese J. of Anal. Chem.*, 41 (2013) 1664–1668.

M

[Ma, 2013]: Ma, W.; Lv, X.; Han, D.; Li, F.; Dong, X.; Niu, L. *J. Electroanal. Chem.*, 690 (2013) 111–116.

[Mao, 2012]: Mao, S.; Pu, H.; Chen, J. *RSC Advances*, 2 (2012) 2643-2662.

[Marcano, 2010]: Marcano, D.C.; Kosynkin, D.V.; Berlin, J.M.; Sinitskii, A.; Sun, Z.; Slesarev, A.; Alemany, L.W.; Lu, W.; Touret, J.M. *ACS*, 4 (2010) 4806-4814.

[Mathot, 1994]: Mathot, V. "Calorimetry and thermal analysis of polymers". Ed. H. Publishers. New York (1994).

[Meulenberg, 2009]: Meulenberg, E. P. *Molecules*, 14 (2009) 439-473.

[Migneault, 2004]: Migneault, I.; Dartiguenave, C.; Bertrand, m. J. Waldron, K. C. *BioTechniques*, 37 (2004) 790-802.

[Miller, 2000]: Miller, N. M.; Miller, J. C. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, 4ª ed. Prentice Hall, Madrid (2000).

[Moujahid, 2003]: Moujahid EM, Besse, J. P.; Leroux, F. J. *Mater. Chem.*, 13 (2003) 258–264.

[Mousty, 2001]: Mousty, C.; Galland, B.; Cosnier, S. *Electroanalysis*, 13 (2001) 186-190.

N

[Němcová, 2010]: Němcová, K.; Havran, L.; Šebest, P.; Brázdová, M.; Pivoňcová, H.; Fojta, M. *Analytica Chimica Acta*, 668 (2010) 166–170.

[Ni, 2013]: Ni, Y.; Zhang, F.; Kokot, S. *Anal. Chim. Acta*, 769 (2013) 40–48.

[Ninan, 2013]: Ninan, N.; Muthiah, M.; Park, I. K.; Elain, A.; Thomas, S.; Grohens, Y. *Carbohydr. Polym.*, 98 (2013) 877–885.

[Niu, 2013]: Niu, S.; Sun, J.; Nan, C.; Lin, J. *Sens. Actuators B*, 176 (2013) 58–63.

[Novoselov, 2004]: Novoselov, K. S.; Geim, A. K.; Morozov, S. V.; Jiang, D.; Zhang, Y.; Dubonos, S. V.; Grigorieva, I. V.; Firsov, A. A. *Science* 306 (2004) 666-669.

O

[Ortega, 1994]: Ortega, F.; Domínguez, E.; Burestedt, E.; Emnéus, J.; Gorton, L.; Marko-Varga, G. *J. Chromatogr. A*, 675 (1994) 65-78.

[Ouyang, 2013]: Ouyang, F.P.; Zou, H.; Ni, X.; Peng, S.L.; Ouyang, J.; Chen, Y. *Wuli Huaxue Xuebao/ Acta Physico-Chim.Si.*, 29 (2013) 250–254.

P

[Paek, 2009]: Paek, S. M.; Yoo, E. J.; Honma, I. *Nano Lett.*, 9 (2009) 72–75

[Palanisamy, 2014]: Palanisamy, S.; Karuppiyah, C.; Chen, S. *Coll. Surfaces B: Biointerfaces*, 114 (2014) 164–169.

[Paleček, 2014]: Paleček, E.; Černocká, H.; Ostatná, V.; Navrátilová, L.; Brázdová, M. *Analytica Chimica Acta*, 828 (2014) 1–8.

[Pan, 2015]: Pan, D.; Gu, Y.; Lan, H.; Sun, Y.; Gao, H. *Anal. Chim. Acta*, 853 (2015) 297–302.

[Park, 2009a]: Park, S.; Ruoff, R. S. *Nat. Nanotechnol.*, 4 (2009) 217–224.

[Park, 2009b]: Park, S.; An, J.; Jung, I.; Piner, R. D.; An, S. J.; Li, X.; Velamakanni, A.; Ruoff, R. S.; *Nano Lett.* 9 (2009) 1593–1597.

[Peláez-García, 2013]: Peláez-García, A.; Barderas, R.; Torres, S.; Hernández-Varas, P.; Teixido, J.; Bonilla, F.; de Herreros, A. G.; Casal, J. I. *PLoS One*. 8 (2013) e63695.

[Peng, 2013]: Peng, C.; Xiong, Y.; Liu, Z.; Zhang, F.; Ou, E.; Qian, J.; Xiong, Y.; Xu, W. *App. Surf. Sci.* 280 (2013) 914–919.

[Peña, 2001]: Peña, N.; Reviejo, A.J.; Pingarrón, J.M. *Talanta* 55 (2001) 179–187.

[Peña, 2003]: Peña, N. Tesis Doctoral. *Universidad Complutense de Madrid*, (2003).

[Pingarrón, 2008]: Pingarrón, J.M.; Yanez-Sedeno, P.; Gonzalez-Cortes, A. *Electrochim. Acta*, 53 (2008) 5848–5866.

[Poupot, 2010]: Poupot, M.; Poupot, R.; Fournier, J. J.; Portevin, D.; Fruchon, S.; Davignon, J. L.; Turrin, C. O.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Rolland, O. *Patente: WO2010013086; 01/2010.*

[Prota 1995]: Prota, G. *Progr. Chem. Org. Nat. Prod.* 64 (1995) 93–148.

[Pumera, 2009]: Pumera, M. *Chem. Rec.* 9 (2009) 211–223.

[Pumera, 2010]: Pumera, M.; Ambrosi, A.; Bonanni, A.; Chng, E.L.K.; Poh, H.L. *Trac-Trend Anal. Chem.* 29 (2010) 954–965.

[Putzbach, 2013]: Putzbach, W.; Ronkainen, N.J. *Sensors (Switzerland)*, 13 (2013) 4811–4840.

Q

[Qi, 2010]: Qi, X.; Pu, K. Y.; Zhou, X.; Li, H.; Liu, B.; Boey, F.; Huang, W.; Zhang, H. *Small*, 6 (2010) 663–669.

7. BIBLOGRAFÍA

[Qin, 2012]: Qin, Y.; Kong, Y.; Xu, Y.; Chu, F.; Tao, Y.; Li, S. (2012) DOI: 10.1039/c2jm35321k.

[Qiu, 2011]: Qiu, J. D.; Huang, J.; Liang, R. P. *Sensor Actuat. B Chem.* 160 (2011) 287–294.

[Qu, 2013]: Qu, Y.; Ma, M.; Wang, Z.; Zhan, G.; Li, B.; Wang, X.; Fang, H.; Zhang, H.; Li, C. *Biosens. Bioelectron.*, 44 (2013) 85–88.

R

[Radhapyari, 2013]: Radhapyari, K.; Kotoky, P.; Das, M.R.; Khan, R. *Talanta*, 111 (2013) 47–53.

[Rahman, 2011]: Rahman, M. M. *Nanomaterials*, Intech, EUA (2011).

[Rajesh, 2004a]: Rajesh, A.; Takashima, W.; Kaneto, K. *React. Funct. Polym.* 59 (2004) 163-169.

[Rajesh, 2004b]: Rajesh, A.; Takashima, W.; Kaneto, K. *Sens. Actuators, B.* 102 (2004) 271-277.

[Ramesha, 2009]: Ramesha, G.K.; Sampath, S. *J. Phys. Chem. C*, 113 (2009) 7985-7989.

[Raouf, 2011]: Raouf, J. B.; Ojani, R.; Golabi, S. M.; Hamidi-Asl, E.; Hejazi, M. S. *Sens. Actuators B*, 157 (2011) 195– 201.

[Rather, 2014]: Rather, J. A.; Pilehvar, S.; Wael, K.; *Sens. Actuators B: Chemical*, 190 (2014) 612-620.

[Ratinac, 2011]: Ratinac, K.R.; Yang, W.; Gooding, J.; Thordarson, P.; Braet, F. *Electroanalysis*, 23 (2011) 803-826.

[Razmi, 2013]: Razmi, H.; Mohammad-Rezaei, R. *Biosens. Bioelectron.* 41 (2013) 498–504.

[Reuben 1983]: Reuben, J.; Conner, H.T. *Carbohydrate research*, 115 (1983) 1-13.

[Reviejo, 2000]: Reviejo, A.J.; Pingarrón, J.M. *Anales de la Real Sociedad Española de Química* (2a Ep.) (2000) 5-15.

