



UNIVERSIDADE DA CORUÑA  
Facultade de Ciencias

## Grao en Química

### Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Detección fluorescente de oligonucleótidos mediante sistemas basados en materiais bidimensionais**

Detección fluorescente de oligonucleótidos mediante sistemas basados en materiais bidimensionais

Fluorescent detection of oligonucleotides using systems based on two-dimensional materials

**Anahir Franco Gacio**

**Curso: 2021 - 2022. Convocatoria: Xullo**

*Director 1: Alejandro Criado Fernández*

*Director 2: Elena Pazos Chantrero*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi director, el Dr. Alejandro Criado, agradecerle su apoyo e implicación durante todos estos meses, así como la confianza depositada en mí. Gracias por tu cercanía y por haberme hecho sentir parte del grupo desde el primer momento. Pero sobre todo por tu optimismo, aunque algo no saliese como esperábamos. Gracias también a mi codirectora, la Dra. Elena Pazos, por habernos ofrecido su ayuda y su punto de vista sobre la parte biológica del Trabajo.

Gracias a todos los miembros y compañeros del grupo. A Jesús, por prestarnos siempre su ayuda sin dudar. Y a los doctorandos Sandra, María y Adrián, por haberme acogido y ayudado siempre que lo necesité, y por hacer más amenas las jornadas en el laboratorio.

Gracias a Paula, por estar siempre dispuesta a echarme una mano, y por sus consejos.

Al grupo *Carbon bionanotechnology* del CICbiomaGUNE, en concreto a Mariano y Cecilia. Sin su colaboración habría sido más difícil sacar adelante este Trabajo.

A mi familia y amigos. A mis padres, gracias por haberme apoyado en todas mis decisiones y no haberme dejado tirar la toalla nunca. A mis abuelos, por haberse sentido siempre orgullosos de su nieta. A Jacobo, por acompañarme durante este camino, en los buenos y en los malos momentos. A Esther, Carlota y Lucía, por haberme regalado tantos buenos momentos durante estos seis años. Y en especial a Esther, gracias por el vínculo que hemos construido y ser como una hermana.

## ABREVIATURAS

<b>2D/3D</b>	Dos/tres dimensiones
<b><math>\mu\text{S}</math></b>	Microsiemens
<b><math>\varepsilon</math></b>	Coefficiente de extinción
<b><math>\Omega</math></b>	Ohmio
<b><math>\sigma</math></b>	Desviación estándar
<b><math>\lambda_{\text{exc}}</math></b>	Longitud de onda de excitación
<b>A</b>	Absorbancia
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADN<sub>mc</sub>/ADN<sub>bc</sub></b>	ADN monohebra / ADN bihebra
<b>AEDT</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>AFM</b>	<i>Atomic Force Microscopy</i> – Microscopía de fuerza atómica
<b>APS</b>	<i>Ammonium persulfate</i> – Persulfato de amonio
<b>ATR</b>	<i>Attenuated total reflectance</i> – Reflectancia total atenuada
<b>C</b>	Concentración
<b>CNMs</b>	<i>Carbon Nanomaterials</i> – Nanomateriales basados en carbono
<b>Cy3</b>	<i>Cyanine3</i> – Cianina3
<b>EMSA</b>	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i> – Ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética
<b>EQ</b>	Eficiencia de extinción
<b>Exf</b>	Exfoliado
<b>FAM</b>	<i>Fluorescein</i> - Fluoresceína
<b>FRET</b>	<i>Förster resonance energy transfer</i> – Transferencia de energía por resonancia de Förster
<b>FT-IR</b>	<i>Fourier-Transform Infrared Spectroscopy</i> – Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
<b>GBMs</b>	<i>Graphene-based materials</i> – Materiales basados en grafeno
<b>GO</b>	<i>Graphene oxide</i> – Óxido de grafeno
<b>IGAs</b>	<i>Inorganic graphene analogues</i> – Análogos inorgánicos del grafeno
<b>l</b>	Longitud de paso óptico
<b>l-GO</b>	<i>Large-Graphene Oxide</i> – Óxido de grafeno largo
<b>LOD /LOQ</b>	Límite de detección / Límite de cuantificación
<b>LPE</b>	<i>Liquid-phase exfoliation</i> – Exfoliación en fase líquida

<b>PB</b>	<i>Phosphate buffer</i> – Tampón fosfato salino
<b>PTFE</b>	Politetrafluoroetileno
<b>r.p.m.</b>	<i>Revolutions per minute</i> – Revoluciones por minuto
<b>TBE</b>	<i>Tris-borate-EDTA</i> – Tris-borato-AEDT
<b>TEM</b>	<i>Transmission Electron Microscopy</i> - Microscopía electrónica de transmisión
<b>TEMED</b>	Tetrametiletilendiamina
<b>TGA</b>	<i>Thermogravimetric Analysis</i> – Análisis termogravimétrico
<b>TMDs</b>	<i>Transition-Metal Dichalcogenides</i> - Dicalcogenuros de metales de transición
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>u.a.</b>	Unidades arbitrarias
<b>us-GO</b>	<i>Ultra small-Graphene Oxide</i> – Óxido de grafeno ultra pequeño
<b>UV/Vis</b>	Ultravioleta/Visible
<b>v/v</b>	Concentración Volumen/Volumen
<b>XPS</b>	<i>X-ray Photoelectron-Spectroscopy</i> - Espectroscopía fotoelectrónica de rayos



## **RESUMEN**

En muchas enfermedades, como las neurodegenerativas y distintos tipos de cánceres, su diagnóstico temprano y seguimiento desempeñan un papel clave en el aumento de la tasa de supervivencia de los pacientes. Por este motivo, interesa detectar la presencia de biomarcadores ligados al desarrollo de la enfermedad. Para conseguirlo se necesitan métodos analíticos sensibles, selectivos y rápidos. Los biosensores ópticos y, en concreto, los biosensores fluorescentes basados en FRET, se han convertido en una de las opciones más atractivas. Gracias a las excelentes propiedades ópticas, electrónicas y mecánicas que poseen, en los últimos años los materiales 2D se han establecido como nanoplataformas indispensables para la detección óptica de biomoléculas diana. Motivado por su repercusión en investigación biomédica, en este proyecto se exploró la aplicación de derivados del GO y de MoS<sub>2</sub> para la detección fluorescente de ADN objetivo. Asimismo, se prepararon y/o caracterizaron los distintos materiales 2D empleados. Para ello, se siguió una estrategia sintética descendente en fase líquida y se recurrió a diversas técnicas de caracterización físico-química.

**Palabras clave:** biosensores; biomarcadores; detección precoz; óxido de grafeno; MoS<sub>2</sub>; exfoliación en fase líquida.

## **RESUMO**

En moitas enfermidades, como as neurodexenerativas e distintos tipos de cancros, o diagnóstico temperán e o seu seguimento desempeñan un papel chave no aumento da taxa de supervivencia dos pacientes. Por este motivo, interesa detectar a presenza de biomarcadores ligados ao desenvolvemento da enfermidade. Para conseguilo requírense métodos analíticos sensibles, selectivos e rápidos. Os biosensores ópticos e, en concreto, os biosensores fluorescentes baseados en FRET, convertéronse nunha das opcións máis atractivas. Grazas ás excelentes propiedades ópticas, electrónicas e mecánicas que posúen, nos últimos anos os materiais 2D establecéronse como nanoplataformas indispensables para a detección óptica de biomoléculas diana. Motivado pola súa repercusión en investigación biomédica, neste proxecto explorouse a aplicación de derivados do GO e de MoS<sub>2</sub> para a detección fluorescente de ADN obxectivo. Así mesmo, preparáronse e/ou caracterizáronse os distintos materiais 2D empregados. Para iso, seguiuuse unha estratexia sintética descendente en fase líquida e fíxose uso de diversas técnicas de caracterización físico-química.

**Palabras chave:** biosensores; biomarcadores; detección temperá; óxido de grafeno; MoS<sub>2</sub>; exfoliación en fase líquida.

## **ABSTRACT**

In many diseases, such as neurodegenerative diseases and different types of cancers, early diagnosis and follow-up play a key role in increasing the survival rate of patients. For this reason, it is of interest to detect the presence of biomarkers linked to the development of the disease. To achieve this, sensitive, selective and rapid analytical methods are needed. Optical biosensors, and in particular FRET-based fluorescent biosensors, have become one of the most attractive options. Thanks to their excellent optical, electronic and mechanical properties, in recent years 2D materials have established themselves as indispensable nanoplatforms for the optical detection of target biomolecules. Motivated by their impact on biomedical research, the application of GO and MoS<sub>2</sub> derivatives for the fluorescent detection of target DNA was explored in this project. Furthermore, the different 2D materials used were prepared and/or characterized. For this purpose, a liquid-phase top-down synthetic strategy was followed and various physicochemical characterization techniques were used.

**Keywords:** biosensors; biomarkers; early detection; graphene oxide; MoS<sub>2</sub>; liquid phase exfoliation.



## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES EXISTENTES.....	1
1.1 Materiales 2D.....	1
1.1.1 Materiales 2D derivados del grafeno: óxido de grafeno.....	2
1.1.2 Materiales 2D post-grafeno: dicalcogenuros de metales de transición .....	4
1.2 Métodos de obtención de los materiales 2D .....	5
1.3 Biosensores ópticos basados en materiales 2D.....	6
2. OBJETIVOS.....	9
3. SECCIÓN EXPERIMENTAL .....	10
3.1. Reactivos, disolventes y otros materiales .....	10
3.2. Instrumentación .....	11
3.3. Exfoliación en fase líquida asistida por ultrasonidos.....	12
3.3.1. Síntesis de us-GO .....	13
3.3.2. Preparación de Exf-MoS <sub>2</sub> .....	13
3.4. Procedimiento general para el estudio de la capacidad de extinción de fluorescencia de fluoróforos de los materiales 2D.....	15
3.5. Procedimiento para la detección óptica de ADN por fluorescencia .....	15
3.5.1. Ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética.....	16
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
4.1. Preparación y caracterización de materiales 2D .....	17
4.1.1. Preparación y caracterización del us-GO .....	17
4.1.2. Preparación y caracterización del Exf-MoS <sub>2</sub> .....	23
4.2. Detección de ADN mediante fluorescencia.....	25
4.2.1. Estudio de la capacidad de extinción de fluorescencia de los materiales 2D .....	26
4.2.2. Detección óptica de ADN por fluorescencia.....	31
CONCLUSIONES.....	39
CONCLUSIÓN S .....	40
CONCLUSIONS .....	41
BIBLIOGRAFÍA .....	42
ANEXOS .....	48

## **1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES EXISTENTES**

---

Como resultado de sus extraordinarias propiedades, en los últimos años los materiales bidimensionales (2D) han suscitado gran interés entre la comunidad científica para su aplicación en investigación biomédica. Diferentes estudios indican su utilidad como herramientas avanzadas para la administración de fármacos, la terapia, la obtención de imágenes y la biodetección. De este modo, a través de ellos la nanomedicina está proporcionando nuevas y prometedoras alternativas en el diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades.<sup>1,2</sup>

En muchas enfermedades, por ejemplo, las neurodegenerativas y diversos tipos de cánceres, el diagnóstico temprano y preciso de la enfermedad presenta un papel clave en el éxito de los tratamientos aplicados y en el consecuente incremento de la tasa de supervivencia de los pacientes. El desarrollo de la enfermedad suele ir acompañado de la aparición y/o fluctuación de los niveles de determinadas biomoléculas en el cuerpo humano, lo que se conoce como biomarcadores. Por tanto, poder determinar su presencia, resultaría útil no solo para la detección precoz de la enfermedad, sino también para su seguimiento. No obstante, como normalmente estos biomarcadores se encuentran en baja concentración y en muestras biológicas complejas (fluidos corporales), para conseguirlo es necesario disponer de métodos analíticos sensibles, selectivos y rápidos. Los biosensores con capacidad de detección de moléculas biológicamente activas constituyen una de las opciones más interesantes.<sup>3,4</sup>

Gracias a las excelentes propiedades ópticas, electrónicas y mecánicas que poseen, los materiales 2D se han erigido como nanoplataformas versátiles para el diseño de biosensores de alta sensibilidad que permitan la detección de biomarcadores de distinta naturaleza (proteínas, ácidos nucleicos y moléculas discretas).<sup>5,6</sup>

### **1.1 MATERIALES 2D**

Durante décadas se consideró al grafeno como un material exclusivamente teórico, termodinámicamente inestable e imposible de aislar.<sup>7</sup> Sin embargo, desde su aislamiento y caracterización por primera vez en 2004, el grafeno ha generado un gran interés debido a sus fascinantes propiedades físicoquímicas y estructurales; asimismo, ha supuesto una verdadera revolución en el campo de los materiales 2D y, en consecuencia, en el de los nanomateriales basados en carbono (*Carbon Nanomaterials*, CNMs).<sup>1,7,8</sup>

Poco tiempo después de darse a conocer el grafeno, se vio que la dimensionalidad de las estructuras constituye uno de los parámetros con más influencia e importancia a la hora de determinar las propiedades y funcionalidades de los materiales 2D.<sup>1</sup>

Tras descubrir las propiedades sin precedentes del grafeno, otros materiales estratificados han atraído la atención en los últimos años. Se trata de sus análogos inorgánicos (*Inorganic graphene analogues*, IGAs). Entre ellos, uno de los grupos que más interés ha despertado ha sido el de los dicalcogenuros de metales de transición (*Transition-metal dichalcogenides*, TMDs), por ejemplo, MoS<sub>2</sub> y WS<sub>2</sub>.<sup>2,9</sup>

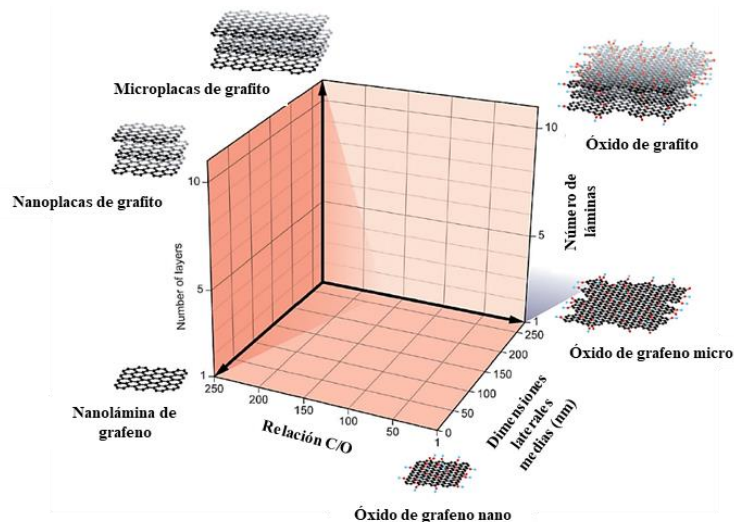
A pesar de que los materiales 2D presentan una gran diversidad en cuanto a propiedades mecánicas, químicas y ópticas, comparten ciertas características comunes debido a la baja dimensionalidad de sus estructuras. Por ejemplo, al ser los materiales de menor grosor conocidos, son también los de mayor relación superficie/volumen, pudiendo establecer numerosas interacciones superficiales. Además, poseen propiedades físicas y químicas anisotrópicas en comparación con los materiales tridimensionales (3D).<sup>1</sup>

En el presente trabajo, se prestará atención a las interacciones entre los oligonucleótidos y los materiales 2D derivados del óxido de grafeno (*Graphene oxide*, GO) y el MoS<sub>2</sub>.

### **1.1.1 Materiales 2D derivados del grafeno: óxido de grafeno**

Aunque el término “grafeno” hace referencia a una monocapa de átomos de carbono sp<sup>2</sup> dispuestos en una red hexagonal 2D, en la última década se ha empleado de manera imprecisa para describir numerosos materiales diferentes basados en grafeno (*Graphene-based materials*, GBMs).<sup>8,10</sup>

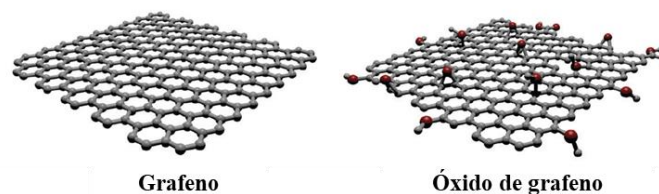
Los GBM abarcan, entre otros, el GO, el óxido de grafeno reducido y los puntos cuánticos de grafeno. Por este motivo, en 2014 se desarrolló un modelo de nomenclatura para clasificar los distintos derivados del grafeno atendiendo a tres parámetros morfológicos: dimensiones laterales, relación carbono/oxígeno y número de capas (*Fig. 1*).<sup>11</sup>



**Figura 1.** Clasificación de los distintos derivados del grafeno en función de sus propiedades principales. Adaptado de Wick *et al.* 2014.<sup>11</sup>

La importancia biológica del grafeno está correlacionada con su hidrofobicidad/hidrofilia superficial. Las láminas de grafeno exfoliadas son hidrofóbicas, con tendencia a agregarse y baja capacidad de dispersión en agua y en la mayoría de los disolventes orgánicos.<sup>12</sup>

Sin embargo, cuando este material se oxida forma su “derivado hidrofílico”, el GO. Estructuralmente, se basa en el mismo patrón hexagonal de átomos de carbono que el grafeno, pero mostrando una mayor cantidad de átomos de oxígeno en detrimento del número de átomos de carbono  $sp^2$  intactos (reducción hasta un 40-60%). Así, presenta frecuentes carbonos  $sp^3$  enlazados a grupos funcionales oxigenados (*Fig. 2*), por ejemplo, hidroxilos y carboxilos, aunque su naturaleza depende en gran medida de las condiciones de reacción y procedimiento de elaboración. Dichas funcionalidades de oxígeno se sitúan en ciertos lugares, extendiéndose tanto fuera del plano basal como en los bordes de la lámina, derivando en una estructura menos plana. Aunque se han propuesto varios modelos estructurales, el GO es un material polidisperso y resulta complicado definir su estructura exacta de forma precisa.<sup>1,12-15</sup>



**Figura 2.** Estructuras moleculares del grafeno y del GO. Adaptado de Reina *et. al* 2017.<sup>12</sup>

Estas funcionalidades oxigenadas pueden entenderse como defectos introducidos en el plano del grafeno, que lo transforman en un material aislante.<sup>14</sup> Además, dotan al GO de

una química superficial más rica, proporcionándole propiedades únicas ausentes en el grafeno de partida, como la hidrofilia. Es soluble en agua, y la ionización de los grupos funcionales le proporciona una mayor estabilidad coloidal en medio fisiológico y ciertos disolventes orgánicos, en comparación a otros nanomateriales basados en carbono.<sup>12-14</sup>

