



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Departament de Química Analítica i Química Orgànica

**DETECCIÓN DE COMPUESTOS XENOBIÓTICOS
MEDIANTE TRANSISTORES DE EFECTO CAMPO
BASADOS EN NANOTUBOS DE CARBONO**

Memoria presentada por

Zayda Constanza Sánchez Acevedo

Para optar al grado de Doctor de la Universitat Rovira i Virgili

Dirigida por el Dr. Jordi Riu Rusell y el Prof. F. Xavier Rius
Ferrús

Tarragona, 2009

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

DETECCIÓN DE COMPUESTOS XENOBIÓTICOS MEDIANTE TRANSISTORES DE EFECTO CAMPO

BASADOS EN NANOTUBOS DE CARBONO.

Zayda Constanza Sánchez Acevedo

ISBN:978-84-692-6900-8 DL:T-1846-2009



**UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI**

**DEPARTAMENT DE QUÍMICA ANALÍTICA
I QUÍMICA ORGÀNICA**

Campus Sescelades
C/ Marcel·lí Domingo s/n
43007 Tarragona
Tel. 34 977 55 97 69
Fax 34 977 55 84 46
e-mail: secqaqo@quimica.urv.cat

Dr. JORDI RIU RUSELL, profesor agregado y Dr. F. XAVIER RIUS FERRÚS, profesor catedrático del Departament de Química Analítica i Química Orgànica de la Facultat de Química de la Universitat Rovira i Virgili,

CERTIFICAN:

Que la presente memoria que tiene por título: "DETECCIÓN DE COMPUESTOS XENOBIÓTICOS MEDIANTE TRANSISTORES DE EFECTO CAMPO BASADOS EN NANOTUBOS DE CARBONO", ha sido realizada por ZAYDA CONSTANZA SÁNCHEZ ACEVEDO bajo nuestra dirección en el Área de Química Analítica de esta Universidad y que todos los resultados presentados son fruto de las experiencias realizadas por dicha doctoranda.

Tarragona, junio de 2009

Dr. Jordi Riu Rusell

Dr. F. Xavier Rius Ferrús

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETECCIÓN DE COMPUESTOS XENOBIÓTICOS MEDIANTE TRANSISTORES DE EFECTO CAMPO
BASADOS EN NANOTUBOS DE CARBONO.
Zayda Constanza Sánchez Acevedo
ISBN:978-84-692-6900-8 DL:T-1846-2009

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar en unas pocas pero significativas líneas mis más sinceros agradecimientos a aquellas personas y entidades que de alguna forma u otra, me han brindado apoyo y colaboración durante el transcurso de mis estudios de doctorado, para la culminación de la presente Tesis.

A mis directores de Tesis, el Dr. Jordi Riu y el Dr. F. Xavier Rius, por su guía constante y asesoramiento. Por sus continuas enseñanzas, valiosos consejos y aportes, que al día de hoy me han proporcionado, al igual que a su comprensión y apoyo en momentos de dificultad.

A todas aquellas personas que me han brindado ayuda, poniendo a mi disposición sus conocimientos y tiempo, a la Dra. Alicia Maroto y en especial al Dr. Santiago Macho por estar siempre dispuesto a la solución de problemas.

A los técnicos del Servei de Recursos Científics i tècnics, en especial a las apreciadas Mariana y a Mercè por su continua colaboración en microscopía electrónica, así como a Tere Codera nuestra técnica de laboratorios por su gentil ayuda.

A mis compañeros, integrantes del grupo de Quimiometría, Cualimetría y Nanosensores, tanto a los que actualmente se encuentran, como aquellos que ya se han ido, porque gracias a los momentos que hemos compartido se ha propiciado un clima de trabajo agradable, encontrado en muchos de ellos no solo colaboración, sino una sonrisa y palabras de aliento cuando más lo necesitaba. Gracias Ignacio, Mariano, Martica, Pablo, Ester, Giselle, Oleguer, Carolina, Joe, Néstor, Cristina B

Rafa, Vanessa, Idoia, Cristina F, Jaume, Xavi, Enrique, Raquel, Nicolás, Eulalia, Paquita, Gustavo y Cristina C.

A mis amigos y compañeros colombianos que me hicieron sentir como en mi patria, con sus consejos y apoyo en los momentos más difíciles. Espero en Colombia seguir estrechando los lazos de amistad que acá hemos sembrado.

A la Universitat Rovira i Virgili y a la Universidad de Pamplona, ya que gracias al convenio existente fue posible la realización de mis estudios de Doctorado.

A la apreciada familia Suárez Castrillón, cuna de mi amado esposo. A ti Albert, porque llegaste cuando más te necesitaba y aunque la distancia es dura, siempre has estado presente. Gracias por tu amor, comprensión y apoyo constante.

A mi familia, en especial a mis padres, hermanos, cuñadas y sobrinos, ya que a pesar de la distancia siempre han estado junto a mí, con su constante apoyo, confianza, sabios consejos y demostraciones de afecto. Porque ellos fueron los que más me impulsaron a emprender este proyecto, porque sin su apoyo constante nada hubiera sido posible, por compartir tanto mis logros como mis angustias, ayudándome a encontrar la fortaleza necesaria para superar las dificultades.

Para todos ellos, sin excepción, mi cariño y agradecimientos, así como para todos aquellos que, por razón del nerviosismo que me embarga, no hubiera nombrado.

.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETECCIÓN DE COMPUESTOS XENOBIÓTICOS MEDIANTE TRANSISTORES DE EFECTO CAMPO
BASADOS EN NANOTUBOS DE CARBONO.
Zayda Constanza Sánchez Acevedo
ISBN:978-84-692-6900-8 DL:T-1846-2009

*A mi familia, en especial a mis padres por
su confianza y constante apoyo y a
Albert por su amor y paciente espera.*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETECCIÓN DE COMPUESTOS XENOBIÓTICOS MEDIANTE TRANSISTORES DE EFECTO CAMPO
BASADOS EN NANOTUBOS DE CARBONO.
Zayda Constanza Sánchez Acevedo
ISBN:978-84-692-6900-8 DL:T-1846-2009

Tabla de Contenidos

1. <i>Objetivos y estructura de la tesis</i>	1
1.1. Objetivos	3
1.2. Estructura de la tesis.....	4
2. <i>Fundamentos conceptuales</i>	9
2.1. Introducción.....	13
2.2. Nanotubos de carbono.....	16
2.2.1. Propiedades de los nanotubos de carbono de una capa...	18
2.2.2. Síntesis de nanotubos de carbono.....	23
2.2.3. Aplicaciones de nanotubos de carbono de una capa en sistemas de detección.....	26
2.3. Transistores efecto campo basados en nanotubos de carbono de pared sencilla.....	31
2.3.1. Funcionalización de SWCNTs.....	38
2.3.2. Mecanismos de respuesta en la interacción entre el analito y el nanotubo de carbono.....	42
2.3.3. Aplicaciones de los CNTFETs.....	45
2.4. Mecanismo de reconocimiento molecular.....	47
2.4.1. Receptores nucleares.....	48
2.5. Bibliografía.....	57
2.6. Anexo: Review “ <i>Nanomaterial-based devices and sensors for the determination of xenobiotic compounds</i> ”	68
3. <i>Desarrollo experimental</i>	107
3.1. Introducción.....	111
3.2. Materiales.....	112