[Rivlin, 2011]: Rivlin, N.; Brosh, R.; Oren, M.; Rotter, V. *Genes & Cancer*, 2 (2011) 466-474.

[Rourke, 2011]: Rourke, J. P.; Pandey, P. A.; Moore, J. J.; Bates, M.; Kinloch, I. A.; Young R. J.; Wilson, N. R. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 50 (2011) 3173–3177.

[Ruan, 2013]: Ruan, C.; Shi, W.; Jiang, H.; Sun, Y.; Liu, X.; Zhang, X.; Sun, Z.; Dai, L.; Ge, D. *Sensors Actuat. B*, 177 (2013) 826–832.

[Ruecha, 2014]: Ruecha, N.; Rangkupan, R.; Rodthongkum, N.; Chailapakul, O. *Biosens. Bioelectron.*, 52 (2014) 13–19.

[Runnebaum, 1991]: Runnebaum, I.B.; Nagarajan, M.; Bowman, M.; Soto, D.; Sukumar, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 (1991) 10657–10661.

[Ruzgas, 1996]: Ruzgas, T.; Csöregi, E.; Emnéus, J.; Gorton L.; Marko-Varga G. *Analytica Chimica Acta*, 330 (1996)123-138.

S

[Sato, 2013]: Sato, K.; Anzai, J. *Molecules*, 18 (2013) 8440-8460.

[Scheible, 2010]: Scheible, B.; Borowiak-Palen, E.; Kalenczuk, R. J. *J Alloys Compd.*, 500 (2010) 117-124.

[Scheuermann, 2009]: Scheuermann, G. M.; Rumi, L.; Steurer, P.; Bannwarth, W.; Mülhaupt, R. *J. Am. Chem. Soc.*, 131 (2009) 8262–8270.

[Scott, 2005]: Scott, R.W.; Wilson, O.M.; Crooks, R.M. *J. Phys. Chem. B*. 109 (2005) 692–704.

[Scully, 2009]: Scully, K.; Bissessur, R. *Thermochim. Acta*, 490 (2009) 32–6.

[Serra, 1999]: Serra, B.; Mateo, E.; Pedrero, M.; Reviejo, A.J.; Pingarrón, J.M. *Analyst*, 27 (1999) 592-599.

[Serra, 2002]: Serra, B. Tesis Doctoral. *Universidad Complutense de Madrid*, (2002).

[Shan, 2010a]: Shan, C.; Yang, H.; Han, D.; Zhang, Q.; Ivaska, A.; Niu, L. *Biosens. Bioelectron.* 25 (2010) 1070–1074.

[Shan, 2010b]: Shan, D.; Li, Q.B.; Ding, S.N.; Xu, J.Q.; Cosnier, S.; Xue, H.G. *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 536-541.

[Shao, 2009]: Shao, D. D.; Jiang, Z. D.; Wang, X. K.; Li, J. K.; Meng, Y. D. *Phys. Chem. B.*, 113 (2009) 860-864.

[Shao, 2010a]: Shao, Y.; Wang, J.; Wu, H.; Liu, J.; Aksay, I. A.; Lin, Y. *Electroanalysis*, 22 (2010) 1027–1036.

[Shao, 2010b]: Shao, Y.; Wang, J.; Wu, H.; Liu, J.; Aksay, I.; Lin, Y. *Electroanalysis*, 21 (2010) 139–152.

[Shen, 2009]: Shen, J. F.; Hu, Y. Z.; Shi, M.; Lu, X.; Qin, C.; Li C.; Ye, M. G. *Chem. Mater.*, 21 (2009) 3514-3520.

[Si, 2008]: Si, Y.; Samulski, E.T. *Nano Lett.*, 8 (2008) 1679-1682.

[Singal, 2014]: Singal, S.; Srivastava, A. K.; Biradar, A. M.; Mulchandani, A.; Rajesh. *Sens. Actuators B*, 205 (2014) 363–370.

7. BIBLOGRAFÍA

[Singh, 2013]: Singh, A.; Sinsinbar, G.; Choudhary, M.; Kumar, V.; Pasricha, R.; Verma, H.N.; Surinder, P.; Arora, K. *Sens. Actuators B*, 185 (2013) 675–684.

[Smith, 1962]: Smith J. L.; Krueger, R. C. *J. Biol. Chem.* 237 (1962) 1121-1128.

[Song, 2006]: Song, Y.; Wang, L.; Ren, C.; Zhu, G.; Li, Z. *Sens. Actuators B Chem*, 114 (2006) 1001-1006.

[Song, 2011]: Song, W.; Li, D.; Li, Y.; Li, Y.; Long, Y. *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 3181–3186.

[Song, 2015]: Song, D.; Xi, J.; Zhang, F.; Bi, S.; Xiang, W.; Wang, Z.; Xi, L.; Xi, Y.; Li, Y.; Xi, L. *Sens. Actuators B*, 206 (2015) 111–118.

[Stankovich, 2006a]: Stankovich, S.; Piner, R. D.; Chen, X.; Wu, N.; Nguyen S. T.; Ruoff, R. S.; *J. Mater. Chem.* 16 (2006) 155-158.

[Stankovich, 2006b]: Stankovich, S.; Dikin, D.A.; Dommett, G.H.B.; Kohlhaas, K.M.; Zimney, E.J.; Stach, E.A.; Piner, R.D.; Nguyen, T.S.; Ruoff, R.S. *Nature*, 442 (2006) 282–286.

[Steel, 1998]: Steel, A.B.; Herne, T.M.; Tarlov, M.J. *Anal. Chem.*, 70 (1998) 4670–4677.

[Stoller, 2008]: Stoller, M. D.; Park, S. J.; Zhu, Y. W.; An, J. H.; Ruoff, R. S. *NanoLett.* 8 (2008) 3498–3502.

[Sun, 2012]: Sun, W.; Zhang, Y.; Jub, X.; Li, G.; Gaoc, H.; Sun, Z. *Anal. Chim. Acta*, 752 (2012) 39–44.

[Sun, 2015]: Sun, X.; Jia, M.; Guan, L.; Ji, J.; Zhang, Y.; Tang, L.; Li, Z. *Food Chemistry*, 172 (2015) 335–342

Ş

[Şenel, 2013]: Şenel, M.; Nergiz, C.; Çevik, E. *Sensors and Actuators B*, 176 (2013) 299–306.

Š

[Šipova, 2011]: Šipova, H.; Špringer, T.; Homola, J. *Anal Bioanal Chem*, 399 (2011) 2343–2350.

T

[Tang, 2006]: Tang, D.; Yuan, R.; Chai, Y. *J. Phys. Chem. B.*, 110 (2006) 11640–11646.

[Tang, 2013]: Tang, D.; Ma, G.; Zhang, L.; Chen, G. *J. Chromatogr. A*, 1316 (2013) 127–134.

[Teymourian, 2013]: Teymourian, H.; Salimi, A.; Khezrian, S. *Biosens. Bioelectron.*, 49 (2013) 1–8.

[Tiwari, 2012]: Tiwari, A.; Deshpande, S. R.; Kobayashi, H.; Turner, A. P. F. *Biosens. Bioelectron.*, 35 (2012) 224–229.

[Tothill, 2009]: Tothill, I. E. *Sem. Cell Develop. Biology*, 20 (2009) 55–62.

[Tsuge, 1975]: Tsuge, H.; Natsuaki, O.; Ohashi, K. *J. Biochem.*, 78 (1975) 835–843.

U

[Ueno, 2007]: Ueno, T.; Yokota, S.; Kitaoka, T.; Wariishi, H. *Carbohydr. Res.* 342 (2007) 954–960.

[Unnikrishnan, 2013]: Unnikrishnan, B.; Palanisamy, S.; Chen, S. M. *Biosens. Bioelectronics*, 39 (2013) 70–75.

V

[Valdivia, 2007]: Valdivia, A.; Pérez, Y.; Cao, R.; Baños, M.; García, A.; Villalonga, R.; *Macromol. Biosci.*, 7(2007) 70–75.

[Vaseashta, 2005]: Vaseashta, A.; Dimova-Malinovska, D. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 6 (2005) 312–318.

[Veerapandian, 2014]: Veerapandian, M.; Seo, Y.; Yun, K.; Lee, M. *Biosens. Bioelectron.*, 58 (2014) 200–204.

[Veitch, 2004]: Veitch, N.C. *Phytochem.* 65 (2004) 249–259.

[Villalonga, 1999]: Villalonga, R.; Gómez, L.; Ramirez, H.L.; Villalonga, M.L. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 74 (1999) 635–638.

