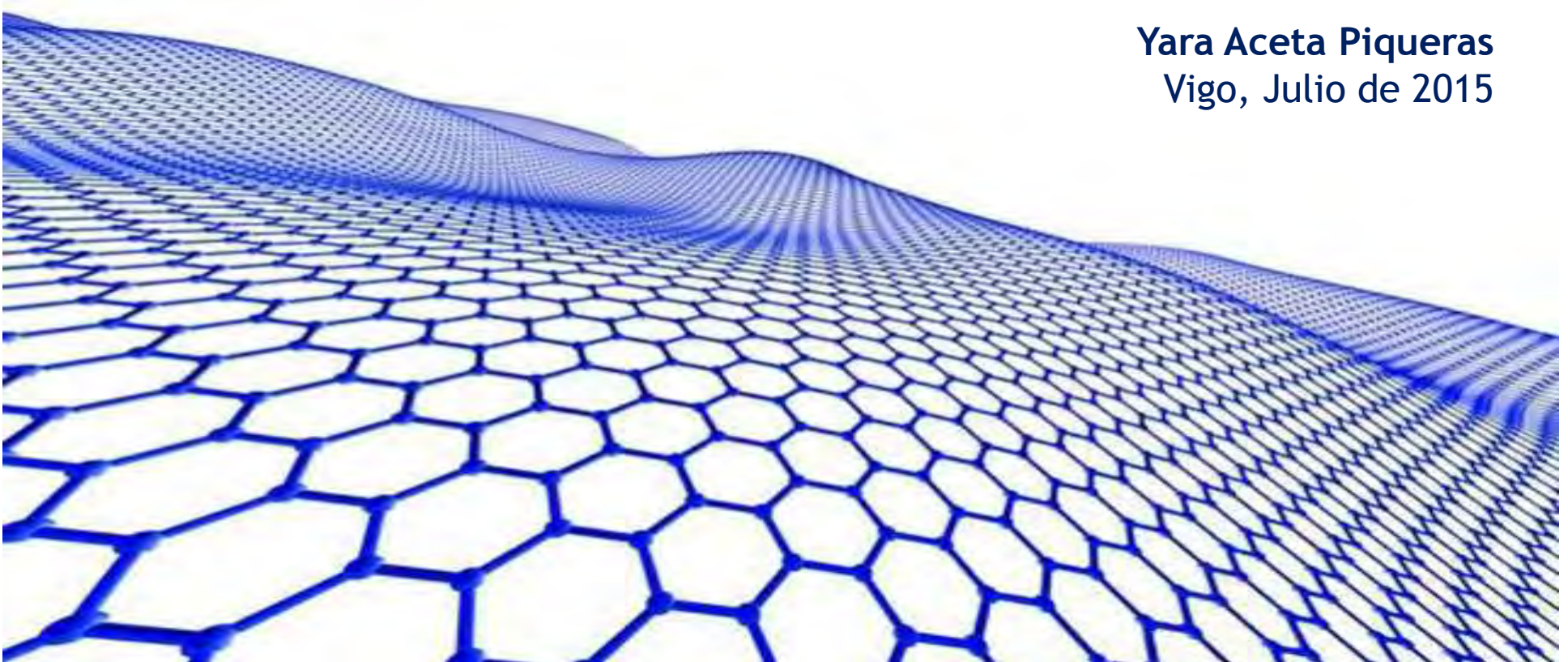
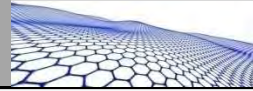


Biosensores de grafeno modificado útiles en técnicas de impedancia. Aplicaciones en detecciones químicas y bioquímicas

Defensa del Plan de Investigación

Yara Aceta Piqueras
Vigo, Julio de 2015



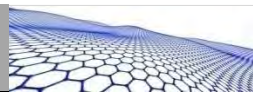


INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

METODOLOGIA Y PLAN DE TRABAJO

RESULTADOS INICIALES



INTRODUCCIÓN

Biosensores electroquímicos

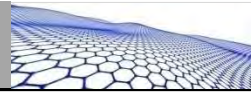
Aptasensores y genosensores

Biosensores y grafeno

OBJETIVOS

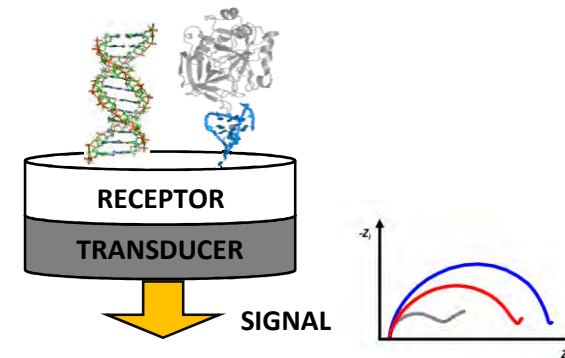
METODOLOGIA Y PLAN DE TRABAJO

RESULTADOS INICIALES



CHEMICAL SENSOR – IUPAC DEFINITION (2001)

A **chemical sensor** is a device that transforms chemical information, ranging from the concentration of a specific sample component to total composition analysis, into an analytically useful signal. Chemical sensors contain usually **two basic components** connected in series: a chemical (molecular) **recognition system (receptor)** and a **physico-chemical transducer**. **Biosensors** are chemical sensors in which the recognition system **utilises a biochemical mechanism** Cammann, 1977; Turner et al., 1987.