El GO es un material 2D con propiedades ópticas, electrónicas, mecánicas y físicas únicas que lo convierten en un material susceptible y prometedor para numerosas aplicaciones biomédicas. Por ejemplo, su elevada relación área superficial/volumen y heterogeneidad química le aportan múltiples sitios de unión para interactuar con biomoléculas y tejidos. En concreto, en los últimos años el estudio de la adsorción de ADN ha sido el eje central de numerosas investigaciones.<sup>4,12,16</sup> Asimismo, su capacidad de extinción de la fluorescencia de ácidos nucleicos marcados fluorescentemente ha llamado la atención de los investigadores.<sup>16</sup>

### **1.1.2 Materiales 2D post-grafeno: dicalcogenuros de metales de transición**

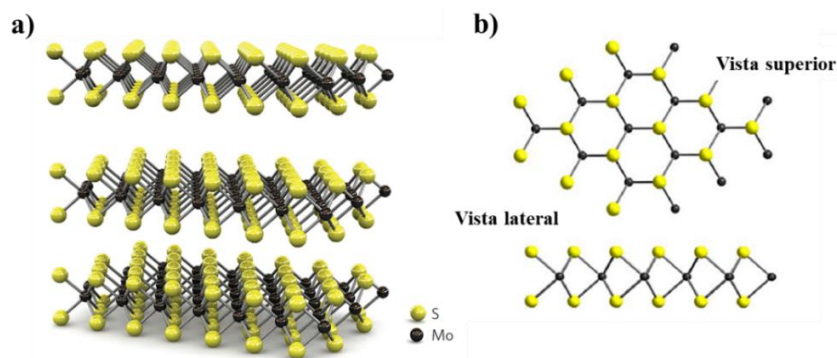
Los TMDs, de una o pocas capas (por ejemplo, MoS<sub>2</sub>, WS<sub>2</sub>, TiS<sub>2</sub>, etc., de manera general MQ<sub>2</sub>), han recibido una gran atención recientemente debido a su movilidad de carga, óptica única, y propiedades electroquímicas y catalíticas.<sup>17,18</sup>

Desde el punto de vista químico, los TMDs están formados por capas hexagonales alternas, donde cada capa está formada por una capa de átomos de metales de transición (M, normalmente Mo o W) intercalada entre dos capas de átomos de calcógeno (Q, típicamente S, Se o Te), unidas de forma covalente con estequiometría MQ<sub>2</sub>. Las capas adyacentes Q-M-Q, a su vez, se apilan a través de interacciones débiles de Van der Waals para formar el material 3D. En función de la coordinación y el estado de oxidación de los átomos metálicos, los TMD pueden ser metálicos, semimetálicos o semiconductores, observándose incluso superconductividad en alguno de ellos.<sup>19</sup>

Los TMDs de una o pocas capas poseen varias ventajas, como la capacidad de dispersarse directamente en solución acuosa, la fácil modificación de su superficie y su producción a gran escala.<sup>17</sup> Estas características dotan a estos materiales de un gran potencial en el campo de la óptica, catálisis, sensores, almacenamiento de energía, etc.

Uno de los TMDs más representativos y estudiados es el MoS<sub>2</sub>, compuesto 2D diamagnético semiconductor. Estructuralmente, dentro de cada capa tipo “sándwich” S-

Mo-S, los enlaces entre átomos muestran un marcado carácter covalente; cada átomo de Mo y seis de S se coordinan originando un prisma triangular o un octaedro (Fig. 3). Por su parte, las interacciones débiles de Van der Waals entre distintas capas S-Mo-S hacen posible la exfoliación de manera mecánica o química.<sup>20</sup>



**Figura 3.** a) Representación 3D de la estructura molecular del MoS<sub>2</sub>. Adaptado de Radisavljevic *et al.* 2011.<sup>21</sup> b) Monocapa MoS<sub>2</sub> tipo “sándwich”: vista superior y lateral. Adaptado de Grayfer *et al.* 2017.<sup>22</sup>

Por otra parte, muchos estudios han demostrado la buena biocompatibilidad de este material, dado que está formado por elementos presentes en el cuerpo humano. En este sentido, el Mo es un elemento traza necesario para la supervivencia del ser humano, pues las enzimas que lo presentan desarrollan un papel fundamental en el metabolismo humano.<sup>23</sup>

Además, las capas de MoS<sub>2</sub> han mostrado una alta capacidad de adsorción y extinción de la fluorescencia de ácidos nucleicos marcados fluorescentemente, por lo que este material 2D se ha propuesto como plataforma para la detección óptica de ADN.<sup>24</sup>

## 1.2 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE LOS MATERIALES 2D

Los materiales 2D, como los derivados del GO y el MoS<sub>2</sub>, pueden obtenerse mediante dos enfoques: métodos descendentes y métodos ascendentes. Entre los primeros, la exfoliación mecánica proporciona las láminas de mayor control y pureza. Sin embargo, no es adecuada para su producción a gran escala de manera reproducible y homogénea.<sup>2,13</sup> Por este motivo, una de las alternativas más usadas implica una aproximación sintética descendente en fase líquida.<sup>25</sup>

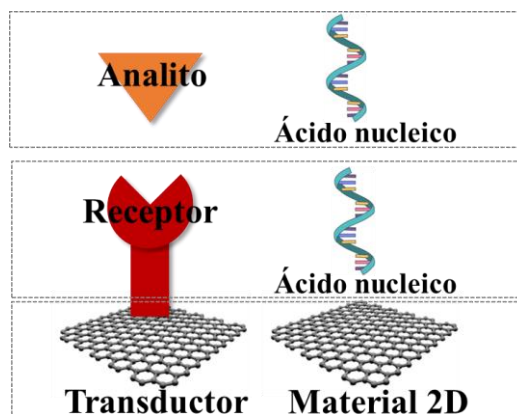
En este sentido, los derivados de GO pueden obtenerse mediante oxidación del grafito en condiciones ácidas seguida de la exfoliación de las láminas de óxido de grafeno largo (*large-Graphene Oxide*, l-GO) resultantes mediante tratamiento de ultrasonidos.<sup>13</sup> Por su

parte, el MoS<sub>2</sub> puede producirse a través de la exfoliación del mineral laminar correspondiente en fase líquida asistida por sonicación.<sup>18,26</sup>

Con este método de exfoliación química se aplica la energía necesaria para romper las fuerzas de Van der Waals que unen las láminas adyacentes de ambos tipos de materiales 2D.<sup>2,27</sup>

### 1.3 BIOSENSORES ÓPTICOS BASADOS EN MATERIALES 2D

En los últimos 10 años se ha prestado especial atención al desarrollo de biosensores de alto rendimiento empleando materiales 2D. Se trata de dispositivos formados normalmente por dos componentes distintos conectados en serie: un receptor y un transductor físico-químico (*Fig. 4*).<sup>12</sup>



**Figura 4.** Esquema general de los biosensores basados en materiales 2D. Adaptado de Reina *et. al* 2017.<sup>12</sup>

El receptor es el elemento de reconocimiento y acostumbra a ser una molécula bioactiva con una interacción específica con el objetivo; traduce la información del dominio bioquímico (usualmente concentración del analito) en una señal de salida química o física. El transductor se encarga de transformar la información química en una señal medible, por ejemplo, la emisión de luz o las reacciones de transferencia de electrones. Receptor y transductor deben encontrarse en contacto espacial directo. No obstante, a veces el receptor no es necesario, pues la interacción directa analito-transductor origina cambios medibles de sus propiedades.<sup>12,28</sup>

Las principales propiedades que requiere un biosensor son la selectividad y la sensibilidad. La selectividad se considera como la capacidad de detectar simultánea o separadamente sustancias químicas diferentes presentes en una misma muestra y depende de la capacidad de unión del receptor. Por su parte, la sensibilidad, entendida como la

capacidad de detectar de manera correcta el analito, depende del receptor y del transductor.<sup>28</sup> Por consiguiente, una buena selectividad y sensibilidad permiten usar los biosensores para detectar biomarcadores en una amplia gama de muestras, desde fluidos corporales hasta cultivos celulares.<sup>20</sup>

Asimismo, dos conceptos importantes a la hora de caracterizar la respuesta de un biosensor son los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ), que se definen como la concentración mínima de analito necesaria para su detección o cuantificación, respectivamente; ambos se relacionan con el blanco y la relación señal-ruido.<sup>28</sup>

Los biosensores electroquímicos, así como los ópticos (en los cuales se centrará este trabajo), son especialmente atractivos para la detección de biomarcadores como resultado de su elevada sensibilidad, facilidad de fabricación y potencial de miniaturización.<sup>3</sup>

Los sensores de detección óptica se basan en cambios en las propiedades ópticas (por ejemplo, emisión de luz) de la plataforma de detección cuando tiene lugar la interacción con la molécula diana.<sup>3,12</sup> Dentro de estos, en la última década han despertado gran interés los biosensores fluorescentes basados en la transferencia de energía por resonancia de Förster (*Förster resonance energy transfer*, FRET). En particular, los basados en los materiales 2D como GO y MoS<sub>2</sub> han sido ampliamente estudiados, pues estos materiales constituyen excelentes receptores de energía para amortiguar la fluorescencia de una amplia gama de especies, como los fluoróforos.<sup>3,5,6,20</sup>

La estrategia seguida por estos biosensores se basa en la capacidad de transferencia de energía del donante (en este caso, un fluoróforo unido covalentemente a ADN monohebra, ADNmc) al receptor (en este caso, el material 2D).<sup>20</sup> Cabe destacar que es una técnica de detección dependiente de la distancia. Ésta se ve favorecida cuanto más estrecho es el contacto entre el par aceptor-dador de energía. Por tanto, la extinción de la fluorescencia está estrechamente ligada a los eventos de hibridación del ADNmc fluorescente.<sup>5,6</sup> En este sentido, se ha visto que los materiales 2D objeto de estudio muestran una unión preferente por el ADNmc frente al ADN bihebra (ADNbc), siendo éste uno de los principios en los que se fundamentan los biosensores fluorescentes.<sup>5,24</sup> Además, debido a su gran relación superficie/volumen, ambos materiales son ideales para la adsorción del ADNmc.<sup>6,20</sup>



Durante la detección, la fluorescencia se restablece cuando la sonda de ADNmc marcada hibrida con su ADN diana complementario formando un dúplex. En esta situación, las nucleobases del ADNbc están protegidas por el esqueleto de grupos fosfatos cargados negativamente, de modo que la interacción entre el ADNbc y los materiales 2D es muy débil y el dúplex se aleja de su superficie, derivando en la retención de la fluorescencia.<sup>5,24</sup>

Por todo lo expuesto, en el presente proyecto se plantea una estrategia para la detección fluorescente de ADN diana a través del estudio de las interacciones entre distintos materiales 2D (en particular, GO y MoS<sub>2</sub>) y los oligonucleótidos marcados fluorescentemente.

## 2. OBJETIVOS

---

El objetivo general del presente Trabajo de Fin de Grado, desarrollado en el grupo NanoSelf del CICA (Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas – Centro Interdisciplinar de Química y Biología), es la detección fluorescente de oligonucleótidos diana mediante sistemas basados en materiales 2D. Como objetivos específicos se proponen:

- Preparación y/o caracterización físico-química de materiales 2D: MoS<sub>2</sub> y dos derivados del GO (l-GO y us-GO).
- Estudio de la capacidad de extinción de la fluorescencia de fluoróforos por parte de los materiales 2D mencionados.
- Detección óptica de ADN diana por fluorescencia, empleando como plataforma de detección óptica los materiales 2D MoS<sub>2</sub> y los dos derivados de GO.

### 3. SECCIÓN EXPERIMENTAL

---

En este apartado se enumerarán los diferentes reactivos, disolventes y otros materiales usados durante el desarrollo experimental del proyecto. También se hará una descripción de la metodología experimental utilizada, tanto en la preparación de los distintos materiales 2D como en los ensayos de fluorescencia, así como en las técnicas de caracterización empleadas.

#### 3.1. REACTIVOS, DISOLVENTES Y OTROS MATERIALES

Para la preparación del MoS<sub>2</sub> exfoliado (Exf-MoS<sub>2</sub>) se usaron los siguientes reactivos y disolventes: MoS<sub>2</sub> en polvo (<2 μm, 99%) de *Sigma-Aldrich*; 2-propanol (*iPrOH*), adquirido a *Scharlau*; y agua obtenida a partir de una estación de filtración Milli-Q (agua ultrapura “Tipo 1”, con resistividad 0,05μS cm<sup>-1</sup> a 25,5 °C). Se emplearon filtros de membrana Omnipore (PTFE, 0,45 μm, 47 mm en diámetro) comprados a *MerckMillipore*.

Para la síntesis de GO ultra pequeño (*ultra small-Graphene Oxide*, us-GO) se utilizó como compuesto de partida l-GO, cedido por el grupo *Carbon bionanotechnology* del CICbiomaGUNE y producido mediante una versión del método de Hummers.<sup>13,29</sup>

Para los ensayos de fluorescencia se usaron oligonucleótidos de ADN (con y sin marcaje fluorescente) sintetizados y purificados por las empresas *Biomers* y *Eurofins Genomics*. El tampón salino (PB, pH 7,5-7,6) se preparó a partir de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,1 M, 98-102%), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,1 M, ≥99%), y NaCl (1 M, ≥99%) de *Fisher Scientific*; MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (99-102%) de *Sigma-Aldrich*; NaOH de *Scharlau*; y agua obtenida a partir de una estación de filtración Milli-Q (agua ultrapura “Tipo 1”, con resistividad 0,05μS cm<sup>-1</sup> a 25,5 °C).

Para la preparación del gel de acrilamida/bisacrilamida se emplearon los reactivos que se indican a continuación: acrilamida/bisacrilamida (30%, 37,5:1) adquirido a *Alfa Aesar*; AEDT (≥99,5%), Tris·base (≥99,8%), BH<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (≥99%), TEMED (≥97%) y APS (≥98%) de *Fisher Scientific*; y agua obtenida a partir de una estación de filtración Milli-Q (agua ultrapura “Tipo 1”, con resistividad 0,05μS cm<sup>-1</sup> a 25,5 °C). Para la preparación del tampón de carga se utilizó: Tris·base (≥99,8%), HCl (37%), (KCl (≥99%), glicerol (≥99,5%), AEDT (≥99,5%) y MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (≥99%) adquiridos a *Fisher Scientific*. Como agente de tinción fluorescente para el revelado de los geles se empleó *SYBR<sup>TM</sup> Gold nucleic acid gel stain*, de *Invitrogen*.

### 3.2. INSTRUMENTACIÓN

Los espectros de absorbancia se obtuvieron con *GENESYS™ UV-Vis Spectrophotometer* (*Thermo Scientific*), empleando una cubeta de cuarzo (longitud de paso óptico: 1 cm) (*Hellma Analytics*). Se registraron a temperatura ambiente. Como control de blanco se usó agua Milli-Q en el caso de los derivados de GO (l-GO y us-GO), y una mezcla 7:3 (v/v) de *i*PrOH y agua Milli-Q en el caso del Exf-MoS<sub>2</sub>. Las mediciones abarcaron el rango de longitudes de onda 200-800 nm (l-GO y us-GO) y 300-800 nm (Exf-MoS<sub>2</sub>).

Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo a temperatura ambiente, usando el espectrofluorímetro *Fluoromax Plus-P* (*Horiba Scientific*) (tiempo de integración por punto en 0,1 s; *slits* de excitación y emisión: 5 nm) Para ello, se empleó una cubeta de cuarzo (longitud de paso óptico: 10 mm) (*Hellma Analytics*). Los espectros del l-GO y us-GO se registraron a dos longitudes de onda de excitación ( $\lambda_{exc}$ ): 525 nm y 475 nm (rango de barrido de emisión: 550-700 nm y 500-700 nm, respectivamente). En el caso del MoS<sub>2</sub>, se excitó a 485 nm (rango de barrido de emisión: 510-700 nm), previa centrifugación durante 5 min a 6000 r.p.m. (*Centrifuge MinisSpin, Eppendorf*). Para hacer las medidas con la sonda marcada con el fluoróforo Cy3 se excitó a 525 nm, estudiando el rango de emisión 550-700 nm. Para la sonda marcada con el fluoróforo FAM, se excitó a 475 nm y se registró el rango de emisión 500-700 nm.

Los espectros de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (*Fourier-transform Infrared Spectroscopy*, FT-IR) se obtuvieron con el espectrómetro *Nicolet iS10* (*Thermo Scientific*), aplicando la técnica de reflectancia total atenuada (*Attenuated total reflectance*, ATR). Para realizar las medidas, se usaron gotas de las dispersiones acuosas de los materiales (~20  $\mu$ L). Los espectros de transmitancia se registraron transcurridos aproximadamente 3 min desde la deposición de las gotas sobre el cristal de diamante del equipo. Se adquirieron 32 escaneos en el rango 800-4000  $cm^{-1}$  con una resolución de 4  $cm^{-1}$ .

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (*Transmission Electron Microscopy*, TEM) se obtuvieron con el equipo *JEOL JEM-1010*, del SAI (Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de A Coruña). Presenta un cañón de electrones termoiónico con filamento de tungsteno con un voltaje de aceleración de 100 kV. Proporciona imágenes de transmisión convencionales, de campo oscuro y campo claro,

con una resolución entre puntos de 0,35 nm, captadas con una cámara *Megaview II*. Las imágenes fueron tratadas con el programa ImageJ.

Las medidas de microscopía de fuerza atómica (*Atomic Force Microscopy*, AFM) fueron hechas por los colaboradores del grupo *Carbon bionanotechnology* del CICbiomaGUNE con el equipo *JK NanoWizard II* operando en modo de contacto intermitente. Se usó una sonda de silicio grabada por contacto (TESPA-V2), con un silicio dopado con antimonio de 0,01 - 0,025  $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ . La sonda estaba equipada con un cantiléver rectangular (3,8  $\mu\text{m}$  de grosor, frecuencia de resonancia nominal de 320 kHz, constante de resorte de 42  $\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$ , longitud de 123  $\mu\text{m}$  y anchura de 40  $\mu\text{m}$ ). Los datos se analizaron con el software WSxM 5.0 Develop 7.0, y las imágenes fueron tratadas con el programa ImageJ.