[Villalonga, 2000]: Villalonga, R.; Villalonga, M.L.; Gómez, L. *J. Mol. Catal. B*, 10 (2000) 483–490.

[Villalonga, 2003]: Villalonga, M. L.; Fernández, M. Fragoso, A.; Cao, R.; Villalonga, R. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 33 (2003) 53–66.

[Villalonga, 2011a]: Villalonga, R.; Díez, P.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J. M. *Electrochim. Acta*, 56 (2011) 4672–4677.

[Villalonga, 2011b]: Villalonga, R.; Villalonga, M. L.; Díez, P.; Pingarrón, J. M. *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 12858–12864.

[Villalonga, 2012]: Villalonga, R.; Díez, P.; Casado, S.; Eguílaz, M.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J. M. *Analyst* 137 (2012) 342–348.

7. BIBLOGRAFÍA

[Villalonga, 2013]: Villalonga, R.; Díez, P.; Sánchez, A.; Aznar, E.; Martínez-Máñez, R.; Pingarrón, J. M. *Chem. Eur. J.* 19 (2013) 7889–7894.

[Vögtle, 2009]: Vögtle, F.; Richardt G.; Werner, N. *Dendrimer chemistry: concepts, synthesis, properties, applications* (2009) Wiley-VCH, Weinheim.

W

[Wakabayashi 2008]: Wakabayashi, K.; Pierre, C.; Dikin, D. A.; Ruoff, R. S.; Ramanathan, T.; Brinson, L. C. *Macromolecules* 41 (2008) 1905–1908.

[Walcarius, 2013]: Walcarius, A.; Minter, S. D.; Wang, J.; Lin, Y.; Merkoçi, A. J. *Mater. Chem. B*, 1 (2013) 4878–4908.

[Wang, 2000]: Wang, B.; Zhang, J.; Dong, S. *Biosens. Bioelectron.* 15 (2000) 397–402.

[Wang, 2005]: Wang, J. *Electroanalysis*, 17 (2005) 7–14.

[Wang, 2008]: Wang, S.; Tan, Y.; Zhao, D.; Liu, G. *Biosens. Bioelectron.* 23 (2008) 1781–1787.

[Wang, 2009a]: Wang, G. X.; Wang, B.; Park, J.; Yang, X.; Shen, P.; Yao, J. *Carbon*, 47 (2009) 68–72.

[Wang, 2009b]: Wang, Y.; Zhu, X.; Wu, M.; Xia, N.; Wang, J.; Zhou, F. *Anal. Chem.*, 81 (2009) 8441–8446.

[Wang, 2011]: Wang, X.; Zhang, X.; He, P.; Fang, Y. *Biosens. Bioelectron.*, 26 (2011) 3608–3613.

[Wang, 2012a]: Wang, Q.; Cui, X.; Chen, J.; Zheng, X.; Liu, C.; Xue, T.; Wang, H.; Jin, Z.; Qiao, L.; Zheng, W. *RSC Adv.*, 2 (2012) 6245–6249.

[Wang, 2012b]: Wang, D.W.; Du, A.; Taran, E.; Lu, G.Q.M.; Gentle, I.R. *J. Mat. Chem.* 22 (2012) 21085–21091.

[Wang, 2013a]: Wang, H.; Zhang, Y.; Li, H.; Du, B.; Ma, H.; Wu, D.; Wei, Q. *Biosens. Bioelectron.*, 49 (2013) 14–19.

[Wang, 2013b]: Wang X.; Wang, X.; Wang, X.; Chen F.; Zhu, K.; Xu, Q.; Tang, M. *Anal. Chim. Acta*, 765 (2013) 63–69.

[Wang, 2013c]: Wang, R.; Xue, C. *Anal. Methods*, 5 (2013) 5195–5200.

[Wang, 2014a]: Wang, G.; Tan, X.; Zhou, Q.; Liu, Y.; Wang, M.; Yang, L. *Sens. Actuators B*, 190 (2014) 730–736.

[Wang, 2014b]: Wang, W.; Xu, G.; Cui, X. T.; Sheng, G.; Luo, X. *Biosens. Bioelectron.*, 58 (2014) 153–156.

[Wang, 2014c]: Wang, Y.; Li, H. Kong, J. *Sens. Actuators B*, 193 (2014) 708–714.

[Wang, 2015]: Wang, J.; Shi, A.; Fang, X.; Han, X.; Zhang, Y. *Anal. Biochem.*, 15 (2015) 71–75.

[Wei, 2009]: Wei, D.; Liu, Y.; Wang, Y.; Zhang, H.; Huang, L.; Yu, G. *Nano Lett.* 9 (2009) 1752–1758.

[Wilson, 2005]: Wilson, P. K.; Jiang, T.; Minunni, M.; Turner, A. P. F.; Mascini, M. *Biosens. Bioelectron.*, 20 (2005) 2310–2313.

[Wu, 2009a]: Wu, Z. S.; Ren, W. C.; Gao, L. B.; Zhao, J. P.; Chen, Z. P.; Liu, B. L.; Tang, D. M.; Yu, B.; Jiang, C. B.; Cheng, H. M. *ACSNano*, 3 (2009), 411–417.

[Wu, 2009b]: Wu, H.; Wang, J.; Kang, X.; Wang, C.; Wang, D.; Liu, J.; Aksay, I. A.; Lin, Y. *Talanta*, 80 (2009) 403–406.

[Wu, 2010]: Wu, J.; Campuzano, S.; Halford, C.; Haake, D. A.; Wang, J. *Anal. Chem.* 82 (2010) 8830–8837.

[Wu, 2012]: Wu, Z. S.; Zhou, G.; Yin, L. C.; Ren, W.; Li, F.; Cheng, H. M. *Nano Energy*, 1 (2012) 107–131.

[Wu, 2013]: Wu, S.; Huang, F.; Lan, X.; Wang, X.; Wang, J.; Meng, C. *Sens. Actuators B: Chem.*, 177 (2013) 724–729.

X

[Xi, 2009]: Xi, F.; Liu, L.; Chen, Z.; Lin, X. *Talanta*, 78 (2009) 1077–1082.

[Xie, 2004]: Xie, H.; Yu, Y. H.; Xie, F.; Lao, Y. Z.; Gao, Z. *Clin. Chem.* 50 (2004) 1231–1233.

[Xie, 2011]: Xie, Y.; Chen, A.; Du, D.; Lin, Y. *Anal. Chim. Acta*, 699 (2011) 44–48.

[Xie, 2013]: Xie, L.; Xu, Y.; Cao, X. *Coll. Surfaces B: Biointerfaces*, 107 (2013) 245–250.

[Xu, 2008]: Xu, Y.X.; Bai, H.; Lu, G.W.; Li, C.; Shi, G.Q.; *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 5856–5857.

[Xu, 2013a]: Xu, H.; Wang, D.; He, S.; Li, J.; Feng, B.; Ma, P.; Xu, P.; Gao, S.; Zhang, S.; Liu, Q.; Lu, J.; Song, S.; Fan, C. *Biosens. Bioelectron.*, 50 (2013) 251–255.

[Xu, 2013b]: Xu, C.; Xu, B.; Gu, Y.; Xiong, Z.; Sun, J.; Zhao, X.S. *Energy Environ. Sci.*, 6 (2013) 1388–1414.

[Xue, 2014]: Xue, K.; Zhou, S.; Shi, H.; Feng, X.; Xin, H.; Song, W. *Sens. Actuators B*, 203 (2014) 412–416.

Y

7. BIBLOGRAFÍA

[Yang, 2010]: Yang, Q.; Pan, X.; Huang, F.; Li, K.; *J. Phys. Chem. C*, 114 (2010) 3811-3816.

[Yang, 2011]: Yang, X.; Zhu, J.; Qiu, L.; Li, D. *Adv. Mater.* 23 (2011) 2833–2838.

[Yang, 2012]: Yang, L.; Xiong, H.; Zhang, X.; Wang, S. *Bioelectrochemistry*, 84 (2012) 44-48.

[Yang, 2013a]: Yang, L.; Wang, G.; Liu, Y. *Anal. Biochem.*, 437 (2013) 144–149.

[Yang, 2013b]: Yang, L.; Wang, G.; Liu, Y. Wang, M. *Talanta*, 113 (2013) 135–141.

[Yáñez-Sedeño, 2015]: Yáñez-Sedeño, P.; Villalonga, R.; Pingarrón, J.M. "Encyclopedia of Analytical Chemistry", Ed. R.A. Meyers, John Wiley & Sons, Chichester, UK. (2015). DOI:10.1002/9780470027318, ISBN: 9780470027318.

