

RESUMEN TESIS DOCTORAL

**Título: Biosensores de grafeno modificado útiles en técnicas de impedancia.
Aplicaciones en detecciones químicas y bioquímicas**

Yara Aceta

Este proyecto de Tesis está incluido en el proyecto de investigación *“Electronic Tongue Fingerprinting: Applications in the Food & Security field”* (Proyecto MINECO CTQ2013-41577-P) que se desarrolla en el Grupo de Sensores y Biosensores (GSB), Departamento de Química de la UAB.

La investigación que constituye el *“core”* de la Tesis Doctoral, tiene dos objetivos, en primer lugar el desarrollo (construcción y ensayo) de biosensores electroquímicos de DNA (genosensores y aptasensores), empleando una plataforma de grafeno y utilizando para el paso de transducción una técnica electroquímica altamente sensible, la Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS), capaz de detectar cambios en la superficie del electrodo durante el proceso de bioreconocimiento del sistema sin necesidad de marcadores (*“label-free assays”*); en segundo lugar, utilizar estos biosensores en la determinación de microorganismos, virus, explosivos y opiáceos.

Paso a continuación a detallar el estado del arte y el plan de trabajo de estos puntos:

Desarrollo de biosensores electroquímicos de DNA

Un genosensor es un biosensor en el que el elemento de reconocimiento son hebras de DNA y, la hibridación con las hebras complementarias de DNA a través de la renaturalización de la doble hélice es el fundamento de su funcionamiento; los aptasensores son biosensores que utilizan como elemento de bioreconocimiento aptámeros. Éstos son cadenas sintéticas de oligonucleótidos de DNA o RNA seleccionados *in vitro*, los cuales tienen una gran habilidad por unirse a proteínas, moléculas pequeñas o incluso células, reconociendo a sus moléculas diana con alta afinidad y especificidad, incluso mayor que las que presentan los anticuerpos con sus respectivos antígenos. Debido a sus propiedades, en los últimos años se han desarrollado diferentes tipos de aptasensores altamente sensibles, llegando incluso a niveles de detección picomolar y femtomolar. Estos dispositivos (genosensores y aptasensores) permiten llevar a cabo medidas sin marcación (*“label-free”*), por lo que se simplifican los ensayos, y son muy atractivos por su elevada especificidad y sensibilidad, corto tiempo de análisis, capacidad de inclusión en sistemas integrados y trabajar en tiempo real, así como por su versatilidad y bajo coste.

Esta Tesis es continuación de las líneas de investigación existentes en los laboratorios del GSB, donde ya se dispone de genosensores y aptasensores operativos [1]. Y, la contribución de este trabajo de Tesis al proyecto global en el que se enmarca

es la de evaluar y contrastar el uso del grafeno, como nuevo material proveniente de la nanotecnología, [2] para la mejora de las prestaciones de los sensores de impedancia.

En comparación con otros materiales utilizados como electrodo, el grafeno presenta algunas propiedades mejoradas que lo convierten en un material idóneo para el desarrollo de biosensores de impedancia (alta conductividad eléctrica en 2D; velocidades de reacción de transferencia de carga elevadas; y una gran superficie electródica) como pone de manifiesto Bonanni *et al.* [3]. Además, el grafeno y sus derivados (por ejemplo, el óxido de grafeno (GO)) pueden ser funcionalizados fácilmente mediante métodos químicos o electroquímicos y fácilmente obtenidos a bajo coste a partir de grafito (bien por exfoliación directa del grafito utilizando disolventes; por crecimiento de grafeno sobre superficies metálicas empleando el “*vapor deposition method*”; o por el método de *Hummers*). [4]

Así, el primer paso para comenzar será la síntesis de grafeno mediante el método *Hummers*, [4] que consiste en la reducción química o electroquímica del óxido de grafeno (GO) producido por exfoliación de los productos de oxidación química del grafito. Este método nos permitirá obtener distintos tipos de grafeno químicamente modificados (CMGs por sus siglas en inglés); estudiaremos la compatibilidad del grafeno con los electrodos de composite epoxy-grafito habituales en los laboratorios del GSB y la posibilidad de integrar el grafeno en el composite o, como recubrimiento superficial del área activa del electrodo; también se estudiará la forma óptima de grafeno para ser integrada en el sensor respecto a la señal de impedancia, diferenciando entre grafeno oxidado y reducido por varias vías (química y electroquímica). Y dependiendo de la forma de grafeno utilizada, compararemos los diferentes métodos de inmovilización del oligómero de DNA, bien por adsorción o por enlace covalente vía reacción de la carbodiimida; compararemos protocolos de medida directa y tipo “*sandwich*” respecto de propiedades como la sensibilidad y la selectividad; verificaremos la posibilidad de utilizar estrategias de amplificación de señal, tales como el uso de nanobiocomponentes (nanopartículas metálicas, uso de enzimas, uso de productos insolubles, etc.); y, por último, compararemos los dispositivos desarrollados en la tesis con sistemas comerciales como electrodos serigrafiados de grafeno.

Aplicaciones de los biosensores electroquímicos de DNA

El GSB, respecto a los genosensores, viene trabajando el campo vitivinícola, concretamente en la detección de la levadura *Brettanomyces* (conocida como *Brett*), que ocasiona elevadas pérdidas a los productores y requiere de sistemas portátiles a pie de proceso, de elevada sensibilidad y selectividad para su detección. [5]

También con genosensores, es posible la identificación de secuencias específicas de DNA de microorganismos o virus que actúan como vectores en el desarrollo de enfermedades, como ejemplo en éste área está el trabajo de Del Valle *et al.* [6] en el cual se determinó el virus Influenza A subtipo H1N1, más conocido como gripe A.

Los genosensores se postulan como método alternativo una vez se dispone de los genes indicadores (conocido el genoma del microorganismo) que utilizar como superficie de reconocimiento. El gen se inmovilizará mediante funcionalización carboxílica de la superficie de un electrodo de carbono (por oxidación electroquímica o por injerto electroquímico con sales de diazonio), y enlace amida catalizado por carbodiimida. Se ensayarán diferentes estrategias de amplificación de señal para alcanzar el límite de detección requerido.

Además y como continuación de desarrollos en curso, se ensayan sistemas basados en biosensores de impedancias de aptámeros para la detección de explosivos y opiáceos, ya descritos en la literatura. Dado que está descrito el aptámero para TNT [7], se pretende obtener el aptasensor de impedancia para su detección a muy bajo límite de concentración.

- [1] Ocaña, C.; Arcay, E.; del Valle, M. *Sensors and Actuators, B: Chemical*. **2014**, 191, 860.
- [2] Del Valle, M.; Bonanni, A. *Anal. Chim. Acta*. **2010**, 678, 7.
- [3] Bonanni, A.; Loo, A.; Pumera, M. *Trends in Analytical Chemistry*. **2012**, 37, 12.
- [4] Hummers, W. S.; Offeman, R. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 133.
- [5] Phister T.G., Mills D.A. *Applied and Environmental Microbiology*. **2003**, 69, 7430.
- [6] Del Valle, M.; Bonanni, A.; Pividori, M.I. *Analyst*. **2010**, 135, 1765
- [7] Ehrentreich-Förster, E.; Orgel, D.; Krause-Griep, A.; *et al.* *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 391, 1793.