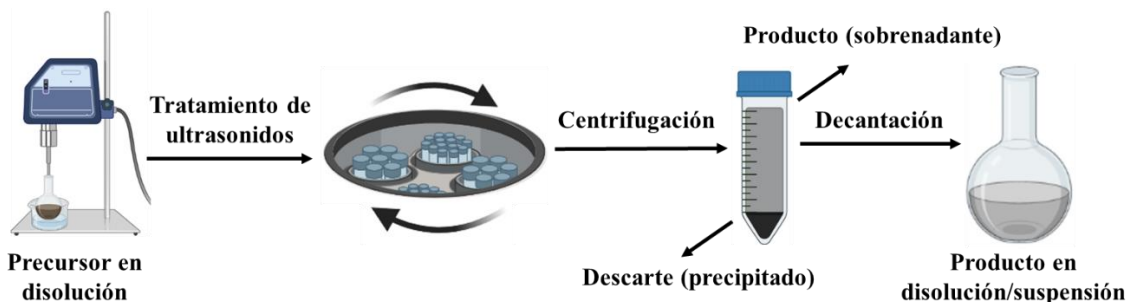
El análisis termogravimétrico (*Thermogravimetric Analysis*, TGA) se llevó a cabo mediante el equipo *Discovery (TA Instruments)*, bajo atmósfera de nitrógeno en un rango de temperaturas de 100-800°C, aplicando un gradiente de 10  $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ . Las medidas fueron realizadas por los colaboradores del grupo *Carbon bionanotechnology* del CICbiomaGUNE.

Las medidas de espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (*X-ray Photoelectron Spectroscopy*, XPS) fueron hechas por los colaboradores del grupo *Carbon bionanotechnology* del CICbiomaGUNE, empleando un espectrómetro *SPECS Sage HR 100* con una fuente de rayos X no monocromática de aluminio con una línea  $K_{\alpha}$  de 1486,6 eV de energía y 300 W. El ajuste de los datos se llevó a cabo con el software CasaXPS.

Los espectros Raman se registraron con un microscopio confocal Raman *Renishaw Invia* equipado con un láser rojo ( $\lambda_{\text{exc}}=633 \text{ nm}$ ), y se representaron tras haber corregido la línea base mediante el software Wire 4.3. Las medidas fueron hechas por los colaboradores del grupo *Carbon bionanotechnology* del CICbiomaGUNE.

### **3.3. EXFOLIACIÓN EN FASE LÍQUIDA ASISTIDA POR ULTRASONIDOS**

En este trabajo se propuso una estrategia común para la exfoliación en fase líquida (*Liquid Phase Exfoliation*, LPE) del us-GO y del MoS<sub>2</sub>. La Fig.5 muestra un esquema general de las etapas constituyentes.



**Figura 5.** Esquema general del procedimiento seguido para la LPE del us-GO y del MoS<sub>2</sub>.

### 3.3.1. Síntesis de us-GO

El us-GO se obtuvo a partir de un l-GO el cual se preparó previamente a partir de láminas de grafito mediante una variación del método de Hummers.<sup>13,29</sup> Dicho método se basa en la oxidación de grafito por adición de nitrato de sodio, ácido sulfúrico y permanganato potásico.

Una solución de láminas de l-GO (2,7 mg·mL<sup>-1</sup>) en agua (85 mL) fue sometida a una reducción de tamaño de las láminas mediante tratamiento de ultrasonidos empleando una sonda (*Ultrasonic Processor UP200S*, 200-240 V, 50/60 Hz, *Hielscher*) en un baño de agua. Se operó durante 5 h a una amplitud del 70%. La temperatura del baño de sonicación se monitoreó para controlar que no excediera los 40°C, manteniéndose en todo momento a 25°C. A continuación, la suspensión se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 1 h (*Centrifuge MinisSpin*, *Eppendorf*) para descartar las láminas de l-GO que pudiesen quedar. Por último, los sobrenadantes se separaron mediante decantación en un matraz de fondo redondo de 250 ml (*Fig. 5*).

Para determinar la concentración del us-GO, se congelaron varias alícuotas de 10 mL de la dispersión de us-GO en nitrógeno líquido y se liofilizaron durante 48 h (*Lyophilizer Cryodos -80*, *Telstar*). La concentración se determinó por diferencia de pesada de la muestra antes y después de liofilizar.

Posteriormente, se caracterizó el us-GO exfoliado, así como el l-GO de partida, mediante diferentes técnicas: TEM y/o AFM, espectroscopía UV/Vis, espectroscopía Raman, FT-IR, TGA y XPS.

### 3.3.2. Preparación de Exf-MoS<sub>2</sub><sup>18,26</sup>

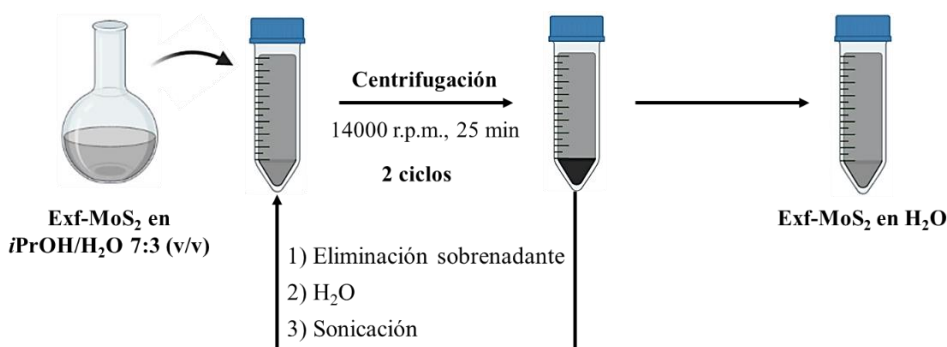
En un matraz de fondo redondo de 250 mL enfriado a 2,5°C con una mezcla 1:1 de agua-hielo se dispersó MoS<sub>2</sub> en polvo (160 mg) en una mezcla *i*PrOH/H<sub>2</sub>O 7:3 (v/v) (160 mL).

La LPE se llevó a cabo usando una sonda de ultrasonidos (*Ultrasonic Processor UP200S*, 200-240 V, 50/60 Hz, *Hielscher*) sumergida en la dispersión, operando a una amplitud de 70% durante 1h, a temperatura constante y manteniendo la irradiación de ultrasonidos continua. El matraz se mantuvo en un baño agua-hielo durante todo el proceso. Tras la sonicación, la suspensión negra se centrifugó durante 30 min a 3530 r.p.m. (*CR22N Hitachi* 22000 r.p.m., rotor R15A-1624, 20°C). A continuación, los sobrenadantes de color gris (~160 mL) se separaron del sedimento negro (material no exfoliado) mediante decantación en un matraz de fondo redondo de 250 mL (*Fig. 5*). Se midió su absorbancia por UV/Vis.

Con el fin de obtener el Exf-MoS<sub>2</sub> sólido para posterior construcción de una recta de calibrado, se procedió a la filtración de la dispersión empleando un sistema de filtración con membrana. El Exf-MoS<sub>2</sub> se redispersó en *i*PrOH (60 mL) y se filtró de nuevo. El proceso de redispersión/filtración se repitió un total de tres veces con *i*PrOH. A partir del Exf-MoS<sub>2</sub> sólido se prepararon diluciones de concentración conocida en una mezcla 7:3 (v/v) de *i*PrOH y agua Milli-Q y se midió su absorbancia mediante UV/Vis.

La suspensión de material exfoliado en una mezcla *i*PrOH/H<sub>2</sub>O 7:3 (v/v) (~160 mL) se centrifugó durante 25 min a 14000 r.p.m. (*CR22N Hitachi* 22000rpm, rotor R15A-1624, 20°C). Tras retirar la fase líquida, las láminas de MoS<sub>2</sub> precipitadas se redispersaron en agua Milli-Q y sonicaron durante 2 minutos (*Baths Ultrasonic FB15050*, 80 W, Fisherbrand). Después de realizar el proceso centrifugación/redispersión nuevamente, se obtuvo una suspensión final de Exf-MoS<sub>2</sub> en agua Milli-Q (40 mL) y se almacenó a 4°C (*Fig. 6*).

El Exf-MoS<sub>2</sub> en agua se caracterizó mediante TEM y espectroscopía Raman.



**Figura 6.** Esquema del proceso de cambio de disolvente en la suspensión de Exf-MoS<sub>2</sub>.

### 3.4. PROCEDIMIENTO GENERAL PARA EL ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE EXTINCIÓN DE FLUORESCENCIA DE FLUORÓFOROS DE LOS MATERIALES 2D<sup>30,31</sup>

Distintas secuencias de ADNmc marcadas con un fluoróforo (50 nM) en PB (1 mL) (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; pH 7,5-7,6) se mezclaron con concentraciones crecientes del material exfoliado correspondiente (l-GO o us-GO). Tras 15 min de reacción a temperatura ambiente, se midió la fluorescencia de las soluciones resultantes a la correspondiente longitud de onda de excitación.

### 3.5. PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN ÓPTICA DE ADN POR FLUORESCENCIA<sup>5</sup>

A una disolución de ADNmc etiquetado fluorescentemente (50 nM) en PB (1 mL) (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, pH 7,5-7,6), se añadieron concentraciones crecientes de ADN con secuencias complementarias o no complementarias (0-50 nM). Tras un período de incubación de 30 min a temperatura ambiente, se añadió a las disoluciones anteriores la cantidad de material 2D necesaria para una extinción óptima de la señal fluorescente. Después de 15 min, se registró el espectro de emisión de fluorescencia de cada una de ellas en el rango de longitudes de onda correspondientes.

Para las disoluciones P1/T1 y P1/R1 se usó l-GO (20 µg·mL<sup>-1</sup>, 1 mL). Para las disoluciones P2/T2 y P2/R2 se usó l-GO (16 µg·mL<sup>-1</sup>, 1 mL) y us-GO (15 µg·mL<sup>-1</sup>, 1 mL).

Las secuencias de ADN usadas en este proyecto se recogen en la *Tabla 1*.

**Tabla 1.** Oligonucleótidos empleados en los ensayos de fluorescencia.

Oligonucleótido	Secuencia
<b>P1:</b> Sonda marcada con Cy3	5'- <b>Cy3</b> -GCG CTC TCA ATT TTG ACG CG-3'
<b>T1:</b> Secuencia complementaria de P1	5'-CGC GTC AAA ATT GAG AGC GC-3'
<b>R1:</b> Secuencia no complementaria de P1	5'-AGG CAG CAA CAA TAG GCC CT-3'
<b>P2:</b> Sonda marcada con FAM	5'- <b>FAM</b> -TCG TTG GAG TTT GTC TG-3'
<b>T2:</b> Secuencia complementaria de P2	5'-CAG ACA AAC TCC AAC GA-3'
<b>R2:</b> Secuencia no complementaria de P2	5'-GCA GAG CCA GTT CCA AG-3'



### 3.5.1. Ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética (*Electrophoretic mobility shift assay*, EMSA)

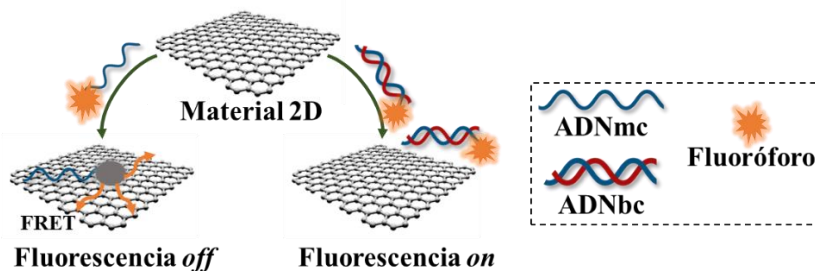
Se prepararon dos geles de 0,75 mm de grosor de acrilamida/bisacrilamida al 10%. Se emplearon los siguientes reactivos en las proporciones que se indican: agua ultrapura (5,95 mL); acrilamida/bisacrilamida al 30% (3,5 mL); tampón Tris-Borato-AEDT (*Tris-borate-EDTA*, TBE) (5X, 1,05 mL, pH=8) preparado previamente con ácido bórico, Tris-base y AEDT; TEMED (7,5 µL) y APS al 10% (75 µL). Tras 30 min de polimerización, se guardaron los geles a 4°C para preservar la humedad hasta su posterior uso.

Las distintas muestras testadas, preparadas siguiendo la estrategia post-mezcla (*apartado 3.5.*), se cargaron en los carriles del gel (1 µL) junto al tampón de carga (11 µL), completando con agua Milli-Q hasta el volumen requerido (8 µL). El tampón de carga presentaba la siguiente composición: Tris·HCl (18 mM, pH 7,5), KCl (90 mM), glicerol (9%); AEDT (1,8 mM) y MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (1,8 mM).

Se aplicó una corriente de 140 V durante 40 min para el desarrollo de la electroforesis. Transcurrido este tiempo, el gel se depositó en un recipiente con tampón TBE 1X (50 mL) y el agente intercalante fluorescente *SYBR<sup>TM</sup> Gold Nucleic acid gel stain* (5 µL). Se mantuvo en agitación durante 10 min (*Orbital shaker DOS-20S, ELMI*), protegido de la exposición a la luz. Por último, el gel se reveló bajo luz UV haciendo uso del fotodocumentador *Chemidoc<sup>TM</sup> MP Imaging System (Biorad)* y aplicando el programa *Image Lab (BioRad)*.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se discutirá la preparación y caracterización físico-química de los materiales 2D. Asimismo, se analizarán los resultados obtenidos para la detección de ADN mediante medidas de fluorescencia, utilizando los materiales 2D como plataforma de detección óptica (*Fig. 7*).



**Figura 7.** Esquema general de una plataforma de detección de ADN marcado fluorescentemente basado en la capacidad de discriminación de ADNmc/ADNbc por parte de los materiales 2D.

### 4.1. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES 2D

Los materiales 2D GO y MoS<sub>2</sub> constituyen excelentes candidatos para la construcción de plataformas de detección óptica debido a sus extraordinarias propiedades. El GO, al igual que el MoS<sub>2</sub>, tiene una amplia relación superficie/volumen que posibilita la interacción con una gran diversidad de moléculas<sup>13,32</sup> Asimismo, puede ser modificado químicamente de múltiples formas gracias a la presencia de grupos funcionales oxigenados en su superficie.<sup>12,13</sup> Ambos presentan capacidad de dispersión en solución acuosa, aunque el GO es un material con mayor solubilidad y estabilidad coloidal en agua.<sup>17,33</sup>

Por otra parte, se optó por una aproximación sintética descendente en fase líquida como estrategia principal de preparación de ambos materiales, porque constituye una vía sencilla para obtener materiales 2D a gran escala en un amplio rango de disolventes.<sup>25</sup>

#### 4.1.1. Preparación y caracterización del us-GO

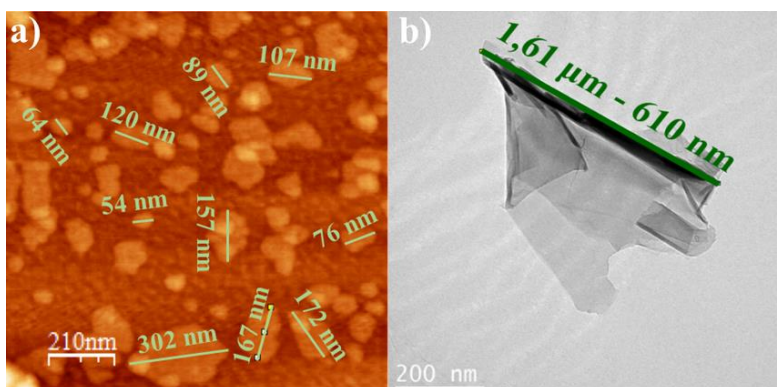
El us-GO se sintetizó usando como material de partida un l-GO (2,7 mg·mL<sup>-1</sup>) que había sido preparado con anterioridad a partir de láminas de grafito usando una variación del método de Hummers. Brevemente, dicho método consiste en la exfoliación química del grafito bajo condiciones fuertemente ácidas y oxidativas.<sup>13,29</sup>

Para la obtención de un derivado de GO de menor tamaño, se planteó una estrategia sintética en dos pasos (apartado 3.3.1.): reducción de tamaño de las láminas de l-GO suspendidas en agua mediante tratamiento de ultrasonidos, seguido de una etapa de purificación de las láminas resultantes por centrifugación (*Fig. 5*). Es importante destacar que en este proceso la temperatura del baño de sonicación se controló de modo que no alcanzó valores superiores a los 25°C. De este modo, se redujeron las posibilidades de que el us-GO experimentase reducción térmica por liberación de moléculas de agua adsorbidas, así como de grupos funcionales oxigenados.

La concentración del us-GO se calculó mediante diferencia de pesada de la muestra antes y después de ser liofilizada, obteniéndose un valor de 1,4 mg·mL<sup>-1</sup>.

Con el fin de realizar un análisis comparativo entre el us-GO y el l-GO de partida, ambos materiales 2D fueron sometidos a diferentes técnicas de caracterización físico-química.

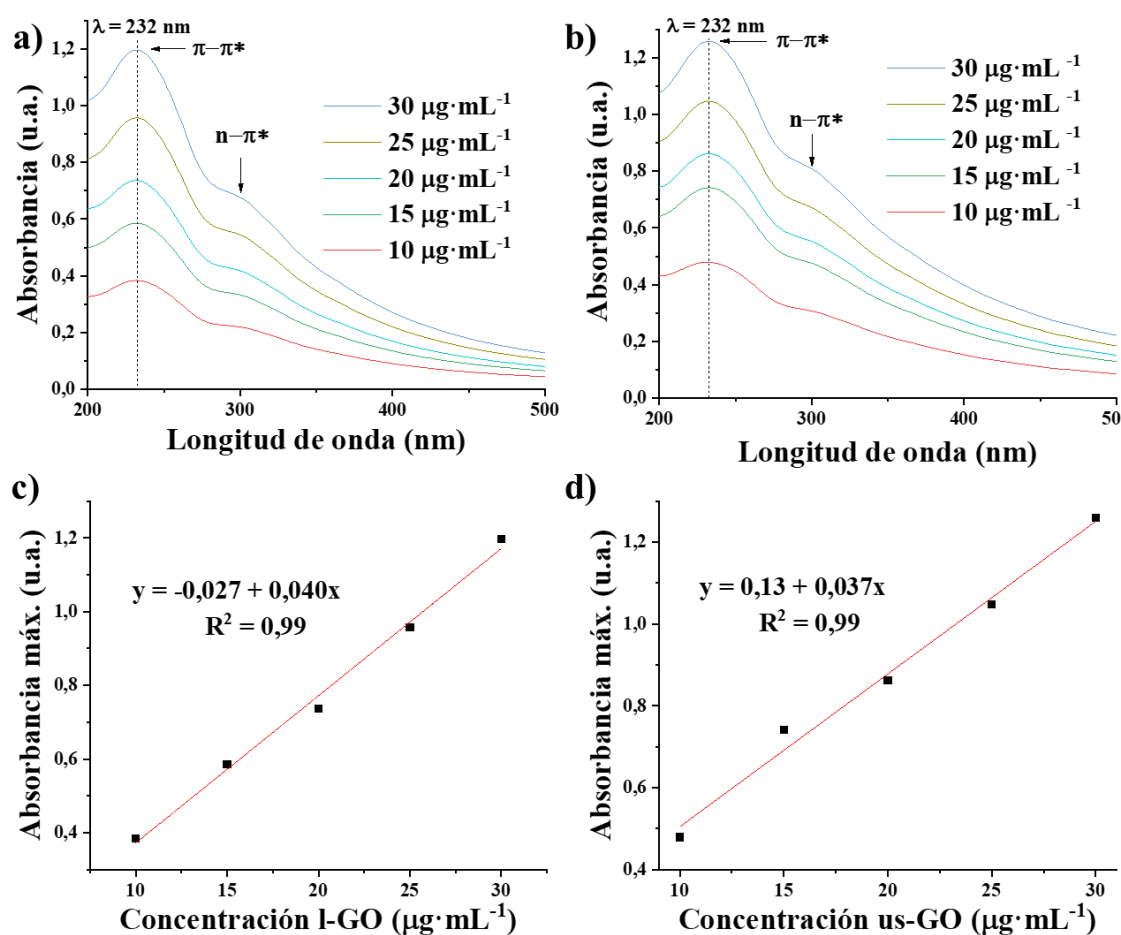
Para determinar la morfología y el grosor de las láminas de estos materiales 2D se recurrió a las técnicas TEM y AFM, respectivamente. En el caso del us-GO, este no pudo ser caracterizado por TEM debido a su pequeño tamaño y bajo contraste al estar formado principalmente por carbono. Solo pudo caracterizarse por AFM (*Fig. 8a*), técnica con la que se observó que las estructuras estaban formadas por capas de altura en torno a 0,6 – 2,5 nm. Dado que cada monocapa de GO posee un grosor teórico de 0,12 nm<sup>14</sup>, las estructuras del us-GO obtenido corresponderían a estructuras formadas por 5-20 capas. En cuanto a sus dimensiones laterales, tienen un tamaño medio de (131± 74) nm. Por su parte, las imágenes TEM del l-GO mostraron estructuras aparentemente monocapa o bicapa, y cuyas dimensiones abarcaban el rango 1,61 μm - 610 nm (*Fig. 8b*).



**Figura 8.** a) Imagen AFM representativa de las láminas de us-GO. La barra de escala es de 210 nm. b) Imagen TEM representativa de las láminas de l-GO. La barra de escala es de 200 nm.

La presencia de grupos funcionales en la superficie de ambos materiales se determinó mediante diversas técnicas, incluyendo las espectroscopías UV/Vis, Raman y FT-IR.

Las Fig. 9a-b recogen los espectros de absorbancia UV/Vis del l-GO y us-GO, respectivamente, en el rango de concentraciones 10-30  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . En ambos casos, las medidas muestran una correlación lineal entre la concentración del material y la absorbancia a 232 nm (Fig. 9c-d). Esta longitud de onda se asocia a transiciones electrónicas  $\pi \rightarrow \pi^*$  inducidas por fotones, típicas de los enlaces aromáticos C=C (grupos  $\text{sp}^2$ ). Además de la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$ , en las Fig. 9a-b se identifica un hombro a  $\sim 300$  nm, que se corresponde a transiciones  $n \rightarrow \pi^*$  de pares de electrones libres de los átomos de oxígeno del grupo C=O, característicos de los grupos carbonilo y carboxilo.<sup>13,14</sup> La relación entre las intensidades de ambos picos se atribuye a un menor coeficiente de extinción de la transición  $n \rightarrow \pi^*$ .<sup>14</sup>



**Figura 9.** a, b) Espectros UV/Vis del a) l-GO y b) us-GO, en el rango de concentraciones 10-30  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . c, d) Regresión lineal de la absorbancia máxima (232 nm) frente a la concentración de c) l-GO y d) us-GO.

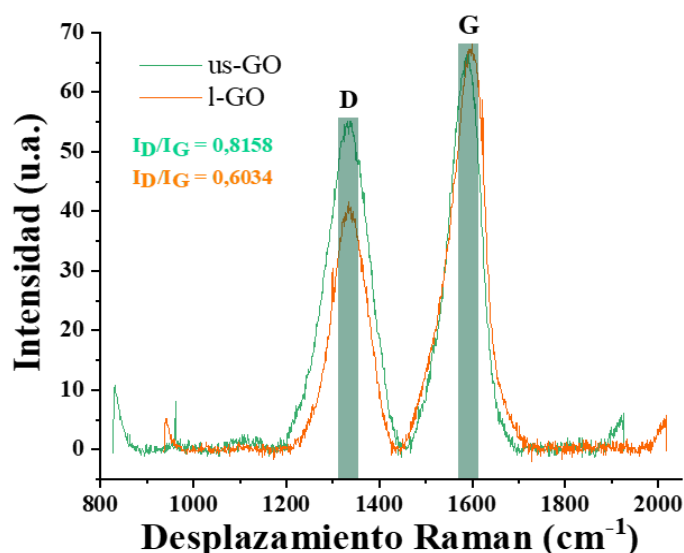
Aplicando la ley de Lambert-Beer (Ec. 1) a la longitud de onda de máxima absorbancia se obtuvo un coeficiente de extinción experimental de 0,037 y 0,040 mL·μg<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> para el us-GO y el l-GO, respectivamente.

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C \quad (\text{Ec. 1}),$$

Donde  $A$  es la absorbancia de la muestra,  $\varepsilon$  el coeficiente de extinción,  $l$  la longitud de paso de la cubeta, y  $C$  la concentración de la muestra.

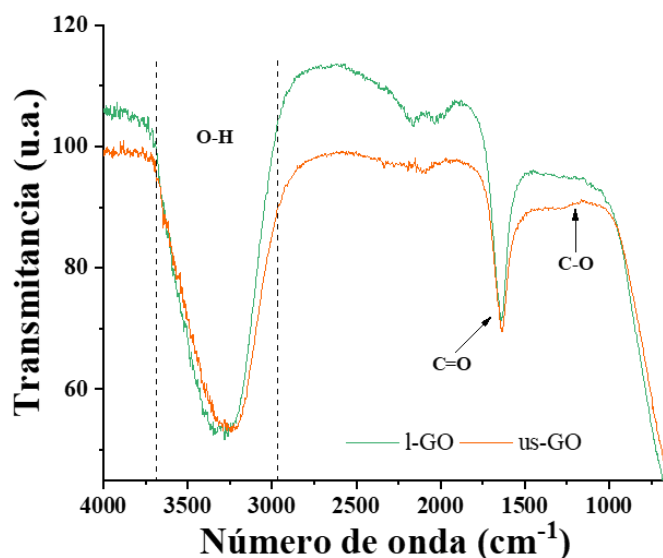
La excitación de las dos muestras de GO con un láser de 633 nm proporcionó los espectros Raman de la Fig. 10. De acuerdo con estudios previos, en ambos casos se observó la presencia de dos bandas: la banda D de primer orden (~1338 cm<sup>-1</sup>) y la banda G (~1590 cm<sup>-1</sup>), típicas de la mayor parte de hidrocarburos poliaromáticos.<sup>34</sup> La elevada intensidad de la banda D ( $I_D$ ) indica la presencia de defectos, como funcionalidades de oxígeno derivadas de la oxidación, en la red del grafeno.<sup>13</sup>

Para estudiar de forma semicuantitativa el efecto de la oxidación del grafeno, se calculó la relación de intensidad de las bandas D y G ( $I_D/I_G$ ), lo que se conoce como “métrica del desorden”.<sup>35</sup> El valor obtenido difiere de manera notable entre ambos materiales de GO, siendo mayor para el us-GO, lo que indicaría que este material presenta una mayor cantidad de defectos que el l-GO, coincidiendo con la bibliografía.<sup>36,37</sup>



**Figura 10.** Caracterización del us-GO y l-GO mediante espectroscopía Raman. Se indican las relaciones  $I_D/I_G$ . Se muestran los resultados tras aplicar una corrección de línea base

Los espectros de FT-IR (*Fig. 11*) permitieron identificar los grupos funcionales de oxígeno presentes en la superficie del us-GO y l-GO. Se observó una banda ancha entre  $2950-3700\text{ cm}^{-1}$ , asociada a vibraciones de tensión O-H típicas de moléculas de agua adsorbidas, grupos hidroxilo y carboxilo.<sup>13</sup> En la zona de los  $1640-1660\text{ cm}^{-1}$  se detectó un pico pronunciado relacionado con vibraciones de tensión C=O, debidas a la presencia de grupos carbonilo y/o carboxilo conjugados por la resonancia de los enlaces C=C.<sup>13,14</sup> La presencia de una banda en torno a  $1195\text{ cm}^{-1}$  se correspondería con vibraciones de tensión C-O típicas de fenoles; en este caso, apenas se aprecian debido a su baja intensidad. El hecho de que esta región aparezca a intensidad más baja para el us-GO sugiere que este material podría presentar una cantidad ligeramente inferior de fenoles.<sup>13</sup>



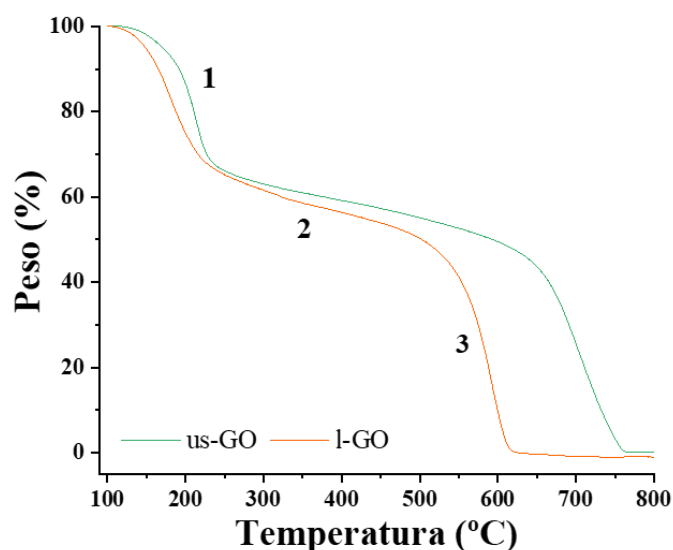
**Figura 11.** Caracterización de la superficie del us-GO y l-GO mediante FT-IR. Los espectros muestran la contribución de los modos de vibración de diversas funcionalidades superficiales.

Para cuantificar la funcionalización y la composición atómica de los materiales de GO se recurrió a las técnicas TGA y XPS, respectivamente.

Los grupos oxigenados derivados de la oxidación del grafito se caracterizan por presentar elevada labilidad. De este modo, su presencia pudo confirmarse gracias al TGA, técnica que da una idea de la estabilidad térmica y del grado de oxidación del compuesto. Los perfiles obtenidos mediante TGA (*Fig. 12*) muestran tres etapas de pérdida de peso a temperaturas por encima de los  $100^{\circ}\text{C}$ .

La primera pérdida de peso tuvo lugar entre  $130-230^{\circ}\text{C}$ , y describe la descomposición de los grupos funcionales más reactivos, como los carboxilo.<sup>13</sup> El cambio de pendiente en

torno a los 230°C fue menos pronunciado y podría atribuirse a la descomposición de otros grupos oxigenados con mayor estabilidad térmica. Se observó una tercera etapa de pérdida (~ 40%), situada entre 635-760°C en el caso del us-GO y entre 530-615°C en el l-GO; se asocia a la degradación de la estructura de naturaleza grafitica del material. Dado que la *Fig. 12* muestra una primera etapa de pérdida de peso parecida para ambos materiales (~30%), se podría concluir que mediante esta técnica no se detectaron diferencias significativas en el grado de funcionalización del us-GO y l-GO.



**Figura 12.** Caracterización de la superficie del us-GO y l-GO mediante TGA bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. Las curvas reflejan la contribución de las funcionalidades oxigenadas a la descomposición térmica de ambos materiales. Región (1) descomposición de carboxilos, (2) descomposición de otros grupos funcionales, (3) degradación de la estructura de naturaleza grafitica.

Los resultados obtenidos mediante el análisis de XPS (*Tabla 2*) proporcionan una relación atómica carbono:oxígeno que se puede asociar con el grado de oxidación. Dicha relación es ligeramente inferior para el us-GO, indicando un grado de oxidación ligeramente superior para este material. Estos resultados reflejan una pureza química elevada para los dos materiales derivados del GO, sin otros elementos procedentes de los reactivos usados durante el proceso de oxidación.

**Tabla 2.** Porcentaje atómico de carbono (C) y oxígeno (O) en l-GO y us-GO. Se indica la relación carbono:oxígeno (C:O) de los dos materiales 2D.

Muestra	C / % atómico	O / % atómico	Relación C:O
l-GO	68,1	31,9	2,13
us-GO	67,3	32,7	2,01

#### 4.1.2. Preparación y caracterización del Exf-MoS<sub>2</sub>

Para preparar el Exf-MoS<sub>2</sub> se planteó una estrategia sintética en dos etapas: *i*) LPE asistida por sonicación, seguida de *ii*) la purificación de las estructuras exfoliadas mediante centrifugación (*apartado 3.3.2.*).

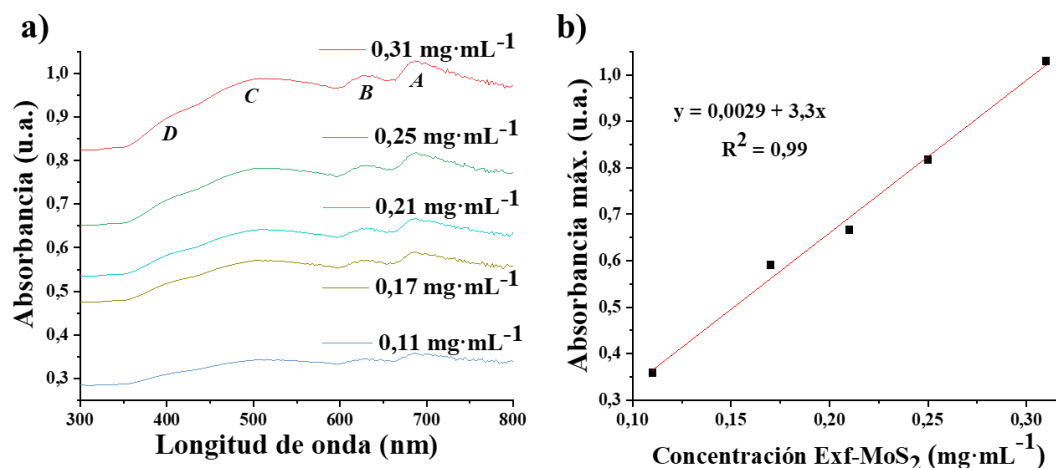
Para llevar a cabo la etapa de exfoliación se usó la mezcla de disolventes polares *i*PrOH/H<sub>2</sub>O 7:3 (v/v). Este disolvente mixto se seleccionó atendiendo a estudios ya publicados, en los que se demostraba un elevado grado de afinidad hacia los componentes polares y dispersivos de la tensión superficial del MoS<sub>2</sub>. Dicha característica deriva en una mayor eficacia tanto a la hora de exfoliar como de estabilizar el material una vez exfoliado.<sup>38</sup>

Por otra parte, temperaturas elevadas durante la exfoliación podrían conducir a la oxidación del Mo. Para tratar de evitar esta situación, se mantuvo el matraz con la dispersión en una mezcla agua:hielo durante todo el proceso.

El Exf-MoS<sub>2</sub> sólido se obtuvo usando un sistema de filtración con membrana (*apartado 3.3.2.*), y a partir del material filtrado se prepararon diluciones de concentración conocida. La *Fig. 13a* recoge los espectros de extinción de dichas diluciones, en los cuales se observan cuatro bandas de absorción, correspondientes a los excitones A, B, C y D, de mayor a menor de longitud de onda.<sup>38</sup> Todas ellas se corresponden a bandas de transición situadas entre las bandas de conducción y de valencia. Dado que las estructuras obtenidas en estos experimentos suelen presentar tamaños del orden de cientos de nanómetros, a la hora de caracterizar las muestras mediante UV/Vis es necesario tener en cuenta la dispersión de la luz por parte de la muestra, sumándose a la señal de absorción en los espectros de extinción.<sup>38</sup> Esto se refleja en que la línea base de las medidas de absorbancia parte siempre de valores superiores a cero, situación que se acentúa al aumentar la concentración de las diluciones.

La *Fig. 13b* muestra la recta de ajuste que se obtuvo al representar los datos de absorbancia a 686 nm (excitón A) frente a la concentración de las diluciones. Asumiendo que se cumple la Ley de Lambert-Beer (*Ec. 1*), el coeficiente de extinción del Exf-MoS<sub>2</sub> obtenido experimentalmente a 686 nm fue 3,3 mL·mg<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>, en concordancia con los datos reportados en la bibliografía.<sup>30</sup>





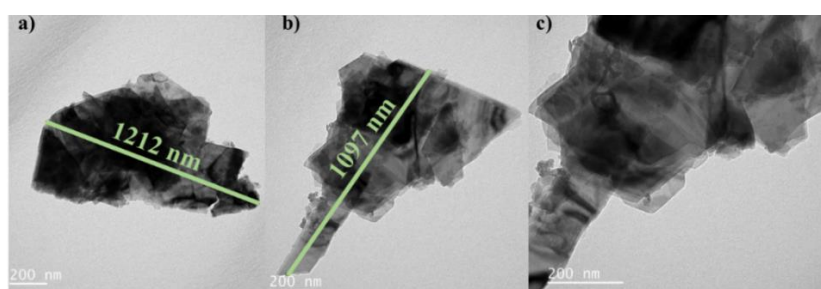
**Figura 13.** a) Espectro UV/Vis de las diluciones de Exf-MoS<sub>2</sub> en *i*PrOH/H<sub>2</sub>O 7:3 (v/v). Las bandas de absorción se corresponden con los excitones A, B, C y D, de mayor a menor longitud de onda. b) Regresión lineal de la absorbancia frente a la concentración de Exf-MoS<sub>2</sub> a la longitud de onda del excitón A (686 nm).

En la *Tabla 3* se recogen las concentraciones de las dispersiones de Exf-MoS<sub>2</sub> preparadas durante este proyecto (*Fig. 14, Anexos*), calculadas aplicando la Ley de Lambert-Beer (*Ec. 1*) y usando el coeficiente de extinción experimental 3,3 mL·mg<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

**Tabla 3.** Valores de absorbancia de las dispersiones de Exf-MoS<sub>2</sub> a 686 nm, registrados tras la etapa de centrifugación, y de sus concentraciones (Ver *Figura 14, Anexos*). Condiciones operacionales de sonicación: 1h, 70% amplitud.