EN FUNCIÓN DE LA SEÑAL MEDIDA LOS SENSORES SE CLASIFICAN EN:

- ópticos
- piezoeléctricos
- térmicos
- **ELECTROQUÍMICOS**
 - potenciométricos
 - amperométricos
 - **IMPEDIMÉTRICOS**

VENTAJAS DETECCIÓN IMPEDIMÉTRICA

Ensayos sin marcador o "*label-free*"

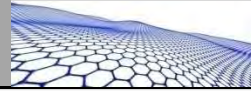
Alta sensibilidad (hasta fM)

Miniaturización

Técnica no destructiva

Thévenot, D.R. *et al.* Technical report. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors & Bioelectronics*. **2001**, 16, 121

Bonanni, A; Pumera, M; Miyahara, Y. Rapid, Sensitive, and Label-Free Impedimetric Detection of a Single-Nucleotide Polymorphism Correlated to Kidney Disease. *Anal. Chem.* **2010**, 82, 3772



ELEMENTOS DE BIORECONOCIMIENTO

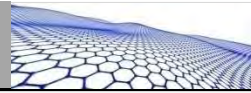
- **Ácidos nucleicos**
- Anticuerpos o antígenos
- Proteínas
- Células (bacterias) u orgánulos
- Tejidos (plantas o animales)

APTÁMEROS → **APTASENSORES**

- Alta afinidad y especificidad
- Estables en condiciones extremas de temperatura
- Formación reversible del complejo aptámero - diana
- Síntesis química no requiere material biológico

DNA → **GENOSENSORES**





GRAFENO COMO MATERIAL ELECTRÓDICO

Desde el punto de vista electroquímico nos interesa...

Gran superficie

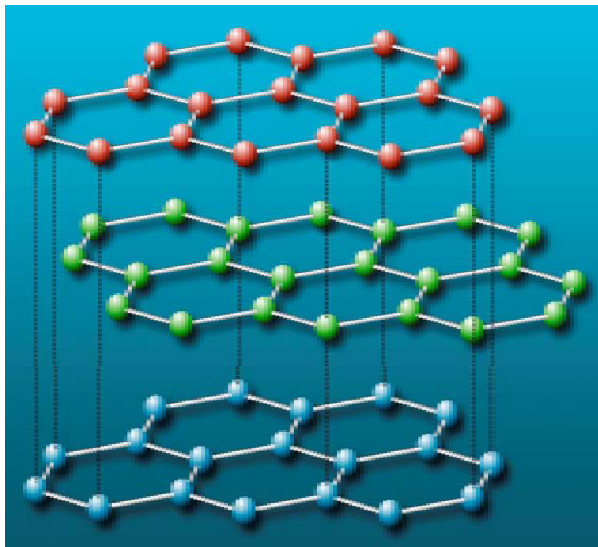
Alta velocidad de transferencia electrónica

Material biocompatible

Funcionalizable

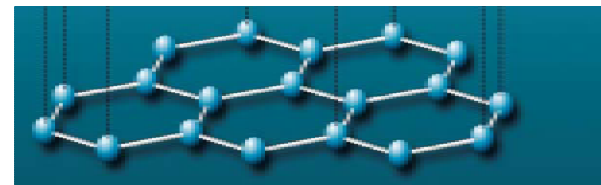
Barato

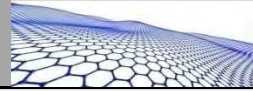
Graphite



0.3 nm

Graphene





Nuestros objetivos son...

1

Desarrollo (construcción y ensayo) de biosensores electroquímicos de DNA (genosensores y aptasensores), empleando una plataforma de grafeno y utilizando para la detección la EIS.

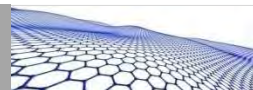
2

Aplicar estos biosensores en la detección de:

- Compuestos nitro-derivados → seguridad y medio ambiente
- Microorganismos (*Brettanomyces*) → alimentación y bebidas
- Enfermedades genéticas → biomedicina

3

Evaluar y contrastar el uso del grafeno, como nuevo material proveniente de la nanotecnología, para la mejora de las prestaciones de los sensores electroquímicos.



INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO

Técnicas químicas y electroquímicas

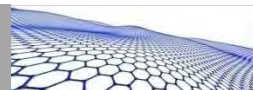
Protocolo de medida en EIS

Síntesis de grafeno

Construcción del electrodo de trabajo

Métodos de inmovilización de aptámeros y DNA

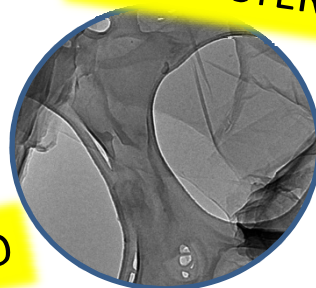
RESULTADOS INICIALES



TÉCNICAS QUÍMICAS

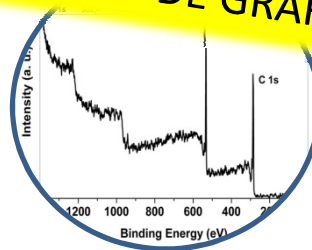
OXIDACIÓN
QUÍMICA DE
GRAFITO

SÍNTESIS GRAFENO

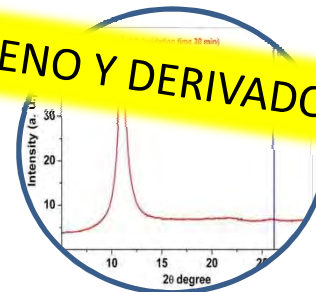


Microscopía
Electrónica de
Transmisión
(TEM)

CARACTERIZACIÓN DE GRAFENO Y DERIVADOS

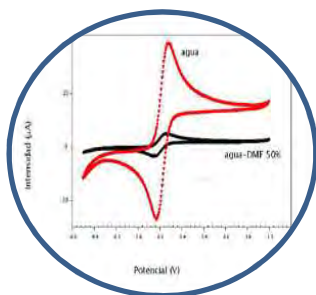


Espectroscopia
fotoelectrónica de
Rayos X
(XPS)



Difracción de
rayos X
(XRD)

TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS



Técnica rápida
CV

Reducción GO

Electrografting

Caracterización
materiales

Naturaleza electrodo

Condiciones electroquímicas habituales

MEDIO ACUOSO
TAMPONADO + ELECTROLITO INERTE

Parámetros característicos de las SEA

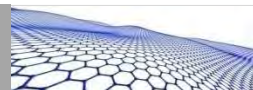
E_{pc} , I_{pc} , E_{pa} , I_{pa} , ΔE_p

Esquema experimental a tres electrodos

WE: GC o GEC

RE: Ag / AgCl / Cl⁻

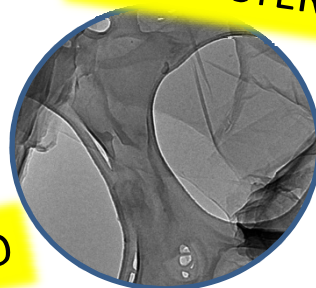
CE: Pt



TÉCNICAS QUÍMICAS

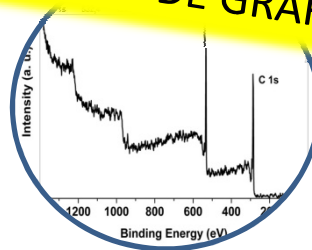
OXIDACIÓN
QUÍMICA DE
GRAFITO

SÍNTESIS GRAFENO

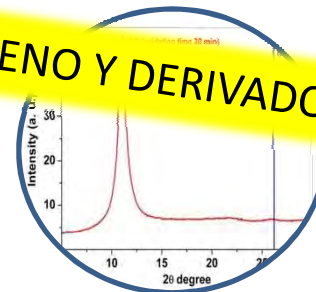


Microscopía
Electrónica de
Transmisión
(TEM)

CARACTERIZACIÓN DE GRAFENO Y DERIVADOS

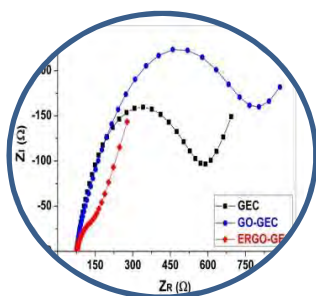


Espectroscopia
fotoelectrónica de
Rayos X
(XPS)



Difracción de
rayos X
(XRD)

TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS



EIS

Fines analíticos

Caracterización
materiales

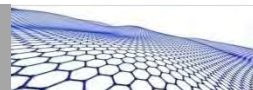
Caracterización electrodo

Condiciones electroquímicas habituales

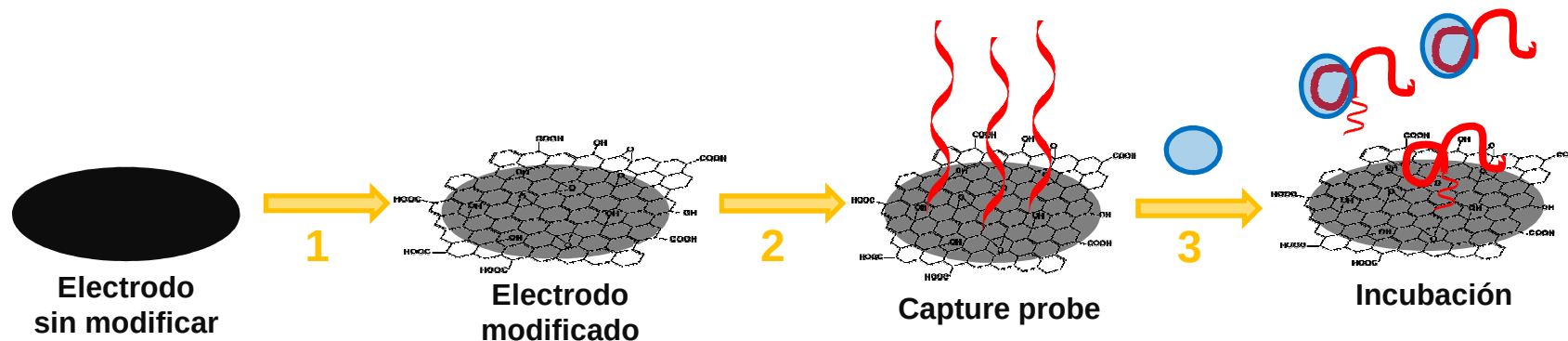
MEDIO ACUOSO
TAMPONADO + ELECTROLITO INERTE +
MARCADOR REDOX
 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$; $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$

Parámetros característicos
 R_{CT} , R_{SOL} , CPE_{DL}

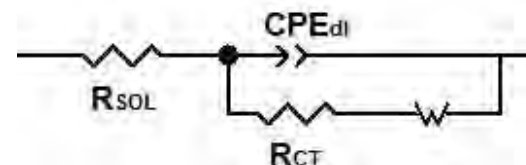
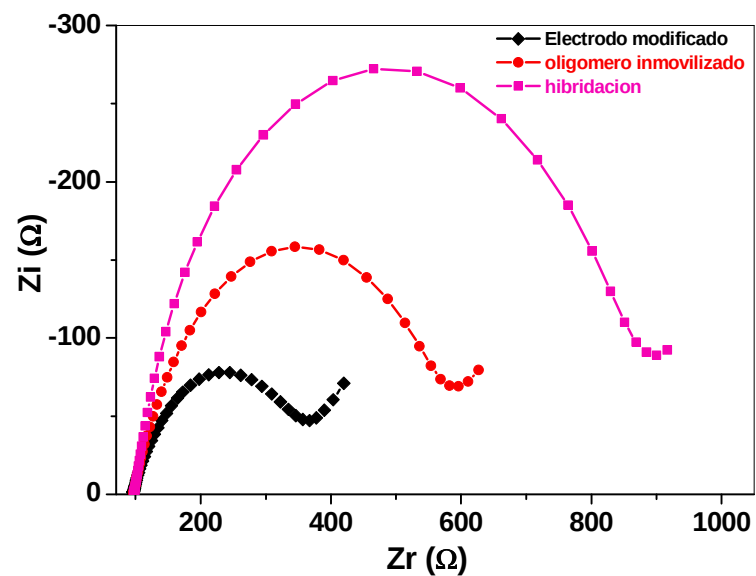
WE: GEC MODIFICADO
RE: pseudo Ag / AgCl / Cl⁻
CE: Pt



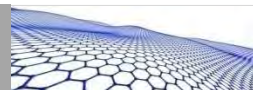
METODOLOGIA GENERAL DETERMINACIÓN ANALITICA CON EIS



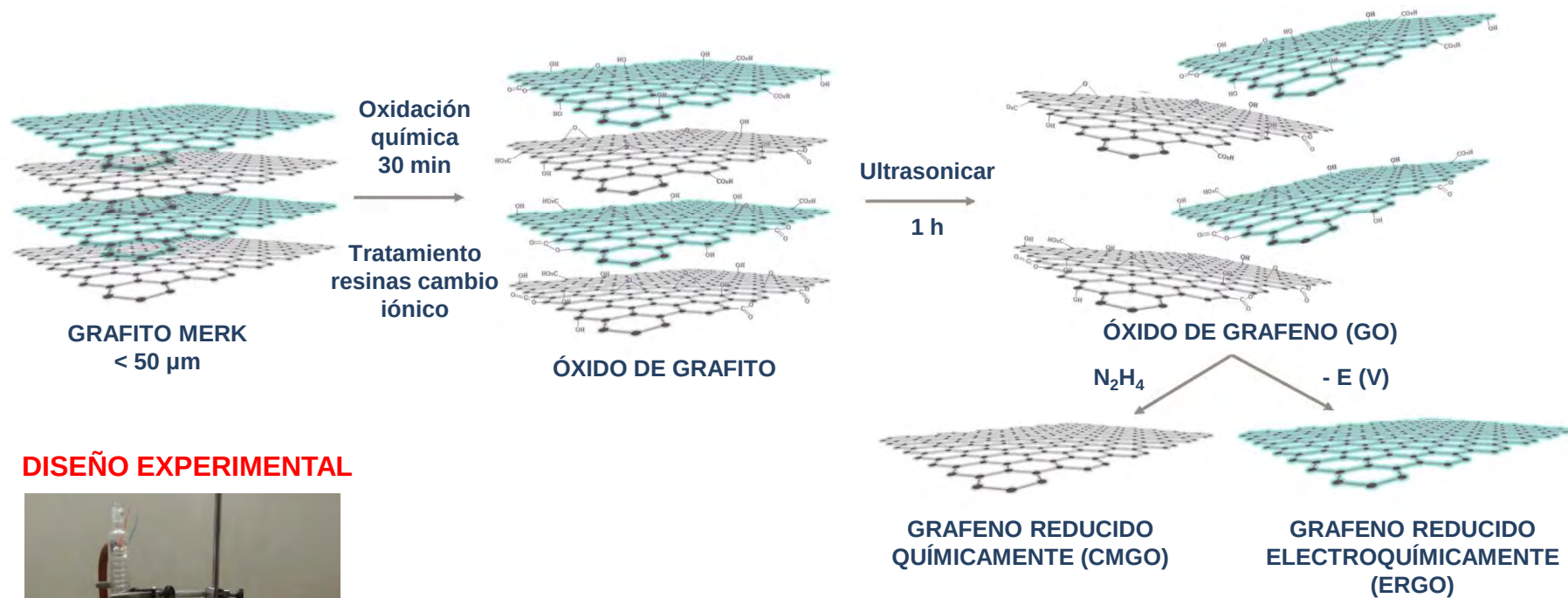
● = 5'- ttggggttggtgtggtgg-3'