[Yao, 2012]: Yao, J.; Sun, Y.; Yang, M.; Duan, Y. *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 14313–14329.

[Yin, 2009]: Yin, H.; Ai, S.; Shi, W.; Zhu, L. *Sens. Actuators B Chem.* 137 (2009) 747–753.

[Yogeswaran, 2008]: Yogeswaran, U.; Chen, S.M. *Sensors*, 8 (2008) 290–313.

[Yola, 2014]: Yola, M. L.; Eren, Y.; Atar, N. *Electrochim. Acta*, 125 (2014) 38–47.

Z

[Zeng, 2011]: Zeng, Q.; Cheng, J. S.; Liu, X. F.; Bai, H. T.; Jiang, J. H. *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 3456–3463.

[Zhang, 2009a]: Zhang, D. D.; Zu, S. Z.; Han, D. D.; Zu, S. Z.; Han, B. H. *Carbon*, 47 (2009) 2993–3000.

[Zhang, 2009b]: Zhang, J.; Lei, J.; Liu, Y.; Zhao, J.; Ju, H. *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 1858-1863.

[Zhang, 2010]: Zhang, Y.; Yuan, R.; Chai, Y.; Xiang, Y.; Hong, C.; Ran, X. *Biochem. Eng. J.*, 51 (2010) 102-109.

[Zhang, 2013a]: Zhang, H.; Gruner, G.; Zhao, Y. *J. Mater. Chem. B*, 1 (2013) 2542–2567.

[Zhang, 2013b]: Zhang, Y.; Yang, A.; Zhang, X.; Zhao, H.; Li, X.; Yuan, Z. *Colloids and Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.*, 436 (2013) 815–822.

[Zhang, 2014]: Zhang, W.; Zheng, J.; Shi, J.; Lin, Z.; Huang, Q.; Zhang, H.; Wei, C.; Chen, J.; Hu, S.; Hao, A. *Anal. Chim. Acta* (2014).

[Zhao, 2003]: Zhao, H.; Ando, Y.; Liu, Y.; Jinno, M.; Suzuki, T. *Physical Review Letters*, 90 (2003) 187401(4).

[Zhao, 2007]: Zhao, Y. F.; Xiao, M.; Wang, S. J.; Ge, X. C.; Meng, Y. Z. *Compos. Sci. Technol.*, 67 (2007) 2528–2534.

[Zheng, 2012]: Zheng, D.; Vashist, S.K.; Al-Rubeaan, K.; Luong, J.H.T.; Sheu, F.S. *Talanta*, 99 (2012) 22–28.

[Zhong, 2010]: Zhong, Z.; Wu, W.; Wang, D.; Wang, D.; Shan, J.; Qing Y.; Zhang, Z. *Biosens. Bioelectron.*, 25 (2010) 2379–2383.

[Zhou, 2010]: Zhou, D.; Han, B. H. *Adv Funct Mater*, 20 (2010) 2717–2722.

[Zhou, 2011]: Zhou, K.; Zhu, Y.; Yang, X.; Li, C. *Electroanalysis*, 23 (2011) 862–869.

[Zhou, 2013]: Zhou, Q.; Yang, L.; Wangb, G.; Yang, Y. *Biosens. Bioeletron.*, 49 (2013) 25–31.

[Zhou, 2014]: Zhou, Y.; Dong, H.; Liu, L.; Liu, J.; Xu, M. *Biosens. Bioelectron.*, 60 (2014) 231–236.

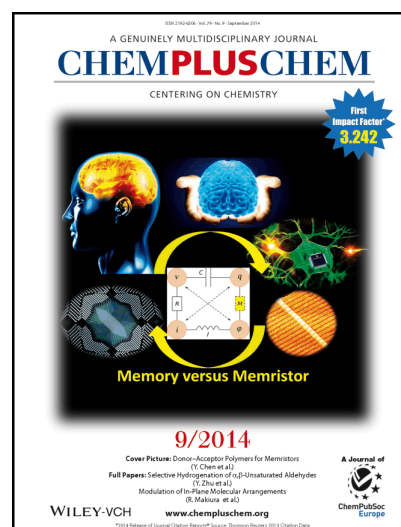
8

PUBLICACIONES

Water-Soluble Reduced Graphene Oxide– Carboxymethylcellulose Hybrid Nanomaterial for Electrochemical Biosensor Design

Elena Araque, Reynaldo Villalonga, María Gamella, Paloma Martínez-Ruiz, Alfredo Sánchez, Valentín García-Baonza, José M. Pingarrón.

ChemPlusChem, 2014, **79**, 1334-1341
DOI: 10.1002/cplu.201402017



DOI: 10.1002/cplu.201402017

Water-Soluble Reduced Graphene Oxide–Carboxymethylcellulose Hybrid Nanomaterial for Electrochemical Biosensor Design

Elena Araque,^[a] Reynaldo Villalonga,^{*,[a, b]} María Gamella,^[a] Paloma Martínez-Ruiz,^[c] Alfredo Sánchez,^[a] Valentín García-Baonza,^[d] and José M. Pingarrón^{*,[a, b]}

A novel hybrid nanomaterial was synthesised by covalent attachment of *O*-carboxymethylcellulose to reduced graphene oxide. Graphene oxide was first anchored with (3-aminopropyl)triethoxysilane moieties to provide reactive primary amino groups at the basal plane. Periodate-oxidised *O*-carboxymethylcellulose was further covalently attached to this aminated nanomaterial through reductive alkylation with NaBH₄. Stable aqueous dispersions were obtained with the resulting hybrid

nanomaterial, which was used to coat glassy carbon electrodes. Furthermore, the enzyme tyrosinase was covalently immobilised and the nanostructured enzyme electrode was successfully employed for the amperometric detection of catechol in the 20 nM–56 μM range. The biosensor showed excellent analytical performance with a high sensitivity of 270 mA M⁻¹ and a low detection limit of 0.2 nM.

Introduction

The advent of nanotechnology has opened new possibilities for the design of a next generation of biomaterials, drug-delivery systems, protective coatings, electronic devices and sensor systems with nanometric dimensions.^[1] Undoubtedly, the key challenge to achieve these goals is the tailor-made preparation of advanced functional nanomaterials with novel and well-defined properties. A rational strategy to synthesise these nanostructures is the functionalisation with other molecular or nanosized materials to yield hybrid derivatives, in which the resulting structure, degree of organisation and therefore the synergistic and novel properties are ruled by the chemical nature and molecular architecture of the individual components.^[2]

In particular, considerable interest is currently devoted to the preparation of conductive hybrid nanomaterials with improved biocompatibility for proteins, nucleic acids, cells and tissues oriented to the fabrication of bioelectronics, biocom-

puting and biosensing systems.^[1a,3] In this context, graphene appears to be the most promising nanomaterial owing to its unique properties such as large surface-to-volume ratio, remarkable electrical, thermal and mechanical properties, and relatively low production cost.^[4] However, the high hydrophobicity and the absence of chemical functionalities in graphene prevent the direct application of this nanomaterial in biologically driven applications. In fact, graphene is not soluble in aqueous media and its carbonaceous sheets tend to be irreversibly clustered into graphitic nano- and microstructures through strong π–π stacking and van der Waals interactions.^[5] This hydrophobic environment is also counterproductive for the active conformation of proteins, the diffusion of substrates from the bulk solution to the graphene–protein interface, and thus, the efficient occurrence of the biorecognition and catalytic events. In addition, the stable and large attachment of biomolecules on graphene nanosheets is not allowed owing to the lack of chemical functional groups in this nanomaterial for covalent immobilisation.^[6]

Graphene nanosheets can be easily provided with reactive and hydrophilic functional groups by either chemical or supramolecular modifications. Oxidative treatment is the approach most commonly employed to generate graphene oxide (GO), which can be then employed as a starting material for further derivatisations.^[7] However, such modifications should be highly controlled to avoid excessive structural and electronic perturbations in the graphene sheets. For this reason, the synthesis of highly soluble and functionalised graphene-based hybrid nanomaterials with low modification of the carbonaceous sheets is highly desired.