3.2.1. Síntesis de SWCNTs por CVD (<i>Chemical Vapour Deposition</i>).....	112
3.2.2. Construcción del CNTFET.....	113
3.2.3. Proceso de funcionalización.....	113
3.2.4. Caracterización del CNTFET.....	114
3.3. Métodos.....	115
3.3.1. Síntesis de SWCNTs por CVD (<i>Chemical Vapour Deposition</i>).....	115
3.3.2. Construcción del CNTFET.....	118
3.3.3. Proceso de funcionalización.....	121
3.3.4. Caracterización del CNTFET.....	126
3.4. Bibliografía.....	133
4. <i>Detección de compuestos xenobióticos usando transistores de efecto campo funcionalizados con receptores nucleares</i>	135
4.1. Introducción.....	138
4.2. Resultados y discusión.....	139
4.2.1. Síntesis de SWCNTs por CVD	139
4.2.2. Construcción del CNTFET.....	141
4.2.3. Proceso de funcionalización	142
4.2.4. Validación del CNTFET.....	151
4.3. Bibliografía.....	168
4.4. Anexo: Artículo " <i>Fast picomolar selective detection of bisphenol A in water using a carbon nanotube field effect transistor functionalized with estrogen receptor-α</i> " <i>Biosens. Bioelectron.</i> , 2009, 24, 2842.....	169

5. Conclusiones generales.....	191
6. Anexos: Glosario.....	197

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETECCIÓN DE COMPUESTOS XENOBIÓTICOS MEDIANTE TRANSISTORES DE EFECTO CAMPO
BASADOS EN NANOTUBOS DE CARBONO.
Zayda Constanza Sánchez Acevedo
ISBN:978-84-692-6900-8 DL:T-1846-2009

Primer Capítulo

Objetivos y estructura de la tesis



1.1 Objetivos

El objetivo primordial de la presente tesis doctoral es demostrar que los receptores celulares (cuya clasificación más simple es en receptores de transmembrana y receptores nucleares) pueden constituir una fase de reconocimiento adecuada para la determinación de analitos de bajo peso molecular utilizando transistores de efecto campo (*field-effect transistor* FET) basados en nanotubos de carbono de pared sencilla (*single-walled carbon nanotube* SWCNT).

Como ejemplo, se desarrolla un sensor basado en nanotubos de carbono para la detección de bisfenol A (BFA), un compuesto xenoestrogénico, en aguas. El dispositivo sensor utilizado es un transistor de efecto campo en el que se usa como canal conductor nanotubos de carbono de pared sencilla (*carbon nanotubes field-effect transistor*, CNTFET).

Este objetivo a su vez puede desglosarse en objetivos más específicos a saber:

- Utilizar por primera vez receptores nucleares en la funcionalización de los nanotubos de carbono en los CNTFETs.
- Demostrar que los CNTFETs se pueden utilizar para la detección selectiva de muy bajas concentraciones de analitos de bajo peso molecular.
- Desarrollar un dispositivo sensor que permita realizar una detección selectiva del BFA a concentraciones que están no solo por debajo del nivel de detección permitido, sino por debajo de los límites de detección obtenidos por otros métodos de detección.

- Mejorar el tiempo de respuesta en la detección del BFA con respecto a los reportados teóricamente,
- Realizar una revisión científica de las publicaciones dedicadas a la detección de compuestos xenobióticos mediante sensores nanoestructurados

Igualmente mediante el desarrollo de la presente tesis doctoral se pretende profundizar acerca del aporte realizado por la Nanociencia y la Nanotecnología en el campo de la Química Analítica. Además de la incorporación y desarrollo de una serie de habilidades y destrezas propias de un investigador.

1.2 Estructura de la tesis

El trabajo que se presenta en la presente tesis doctoral, forma parte del subproyecto “Aplicaciones medioambientales basadas en biosensores de anticuerpos, receptores celulares y aptameros” que forma parte del proyecto coordinado de la acción estratégica de Nanociencia y Nanotecnología SENSONAT “Sensores analíticos basados en nanotubos de carbono” (NAN2004-09306-C05-05). Con el trabajo de esta tesis se logra el desarrollo de un biosensor basado en nanotubos de carbono para aplicaciones en medio ambiente, en donde los nanotubos de carbono son la parte transductora del sensor y las biomoléculas (receptores nucleares) son la parte sensora.

La estructura de la presente tesis es la siguiente:

- En primera instancia se dan a conocer tanto el objetivo principal como los objetivos específicos.
- El segundo capítulo comprende los antecedentes del conocimiento que sirven de fundamento para el trabajo desarrollo experimental que más adelante se plantea.
- El tercer capítulo contiene el desarrollo experimental que se ha llevado acabo para la obtención de nuestro biosensor.
- El cuarto capítulo abarca los resultados obtenidos a lo largo del desarrollo de la tesis.
- En el quinto capítulo se plantean las conclusiones generales de la tesis.

En el segundo capítulo, se encuentra el fundamento teórico que permite un mejor entendimiento del trabajo desarrollado, ya que inicia con una revisión acerca del aporte de los nanotubos de carbono en el campo de la Química Analítica, sus generalidades y propiedades, así como los métodos de obtención y sus aplicaciones en sistemas de detección. Así mismo se continúa con una profundización acerca del mecanismo de acción y aplicación de los CNTFETs, base del presente trabajo. Igualmente, ya que con el uso de sensores se pretende realizar detecciones selectivas de analitos por medio de mecanismos de reconocimiento molecular, se profundiza un poco al respecto, específicamente acerca de los mecanismos de reconocimiento que tienen lugar en el caso de los biosensores, centrándonos en la gran afinidad entre el receptor de estrógenos α (RE- α) y los compuestos xenobióticos (bisfenol A), siendo el RE- α la molécula receptora del sensor a desarrollar y BFA el analito a detectar. Finalmente, a

nivel de anexo se encuentra una revisión crítica de los avances en el uso de nanoestructuras en los sistemas de detección y cuantificación de compuestos xenobióticos presentes en el medio ambiente. *“Nanomaterial-based devices and sensors for the determination of xenobiotic compounds”* El análisis de estos aspectos constituye la motivación de los objetivos de la presente tesis, expuestos en la sección anterior.

El tercer capítulo comprende la explicación detallada de los procesos llevados a cabo a lo largo de todo el desarrollo experimental, los materiales, equipos y procedimientos que permiten la obtención de un dispositivo CNTFET funcionalizado con receptores nucleares. Partiendo de la síntesis de los SWCNTs mediante deposición química en fase vapor (*chemical vapour deposition, CVD*), el diseño del dispositivo CNTFET y el proceso de funcionalización de los SWCNTs con el RE- α , llegando a la obtención de un CNTFET funcionalizado y listo para usarse en la detección del analito de interés, el BFA.

El cuarto capítulo corresponde a los resultados obtenidos en los procesos descritos en el tercer capítulo y en la validación del CNTFET al ser usado en la detección de BFA en agua, comprobándose la mínima concentración de BFA que se puede detectar con este dispositivo, la selectividad al probarse el comportamiento del CNTFET ante diferentes interferentes, el tiempo de respuesta obtenido por el CNTFET, así como la estabilidad del mismo. Al final se encuentra anexo el artículo *“Fast picomolar selective detection of bisphenol A in water using a carbon nanotube field effect transistor functionalized with estrogen receptor- α ”*, publicado en la revista *Biosensors & Bioelectronics*.

Finalmente en el quinto capítulo se encuentran las conclusiones generales de la tesis y las perspectivas del uso de dispositivos CNTFETs funcionalizados con receptores nucleares en el campo de la detección química.