$$R_{ct} \text{ ratio} = \frac{R_{ct} (\text{target}) - R_{ct} (\text{blanco})}{R_{ct} (\text{probe}) - R_{ct} (\text{blanco})}$$



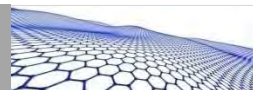
MÉTODO DE HUMMERS MODIFICADO



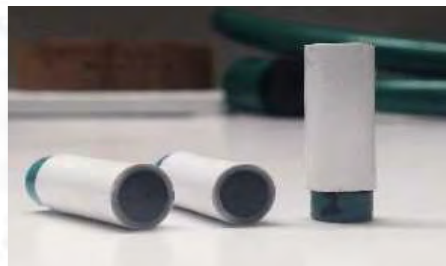
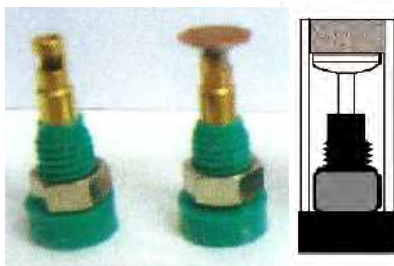
DISEÑO EXPERIMENTAL



Hummers, W. S.; Offeman, R. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 133



ELECTRODO DE TRABAJO DE COMPOSITE EPOXY-GRAFITO (GEC)

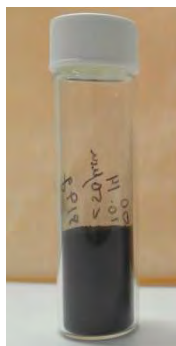


1. Limpieza del cobre
2. Soldar la pieza de Cu al conector de Au
3. Ajustar la pieza soldada al cuerpo del electrodo (PVC)
4. Hacer el composite y empastar
5. Curar durante 3 días a 80°C
6. Pulir

CÓMO INCORPORAR EL GRAFENO

1. En superficie
2. En el composite en distintas proporciones

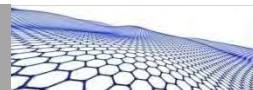
GRAFENO

DISOLUCIÓN DE GRAFENO
(ORGÁNICA o ACUOSA)