This goal can be achieved by grafting water-soluble polymers bearing reactive functional groups to graphene or GO nanosheets.^[8] This approach has been successfully employed

[a] E. Araque, Dr. R. Villalonga, Dr. M. Gamella, Dr. A. Sánchez, Prof. J. M. Pingarrón
Department of Analytical Chemistry
Complutense University of Madrid
28040 Madrid (Spain)
Fax: (+34) 913944329
E-mail: rvillalonga@quim.ucm.es
pingarro@quim.ucm.es

[b] Dr. R. Villalonga, Prof. J. M. Pingarrón
IMDEA Nanoscience
Cantoblanco University City, 28049 Madrid (Spain)

[c] Prof. P. Martínez-Ruiz
Department of Organic Chemistry I
Complutense University of Madrid, 28040 Madrid (Spain)

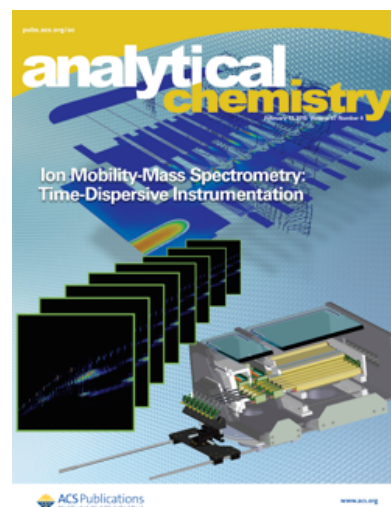
[d] Prof. V. García-Baonza
Department of Physical Chemistry I
Complutense University of Madrid, 28040 Madrid (Spain)

 Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/cplu.201402017>.

Dual Functional Graphene Derivative-Based Electrochemical Platforms for Detection of the TP53 Gene with Single Nucleotide Polymorphism Selectivity in Biological Samples

Berta Esteban-Fernaández de Ávila, Elena Araque, Susana Campuzano, María Pedrero, Berna Dalkiran, Rodrigo Barderas, Reynaldo Villalonga, Esmá Kilic, José M. Pingarrón.

Anal. Chem., 2015, **87**, 2290–2298
DOI: 10.1021/ac504032d



Dual Functional Graphene Derivative-Based Electrochemical Platforms for Detection of the *TP53* Gene with Single Nucleotide Polymorphism Selectivity in Biological Samples

Berta Esteban-Fernández de Ávila,[†] Elena Araque,[†] Susana Campuzano,^{*,†} María Pedrero,[†] Berna Dalkiran,[‡] Rodrigo Barderas,[§] Reynaldo Villalonga,^{†,||} Esmá Kiliç,[‡] and José M. Pingarrón^{*,†,||}

[†]Departamento de Química Analítica, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain

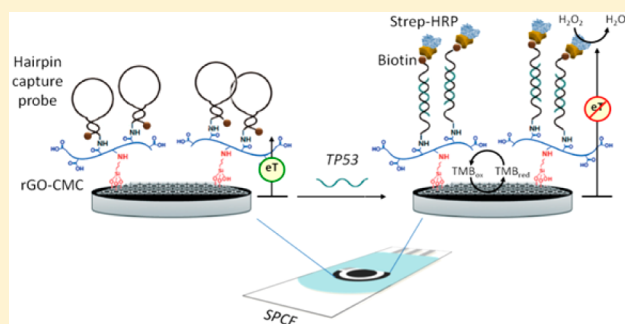
[‡]Faculty of Science, Department of Chemistry, Ankara University, 06100-Tandoğan, Ankara, Turkey

[§]Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain

^{||}IMDEA Nanoscience, City University of Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: Novel disposable electrochemical DNA sensors were prepared for the detection of a target DNA sequence on the p53 tumor suppressor (*TP53*) gene. The electrochemical platform consisted of screen-printed carbon electrodes (SPCEs) functionalized with a water-soluble reduced graphene oxide–carboxymethylcellulose (rGO-CMC) hybrid nanomaterial. Two different configurations involving hairpin specific capture probes of different length covalently immobilized through carbodiimide chemistry on the surface of rGO-CMC-modified SPCEs were implemented and compared. Upon hybridization, a streptavidin–peroxidase (Strep-HRP) conjugate was employed as an electrochemical indicator. Hybridization was monitored by recording the amperometric responses measured at -0.10 V (vs an Ag pseudo-reference electrode) upon the addition of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) as a redox mediator and H_2O_2 as an enzyme substrate. The implemented DNA platforms allow single nucleotide polymorphism (SNP) discrimination in cDNAs from human breast cancer cell lines, which makes such platforms excellent as new diagnosis tools in clinical analysis.



More than 11 million people are diagnosed with cancer every year. It is estimated that there will be 16 million new cases per year by 2020. Cancer is a cluster of diseases involving alterations in the status and expression of multiple genes that confer a survival advantage and undiminished proliferative potential to somatic or germinal cells. Alterations primarily in three main classes of genes (*viz.*, (proto)oncogenes, tumor suppressor genes, and DNA repair genes) collectively contribute to the development of cancer.¹

The p53 gene (*TP53*; 1182 bp) is one of the most important tumor suppressor genes, because of its dysfunction in the majority of human cancers. It normally acts as a mediator of several cellular functions, including growth arrest and apoptosis in response to DNA damage. It stops cell cycle in damaged cells until the alteration is properly repaired; otherwise, it initiates apoptosis cascade in damaged cells. If this guardian of the genome becomes inactivated upon mutation, it cannot execute its duty and more mutations will accumulate in the cell, eventually leading to cancer development. In addition to suppressing cancer development, normal *TP53* gives sensitivity to chemotherapy and radiotherapy in tumor cells.² The human *TP53* gene is composed of 11 exons and codes a protein with 393 amino acids, the p53

protein. Down-regulation of the *TP53* gene, mutations, or altered p53 protein function (suggested by elevated expression) are the most frequently genetic events in human cancer, being present in more than 50% human tumors and cancer cell lines.^{1–4}

Unlike the majority of tumor suppressor genes, which are usually inactivated during cancer progression by deletions or truncating mutations, the *TP53* gene in human tumors is often found to undergo missense mutations, in which a single nucleotide is substituted by another. Approximately 90% of all mutations occur in exons 4–9, which encode the DNA binding domain of the protein and result in dysfunctional types of stable mutant p53 proteins whose accumulation is regarded as a hallmark of cancer cells. Of the mutations in this domain, ~30% fall within six “hotspot” residues (residues R175, G245, R248, R249, R273, and R282) and are frequent in almost all types of cancer. Mutated *TP53* genes typically occur with greater frequency in patients with late-stage cancer and at sites

Received: October 29, 2014

Accepted: January 17, 2015

Published: January 17, 2015

SUPPORTING INFORMATION

Dual functional graphene derivative-based electrochemical platforms for the detection of TP53 gene with single nucleotide polymorphism selectivity in biological samples

Berta Esteban-Fernández de Ávila¹, Elena Araque¹, Susana Campuzano^{1*}, María Pedrero¹,
Berna Dalkiran², Rodrigo Barderas³, Reynaldo Villalonga^{1,4}, Esmá Kiliç² and José M.
Pingarrón^{1,4*}

¹*Departamento de Química Analítica, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain. E-mail: pingarro@quim.ucm.es. Phone number: +34 913944315. Fax number: +34 913944329*

²*Ankara University, Faculty of Science, Department of Chemistry, 06100-Tandoğan, Ankara, Turkey.*

³*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain.*

⁴*IMDEA Nanoscience, Cantoblanco University City, 28049 Madrid (Spain).*

CONTENTS

Table S1	S2
Table S2	S2
Figure S1	S3

Table S1

Oligonucleotides used in this work.