Segundo Capítulo

Fundamentos Conceptuales

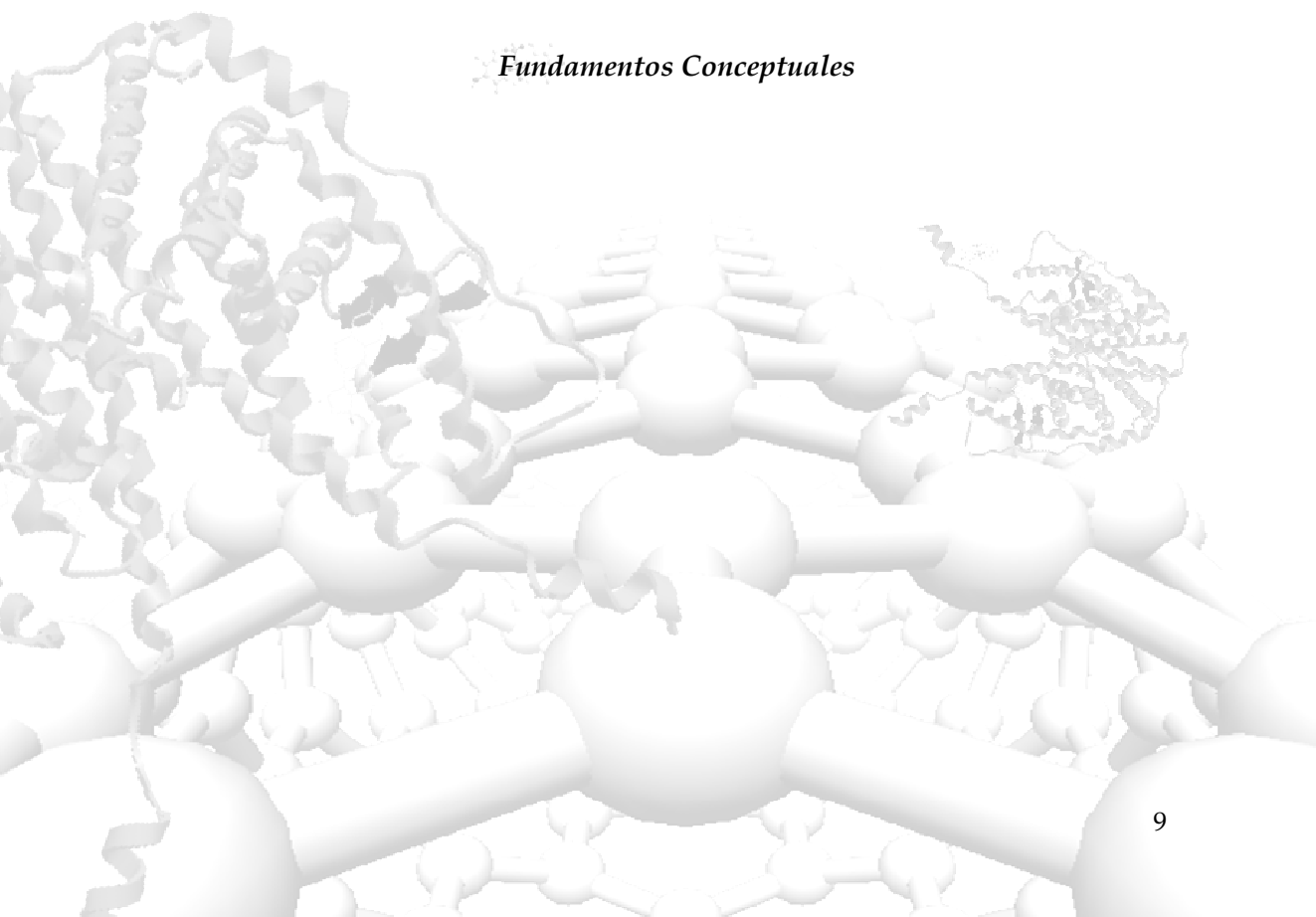


Tabla de Contenidos

2.1.	<i>Introducción.....</i>	13
2.2.	<i>Nanotubos de carbono.....</i>	16
2.2.1.	Propiedades de los nanotubos de carbono de una capa.....	18
2.2.2.	Síntesis de nanotubos de carbono.....	23
2.2.3.	Aplicaciones de nanotubos de carbono de un capa en sistemas de detección.....	26
2.2.3.1.	Dispositivos no enzimáticos.....	27
2.2.3.2.	Dispositivos enzimáticos.....	29
2.3.	<i>Transistores efecto campo basados en nanotubos de carbono de pared sencilla.....</i>	31
2.3.1.	Funcionalización de SWCNTs.....	38
2.3.2.	Mecanismos de respuesta en la interacción entre el analito y el nanotubo de carbono.....	42
2.3.3.	Aplicaciones de los CNTFETs.....	45
2.4.	<i>Mecanismo de reconocimiento molecular.....</i>	47
2.4.1.	Receptores nucleares.....	48
2.4.1.1.	Receptor de estrógenos.....	50
2.4.1.2.	Estrógenos y xenoestrógenos.....	53
2.4.1.3.	Dispositivos y sensores basados en nanomateriales para la determinación de compuestos xenobioticos.....	55

2.5. Bibliografía.....	57
2.6. Anexo: Review “Nanomaterial-based devices and sensors for the determination of xenobiotic compounds”	68

2.1. Introducción

Durante los últimos años dentro de la química analítica se ha visto un incremento sustancial de métodos y técnicas de detección que utilizan nuevos materiales surgidos de los campos de la Nanociencia y la Nanotecnología.

Los términos Nanociencia y Nanotecnología son relativamente nuevos, y tratan sobre el estudio, diseño, manipulación y propiedades de diferentes estructuras de la materia con dimensiones del orden de nanómetros (10^{-9} m) (Suryanayana, 2005; Poole, 2007). La Nanociencia trata de comprender qué pasa a estas escalas y la Nanotecnología intenta manipular y controlar estos fenómenos. De igual forma estos dos términos están íntimamente relacionados, ya que dentro de la Nanotecnología se encuentran nanoestructuras que se pueden considerar unidimensionales (1D) y que han permitido realizar avances significativos en la Nanociencia. Entre estas nanoestructuras encontramos los nanotubos, nanocables, nanofibras, etc. (Dai, 2002; Avouris, 2002; Merkoçi, 2005).

Es gracias a dichas nanoestructuras, y a las propiedades que las caracterizan, que la Nanociencia y la Nanotecnología abarcan diversas áreas de acción, (Valentini, 2008; Kauffman, 2008) ya que son la base de múltiples investigaciones a nivel químico, biotecnológico o médico. Dentro de la Química Analítica presentan un gran potencial para la fabricación de dispositivos sensores, (Wanekaya, 2006; Trojanowicz, 2006; Allen, 2007; Agüí, 2008; Valcárcel, 2008) ofreciendo igualmente grandes ventajas potenciales como su mejorada sensibilidad (Grüner, 2006) y selectividad con respecto a los dispositivos tradicionales. (Liu, 2008)

Partiendo de la definición de sensor químico dada por Thevenot en 1999 “Un sensor químico es un dispositivo que transforma la información química, que abarca desde la concentración de un componente específico de la muestra al análisis de la composición total, en una señal analíticamente útil. Los sensores químicos contienen generalmente dos componentes básicos conectados en serie: Un sistema (receptor) de reconocimiento químico (molecular) y un transductor fisicoquímico, que es retenido en contacto espacial directo con un elemento de transducción electroquímico”, (Thevenot, 1999) se han producido en los últimos años grandes avances en el campo de los sensores químicos basados en nanotubos de carbono como elemento de transducción, que emplean una gran variedad de biomoléculas como elemento de reconocimiento de numerosos analitos. Esta es la razón por la que se encuentran hoy en día numerosas revisiones bibliográficas al respecto. (Trojanowicz, 2006; Kauffman, 2008; Agüí, 2008)

El uso de SWCNTs en el desarrollo de métodos analíticos ha tenido un fuerte impulso en los últimos años. Algunos dispositivos, como los llamados transistores de efecto campo, aprovechan las propiedades semiconductoras de los SWCNTs. Estos dispositivos adolecen de la falta de selectividad debido a que los SWCNTs interaccionan de forma indiscriminada con las sustancias del medio por lo que se hace necesario la funcionalización de dichas nanoestructuras mediante la incorporación de moléculas receptoras, las cuales interaccionan selectivamente con el analito de interés. Aunque existen mecanismos de transferencia de carga debido, por ejemplo, a reacciones enzimáticas, dichas interacciones generalmente se dan gracias a los mecanismos de reconocimiento molecular.