GEC



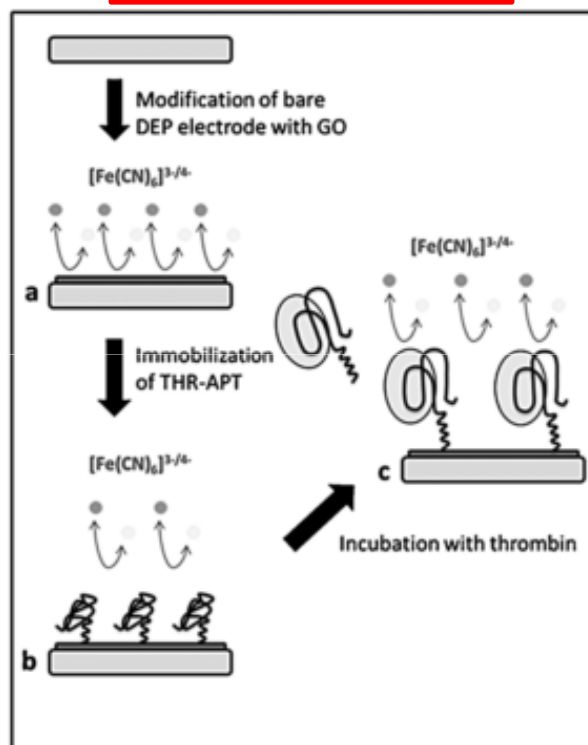
40 μL
1 mg mL⁻¹



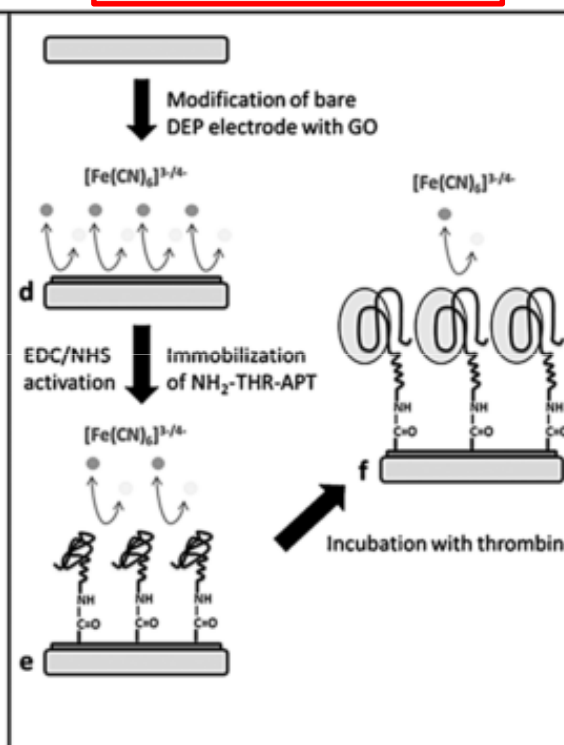
PRINCIPALES MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN DE DNA

Avidina - Biotina $K_D \approx 10^{-15}$ M

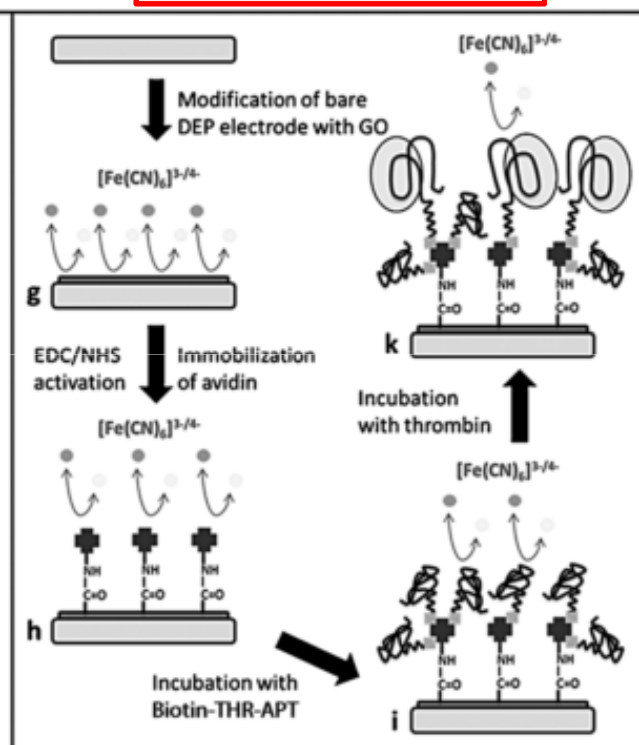
A. Physical immobilization



B. Covalent immobilization



C. Affinity immobilization



Legend:

Bare DEP electrode

GO

 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$

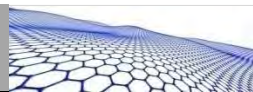
Thrombin

Avidin

THR-APT

 NH_2 -THR-APT

Biotin-THR-APT



INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

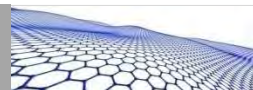
METODOLOGÍA

PLAN DE TRABAJO

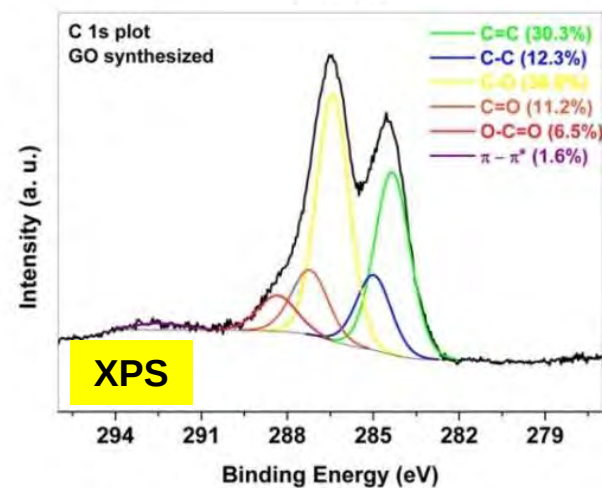
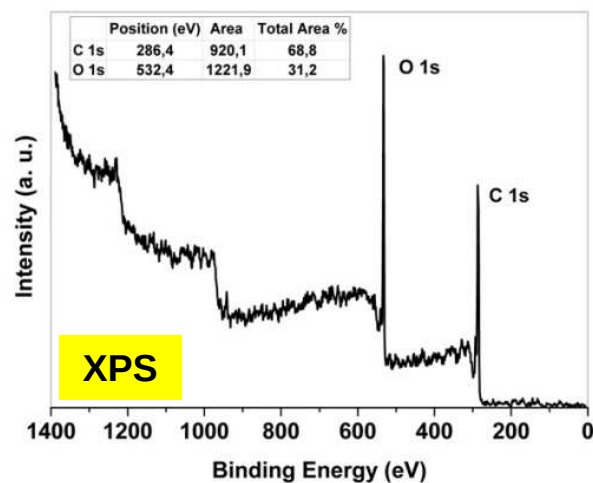
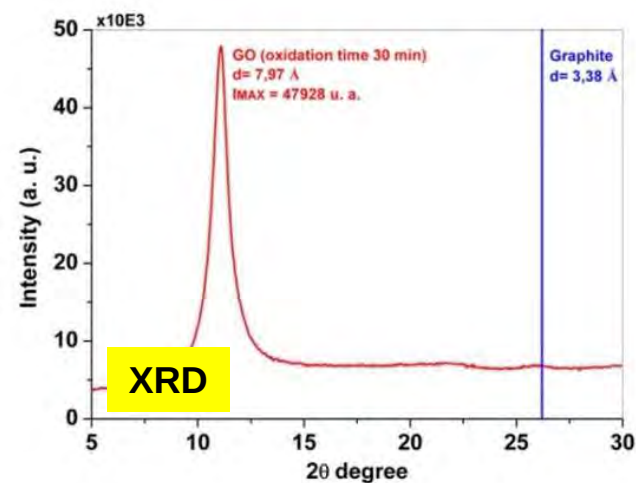
RESULTADOS INICIALES

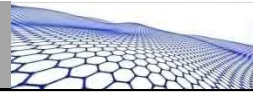
Caracterización del GO y ERGO

Aptasensor para detección TNT



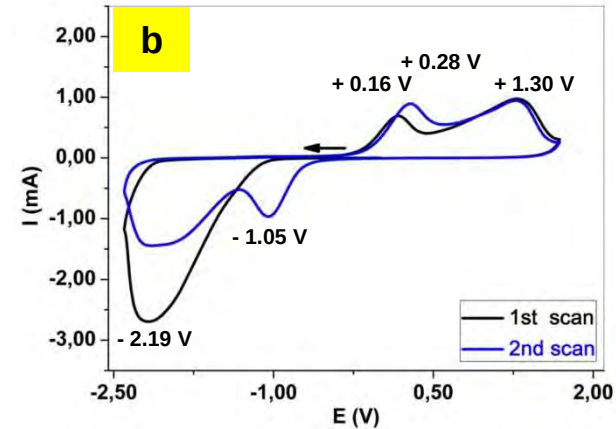
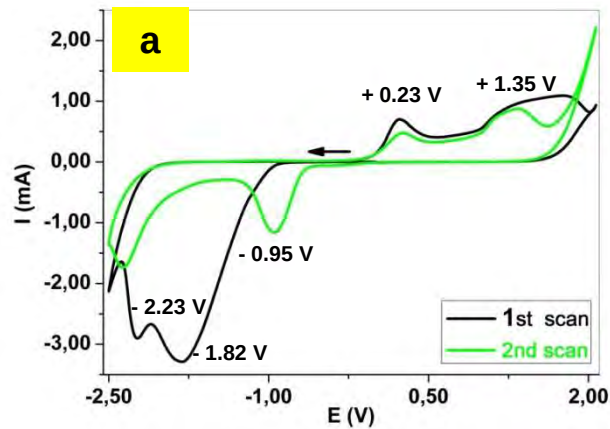
CARACTERIZACIÓN QUÍMICO - FÍSICA DEL GO SINTETIZADO



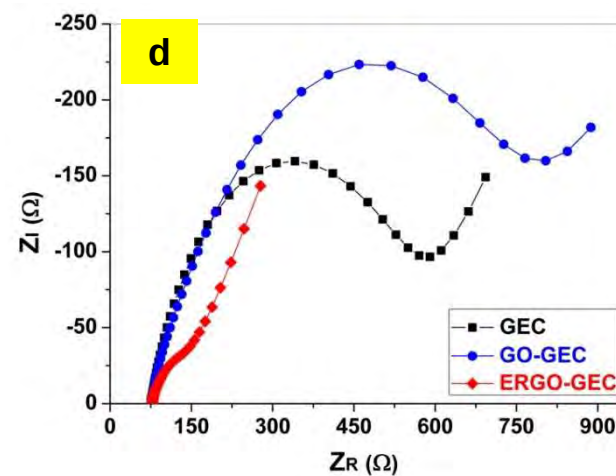
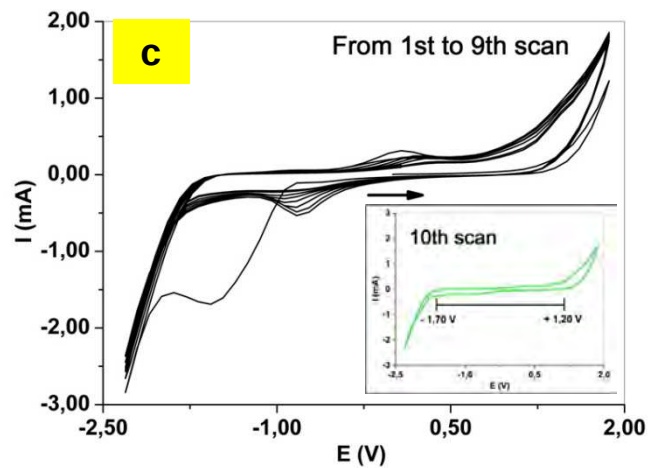