Oligonucleotide	Sequence (5'→3')
Long <i>TP53</i> capture probe (lcpp53)	5'-[Btn]GAG GTC ATG GTG GGG GCA GCG CCT CAC AAC CTC[AmC7]-3'
Short <i>TP53</i> capture probe (scpp53)	5'-[Btn]GT TGT GCA GCG CCT CAC AAC[AmC7]-3'
Target (<i>TP53</i>)	5'-GAG GTT GTG AGG CGC TGC CCC CAC CAT G-3'
1-base mismatched (1-m)	5'-GAG GTT GTG AGG <u>C</u> AC TGC CCC CAC CAT G-3'

Table S2- Current values ratios measured at -0.10 V in the absence (blank, i_0) and in the presence (signal, $i_{0.1}$) of 100 nM synthetic *TP53* target onto different biosensing scaffolds.

	scpp53 ($i_{0.1}/i_0$)	lcpp53 ($i_0/i_{0.1}$)
rGO-CMC-SPCEs + EDC/Sulfo-NHS + cp	3.0	3.2
SPCEs + EDC/Sulfo-NHS + cp (No rGO-CMC)	1.0	1.1
rGO-CMC-SPCEs + cp (No EDC/Sulfo-NHS)	0.9	0.9
rGO-CMC-SPCEs + EDC/Sulfo-NHS (No cp)	1.1	1.0

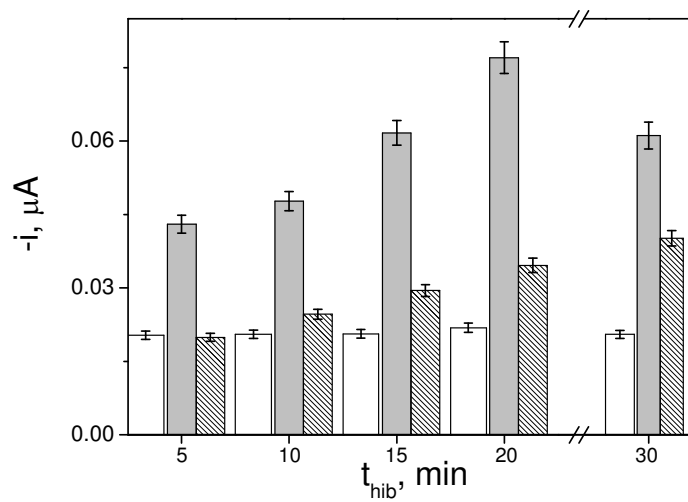
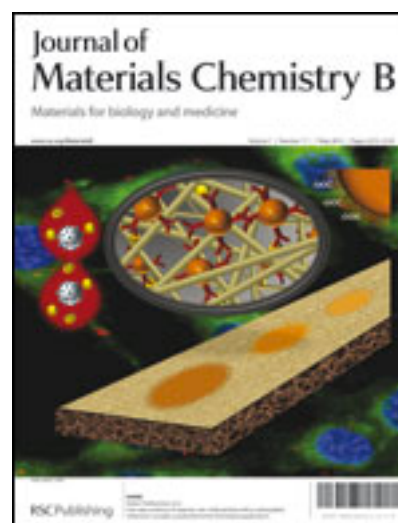


Figure S1.- Effect of the hybridization time on the selectivity for the 1-m sequence using the scpp53-rCO-CMC-SPCEs. Blank signals, white bars; 100 nM synthetic *TP53*, grey bars; 100 nM synthetic 1-m, lined bars. Experimental conditions described in Table 1 (Selected values column). Error bars estimated as triple of the standard deviation (n=3).

Crumpled reduced graphene oxide–polyamidoamine
dendrimer hybridnanoparticles for the preparation of an
electrochemical biosensor

Elena Araque, Reynaldo Villalonga, María Gamella, Paloma
Martínez-Ruiz, Julio Reviejo· José M. Pingarrón

J. Mater. Chem. B, 2013, **1**, 2289-2296
DOI: 10.1039/C3TB20078G



Crumpled reduced graphene oxide–polyamidoamine dendrimer hybrid nanoparticles for the preparation of an electrochemical biosensor†

Cite this: *J. Mater. Chem. B*, 2013, **1**, 2289

Elena Araque,^a Reynaldo Villalonga,^{*a} María Gamella,^a Paloma Martínez-Ruiz,^b Julio Reviejo^a and José M. Pingarrón^{*a}

Reduced graphene nanoparticles were prepared from graphene oxide through a two-step covalent modification approach. Graphene oxide was first enriched with reactive epoxy groups by anchoring (3-glycidyloxypropyl)trimethoxysilane at the hydroxyl groups located on the nanocarbon basal plane. Modified graphene oxide was further cross-linked and partially reduced by treatment with the fourth-generation ethylenediamine core polyamidoamine G-4 dendrimer producing graphene nanoparticles with crumpled paper-like morphology. This graphene derivative was employed as a coating material for glassy carbon electrodes and the nanostructured electrode was tested for the preparation of electrochemical biosensors by immobilizing the enzyme tyrosinase through cross-linking with glutaraldehyde. This bioelectrode showed excellent electroanalytical behavior for catechol with a fast response in about 6 s, linear range of 10 nM to 22 μ M, sensitivity of 424 mA M⁻¹, and low detection limit of 6 nM. The enzyme biosensor also showed high stability when stored at 4 °C under dry and wet conditions.

Received 20th January 2013

Accepted 1st March 2013

DOI: 10.1039/c3tb20078g

www.rsc.org/MaterialsB

Introduction

Engineering nanomaterials with well-defined three-dimensional morphology has attracted considerable interest in the last few years due to their envisioned applications in the design of novel electronic devices, drug carrier systems and optical and electrochemical sensors. These 3D-shaped nanomaterials can also be employed as building blocks for the construction of original architectures at the nanoscale.¹ In this context, the synthesis of novel hybrid nanomaterials with improved electroconductive properties and capacity to recognize/immobilize analytical biomolecules is a challenge for biosensor technology.² In particular, carbon-based nanomaterials have demonstrated their usefulness in designing hybrid nanostructures for successful application in the preparation of biosensors,³ with recent efforts focused on the use of graphene hybrid derivatives for the construction of electrochemical biosensors⁴ due to the relatively low cost, large surface-to-volume ratio and remarkable electrical, mechanical and thermal properties and biocompatibility of this nanomaterial.⁵

However, there are some major obstacles for the application of graphene in the preparation of electrochemical biosensors. Graphene nanosheets are highly hydrophobic, showing very low solubility in water and many organic solvents, and tending to form irreversible agglomerates through strong π - π stacking and van der Waals interactions.⁶ Moreover, the absence of chemical functional groups in graphene limits the stable and large immobilization of biomolecules through covalent linkages.^{2a} Chemical derivatization of graphene seems to be a rational approach to overcome these disadvantages.⁷ However, the possibility of generically tailoring the chemical properties of graphene is limited by its delicate structure, often yielding nanomaterials with poor electroconductive characteristics. For this reason, the development of synthetic strategies for preparing soluble and highly functionalized graphene derivatives with low modification of its basal structure receives considerable attention.

Many synthetic approaches commonly use graphene oxide (GO), a water soluble derivative that can be easily prepared by oxidative treatment of graphite, as the starting material.⁸ GO mainly consists of graphene-like sheets,⁹ with hydroxyl and epoxide groups on the basal planes and carbonyl and carboxyl groups at the sheet edges.⁵ These oxygen functionalities can be selectively used as anchoring points for chemical modification.⁸ GO and its derivatives can be easily reduced by chemical, thermal, photothermal, and electrochemical methods, restoring in high yield the structural and electrical conductivity properties of graphene.^{2a,8}

^aDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040-Madrid, Spain. E-mail: pingarro@quim.ucm.es; rvillalonga@quim.ucm.es; Fax: +34 913944329; Tel: +34 913944315

^bDepartment of Organic Chemistry I, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040-Madrid, Spain

† Electronic supplementary information (ESI) available: Characterization of the hybrid nanomaterial, optimization of biosensor construction. See DOI: 10.1039/c3tb20078g

Cite this: DOI: 10.1039/c0xx00000x

www.rsc.org/xxxxxx

ARTICLE TYPE

Supplementary Information: Crumpled reduced graphene oxide-polyamidoamine dendrimer hybrid nanoparticles for the preparation of electrochemical biosensor

Elena Araque,^a Reynaldo Villalonga,^{*a} María Gamella,^a Paloma Martínez-Ruiz,^b Julio Reviejo,^a José M. Pingarrón^{*a}

Received (in XXX, XXX) Xth XXXXXXXXXX 20XX, Accepted Xth XXXXXXXXXX 20XX

DOI: 10.1039/b000000x

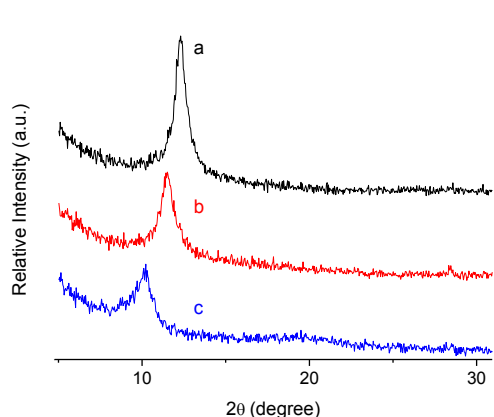


Fig. 1S. X-Ray diffraction of GO (a), Sil-GO (b) and PAMAM-Sil-rGO (c).