En la presente tesis el receptor de estrógenos alfa (RE- α) es la molécula seleccionada para dar selectividad al dispositivo sensor, ya que este receptor nuclear interactúa con el estradiol (hormona sexual femenina del grupo de los estrógenos) y con una familia de xenoestrógenos por medio de uniones no covalentes (interacciones hidrofóbicas y electrostáticas) con gran afinidad y especificidad. Se consigue así el desarrollo de un biosensor debido a la transformación de la interacción biomolécula-analito selectiva en una señal eléctrica cuantificable.

2.2. *Nanotubos de carbono*

Los nanotubos de carbono (*carbon nanotubes*, CNT) son una de las formas alotrópicas del carbono. Aparte de los nanotubos de carbono, se conocen otras tres formas alotrópicas con características diferentes: (McCreery, 2008)

- el diamante, caracterizado por que sus átomos de carbono tienen hibridación sp^3 y se hallan enlazados tetraédricamente formando una estructura tridimensional (Figura 1(a)).

- el grafito, en forma de láminas planas formada por hexágonos de átomos de carbono enlazados, con hibridación sp^2 (Figura 1(b)).

- los fullerenos, descubiertos en 1985 (Kroto, 1985), son estructuras muy estables y prácticamente esféricas, formadas por átomos con hibridaciones esencialmente sp^2 con algún carácter sp^3 , dónde los átomos de carbono se hallan tricoordinados originando anillos hexagonales y pentagonales. El fullereno más conocido es el C_{60} , formado por 20 anillos hexagonales y 12 pentagonales. A dicha estructura se le llamó inicialmente buckminsterfullereno (Figura 1(c)), en honor a Buckminster Fuller, norteamericano diseñador de los domos geodésicos similares a la estructura molecular presentada de C_{60} . (Rao, 2001)

Finalmente, el carbono amorfo es esencialmente grafito que no llega a adoptar una estructura cristalina macroscópica, y presenta propiedades físicas y químicas que pueden variar dependiendo de su método de fabricación y condiciones a las que es sometido.

Los nanotubos de carbono (Figura 1(d)) pueden considerarse fullerenos elongados. Presentan una estructura atómica similar a la de una única capa de grafito (grafeno) y pueden considerarse conceptualmente como formados a partir del enrollamiento de esta lámina de grafito (Figura 2), aunque a diferencia de éste, presentan los mismos tipos de hibridación que los fullerenos, hibridaciones esencialmente sp^2 con algún carácter sp^3 . Normalmente los CNTs se encuentran cerrados en los extremos por la presencia de anillos pentagonales. (Rao 2001)

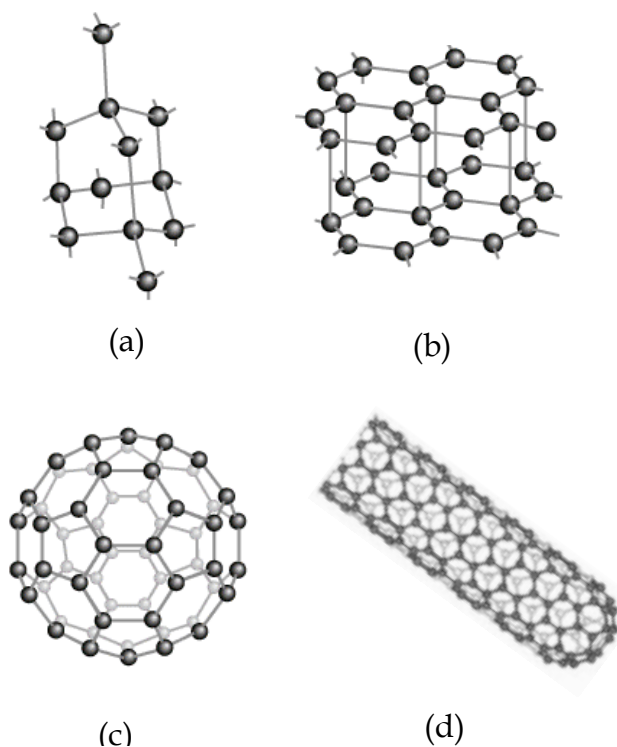


Figura 1. Formas alotrópicas del carbono: (a) diamante, (b) grafito, (c) fullereno y (d) nanotubo de carbono de extremo cerrado.

Aunque el descubrimiento de los CNTs se le atribuye a Sumio Iijima en 1991, (Iijima, 1991) los primeros CNTs fueron obtenidos posiblemente

treinta años antes por Francis Bacon como resultado de su trabajo sobre las “*graphite whiskers*” (Bacon, 1960) y a mediados de los años 70 probablemente fueron tomadas las primeras imágenes con un microscopio electrónico de alta resolución por Morinobu Endo, al realizar estudios sobre la producción de fibras de carbono (Oberlin, 1976). Sin embargo, ninguno de ellos los identificó como tales, pasando inadvertidos en estos primeros trabajos.

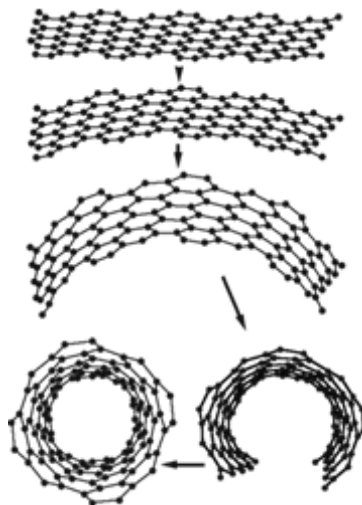


Figura 2. Representación conceptual de la formación de un SWCNT a partir de una lámina de grafeno.

2.2.1. Propiedades de los nanotubos de carbono de una capa

Los CNTs pueden clasificarse según el número de capas de que están formados: pueden ser nanotubos de carbono de una única capa (*single-walled carbon nanotubes*, SWCNTs) o nanotubos de carbono de múltiples capas (*multi-walled carbon nanotubes*, MWCNTs), considerados estos últimos como una serie de tubos concéntricos alrededor de un tubo central de

diámetro nanométrico con separaciones aproximadas de 0.34 nm entre ellos, al igual que diámetros y longitudes que dependen de la técnica usada para su síntesis. (Iijima, 1991) (Figura 3) Sus dimensiones son variadas teniendo diámetros tan pequeños entre 0.4 y 3 nm para los SWCNTs y entre 2 - 100 nm para los MWCNTs (Kim, 2007) y con longitudes que van desde decenas de nanómetros hasta algunos milímetros (Kim, 2002), gracias al crecimiento controlado de CNTs. (Liu, 1998; Gooding, 2003; Chen, 2003).

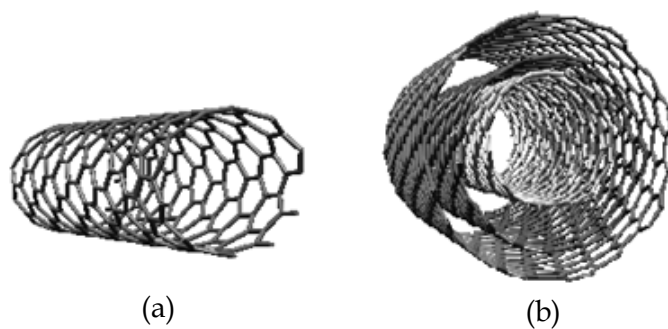


Figura 3. Esquema de los tipos de nanotubos de carbono según el número de capas: (a) SWCNT; (b) MWCNT de 3 capas

Como se mencionó anteriormente podemos considerar conceptualmente a un SWCNT formado a partir del enrollamiento de una lámina de grafeno, lo cual permite en cierto modo comprender las propiedades que los caracterizan, ya que éstas dependen de la manera en que la lámina es enrollada, del diámetro que presentan y de su helicidad, que depende del ángulo quiral. La quiralidad está relacionada con la forma en que se da el enrollamiento del SWCNT respecto a la dirección del eje T , que posee la misma dirección que el eje mayor del nanotubo, en la lámina de grafeno. El enrollamiento de la lámina de grafito se da en el sentido del eje T que se puede apreciar en la Figura 4(a).