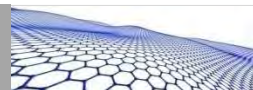
CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DEL GO Y DEL ERGO SINTETIZADOS

Gráficos I - E para la reducción de GO sintetizado (a) y para una muestra comercial de GO (b) sobre un electrodo GC ($\varnothing = 3$ mm)



(c) Gráfico I - E para la oxidación de GO sintetizado sobre un electrodo GEC ($\varnothing = 6$ mm); (d) diagramas de Nyquist obtenidos para el electrodo GEC (■) GO/GEC (●) and ERGO/GEC (♦).



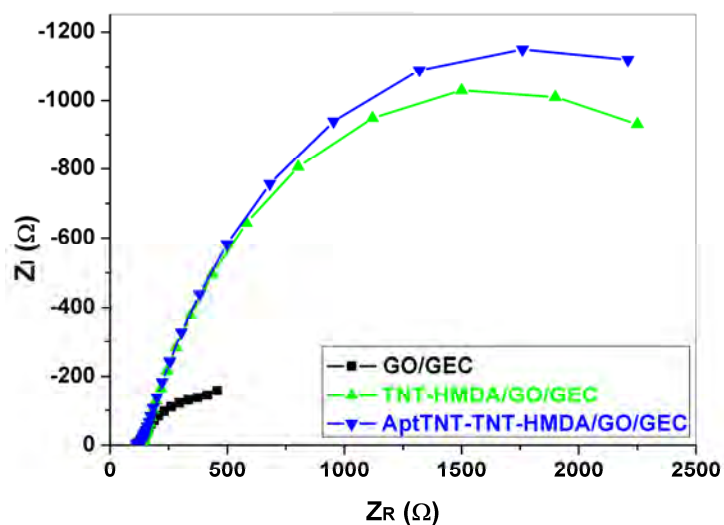


RESULTADOS PRELIMINARES EN EL DESARROLLO DEL APTASENSOR DE TNT

Secuencia del aptámero de TNT (100 bp):

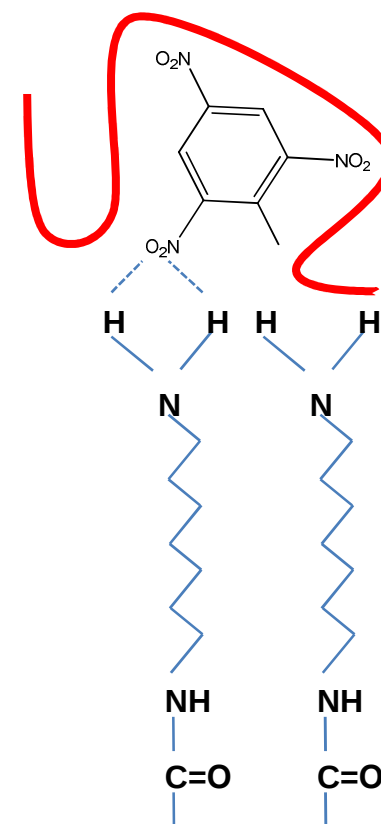
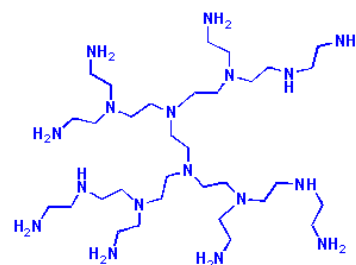
5' – g gat ccg ttg ata taa aat tcc aca tat cac ata ccg agc gcg cga cgt cgt ctc act gtc ctg ctg cct ccg cgt cat ggt tga ttg tgg tgt tgg ctc – 3'

Resultados preliminares



C_{TNT} = 10 Mm

R_{ct} ratio = 1.1



PASOS A SEGUIR

1. ESTUDIO DE LA RESUPUESTA A LA CONCENTRACIÓN
2. NUEVAS ESTRATEGIAS PARA AUMENTAR LA SENSIBILIDAD

Agradecimientos

Laboratorio de Electroquímica Molecular (UAB)

Ministerio de Economía y Competitividad (CTQ2013-41577-P)

Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats