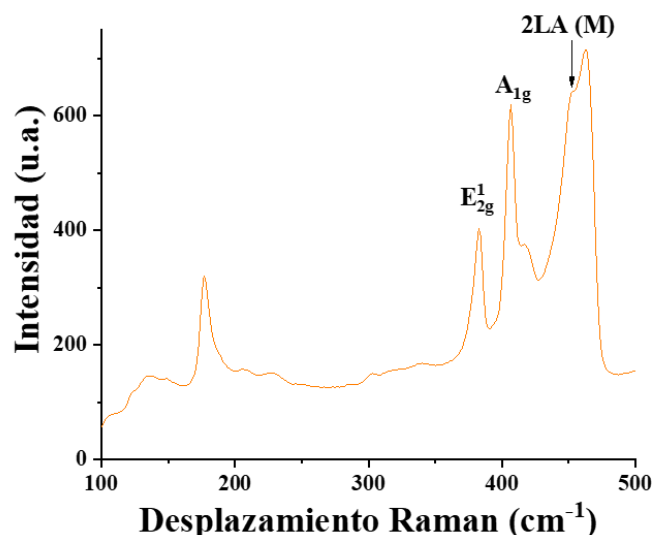
<i>Experimento</i>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Absorbancia a 686 nm (u.a.)</b>	0,14	0,60
<b>Concentración Exf-MoS<sub>2</sub> (mg·mL<sup>-1</sup>)</b>	0,042	0,18

La morfología y el número de capas de las estructuras de Exf-MoS<sub>2</sub> se estudiaron con TEM. En la *Fig. 15* se observa que el tamaño medio del Exf-MoS<sub>2</sub> es de ~ 1155 nm. Además, en la *Fig. 15c* se observa que el material exfoliado está formado por 5-10 capas.



**Figura 14.** Imágenes TEM representativas de las nanoláminas de Exf-MoS<sub>2</sub>. Las barras de escala son de 200 nm.

La excitación del Exf-MoS<sub>2</sub> con un láser de 633 nm originó el espectro Raman recogido en la *Fig. 16*. En él se observan dos picos bien definidos, característicos de los modos fonónicos E<sub>2g</sub> (~ 380 cm<sup>-1</sup>) y A<sub>1g</sub> (~ 406 cm<sup>-1</sup>). Además, en torno a 450 cm<sup>-1</sup> aparece un hombro peor definido, correspondiente al fonón acústico longitudinal de segundo orden (2LA(M)).<sup>39,40</sup> Estos resultados confirman que el MoS<sub>2</sub> está exfoliado.<sup>38</sup>



**Figura 15.** Espectro Raman del Exf-MoS<sub>2</sub>. Se indican los picos de los distintos modos fonónicos característicos del material exfoliado. Se muestran los resultados tras aplicar una corrección de línea base.

En este proyecto, para explorar la aplicación del material exfoliado como sensor óptico de ADN, se requiere que el Exf-MoS<sub>2</sub> se encuentre en suspensión en solución acuosa. No obstante, una exfoliación eficiente de MoS<sub>2</sub> implica el uso de un codisolvente como el *i*PrOH. Debido a la baja solubilidad del ADN en esta mezcla de disolventes se procedió al enriquecimiento en agua de la suspensión de Exf-MoS<sub>2</sub> (apartado 3.3.2.).

#### 4.2. DETECCIÓN DE ADN MEDIANTE FLUORESCENCIA

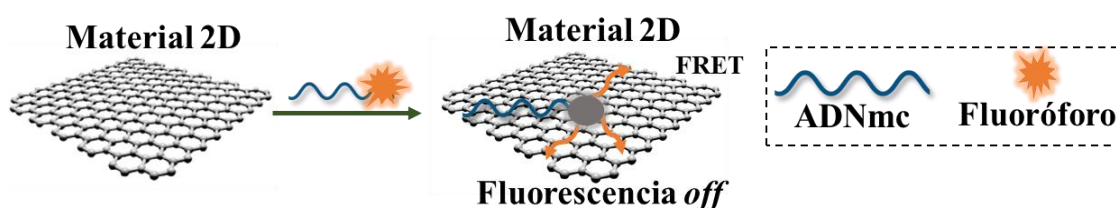
En el presente trabajo se planteó un mecanismo de detección fluorescente de oligonucleótidos mediante sistemas basados en materiales 2D, como los derivados de GO y TMDs como el MoS<sub>2</sub>. Esta decisión se tomó porque estudios recientes han demostrado que *i*) son capaces de unir a su superficie cadenas de oligonucleótidos monohebra marcados con un fluoróforo en su extremo y extinguir su fluorescencia de forma eficiente y *ii*) discernir entre el ADN<sub>mc</sub> y el ADN<sub>bc</sub> en base a la distinta afinidad de adsorción que muestran por ellos. Ambas propiedades llevaron a pensar que estos sistemas podían resultar útiles como nanosensores para el análisis cuantitativo de un ADN objetivo.<sup>5,16,24</sup>

#### 4.2.1. Estudio de la capacidad de extinción de fluorescencia de los materiales 2D

La capacidad de extinción de la fluorescencia de los materiales 2D mencionados anteriormente se debe a que pueden actuar como aceptores de energía en el mecanismo de FRET.

La extinción de la fluorescencia constituye una herramienta útil para estudiar los procesos de adsorción/desorción de los oligonucleótidos en la superficie de las plataformas de detección óptica. Por ello, se decidió explorar previamente la capacidad de extinción de ADN marcado fluorescentemente de los materiales 2D (*Fig. 17*). En concreto, se optimizó la concentración del material 2D para obtener la mayor capacidad de extinción.

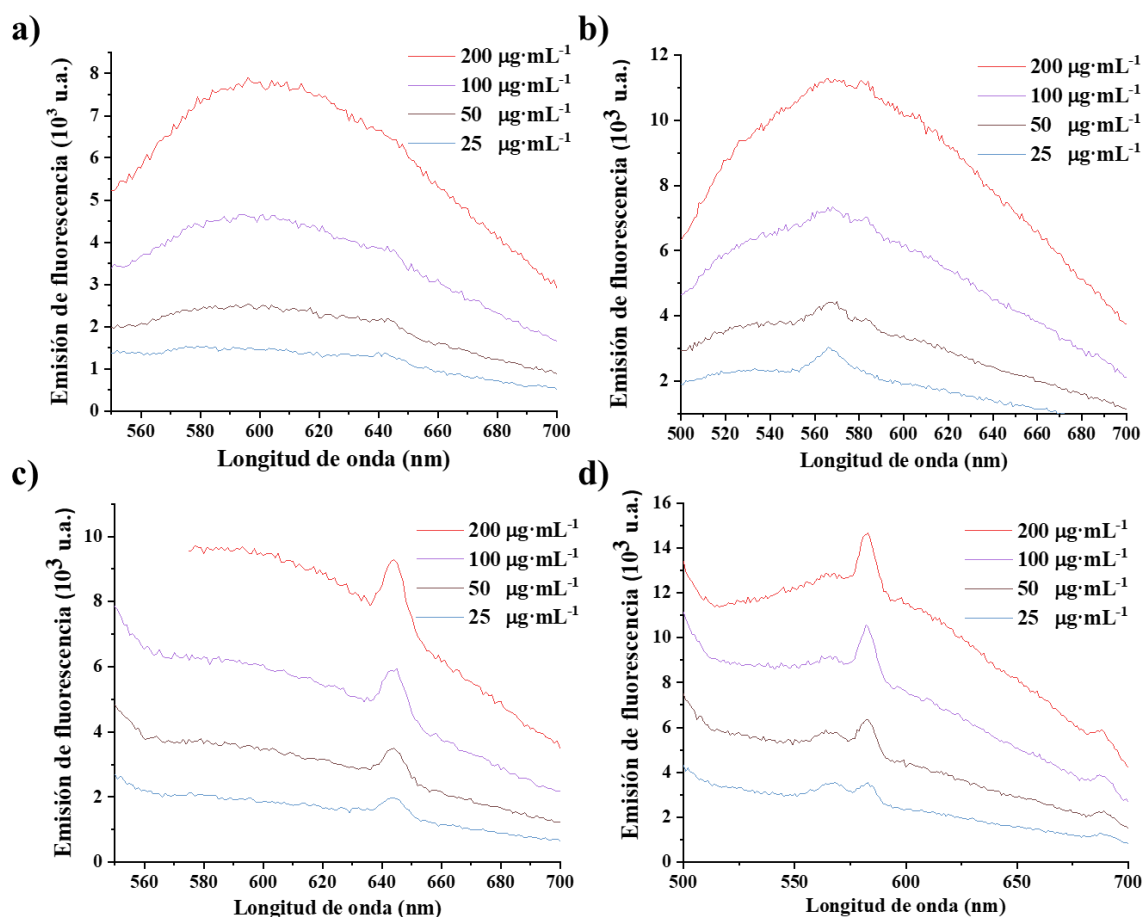
La extinción de la fluorescencia basada en FRET observada en los sistemas estudiados en este proyecto es el resultado de dos procesos: *i*) la fuerte adsorción hidrofóbica de los fluoróforos orgánicos (como Cy3, FAM, etc.) a la superficie de los materiales 2D y, *ii*) la inmovilización del ADNmc sobre los materiales 2D mediante interacciones no covalentes.<sup>24,31</sup>



**Figura 16.** Representación esquemática de la adsorción del ADNmc marcado fluorescentemente sobre el material 2D. Se muestra la extinción de la fluorescencia del fluoróforo mediante FRET.

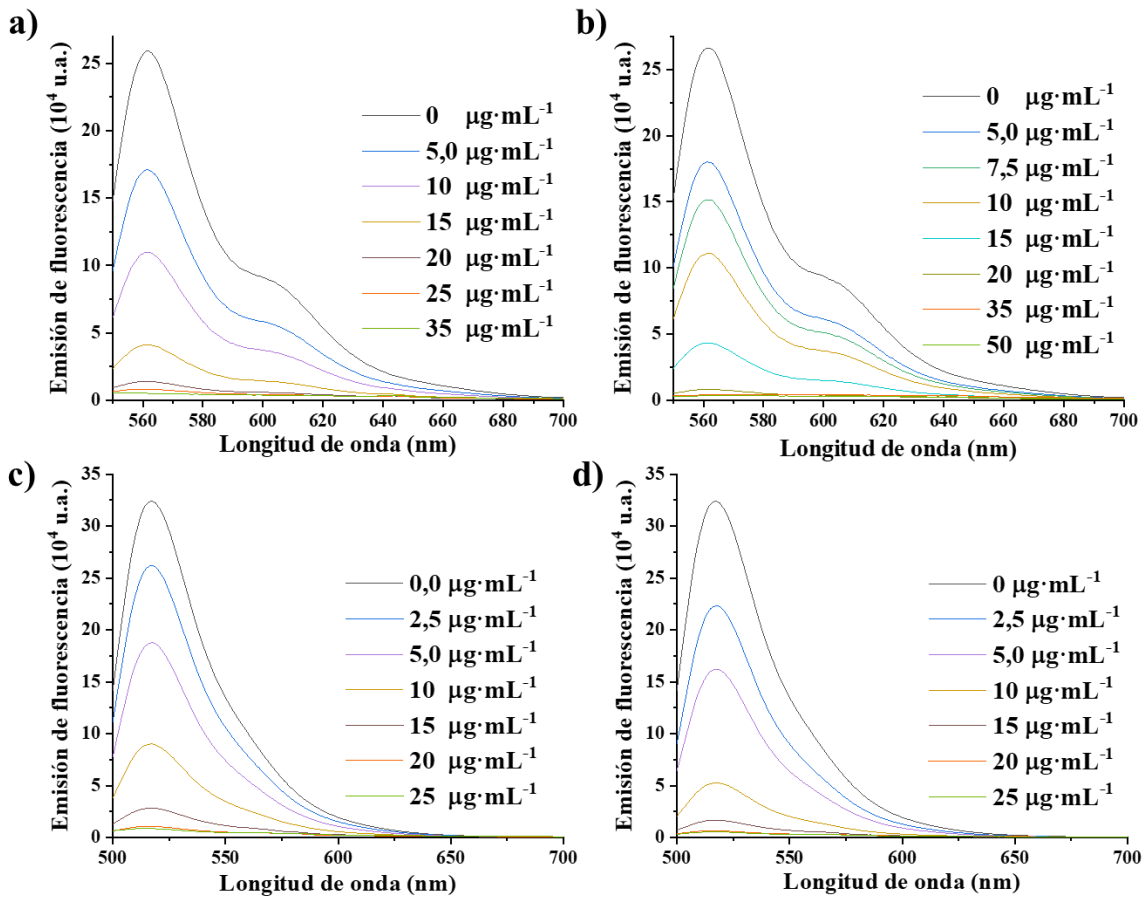
##### 4.2.1.1. Ensayos con us-GO y l-GO

En la *Fig. 18* se recogen los espectros de emisión de fluorescencia del us-GO y l-GO a diferentes concentraciones ( $25\text{-}200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Fueron registrados a  $525\ \text{nm}$  (*Fig. 18a* y *Fig. 18c*),  $\lambda_{\text{exc}}$  de Cy3, y a  $475\ \text{nm}$  (*Fig. 18b* y *Fig. 18d*),  $\lambda_{\text{exc}}$  de FAM. Estas medidas se realizaron para confirmar que la emisión de fluorescencia del l-GO y us-GO no interfiere con el máximo de emisión de los fluoróforos Cy3 y FAM.



**Figura 17.** Espectros de fluorescencia del a) us-GO y c) l-GO a diferentes concentraciones a  $\lambda_{exc}=525$  nm, y del b) us-GO y d) l-GO a diferentes concentraciones a  $\lambda_{exc}=475$  nm.

Para evaluar la capacidad de extinción de la fluorescencia del us-GO y l-GO, se realizaron medidas de la fluorescencia emitida por distintas sondas de ADNmc marcadas fluorescentemente (*Tabla 1*) en presencia de concentraciones crecientes de ambos materiales 2D (apartado 3.4.). Los espectros de emisión de fluorescencia completos se recogen en las *Fig. 19a-b* (para P1), y *Fig. 19c-d* (para P2). En todos los casos se observó una extinción de la fluorescencia dependiente de la proporción entre la concentración de sonda fluorescente y el derivado de GO utilizado.



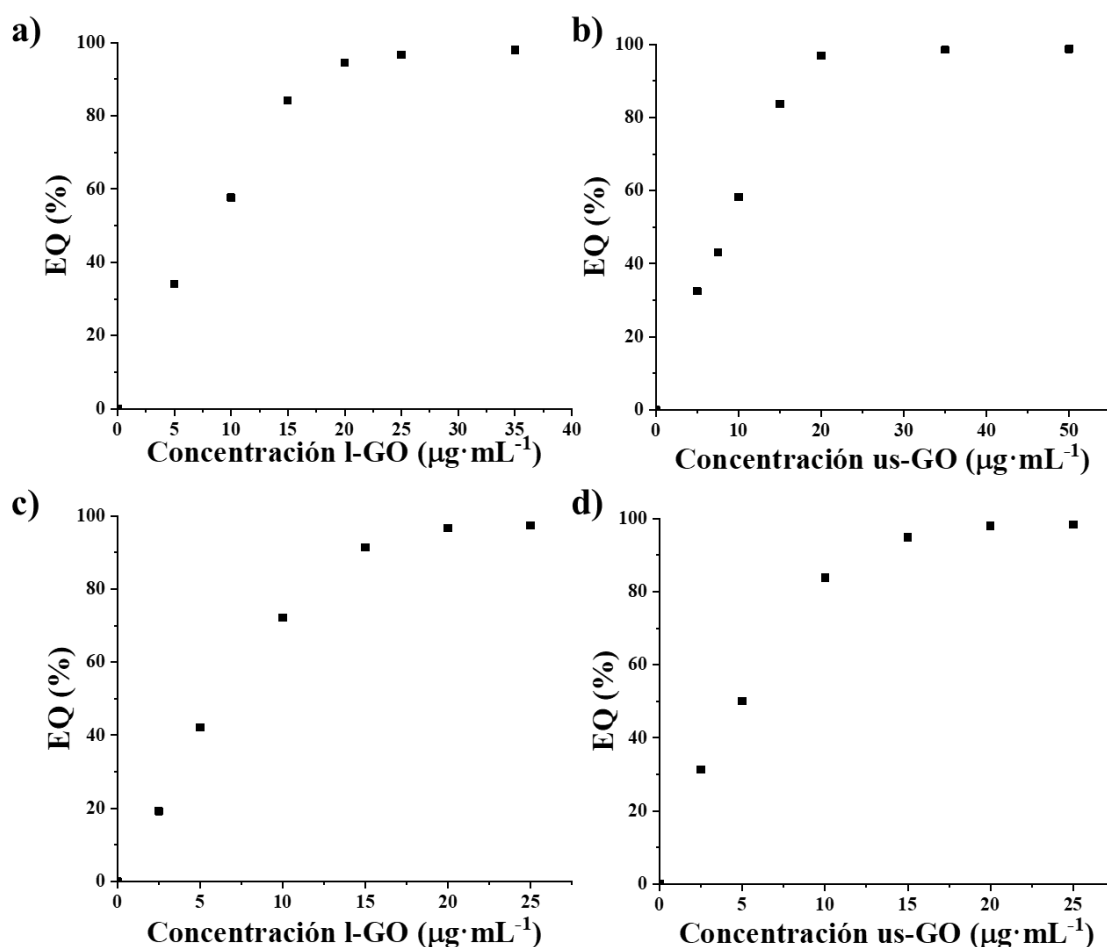
**Figura 18.** Espectro de emisión de fluorescencia de (a, b) P1 (50 nM) en presencia de diferentes concentraciones de (a) l-GO y (b) us-GO ( $\lambda_{exc}=525$  nm) y (c, d) P2 (50 nM) en presencia de diferentes concentraciones de (c) l-GO y (d) us-GO ( $\lambda_{exc} = 475$  nm). En (c) y (d) se representa el valor medio de tres réplicas para cada concentración.

Con el fin de obtener una extinción eficiente usando la mínima cantidad de los derivados de GO (us-GO o l-GO), se calculó la eficiencia de extinción (EQ) usando la Ec. 2<sup>17,30</sup>:

$$EQ (\%) = \frac{F_0 - F}{F_0} \cdot 100 \quad Ec. 2,$$

donde  $F_0$  es la emisión de fluorescencia del ADNmc sustrato en el tampón de reacción, y  $F$  es la emisión de fluorescencia del ADNmc sustrato en el tampón de reacción tratado con el GO correspondiente. La concentración final del ADNmc sustrato empleada para registrar la fluorescencia fue de 50 nM.

La representación de EQ para us-GO y l-GO con P1 y P2 se muestran en la Fig. 20. Se observó que EQ aumenta gradualmente al incrementarse la concentración de ambos derivados de GO, tanto en el caso de P1 (Fig. 20a-b) como de P2 (Fig. 20c-d), hasta alcanzar un *plateau*.



**Figura 20.** EQ de la fluorescencia de (a, b) P1 (50 nM) con distintas concentraciones de (a) l-GO y (b) us-GO (~560 nm) y (c, d) P2 con distintas concentraciones de (c) l-GO y (d) us-GO (~517 nm). En (c) y (d) se representa el valor medio de tres réplicas para cada concentración.

Atendiendo a la *Fig. 21 (Anexos)* se seleccionaron las concentraciones de extinción de los derivados de GO que fueron empleadas posteriormente en los sistemas de detección óptica de ADN (*Tabla 4*).

**Tabla 4.** Concentraciones de extinción de los derivados de GO usadas posteriormente en los sistemas de detección óptica de ADN.

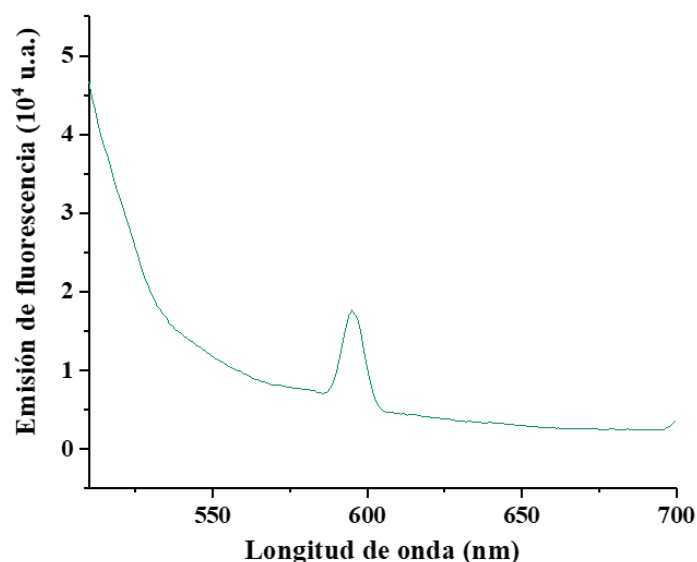
	Concentración l-GO ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Concentración us-GO ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
<b>Sistemas con P1</b>	20	19
<b>Sistemas con P2</b>	16	14

Con ellas, EQ fue superior al 90%. Se aprecia una pequeña diferencia en la capacidad de extinción de la fluorescencia entre ambos materiales, siendo ligeramente más eficiente el us-GO, independientemente de la sonda de ADNmc usada.

Se hipotetizó que estos resultados podían deberse a una mayor solubilidad del us-GO, consecuencia de su menor tamaño y mayor presencia de grupos oxigenados superficiales. Esto podría favorecer la interacción que se produce entre las bases nitrogenadas del ADNmc y el GO a través de puentes de hidrógeno. Sin embargo, no existen muchos estudios sobre este tipo de interacciones, por lo que es necesario seguir investigando para ampliar el conocimiento sobre ellas.

#### 4.2.1.2. Ensayos con Exf-MoS<sub>2</sub>

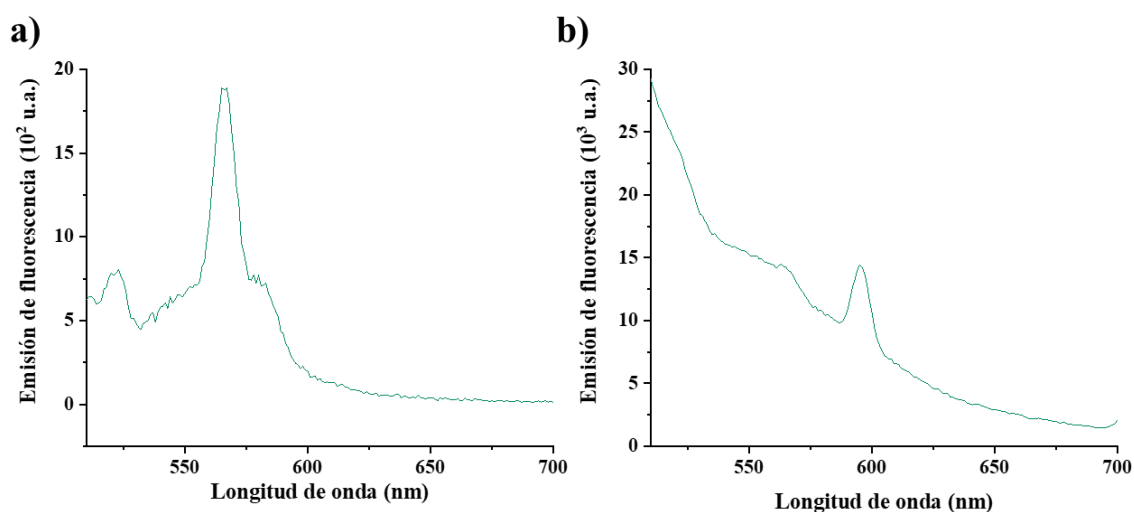
En la *Fig. 22* se recoge el espectro de emisión de fluorescencia ( $\lambda_{exc} = 485$  nm) de una suspensión de Exf-MoS<sub>2</sub> enriquecida en agua (0,17 mg·mL<sup>-1</sup>). Previamente a ser registrado, se centrifugó la muestra para minimizar la señal de fondo. Se observa la presencia de una impureza que interfiere con el máximo de emisión del fluoróforo FAM (~ 510-520 nm) y que se incrementa con el tiempo.



**Figura 19.** Espectro de fluorescencia de una suspensión de Exf-MoS<sub>2</sub> enriquecida en agua (0,17 mg·mL<sup>-1</sup>) después de ser centrifugada.  $\lambda_{exc} = 485$  nm.

Con el objetivo de intentar descubrir el origen de dicha impureza, se registró, a la misma  $\lambda_{exc}$ , la fluorescencia de la mezcla *i*PrOH/H<sub>2</sub>O 7:3 (v/v) (*Fig. 23a*). Los picos observados no concuerdan con los de la impureza. Por tanto, no se deben a la presencia de impurezas en los disolventes usados. También se registró la fluorescencia de una disolución de MoS<sub>2</sub> en polvo sin exfoliar en la misma mezcla de disolventes (previa centrifugación de la muestra) (*Fig. 23b*). En este caso, la emisión de fluorescencia se asemeja a la detectada

en la Fig. 22. Este resultado parece indicar que la impureza procede del propio material 2D.



**Figura 20.** Espectro de fluorescencia de **a)** mezcla *i*PrOH/H<sub>2</sub>O 7:3 (v/v) y **b)** una disolución de MoS<sub>2</sub> en polvo no exfoliado en la misma mezcla de disolventes (previa centrifugación de la muestra).  $\lambda_{exc}=485$  nm.

Para tratar de solventar este problema, se llevó a cabo una serie de lavados con agua Milli-Q. Se observó que, al lavar el material, la señal de la impureza desaparecía casi por completo. Por tanto, se concluyó que era soluble en agua. Sin embargo, si la disolución acuosa de Exf-MoS<sub>2</sub> se usaba tras haber estado almacenada durante un tiempo, no necesariamente largo, dicha señal aparecía de nuevo. En concreto, se observó tras unas 24h en almacenamiento después de haber sido sometida a los lavados. Estos resultados parecían indicar inestabilidad del Exf-MoS<sub>2</sub> en la mezcla acuosa. Esta inestabilidad podía estar provocada por un fenómeno de oxidación.

Por todo lo expuesto, se concluyó que el MoS<sub>2</sub> no era un material 2D adecuado para actuar como plataforma de detección óptica, al contrario de lo que indicaban estudios previos.

#### 4.2.2. Detección óptica de ADN por fluorescencia

A continuación, se evaluó el rendimiento de detección fluorescente de ADN de los sistemas basados en materiales 2D derivados de GO. El Exf-MoS<sub>2</sub> se descartó debido a los problemas de estabilidad que mostró.

Existen dos posibles enfoques para abordar este estudio: estrategia pre-mezcla y estrategia post-mezcla. Sin embargo, trabajos previos indican que el protocolo pre-mezcla presenta una cinética más lenta como consecuencia de la existencia de procesos de

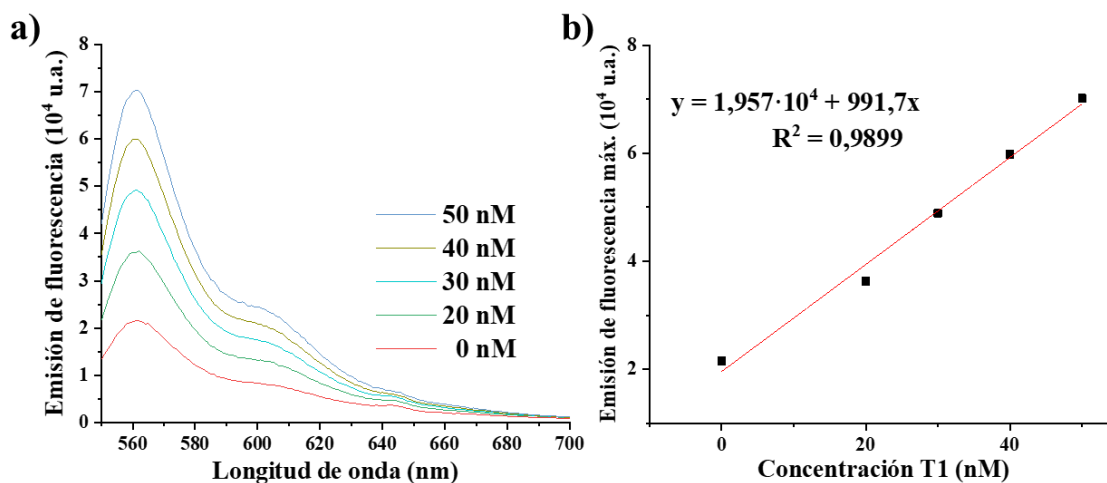


competencia: *i*) el proceso de adsorción ADNmc/GO por interacciones de apilamiento  $\pi$ - $\pi$  y/o enlaces de hidrógeno entre las nucleobases del ADNmc y las celdas hexagonales del GO, y *ii*) la hibridación de la sonda monocatenaria con su secuencia complementaria por emparejamiento específico de bases.<sup>5</sup> Por este motivo, se optó por la estrategia post-mezcla.

Inicialmente, se llevó a cabo la detección de la monohebra T1 utilizando el nanomaterial l-GO y la hebra complementaria P1 marcada fluorescentemente (*Tabla 1*). Se añadieron concentraciones crecientes de T1 (0-50 nM) a una disolución de P1 (50 nM). Entonces, la disolución del dúplex P1/T1 se incubó con l-GO ( $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Al registrar la fluorescencia de la disolución resultante, se observó un incremento gradual de la señal de emisión con la concentración de T1 (*Fig. 24a*). La relación lineal entre la intensidad máxima de fluorescencia de P1 y la concentración de T1 puede expresarse como

$$F=1,957 \cdot 10^4 + 991,7C$$

con un coeficiente de correlación  $R^2 = 0,9899$ , donde  $F$  es la emisión de fluorescencia y  $C$  es la concentración de T1 (*Fig. 24b*).

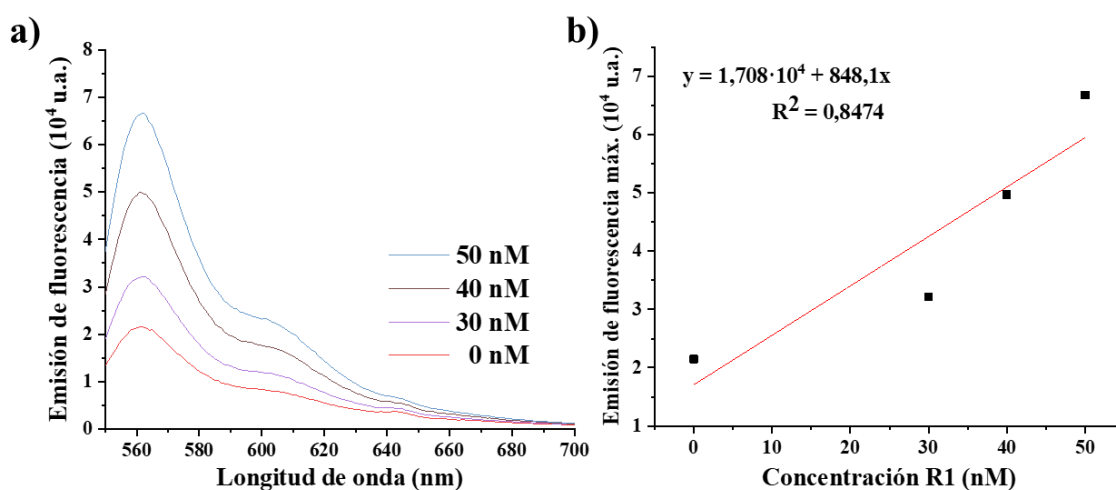


**Figura 21.** a) Espectro de fluorescencia para P1 (50 nM) en presencia de T1 a distintas concentraciones en una suspensión de l-GO ( $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).  $\lambda_{\text{exc}}=525 \text{ nm}$ . b) Regresión lineal de la intensidad de fluorescencia de P1 (562 nm) en función de la concentración de T1.

Aunque se obtuvo una correlación lineal aceptable, los valores máximos de fluorescencia obtenidos para concentraciones elevadas de T1 fueron bajos. Se esperaría que para concentraciones equimolares de T1 y P1 (50 nM:50 nM) alcanzase valores próximos a

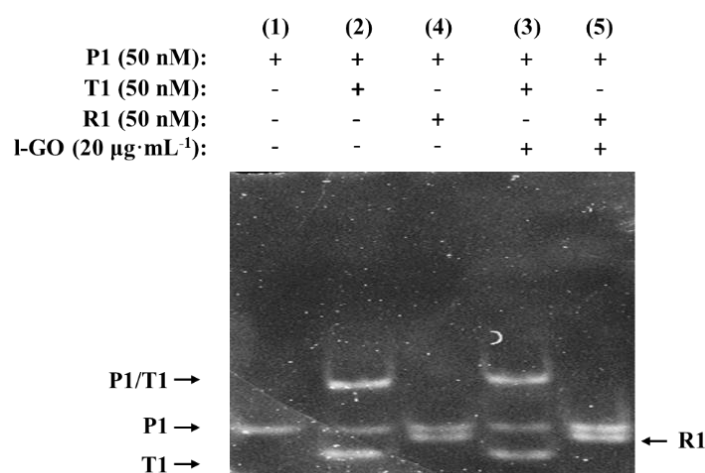
los registrados para la disolución de P1 (50 nM) (Fig. 19a). Sin embargo, la fluorescencia emitida fue un ~28% de la esperada.

Con el objetivo de evaluar la selectividad del sistema de detección de ADN propuesto con P1, se llevó a cabo un experimento de control añadiendo concentraciones crecientes de ADN no complementario R1 (Tabla 1) en lugar de T1.<sup>17</sup> Para concentraciones equimolares de P1 y R1 (50 nM:50 nM) la emisión de fluorescencia (Fig. 25a) apenas difirió de la registrada para T1.



**Figura 22. a)** Espectro de fluorescencia para P1 (50 nM) en presencia de varias concentraciones de R1 tras la incubación con l-GO (20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).  $\lambda_{\text{exc}}=525$  nm. **b)** Representación de la intensidad de fluorescencia de P1 (562 nm) frente a la concentración de R1.

Estos resultados sugerían que, para las secuencias P1 y T1, en teoría complementarias, no se estaba produciendo una hibridación efectiva. Esta hipótesis se comprobó mediante la realización de un EMSA (apartado 3.5.1.). Se estudiaron las siguientes condiciones (Fig. 26): P1 (50 nM), (1); P1 (50 nM) junto con T1 (50 nM) en ausencia y presencia de l-GO (20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), (2) y (3), respectivamente; y P1 (50 nM) junto con R1 (50 nM) en ausencia y presencia de l-GO (20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), (4) y (5), respectivamente. Se observa que, para una concentración equimolar de P1 y T1 (2), se produjo la formación del dúplex P1/T1, pero todavía se observa una cantidad significativa de P1 libre no hibridado. Además, se comprobó que P1 y R1 eran secuencias no complementarias dada la ausencia de formación de bihebra (4). Estos mismos resultados se obtuvieron en presencia de l-GO (3, 5).



**Figura 23.** Ensayo EMSA realizado para comprobar la complementariedad de bases entre las secuencias P1 y T1, así como P1 y R1, en ausencia y presencia del material 2D l-GO. Se empleó la concentración de extinción del l-GO. +: presencia; -: ausencia

Se concluyó que existía un problema de complementariedad de bases entre P1 y T1 que derivaba en una hibridación parcial, probablemente debido a un error en sus secuencias. Por tanto, se consideró que el sistema sensor constituido por ambas secuencias no era adecuado.