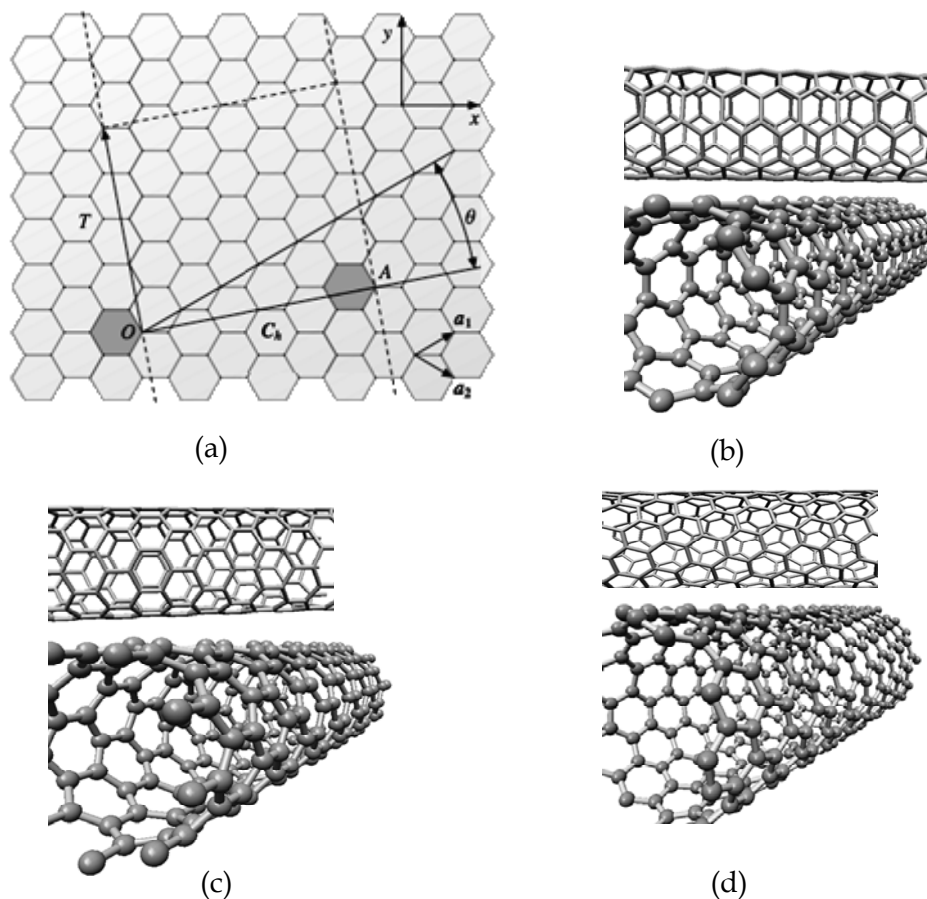


Figura 4. (a) Celda unidad del nanotubo (4,2) y ejemplos de tres posibles enrollamientos para formar SWCNTs b) SWCNT "brazo de silla" (5,5), (c) SWCNT "zig-zag" (9,0) y (d) SWCNT "quiral" (10,5).

El vector quiral C_n también llamado vector circunferencial, $C_n = ma_1 + na_2$, en donde a_1 y a_2 corresponden a los vectores unitarios de la red hexagonal del grafito y el par (m,n) caracteriza el correspondiente SWCNT, forma un ángulo recto con el eje T . Encontramos tres tipos de SWCNTs. Cuando $m = n$, se forma la estructura "brazo de silla" que se aprecia en la Figura 4(b); cuando el enrollamiento se da alrededor de un eje T que presenta una orientación con $m = 0$ o $n = 0$ encontramos la estructura "zig-zag" y cuando m

es distinto de n la estructura “quiral” representadas en las Figuras 4(c) y 4(d) respectivamente. (Dekker, 1999; Poole, 2007)

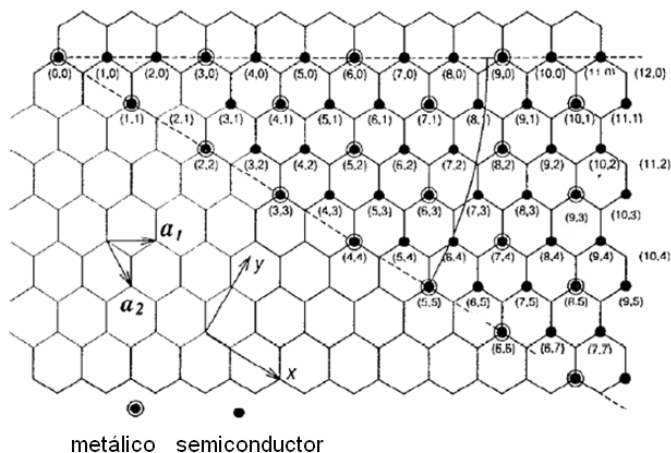


Figura 5. Carácter metálico de los CNTs de acuerdo al vector quiral. Los “brazo de silla” ($m=n$) son metálicos.

El carácter metálico y semiconductor de los SWCNTs puede entenderse bajo el concepto de bandas de orbitales moleculares, teniendo en cuenta que la estructura electrónica de un sólido se caracteriza por una serie de bandas formadas por el solapamiento de orbitales atómicos de energías muy similares, y están separadas unas de otras por discontinuidades de energía. Por lo tanto, un SWCNT será metálico o semiconductor de acuerdo a la separación que exista entre la última banda ocupada electrónicamente y la siguiente banda vacía, espaciado que depende de la quiralidad del nanotubo, (Avouris 2002) encontrándose que los SWCNTs de la configuración “brazo de silla” ($m=n$) son metálicos y los otros dos tipos lo son si $(n-m)=3i$, siendo i un número entero, por lo que $2/3$ de los SWCNTs “quirales” y “zig-zag” son semiconductores. (Figura 5) (Dresselhaus, 2001; Dai, 2002)

La superficie del SWCNT contiene átomos de carbono cuyos orbitales forman una hibridación sp^2 . Tres de los cuatro electrones de la capa de valencia de estos carbonos participan en enlace con carbonos vecinos, mientras que el cuarto electrón se encuentra en un orbital p perpendicular. En la hoja plana de grafeno, estos electrones del orbital p se organizan en bandas de valencia (π) (o de enlace π) y de conducción (π^*) (o anti-enlace π), proporcionando un carácter semi-metálico al grafeno puro debido al valor teórico cero de su distancia entre bandas. (Painter, 1970)

Las bandas anti-enlace π son las bandas que poseen mayor energía que el nivel de Fermi, entendiéndose este último como el orbital molecular de mayor energía que se encuentra ocupado a temperatura absoluta cero, mientras que las bandas de enlace π están localizadas a energías superiores aunque más bajas que el nivel de Fermi (Hamada, 1992).