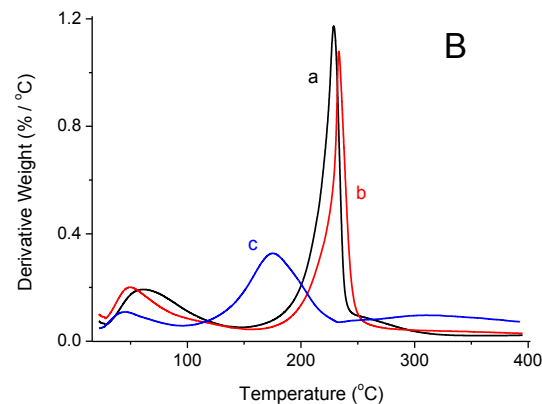
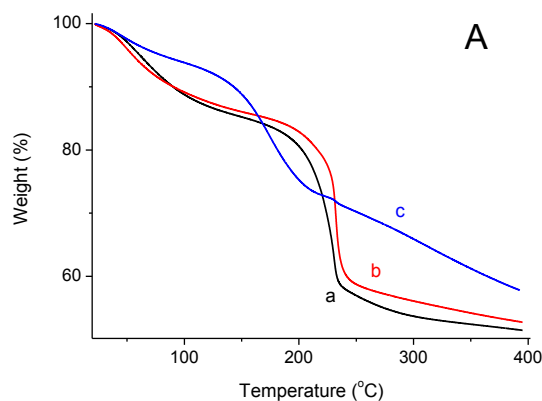


Fig. 3S. TG (A) and DTG (B) analysis for GO (a), Sil-GO (b) and PAMAM-Sil-rGO (c).

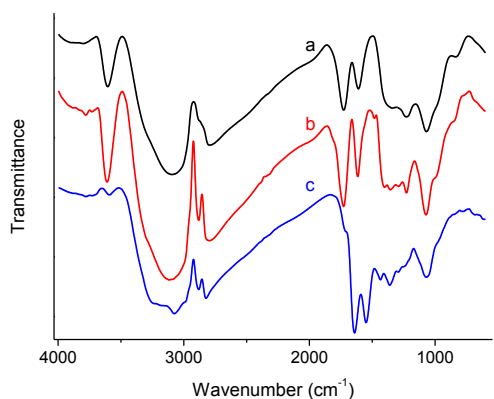


Fig. 2S. FT-IR analysis for GO (a), Sil-GO (b) and PAMAM-Sil-rGO (c).

15

20

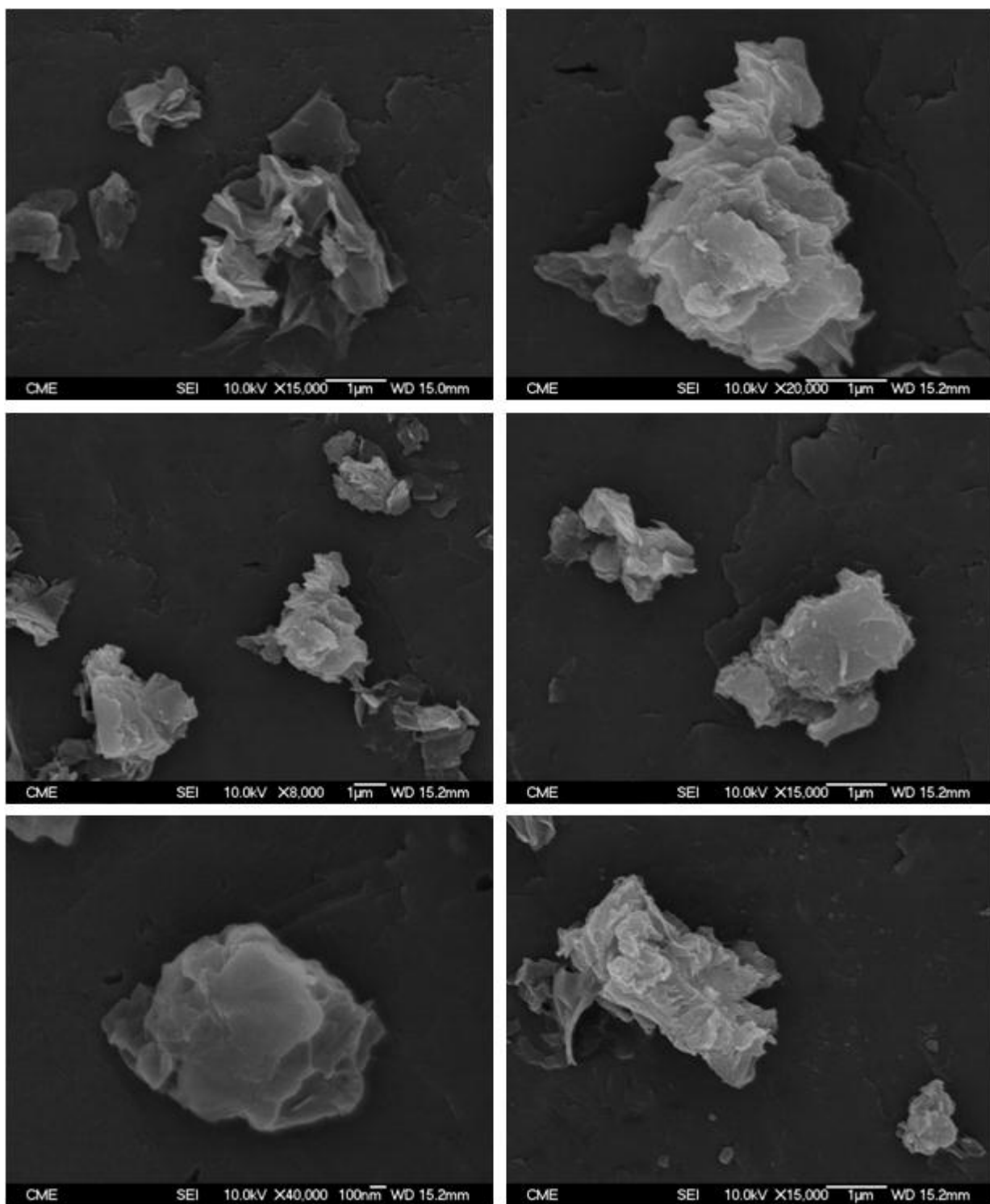


Fig. 4S. FE-SEM images of PAMAM-Sil-rGO crumpled nanostructures.