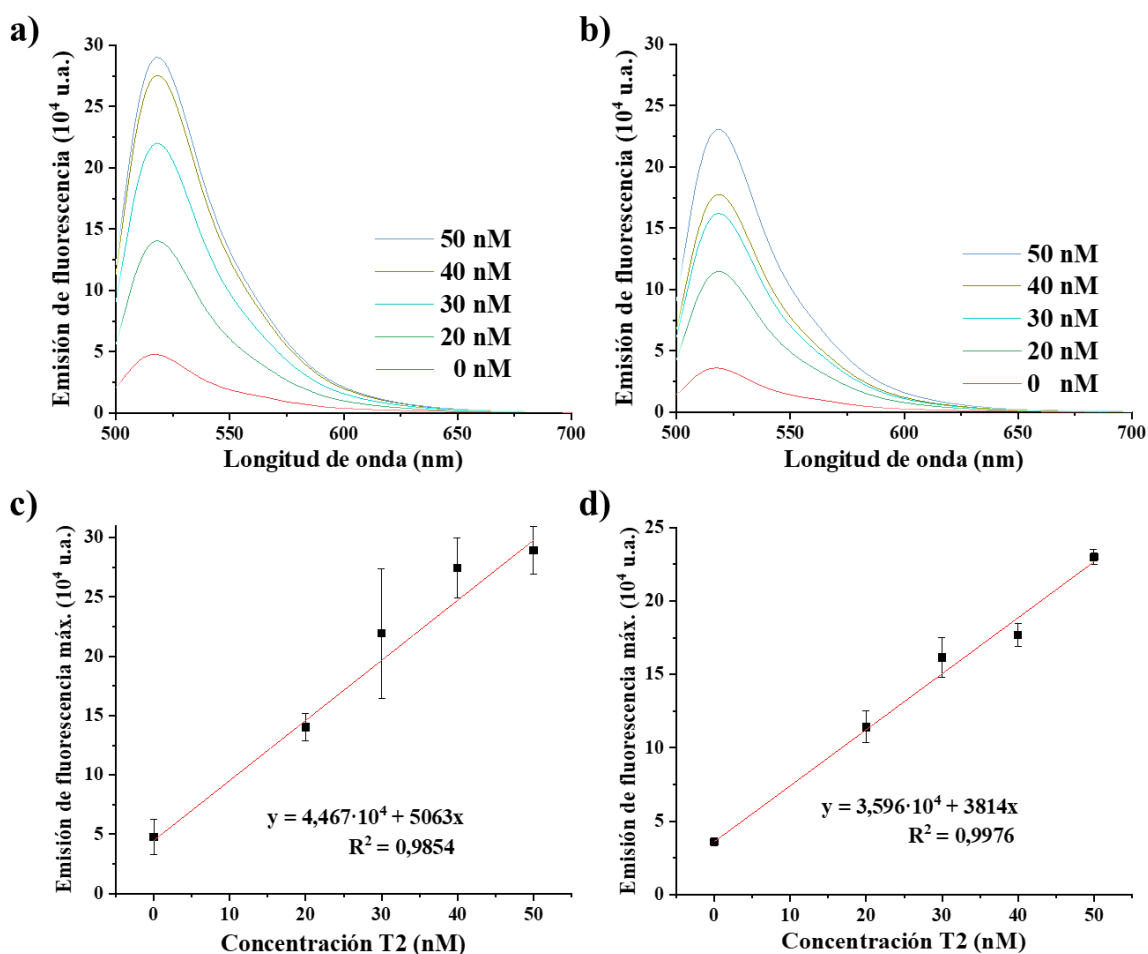
Para tratar de solventar esta situación, se recurrió al empleo de secuencias de ADN con un menor número de nucleótidos y usadas previamente de manera exitosa en el diseño de biosensores: P2 y T2 (*Tabla 1*).<sup>5</sup> Se repitió la estrategia post-mezcla, usando ambos derivados de GO, us-GO y l-GO. Después de incubar las soluciones del dúplex P2/T2 con l-GO ( $16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), se detectó un incremento gradual de la emisión de fluorescencia junto con el aumento de la concentración T2 (*Fig. 27a*). En el caso del us-GO ( $14 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), se observó el mismo patrón (*Fig. 27b*).

Para determinar la linealidad entre T2 y la emisión de fluorescencia máxima, se construyó la regresión lineal para las distintas concentraciones de T2 (*Fig. 27c-d*). En ambos casos el aumento de la intensidad de fluorescencia mostró una dependencia lineal con la concentración de T2 (0-50 nM).

El límite de detección (LOD) para T2 en los sistemas de reacción (*Tabla 5*) se estimó según la regla  $3\sigma$  (*Ec. 3*),

$$LOD = \frac{3\sigma}{S} \quad \text{Ec. 3,}$$

donde  $\sigma$  es la desviación estándar de la señal del blanco y  $S$  la pendiente de la curva estándar.<sup>41</sup>



**Figura 24.** a, b) Espectro de fluorescencia para P2 (50 nM) en presencia de varias concentraciones de T2 tras la incubación con una disolución de (a) l-GO (16  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y (b) us-GO (14  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).  $\lambda_{\text{exc}}=475$  nm. c, d) Regresión lineal de la intensidad de fluorescencia de P2 (517 nm) en función de la concentración de T2 en presencia de (c) l-GO (16  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y (d) us-GO (14  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Barras de error:  $\sigma$  de tres réplicas para cada concentración.

**Tabla 5.** Valores de LOD y sensibilidad para los sistemas que usan como plataforma de detección óptica de T2 los materiales 2D derivados del GO.

	<b>l-GO</b>	<b>us-GO</b>
<b>LOD (nM)</b>	8,713	1,704
<b>Sensibilidad (<math>\text{nM}^{-1}</math>)</b>	5063	3814

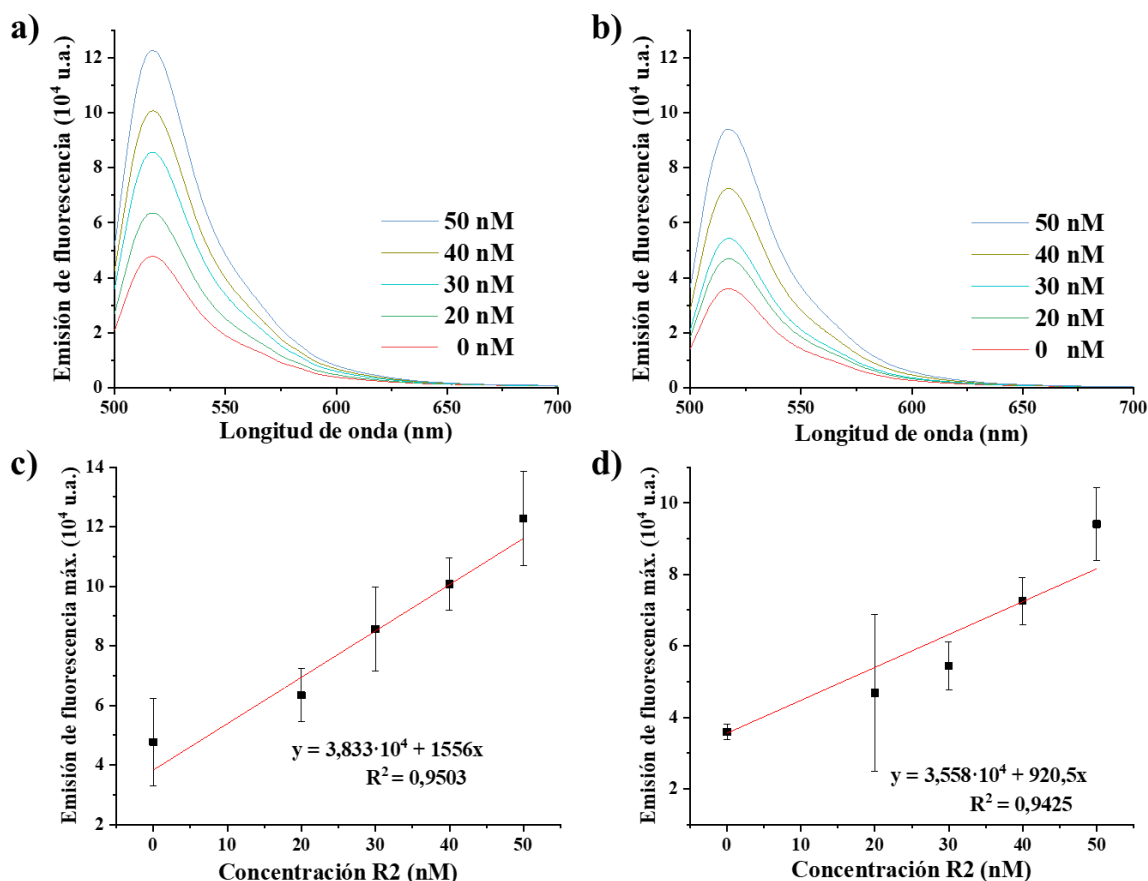
Se observa que para el mismo rango de concentraciones de T2, es más sensible el sistema sensor basado en l-GO (Tabla 5, Fig. 27). En este sistema, para concentraciones equimolares de P2 y T2 (50 nM:50 nM), la fluorescencia emitida fue un ~89% de la

esperada, es decir, con respecto a la registrada para la disolución de P2 (50 nM) (*Fig. 19c*). Sin embargo, para el sistema basado en us-GO fue un ~71% (*Fig. 19d*).

De lo expuesto se puede deducir que la afinidad de unión del ADNmc al GO es significativamente mayor que la del ADNbc y que, además, las nucleobases no apareadas del ADN juegan un papel clave en su grado de adsorción a la superficie del material 2D, tal como demostraron estudios previos.<sup>42</sup>

En el ADNbc las nucleobases se encuentran protegidas dentro de la estructura helicoidal que forman los grupos fosfato. Esto aporta rigidez a la estructura del dúplex, originando un mayor impedimento y, por ende, debilitando la adsorción al GO, probablemente a causa de la interrupción de las interacciones hidrofóbicas.<sup>31,43</sup> De hecho, aunque la interacción entre los grupos hidroxilos del GO y los grupos fosfato del ADNbc es posible, en una simulación de dinámica molecular llevada a cabo por Shijiang *et al.* únicamente se observó un leve enlace de hidrógeno entre ellos, incapaz de mantener su integridad a temperatura ambiente y en solución acuosa. De este modo, el ADNbc permanece libre, no unido a la superficie del material 2D, originando un incremento de la intensidad de fluorescencia. Cabe mencionar que, aunque las nucleobases del ADNmc pueden interaccionar de forma estable con la estructura aromática del GO, la unión es no covalente. Por tanto, ante procesos de competencia externa, como la hibridación específica de secuencia, su separación se vería favorecida.<sup>5</sup>

En este caso también se evaluó la selectividad del sistema de detección de ADN propuesto con P2 a través de ensayos de control siguiendo la estrategia post-mezcla. Se probaron concentraciones crecientes del ADN no complementario R2 (*Tabla 1*). Para concentraciones equimolares de P2 y R2 (50 nM:50 nM), la intensidad de fluorescencia recuperada suponía aproximadamente el 40% de la registrada para T2, tanto al usar l-GO como us-GO (*Fig. 28a* y *Fig. 28b*, respectivamente). Esta emisión de fluorescencia remanente podría explicarse en base al desplazamiento inespecífico de P2 por R2. Dado que el ADNmc marcado interacciona de manera no covalente con la estructura aromática del GO, podría producirse adsorción de R2 y desorción de P2 por repulsión electrostática del ADN.<sup>33,43</sup>



**Figura 28.** a, b) Espectro de fluorescencia para P2 (50 nM) en presencia de varias concentraciones de R2 tras la incubación con una disolución de (a) l-GO (16  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y (b) us-GO (14  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).  $\lambda_{\text{exc}}=475$  nm. c, d) Regresión lineal de la intensidad de fluorescencia de P2 (517 nm) en función de la concentración de R2 en presencia de (c) l-GO (16  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y (d) us-GO (14  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Barras de error:  $\sigma$  de tres réplicas para cada concentración.

Para determinar la linealidad entre R2 y la emisión de fluorescencia máxima, se construyó la regresión lineal para las distintas concentraciones de R2 (Fig. 28c-d). En ambos casos el aumento de la intensidad de fluorescencia mostró una dependencia lineal con la concentración de R2 (0 nM-50 nM). El LOD para R2 en los sistemas de reacción (estimados según la Ec. 3), así como la sensibilidad de las plataformas, se indican en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Valores de LOD y sensibilidad para los sistemas que usan como plataforma de detección óptica de R2 los materiales 2D derivados del GO.

	l-GO	us-GO
LOD R2 (nM)	28,34	7,061
Sensibilidad ( $\text{nM}^{-1}$ )	1556	920,5

Los resultados (*Tabla 5* y *Tabla 6*) sugieren que la estrategia planteada posee buena sensibilidad. El siguiente paso sería el estudio de su capacidad de detección del mismo ADN en matrices más complejas. Además, en un futuro se debería estudiar su selectividad en presencia de otros ADNs y su aplicación en la detección de secuencias más extensas.

Aunque existen diferencias entre el l-GO y us-GO, sustancialmente no son muy diversos en cuanto a su capacidad de detección en este tipo de sensores ópticos. Gracias a la caracterización físico-química, se ha visto que el principal parámetro diferenciador entre ambos materiales derivados de GO es la dimensionalidad -  $\sim 131$  nm y  $1,61 \mu\text{m} - 610$  nm, para el us-GO y l-GO, respectivamente-. No obstante, los resultados parecen indicar que una variación en la dimensión de los materiales 2D no es relevante para el estudio desarrollado. Así, ambos materiales podrían ser adecuados para la construcción de este tipo de sensores.

## CONCLUSIONES

---

En vista de los resultados obtenidos y atendiendo a los objetivos específicos propuestos, se concluye lo siguiente:

- Se han sintetizado los materiales 2D correspondientes usando una aproximación sintética descendente en fase líquida. El Exf-MoS<sub>2</sub> se ha sintetizado directamente a partir del mineral laminar mediante LPE. El us-GO se ha sintetizado a partir de un l-GO preparado previamente a partir de láminas de grafito y usando una variación del método de Hummers.
- La caracterización por espectroscopía UV/Vis, TEM y espectroscopía Raman confirmó la estructura del Exf-MoS<sub>2</sub>. La caracterización por espectroscopía UV/Vis, espectroscopía Raman, FT-IR, TGA, XPS, TEM y/o AFM permitió la caracterización físico-química del us-GO y l-GO, permitiendo su diferenciación.
- Los derivados del GO mostraron una capacidad de extinción de la fluorescencia eficiente, siendo ligeramente superior en el us-GO (independientemente de la sonda de ADNmc usada). Se hipotetizó que podía deberse a una mayor solubilidad del us-GO. El Exf-MoS<sub>2</sub> no es adecuado para ser usado como plataforma de detección óptica debido a su inestabilidad en agua.
- El sistema P2/T2 muestra un incremento de la emisión de fluorescencia linealmente dependiente de la concentración de T2. La emisión de fluorescencia registrada para P2/T2 y P2/R2 difiere en aproximadamente un 60%, independientemente del derivado de GO usado. Los resultados sugieren que la estrategia planteada podría usarse para detectar ADN diana en muestras con cierta complejidad.

Debido a la duración limitada del proyecto, no se ha podido optimizar en profundidad el diseño de las plataformas basadas en materiales 2D derivados del GO. Tampoco se han podido explorar vías alternativas para la construcción de sensores basados en el MoS<sub>2</sub>. De cara a continuar en esta línea de investigación, se propone la optimización de los biosensores desarrollados con éxito y su posterior aplicación para la detección óptica de lncRNAs, potenciales biomarcadores de enfermedades como el cáncer, que presentan una estructura molecular más compleja.



## CONCLUSIÓNS

---

En vista dos resultados obtidos e atendendo aos obxectivos específicos propostos, conclúese o seguinte:

- Os materiais 2D foron sintetizados usando unha aproximación sintética descendente en fase líquida. O Exf-MoS<sub>2</sub> foi sintetizado directamente a partir do mineral laminar mediante LPE. O us-GO foi sintetizado a partir dun l-GO preparado previamente a partir de láminas de grafito e empregando unha variación do método de Hummers.
- A caracterización por espectroscopía UV/Vis, TEM e espectroscopía Raman confirmou a estrutura do Exf-MoS<sub>2</sub>. A caracterización por espectroscopía UV/Vis, espectroscopía Raman, FT-IR, TGA, XPS, TEM e/ou AFM permitiu a caracterización físico-química do us-GO e l-GO, permitindo a súa diferenciación.
- Os derivados do GO mostraron unha capacidade de extinción da fluorescencia eficiente, sendo lixeiramente superior no us-GO (independentemente da sonda de ADNmc usada). Crese que pode deberse a unha maior solubilidade do us-GO. O Exf-MoS<sub>2</sub> non é axeitado para empregarse como plataforma de detección óptica debido á súa inestabilidade en auga.
- O sistema P2/T2 mostra un incremento da emisión de fluorescencia linealmente dependente da concentración de T2. A emisión de fluorescencia rexistrada para P2/T2 e P2/R2 difire en aproximadamente un 60%, independentemente do derivado de GO empregado. Os resultados suxiren que a estratexia exposta podería usarse para detectar ADN diana en mostras con certa complexidade.

Debido á duración limitada do proxecto, non se puido optimizar en profundidade o deseño das plataformas baseadas en materiais 2D derivados do GO. Tampouco se puideron explorar vías alternativas para a construción de sensores baseados no MoS<sub>2</sub>. Para continuar nesta liña de investigación, propónse a optimización dos biosensores desenvolvidos con éxito e a súa posterior aplicación para a detección óptica de lncRNAs, potenciais biomarcadores de enfermidades como o cancro, que presentan unha estrutura molecular máis complexa.

## CONCLUSIONS

---

In view of the results obtained and attending to the specific objectives proposed, we conclude the following:

- 2D materials have been synthesized using a liquid-phase top-down synthetic approach. The Exf-MoS<sub>2</sub> has been synthesized directly from the lamellar mineral using LPE. The us-GO has been synthesized from a previously prepared l-GO from graphite sheets and using a variation of Hummers' method.
- Characterization by UV/Vis spectroscopy, TEM and Raman spectroscopy confirmed the structure of Exf-MoS<sub>2</sub>. Characterization by UV/Vis spectroscopy, Raman spectroscopy, FT-IR, TGA, XPS, TEM and/or AFM allowed the physicochemical characterization of us-GO and l-GO, allowing their differentiation.
- The GO derivatives showed efficient fluorescence quenching ability, being slightly higher in us-GO (irrespective of the mcDNA probe used). It was hypothesized that this could be due to a higher solubility of us-GO. Exf-MoS<sub>2</sub> is not suitable for use as an optical detection platform due to its instability in water.
- The P2/T2 system shows an increase in fluorescence emission linearly dependent on T2 concentration. The fluorescence emission recorded for P2/T2 and P2/R2 differs by approximately 60%, regardless of the GO derivative used. The results suggest that the proposed strategy could be used to detect target DNA in samples with some complexity.