Los SWCNTs son especialmente atractivos para la detección química debido a la elevada relación superficie-volumen y nuevas propiedades de transporte de electrones de estas nanoestructuras. (Gooding, 2005; Wang, 2005) Además los SWCNTs poseen la capacidad de promover reacciones de transferencia de electrones debido a la densidad electrónica presente en su superficie. De ahí la fuerte influencia que ejercen pequeñas diferencias químicas en el medio ambiente del nanotubo, así como las relacionadas con otras moléculas que pueden cederles o donarles electrones, afectando de este modo a su conductividad electrónica. Una posible explicación a la fácil interacción de estas nanoestructuras radica en que todos los átomos de los SWCNTs se encuentran en su superficie. (Heller, 2008)

Sin embargo esta gran sensibilidad es una desventaja, ya que otras moléculas que estén presentes en su entorno químico pueden causar interferencias con el analito que se desee detectar, afectando por consiguiente la selectividad del dispositivo sensor. Es por eso que se hace necesario proteger a los SWCNTs de dichos posibles interferentes y hacerlos selectivos a un determinado analito, lográndose esto al funcionalizar los SWCNTs con moléculas receptoras adecuadas y acordes al analito de interés, proporcionándoles de este modo la selectividad necesaria en un sistema de detección. (Grüner, 2006; Allen, 2007).

Se han realizado numerosos estudios que abarcan el uso de una gran variedad de moléculas receptoras empleadas para la detección selectiva del analito deseado, siendo este tema de fundamental interés por la naturaleza de la presente tesis se ha de profundizar en el siguiente capítulo, dando a conocer los mecanismos de reconocimiento molecular y de respuestas que presentan. Aún así en el apartado 2.2.3. se darán a conocer algunas sustancias que han sido usadas para proporcionar dicha selectividad a los SWCNTs.

2.2.2. Síntesis de nanotubos de carbono

Son varios los métodos empleados para sintetizar nanotubos de carbono ya sea SWCNTs o MWCNTs: la descarga por arco eléctrico, la ablación por láser, la deposición química en fase vapor (*chemical vapour deposition*, CVD), la deposición química en fase vapor asistida por plasma (*plasma enhanced chemical vapour deposition*, PECVD) (Kato, 2003; Li, 2004; Maschmann, 2006) y la descomposición de monóxido de carbono en altas presiones y altas temperaturas (*high pressure carbon monoxide*, HiPCO), (Bronikowski, 2001;

Selbmann, 2008) entre otras. (Journet, 1998; O'Connell, 2006; Gogotsi, 2006) Siendo los tres primeros los más usados, se explicarán brevemente los procesos, e igualmente se darán a conocer algunas ventajas y desventajas de cada uno.

La descarga por arco se basa en la generación de un arco eléctrico entre dos electrodos de grafito en una cámara que se llena con un gas inerte (por ejemplo, argón o helio). La corriente necesaria entre los dos electrodos es de 100 amperios, sublimándose los átomos de carbono de la superficie de los electrodos, formándose así los CNTs en el plasma de la descarga eléctrica entre los dos electrodos. Los CNTs obtenidos por esta técnica son MWCNTs, pero si se usan catalizadores metálicos (por ejemplo Fe, Co o Ni) se obtienen SWCNTs cortos con diámetros entre 1.2 - 1.4 nm (Iijima, 1993; Journet, 1997; Bethune 1993; Grebenyukov, 2008). La importancia de esta técnica radica en que fue la primera usada, aun así, ofrece más desventajas que ventajas. Aunque los nanotubos obtenidos presentan pocos defectos estructurales, su crecimiento es muy lento, depositándose aleatoriamente y tendiendo a ser muy cortos, formándose también carbono amorfo y fullerenos, de tal forma que tan solo un 30% del producto corresponde a los CNTs.

La segunda técnica es la de ablación por láser y consiste en el bombardeo por emisiones intensas de láser de una barra de grafito situada en el interior de un horno a una temperatura de 1000 a 1200 °C y en presencia de un gas inerte, generándose un gas caliente formado de átomos de carbono, a partir de los cuales se forman los nanotubos de carbono al condensarse. Se obtienen grandes conjuntos de SWCNTs con diámetros individuales entre 1 - 1.6 nm. Dentro de las ventajas se halla la obtención de SWCNTs

con pocos defectos, con diámetros que pueden controlarse variando la temperatura de la reacción y con rendimientos de hasta el 70%. (Bower, 1998) Como principal inconveniente podemos destacar que el costo de los láseres requeridos es muy elevado. (Poole, 2007)

Finalmente encontramos la CVD, que utiliza gases de hidrocarburos (por ejemplo metano, etileno o acetileno) como fuentes para los átomos de carbono, partículas de catalizador metálico (como níquel, cobalto o hierro) como “semillas” para el crecimiento de los nanotubos e hidrógeno para activar dicho catalizador. Contrariamente a las técnicas anteriormente enunciadas, los CNTs obtenidos presentan los extremos abiertos (Poole 2007) y se caracteriza por necesitar temperaturas relativamente bajas para el crecimiento de los CNTs, entre 500-1000°C aproximadamente. Asimismo, dependiendo del flujo del hidrocarburo empleado y del tiempo usado en la síntesis, se puede controlar el crecimiento de CNTs ya sea en pequeños agregados o en redes. (Dai, 2002; Dresselhaus, 2001; Andrews, 2002) Además es un proceso muy sensible a la cantidad de H₂ que fluye, presentándose en ocasiones pirólisis. (Dai, 2002)

En la síntesis de CNTs, ninguno de los tres métodos mencionados anteriormente produce CNTs con diámetros y quiralidades homogéneas. (Dai 2002) Aún así tanto el de descarga por arco eléctrico y el de ablación por láser presentan similitudes en el diámetro de los SWCNTs. Con la CVD variando las condiciones de la síntesis se pueden obtener también fibras de carbono y MWCNTs con defectos. Asimismo, la CVD es considerada la técnica más fácil de escalar a nivel industrial, por su bajo costo, por la pureza de los SWCNTs sintetizados, por el alto rendimiento y por poderse controlar el crecimiento de los SWCNTs, además de ser una de las más

empleadas, razones por las cuales, en la presente tesis se ha escogido este método para la obtención de SWCNTs. (Dai, 1996; Kong, 1998; Cassell, 1999; Li, 2001; Harutyunyan, 2002; Huang, 2003; Murakami, 2004; Seidel, 2004; Lamouroux, 2007)

Igualmente, la CVD se caracteriza por la obtención de redes de SWCNTs metálicos y semiconductores, estando estos últimos presentes en mayor porcentaje, siendo esta otra de las razones por las cuales se eligió este tipo de síntesis, aprovechando de este modo las propiedades de semiconducción de dichas nanoestructuras, aún así al encontrarse SWCNTs metálicos es aconsejable elegir las condiciones apropiadas que permitan la obtención de redes poco densas, con el fin de evitar posibles caminos metálicos que interfieran la respuesta dada por el dispositivo sensor.

2.2.3. Aplicaciones de nanotubos de carbono de una capa en sistemas de detección

En los últimos años ha aumentado significativamente el uso de nanotubos de carbono funcionalizados con biomoléculas dedicados al desarrollo de nuevos sistemas de detección química y/o biológica. Dentro de las biomoléculas empleadas podemos destacar el uso de enzimas y proteínas para el desarrollo de biosensores, anticuerpos para el desarrollo de inmunosensores, secuencias de ADN en el desarrollo de genosensores y aptámeros para el desarrollo de aptasensores. En los últimos años se han realizado numerosos trabajos en los que se realiza una revisión de estos sistemas de detección, en donde se encuentra en profundidad el aporte que cada trabajo proporciona en este campo. (Gooding, 2005; Balasubramanian,

2006; Kim, 2007; Agüí, 2008; Liu, 2008; Valentini, 2008; Kauffman, 2008; Grüner, 2006)