Cite this: DOI: 10.1039/c0xx00000x

www.rsc.org/xxxxxx

ARTICLE TYPE

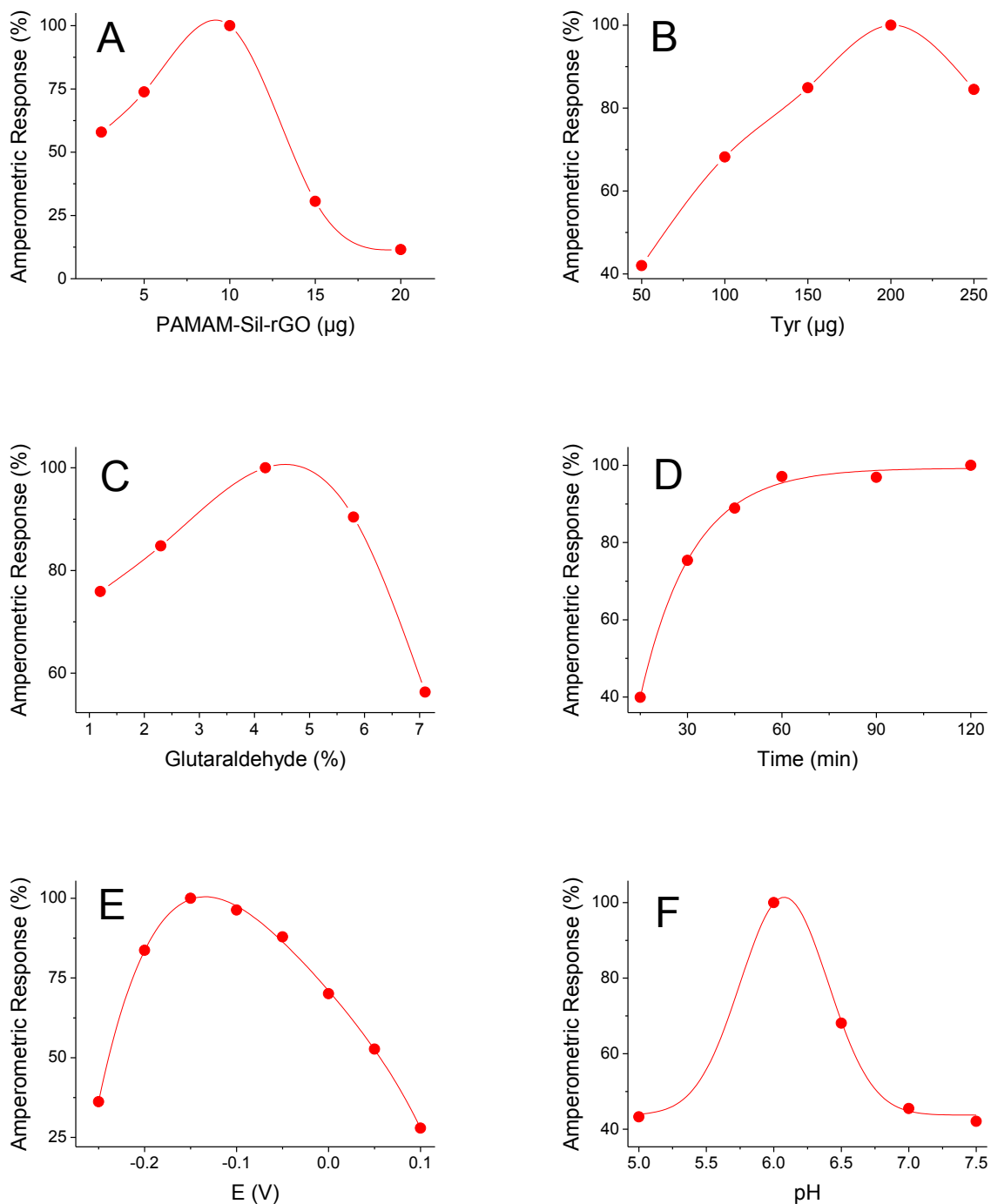
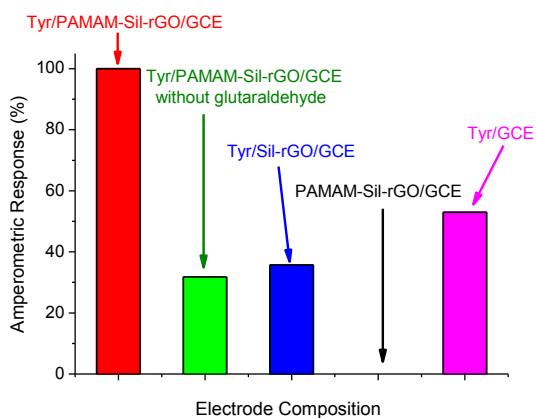
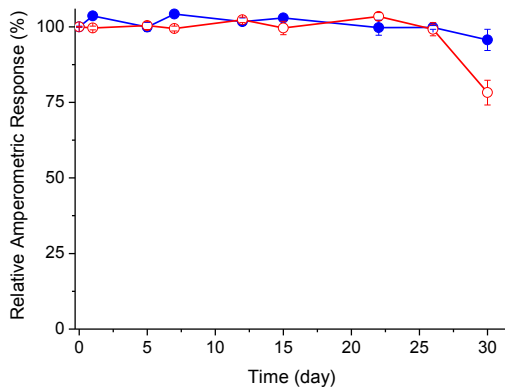


Fig. 5S. Influence of the amount of PAMAM-Sil-rGO (A), enzyme (B), glutaraldehyde (C), time of incubation (D), applied potential (E) and pH (F) on the amperometric response of the electrode toward catechol (100-500 nM).



5 **Fig. 6S.** Influence of the electrode composition on the amperometric response toward catechol (100-500 nM).



10 **Fig. 7S.** Amperometric responses measured with a single Tyr/PAMAM-Sil-rGO/GCE biosensor for 2.0 μ M catechol as a function of the storage time at 4°C under dry (●) and wet, 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, (○) conditions.

15 ^aDepartment of Analytical Chemistry & ^bDepartment of Organic Chemistry I, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040-Madrid Spain. Fax: +34 913944329; Tel: +34 913944315; E-mail: pingarro@quim.ucm.es, rvillalonga@quim.ucm.es

Graphene–polyamidoamine dendrimer–Pt nanoparticles
hybrid nanomaterial for the preparation of mediatorless
enzyme biosensor

Elena Araque, Christian B. Arenas, María Gamella, Julio Reviejo,
Reynaldo Villalonga, José M. Pingarrón

J. Electroanal. Chem., 2014,**717-718**, 96-102
DOI: 10.1016/j.jelechem.2014.01.016





Graphene–polyamidoamine dendrimer–Pt nanoparticles hybrid nanomaterial for the preparation of mediatorless enzyme biosensor



Elena Araque, Christian B. Arenas, María Gamella, Julio Reviejo, Reynaldo Villalonga*, José M. Pingarrón*

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 October 2013

Received in revised form 27 November 2013

Accepted 10 January 2014

Available online 21 January 2014

Keywords:

Dendrimer

Enzyme biosensor

Glucose oxidase

Graphene

Platinum nanoparticles

ABSTRACT

A novel inorganic–organic hybrid nanomaterial was prepared by anchoring (3-glycidyloxypropyl)tri-methoxysilane at the surface of graphene oxide, further cross-linking with polyamidoamine G-4 dendrimer, and final decoration with platinum nanoparticles. A glassy carbon electrode was coated with this hybrid nanomaterial and then used as support for the covalent immobilization of glucose oxidase. This enzyme electrode was employed to construct a mediatorless glucose amperometric biosensor. The resulting biosensor exhibited good electrocatalytic activity for the oxidation of the H_2O_2 produced by the enzyme catalyzed reaction, being able to detect glucose when poised at +400 mV. The biosensor showed a wide linear response to glucose ranging from 10 μM to 8.1 mM, high sensitivity of 24.6 mA/M cm^2 and low detection limit of 0.8 μM . The biosensor was successfully tested for the quantification of glucose in samples of commercial soft drinks.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

During the last years, the use of functional nanomaterials to design electrochemical biosensors with improved stability and analytical performance has been largely explored [1–3]. Nanosized materials have been employed to tailor the chemical and physical properties of electrode surfaces allowing an efficient immobilization of biologically active biomolecules and occurrence of the electrochemical processes involved in the electroanalytical application. In addition, nanomaterials have proven to be useful tools for achieving amplification and providing biorecognition-signaling elements to prepare novel generation electrochemical biosensors [4,5].

In this context, special interest has attracted the design of novel hybrid nanomaterials for electroanalytical applications [6,7]. This unique type of nanomaterials not only offers the advantages associated to combine components of different nature (i.e. organic and inorganic adducts) into the same material, but also provides the possibility to tailor-made the physical and chemical properties of the resulting hybrid through the rational combination of selected functional components [8].

Graphene constitute an excellent candidate for the preparation of nanosized hybrid materials for biosensing due to its unique properties such as large surface-to-volume ratio, easy and cost-effective

synthesis and exceptional high electrical conductivity, mechanical strength and thermal stability [9,10]. In addition, new or improved characteristics such as solubility, chemical functionality, wettability and catalytic capacity can be conferred to graphene by appropriate chemical or physical hybridization with other materials.

A variety of electrochemical biosensors has been constructed by using organic–organic and organic–inorganic hybrid nanomaterials involving the combination of graphene with metal nanoparticles, natural and synthetic polymers and metal/non-metal oxide nanostructures. Gold nanoparticles adsorbed on polyvinylpyrrolidone-protected graphene were included into a chitosan film and this hybrid nanomaterial was used as support for the immobilization of glucose oxidase (GOx) and the amperometric detection of glucose [11]. Similarly, Wu et al. reported the electrodeposition of Pt nanoparticles on glassy carbon electrodes coated with graphene/chitosan, and the further immobilization of GOx for glucose biosensing [12].

Luo et al. recently described the non-covalent coating of graphene oxide with carboxyl-terminated PAMAM dendrimer, generation 3.5, and its further decoration with silver nanoparticles [13]. This hybrid nanomaterial was employed to construct an enzyme biosensor for glucose. Moreover, acetylcholinesterase was immobilized on glassy carbon electrodes coated with 3-carboxyphenylboronic/reduced graphene oxide/chitosan/gold nanoparticles hybrid nanocomposite, and used to detect organophosphorus and carbamate pesticides [14]. Guo et al. reported the construction of an electrochemical label-free integrated aptasensor using silver microspheres as a separation element and graphene-mesoporous silica-gold nanoparticle hybrids as an enhanced element of the sensing

* Corresponding authors. Tel.: +34 91 3944315; fax: +34 91 3944329 (J.M. Pingarrón).

E-mail addresses: rvillalonga@quim.ucm.es (R. Villalonga), pingarro@quim.ucm.es (J.M. Pingarrón).