Due to the limited duration of the project, it has not been possible to optimize in depth the design of the platforms based on GO-derived 2D materials. It has also not been possible to explore alternative avenues for the construction of MoS<sub>2</sub>-based sensors. In order to continue in this line of research, we propose the optimization of the successfully developed biosensors and their subsequent application for the optical detection of lncRNAs, potential biomarkers of diseases such as cancer, which present a more complex molecular structure.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- (1) Chimene, D.; Alge, D. L.; Gaharwar, A. K. Two-Dimensional Nanomaterials for Biomedical Applications: Emerging Trends and Future Prospects. *Adv. Mater.* **2015**, *27* (45), 7261–7284. DOI: 10.1002/adma.201502422
- (2) Liu, T.; Liu, Z. 2D MoS<sub>2</sub> Nanostructures for Biomedical Applications. *Adv. Healthc. Mater.* **2017**, *7* (8), 1701158. DOI: 10.1002/adhm.201701158
- (3) Pasinszki, T.; Krebsz, M.; Tung, T. T.; Losic, D. Carbon Nanomaterial Based Biosensors for Non-Invasive Detection of Cancer and Disease Biomarkers for Clinical Diagnosis. *Sensors* **2017**, *17* (8), 1919. DOI: 10.3390/s17081919
- (4) Lu, C.; Yang, H.; Zhu, C.; Chen, X.; Chen, G. A Graphene Platform for Sensing Biomolecules. *Angew. Chem.* **2009**, *121* (26), 4879–4881. DOI: 10.1002/ange.200901479
- (5) He, S.; Song, B.; Li, D.; Zhu, C.; Qi, W.; Wen, Y.; Wang, L.; Song, S.; Fang, H.; Fan, C. A Graphene Nanoprobe for Rapid, Sensitive, and Multicolor Fluorescent DNA Analysis. *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20* (3), 453–459. DOI: 10.1002/adfm.200901639
- (6) Zhang, H. Ultrathin Two-Dimensional Nanomaterials. *ACS Nano* **2015**, *9* (10), 9451–9469. DOI: 10.1021/acsnano.5b05040
- (7) Novoselov, K. S.; Geim, A. K.; Morozov, S. V.; Jiang, D.; Zhang, Y.; Dubonos, S. V.; Grigorieva, I. V.; Firsov, A. A. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. *Science* **2004**, *306* (5696), 666–669. DOI: 10.1126/science.1102896
- (8) Zhang, H.; Zhang, H.; Aldalbahi, A.; Zuo, X.; Fan, C.; Mi, X. Fluorescent Biosensors Enabled by Graphene and Graphene Oxide. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *89*, 96–106. DOI: 10.1016/j.bios.2016.07.030
- (9) Zhou, K.-G.; Mao, N.-N.; Wang, H.-X.; Peng, Y.; Zhang, H.-L. A Mixed-Solvent Strategy for Efficient Exfoliation of Inorganic Graphene Analogues. *Angew. Chem.* **2011**, *123* (46), 11031–11034. DOI: 10.1002/ange.201105364
- (10) Bianco, A.; Cheng, H.-M.; Enoki, T.; Gogotsi, Y.; Hurt, R. H.; Koratkar, N.;

- Kyotani, T.; Monthieux, M.; Park, C. R.; Tascon, J. M. D.; Zhang, J. All in the Graphene Family – A Recommended Nomenclature for Two-Dimensional Carbon Materials. *Carbon* **2013**, *65*, 1–6. DOI: 10.1016/j.carbon.2013.08.038
- (11) Wick, P.; Louw-Gaume, A. E.; Kucki, M.; Krug, H. F.; Kostarelos, K.; Fadeel, B.; Dawson, K. A.; Salvati, A.; Vázquez, E.; Ballerini, L.; Tretiach, M.; Benfenati, F.; Flahaut, E.; Gauthier, L.; Prato, M.; Bianco, A. Classification Framework for Graphene-Based Materials. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (30), 7714–7718. DOI: 10.1002/anie.201403335
- (12) Reina, G.; González-Domínguez, J. M.; Criado, A.; Vázquez, E.; Bianco, A.; Prato, M. Promises, Facts and Challenges for Graphene in Biomedical Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (15), 4400–4416. DOI: 10.1039/C7CS00363C
- (13) Rodrigues, A. F.; Newman, L.; Lozano, N.; Mukherjee, S. P.; Fadeel, B.; Bussy, C.; Kostarelos, K. A Blueprint for the Synthesis and Characterisation of Thin Graphene Oxide with Controlled Lateral Dimensions for Biomedicine. *2D Mater.* **2018**, *5* (3), 035020. DOI: 10.1088/2053-1583/aac05c
- (14) *Graphene Oxide: Fundamentals and Applications*; Dimiev, A. M., Eigler, S., Eds.; Wiley, 2017.
- (15) Eigler, S.; Hirsch, A. Chemistry with Graphene and Graphene Oxide-Challenges for Synthetic Chemists. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (30), 7720–7738. DOI: 10.1002/anie.201402780
- (16) Nanda, S. S.; Papaefthymiou, G. C.; Yi, D. K. Functionalization of Graphene Oxide and Its Biomedical Applications. *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* **2015**, *40* (5), 291–315. DOI: 10.1080/10408436.2014.1002604
- (17) Xi, Q.; Zhou, D.-M.; Kan, Y.-Y.; Ge, J.; Wu, Z.-K.; Yu, R.-Q.; Jiang, J.-H. Highly Sensitive and Selective Strategy for MicroRNA Detection Based on WS<sub>2</sub> Nanosheet Mediated Fluorescence Quenching and Duplex-Specific Nuclease Signal Amplification. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (3), 1361–1365. DOI: 10.1021/ac403944c

- (18) Vera-Hidalgo, M.; Giovanelli, E.; Navío, C.; Pérez, E. M. Mild Covalent Functionalization of Transition Metal Dichalcogenides with Maleimides: A “Click” Reaction for 2H-MoS<sub>2</sub> and WS<sub>2</sub>. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (9), 3767–3771. DOI: 10.1021/jacs.8b10930
- (19) Coleman, J. N.; Lotya, M.; O’Neill, A.; Bergin, S. D.; King, P. J.; Khan, U.; Young, K.; Gaucher, A.; De, S.; Smith, R. J.; Shvets, I. V.; Arora, S. K.; Stanton, G.; Kim, H.-Y.; Lee, K.; Kim, G. T.; Duesberg, G. S.; Hallam, T.; Boland, J. J.; Wang, J. J.; Donegan, J. F.; Grunlan, J. C.; Moriarty, G.; Shmeliov, A.; Nicholls, R. J.; Perkins, J. M.; Grievson, E. M.; Theuwissen, K.; McComb, D. W.; Nellist, P. D.; Nicolosi, V. Two-Dimensional Nanosheets Produced by Liquid Exfoliation of Layered Materials. *Science* **2011**, *331* (6017), 568–571. DOI: 10.1126/science.1194975
- (20) Wang, J.; Sui, L.; Huang, J.; Miao, L.; Nie, Y.; Wang, K.; Yang, Z.; Huang, Q.; Gong, X.; Nan, Y.; Ai, K. MoS<sub>2</sub>-Based Nanocomposites for Cancer Diagnosis and Therapy. *Bioact. Mater.* **2021**, *6* (11), 4209–4242. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.04.021
- (21) Radisavljevic, B.; Radenovic, A.; Brivio, J.; Giacometti, V.; Kis, A. Single-Layer MoS<sub>2</sub> Transistors. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6* (3), 147–150. DOI: 10.1038/nnano.2010.279
- (22) Grayfer, E. D.; Kozlova, M. N.; Fedorov, V. E. Colloidal 2D Nanosheets of MoS<sub>2</sub> and Other Transition Metal Dichalcogenides through Liquid-Phase Exfoliation. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2017**, *245*, 40–61. DOI: 10.1016/j.cis.2017.04.014
- (23) Mendel, R. R.; Bittner, F. Cell Biology of Molybdenum. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2006**, *1763* (7), 621–635. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2006.03.013
- (24) Zhu, C.; Zeng, Z.; Li, H.; Li, F.; Fan, C.; Zhang, H. Single-Layer MoS<sub>2</sub>-Based Nanoprobes for Homogeneous Detection of Biomolecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (16), 5998–6001. DOI: 10.1021/ja4019572
- (25) Backes, C.; Higgins, T. M.; Kelly, A.; Boland, C.; Harvey, A.; Hanlon, D.; Coleman, J. N. Guidelines for Exfoliation, Characterization and Processing of Layered Materials Produced by Liquid Exfoliation. *Chem. Mater.* **2017**, *29* (1), 243–255. DOI: 10.1021/acs.chemmater.6b03335

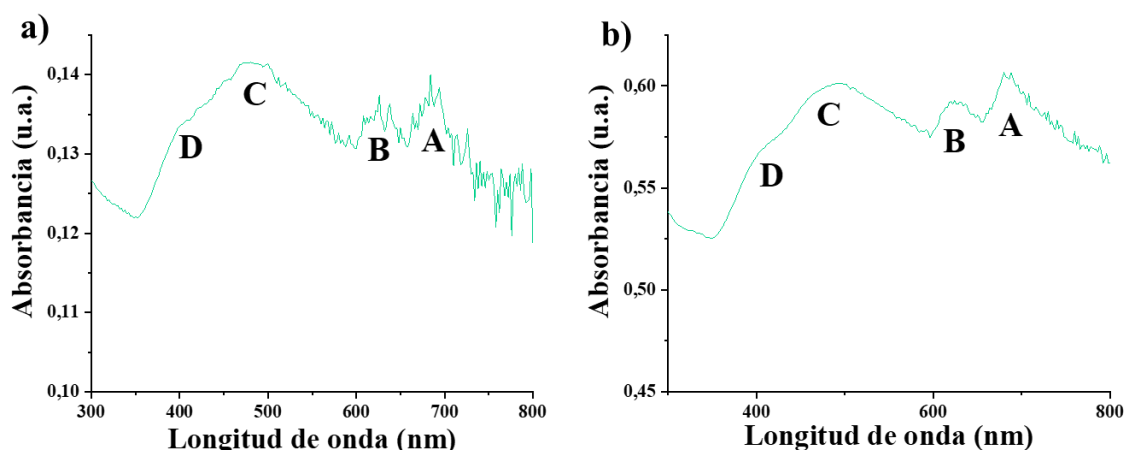
- (26) Quirós-Ovies, R.; Vázquez Sulleiro, M.; Vera-Hidalgo, M.; Prieto, J.; Gómez, I. J.; Sebastián, V.; Santamaría, J.; Pérez, E. M. Controlled Covalent Functionalization of 2 H-MoS<sub>2</sub> with Molecular or Polymeric Adlayers. *Chem.-Eur. J.* **2020**, *26* (29), 6629–6634. DOI: 10.1002/chem.202000068
- (27) Nicolosi, V.; Chhowalla, M.; Kanatzidis, M. G.; Strano, M. S.; Coleman, J. N. Liquid Exfoliation of Layered Materials. *Science* **2013**, *340* (6139), 72–75. DOI: 10.1126/science.1226419
- (28) Thevenot, D. R.; Tóth, K.; Durst, R. A.; Wilson, G. S. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification. *Pure Appl. Chem.* **1999**, *71* (12), 2333–2348. DOI: 10.1351/pac199971122333
- (29) Hummers, W. S.; Offeman, R. E. Preparation of Graphitic Oxide. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80* (6), 1339. DOI: 10.1021/ja01539a017
- (30) Deng, H.; Yang, X.; Gao, Z. MoS<sub>2</sub> Nanosheets as an Effective Fluorescence Quencher for DNA Methyltransferase Activity Detection. *Analyst* **2015**, *140* (9), 3210–3215. DOI: 10.1039/C4AN02133A
- (31) Li, F.; Huang, Y.; Yang, Q.; Zhong, Z.; Li, D.; Wang, L.; Song, S.; Fan, C. A Graphene-Enhanced Molecular Beacon for Homogeneous DNA Detection. *Nanoscale* **2010**, *2* (6), 1021–1026. DOI: 10.1039/b9nr00401g
- (32) Pumera, M.; Loo, A. H. Layered Transition-Metal Dichalcogenides (MoS<sub>2</sub> and WS<sub>2</sub>) for Sensing and Biosensing. *Trends Analyt. Chem.* **2014**, *61*, 49–53. DOI: 10.1016/j.trac.2014.05.009
- (33) Lu, C.; Liu, Y.; Ying, Y.; Liu, J. Comparison of MoS<sub>2</sub>, WS<sub>2</sub>, and Graphene Oxide for DNA Adsorption and Sensing. *Langmuir* **2017**, *33* (2), 630–637. DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b04502
- (34) Ferrari, A. C. Raman Spectroscopy of Graphene and Graphite: Disorder, Electron–Phonon Coupling, Doping and Nonadiabatic Effects. *Solid State Commun.* **2007**, *143* (1–2), 47–57. DOI: 10.1016/j.ssc.2007.03.052
- (35) Zhu, Y.; Murali, S.; Cai, W.; Li, X.; Suk, J. W.; Potts, J. R.; Ruoff, R. S. Graphene

- and Graphene Oxide: Synthesis, Properties, and Applications. *Adv. Mater.* **2010**, *22* (35), 3906–3924. DOI: 10.1002/adma.201001068
- (36) Jasim, D. A.; Lozano, N.; Kostarelos, K. Synthesis of Few-Layered, High-Purity Graphene Oxide Sheets from Different Graphite Sources for Biology. *2D Mater.* **2016**, *3* (1), 014006. DOI: 10.1088/2053-1583/3/1/014006
- (37) Ferrari, A. C.; Basko, D. M. Raman Spectroscopy as a Versatile Tool for Studying the Properties of Graphene. *Nat. Nanotechnol.* **2013**, *8* (4), 235–246. DOI: 10.1038/nnano.2013.46
- (38) Giovanelli, E.; Castellanos-Gomez, A.; Pérez, E. M. Surfactant-Free Polar-to-Nonpolar Phase Transfer of Exfoliated MoS<sub>2</sub> Two-Dimensional Colloids. *Chempluschem* **2017**, *82* (5), 732–741. DOI: 10.1002/cplu.201700038
- (39) Er, E.; Sánchez-Iglesias, A.; Silvestri, A.; Arnaiz, B.; Liz-Marzán, L. M.; Prato, M.; Criado, A. Metal Nanoparticles/MoS<sub>2</sub> Surface-Enhanced Raman Scattering-Based Sandwich Immunoassay for  $\alpha$ -Fetoprotein Detection. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13* (7), 8823–8831. DOI: 10.1021/acsami.0c22203
- (40) Knirsch, K. C.; Berner, N. C.; Nerl, H. C.; Cucinotta, C. S.; Gholamvand, Z.; McEvoy, N.; Wang, Z.; Abramovic, I.; Vecera, P.; Halik, M.; Sanvito, S.; Duesberg, G. S.; Nicolosi, V.; Hauke, F.; Hirsch, A.; Coleman, J. N.; Backes, C. Basal-Plane Functionalization of Chemically Exfoliated Molybdenum Disulfide by Diazonium Salts. *ACS Nano* **2015**, *9* (6), 6018–6030. DOI: 10.1021/acsnano.5b00965
- (41) Gao, Z.; Yuan, H.; Mao, Y.; Ding, L.; Effah, C. Y.; He, S.; He, L.; Liu, L.; Yu, S.; Wang, Y.; Wang, J.; Tian, Y.; Yu, F.; Guo, H.; Miao, L.; Qu, L.; Wu, Y. *In Situ* Detection of Plasma Exosomal MicroRNA for Lung Cancer Diagnosis Using Duplex-Specific Nuclease and MoS<sub>2</sub> Nanosheets. *Analyst* **2021**, *146* (6), 1924–1931. DOI: 10.1039/D0AN02193H
- (42) Park, J. S.; Goo, N.-I.; Kim, D.-E. Mechanism of DNA Adsorption and Desorption on Graphene Oxide. *Langmuir* **2014**, *30* (42), 12587–12595. DOI: 10.1021/la503401d

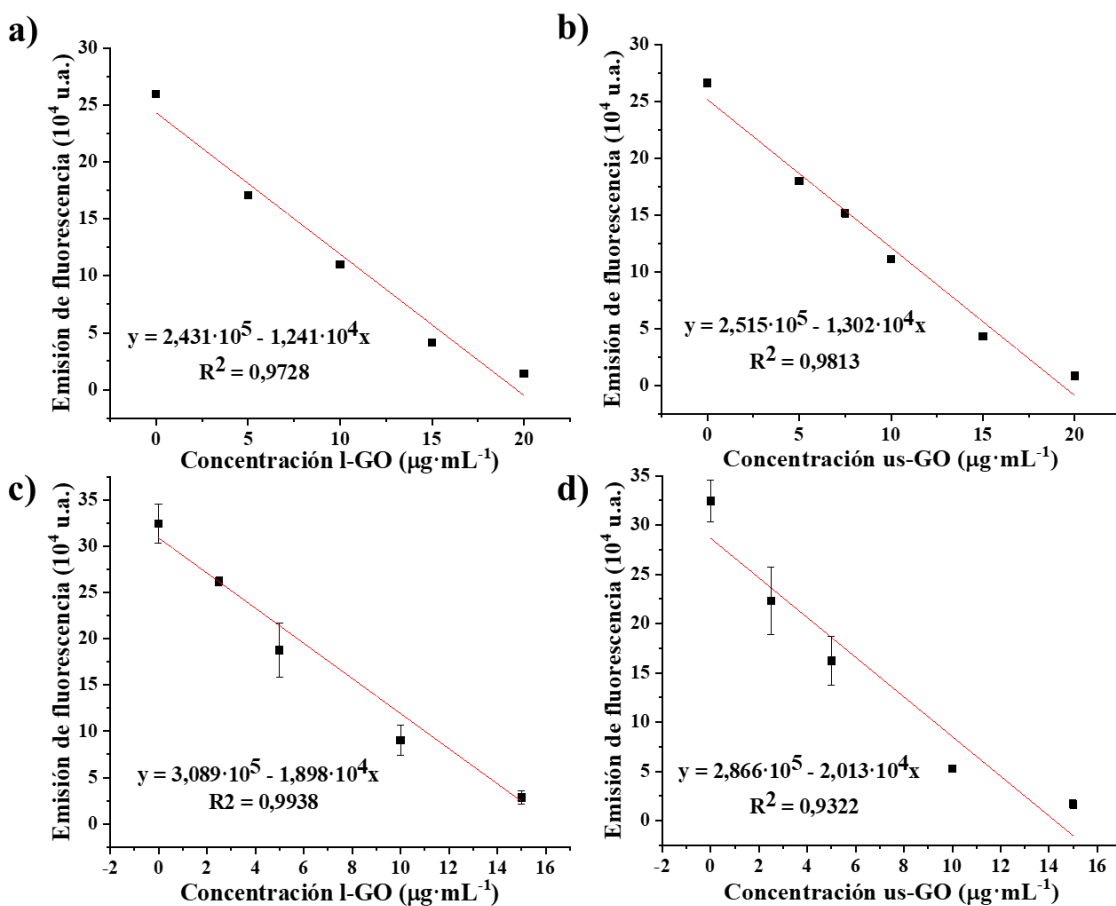
- (43) Wu, M.; Kempaiah, R.; Huang, P.-J. J.; Maheshwari, V.; Liu, J. Adsorption and Desorption of DNA on Graphene Oxide Studied by Fluorescently Labeled Oligonucleotides. *Langmuir* **2011**, 27 (6), 2731–2738. DOI: 10.1021/la1037926



## ANEXOS



**Figura 14.** Espectro UV/Vis de la dilución de Exf-MoS<sub>2</sub> en *i*PrOH/H<sub>2</sub>O 7:3 (v/v) del (a) Experimento 1 y (b) Experimento 2, registrados tras la etapa de centrifugación (Ver Tabla 3). Se indican las bandas de absorción de los excitones A, B, C y D.



**Figura 21.** Cálculo de las concentraciones de extinción de los derivados de GO; se representa el rango lineal. Regresión lineal de la intensidad de fluorescencia de (a, b) P1 (50 nM) en función de la concentración de (a) l-GO y (b) us-GO (~560 nm) y de (c, d) P2 (50nM) en función de la concentración de (c) l-GO y (d) us-GO (~517 nm). En (c) y (d) barras de error:  $\sigma$  de tres réplicas para cada concentración.