2.2.3.1. *Dispositivos no enzimáticos*

Dentro de los dispositivos desarrollados encontramos electrodos voltamperométricos y amperométricos, modificados por SWCNTs dispersados en polímeros conductores, aprovechando las ventajas que ofrece el uso de estos polímeros, como son su gran estabilidad, reproducibilidad, gran adherencia, numerosos sitios activos y homogeneidad en deposición electroquímica. (Wang, 2006) Entre esta clase de electrodos los más utilizados han sido los electrodos de carbón vítreo (*glassy carbon electrode*, GCE) modificados por SWCNTs, para lo cual se han usado diversos líquidos dispersantes como los polímeros Nafión, (Huang, 2003; Sun, 2007) chitosan, (Tkac, 2006) y el polipirrol (Li, 2007), lográndose obtener dispositivos amperométricos (Huang, 2003; Li, 2007) y voltamperométricos (Sun, 2007; Tkac, 2006) para la detección de 4-aminofenol (Huang, 2003), peróxido de hidrógeno (Tkac, 2006), así como también de cationes como el Cd^{+2} . (Sun, 2007) Igualmente se han usado solventes orgánicos como el dimetilsulfóxido como agente dispersante para la detección amperométrica de peróxido de hidrógeno (Salimi, 2008) y de fármacos como ranitidina y metronidasol. (Salimi, 2007)

Asimismo para la modificación de GCE se han usado SWCNTs con materiales híbridos formados por nanopartículas metálicas, polímeros, líquidos iónicos aglutinantes, en ocasiones micropartículas y ciclodextrinas. (Aguí, 2008) Con estos GCE modificados se ha logrado ampliar la variedad de sustancias detectadas voltamperométricamente, pasando por la

dopamina, (Zhang, 2006; Zhang, 2007) fármacos como la trifluoperazina, (Jin, 2008), xantina, (Xiao, 2008), cloranfenicol, (Xiao, 2007) compuestos nitroaromáticos como el trinitrotolueno (TNT), (Hrapovic, 2006) y contaminantes como el metilparation, (Fan, 2008); así como las detecciones amperométricas de nitrito, ácido ascórbico y ácido úrico (Li, 2007).

Dentro de los electrodos no enzimáticos igualmente se encuentran electrodos de metales como el platino que han sido modificados con SWCNTs y ácido fítico (Jo, 2008), electrodos de oro modificados con materiales híbridos de SWCNTs unidos a complejos metaloácidos de ftalocianina, (Ozoemena, 2007) de oro modificados por nanoarreglos de SWCNTs y tetraaminofalocianina, (Ozoemena, 2008) para la detección voltamperométrica de neurotransmisores como la dopamina y la epinefrina. Igualmente, se ha logrado la detección voltamperométrica de flavonoides como el rutósido, con electrodos de oro modificados con SWCNTs dispersados en dimetilformamida. (Zeng, 2006) Asimismo se encuentran electrodos de pasta de SWCNTs (SWCNTP) para la detección voltamperométrica de la coenzima nicotinamida adenina dinucleotido (Antiochia, 2005) y electrodos de fibra de carbón en forma de microdisco recubiertos por SWCNTs dispersados en Nafión para la detección amperométrica de monóxido de nitrógeno. (Du, 2008)

Además se han desarrollado sensores ópticos y acústicos basados en el uso de SWCNTs como materiales nanoestructurados sensibles en sensores de fibra óptica de sílice y microbalanza de cristal de cuarzo para la detección de compuestos aromáticos como el tolueno y el xileno a temperatura ambiente, (Consales, 2006; Consales, 2007) al igual que de hidrógeno a temperaturas criogénicas (Cusano, 2006).

Igualmente se encuentran inmunosensores o genosensores, como los electrodos de grafito pirolítico recubiertos por antibiotina para la detección amperométrica de la biotina (Catacaldo, 2008), electrodos de carbono serigrafiados (*screen-printed carbón electrode*) modificados por SWCNTs y fragmentos de ADN inmovilizados para la detección amperométrica de la *Escherichia coli* (Kerman, 2005) y la detección voltamperométrica del antígeno específico de la próstata mediante el uso de anticuerpos inmovilizados sobre microelectrodos de platino modificados con SWCNTs. (Okuno, 2007)

2.2.3.2. *Dispositivos enzimáticos*

Las enzimas han tenido un amplio uso en el desarrollo de electrodos modificados por SWCNTs, entre las más usadas se encuentran la glucosa oxidasa (GOx) (Liu, 2005) y la peroxidasa del rábano (*horseradish peroxidase*) para la detección amperométrica de glucosa, (Liu, 2005; Zhu, 2007; Muguruma, 2008) y peróxido de hidrógeno (Kum, 2007) mediante la modificación de electrodos de oro por películas formadas por dichas enzimas unidas a SWCNTs dispersados en polímeros de los anteriormente nombrados.

Asimismo se encuentran la tirosinasa inmovilizada en electrodos de SWCNTP para la detección amperométrica del bisfenol (Mita, 2007) e inmovilizada en GCE modificados con SWCNTs para la detección igualmente amperométrica de compuestos fenólicos como el fenol, m-cresol, p-cresol y ácido benzoico. (Zhao, 2005) Además, se halla la modificación de GCE mediante el uso de nanocompuestos formados por poli(azul de nilo A), SWCNTs y enzimas inmovilizadas para detecciones

amperométricas, como la GOx para la detección de glucosa (Du, 2008) y la alcohol deshidrogenasa para el etanol. (Du, 2007)

Otro campo importante dentro de las aplicaciones de los SWCNTs en los sistemas de detección son los transistores efecto campo (*field effect transistor*, FET) basados en SWCNTs. Estos dispositivos aprovechan las características semiconductoras de los SWCNTs para construir dispositivos sensores con excelentes parámetros de calidad, como por ejemplo una alta sensibilidad o la posibilidad de obtener bajos límites de detección. (Grüner, 2006; Kim, 2007; Kauffman, 2008) Al ser éste el dispositivo sensor utilizado en esta tesis, en el próximo apartado se profundizará al respecto.

2.3. *Transistores efecto campo basados en nanotubos de carbono de pared sencilla*

Un transistor es un dispositivo electrónico que, básicamente, tiene tres electrodos: fuente (*source* -S), drenador (*drain* -D) y puerta (*gate* -G). La corriente eléctrica que circula entre los electrodos fuente y drenador depende del voltaje aplicado y de la resistencia del canal semiconductor, siendo modulada por el electrodo puerta. Por otra parte en los transistores efecto campo lo que se aplica entre los electrodos fuente y puerta, separados por una capa dieléctrica que forma, en su conjunto, un condensador, es una diferencia de potencial, modulándose de esta manera la corriente que circula entre los electrodos fuente y drenador, asemejándose al comportamiento de un interruptor "ON/OFF" (conducción/no conducción). (Kauffman, 2008) Esta corriente eléctrica también se puede modular, no sólo a través del circuito eléctrico sino también electroquímicamente, a través de las cargas de los compuestos químicos que están en contacto con la capa semiconductor. Ello constituye el fundamento del sensor electroquímico.

El dispositivo con el que se ha trabajado en esta tesis doctoral es el transistor de efecto campo cuyo canal conductor está formado por uno o más SWCNTs, por lo que recibe el nombre de CNTFET (*carbon nanotube field effect transistor*). Para poder desempeñarse adecuadamente como canal conductor en un CNTFET es necesario que los SWCNTs presenten propiedades de semiconducción o que al menos, si se encuentran formado una red, el carácter global de la red sea semiconductor.

Por tanto, un dispositivo CNTFET puede ser diseñado empleando un solo SWCNT semiconductor (Figura 6(a)) o redes de SWCNTs (Figura 6(b)) (Snow, 2003) contactadas por dos electrodos metálicos fuente y drenador, depositados sobre una fina capa de SiO₂. El tercer electrodo (puerta) corresponde a un sustrato dopado (usualmente Si), siendo éste último el que, a través del efecto campo eléctrico, modula el flujo electrónico que pasa a través de los SWCNTs. (Star, 2004)

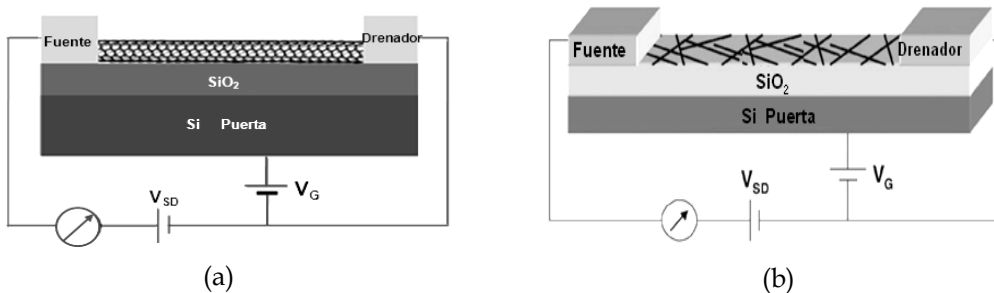


Figura 6. (a) Representación esquemática de un CNTFET formado por un solo SWCNT semiconductor contactado por los electrodos metálicos fuente (S) y drenador (D) con Si como electrodo puerta (G) separado por una capa aislante de SiO₂ en el circuito (Star, 2004) (b) representación esquemática de un CNTFET formado por una red de SWCNT como canal conductor, (Kauffman, 2008)

En una red de SWCNTs se encuentran nanotubos semiconductores y metálicos dado que en las diversas técnicas usadas para la síntesis de nanotubos se mantiene una relación aproximada de 3:1 respectivamente (Dresselhaus, 2001). Ya que en su mayoría estas redes forman el canal semiconductor de los CNTFETs, se hace necesario para trabajar con estas redes que posean una densidad máxima de nanotubos/ μm^2 planteada por Grüner y sus colaboradores de 1.43 nanotubos/ μm^2 , (Hu, 2004) conocido como límite de percolación. Estando dentro de este límite se evita que hayan demasiados caminos de conducción a través de SWCNTs

únicamente metálicos que alteren el comportamiento de la respuesta eléctrica obtenida por el CNTFET.

Por tanto, en redes densas de SWCNTs, el efecto de los SWCNTs metálicos dominará en la conductancia del estado apagado (*OFF-state*) que puede alcanzarse por aplicación de V_G positivos, viéndose reducida la modulación, es decir la diferencia de conductancia entre los estados encendido/apagado del dispositivo, al igual que la sensibilidad del dispositivo. (Hu, 2004; Byon, 2006)

Los SWCNTs presentan en la atmósfera comportamiento semiconductor tipo “p”, es decir, sus transportadores mayoritarios de carga son agujeros electrónicos, (Figura 7(a)) gracias al efecto electroatractor del oxígeno del aire, que retira electrones de los nanotubos dejándolos en defecto respecto a los agujeros. (Derycke, 2002)

Mediante el potencial aplicado en el electrodo puerta se controla el paso de corriente a lo largo del canal formado por el o los SWCNT, ya que un V_G positivo polariza el sistema de forma tal que se provoca acumulación de cargas negativas en la capa de SiO_2 en contacto con el nanotubo. Siendo así los agujeros electrónicos pueden cancelarse con estas cargas negativas y llegar incluso a cancelar la corriente eléctrica encontrándose en estado apagado (*OFF-state*) (Figura 7(b)), así mismo al aplicarse un V_G negativo ocurre lo contrario por lo que la intensidad de la corriente aumenta, (Figura 7(c)) debido al comportamiento tipo “p” característico de estas nanoestructuras.

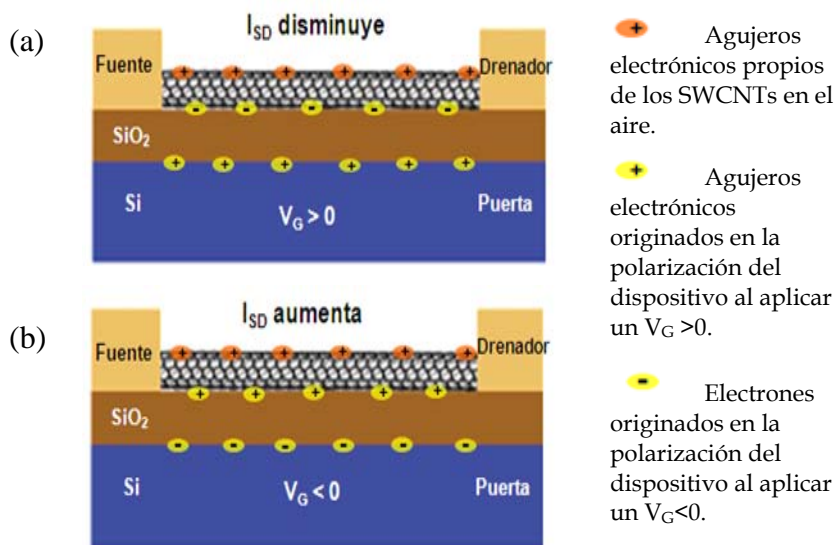


Figura 7. (a) Con V_G positivo los agujeros electrónicos en el nanotubo disminuyen y se reduce la corriente I_{SD} . (b) Con V_G negativo, los agujeros electrónicos se incrementan lo que genera un aumento en el flujo electrónico.

Es por esto que se afirma que un FET es un dispositivo controlado por tensión, ya que la intensidad de la corriente de salida del electrodo drenador I_{SD} , depende de la tensión (voltaje) aplicada en el electrodo puerta V_G . Los primeros CNTFETs fueron reportados en 1998 por Tans y col. (Tans, 1988) y Martel y col. (Martel, 1988).

En la Figura 8 puede apreciarse los componentes fundamentales para una señal eléctrica tipo "p" de un CNTFET formado por un SWCNT semiconductor individual, entendiéndose la tensión umbral como la tensión de puerta mínima para que circule corriente eléctrica por el canal, la modulación como la variación de esta corriente a partir de la tensión umbral y la transconductancia como la relación del cambio en la corriente del drenador con respecto al cambio del voltaje de puerta durante un

pequeño intervalo de la curva I_{SD} vs. V_G , como se aprecia en la Figura 8 (b) en donde se observa una reducción en la pendiente (a un $V_G=0$) de la transferencia característica originada por un cambio en la movilidad de la carga (electrones o huecos). (Allen, 2007).

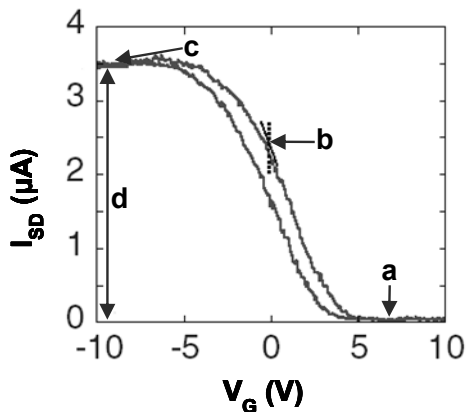


Figura 8. Representación gráfica de la señal eléctrica I_{SD} típica de un dispositivo CNTFET tipo "p" y su dependencia con el voltaje de puerta V_G . (a) Tensión umbral, (b) transconductancia, (c) máxima conductancia y (d) modulación. (Allen, 2007)

Como se expresó anteriormente, en las síntesis de SWCNTs se obtienen mezclas de SWCNTs metálicos y semiconductores formando redes o manojos (bundle). Por lo tanto en redes muy densas de SWCNTs, igualmente son numerosos los caminos metálicos, los cuales llevan a la obtención de señales contrarias a las típicas obtenidas por un transistor, como los nanotubos metálicos presentan intensidad de base constante, no pueden llegar a valor de intensidad igual a cero ni a potenciales de puerta elevados. Apréciase en la Figura 9 (a) la ausencia de modulación por parte de los SWCNTs metálicos, aún así se presenta una conductividad fuerte debido a los semiconductores presentes (Avouris, 2002), contrario al comportamiento observado en la característica curva de corriente eléctrica

obtenida por un CNTFET. Por lo tanto es evidente que son de interés por sus propiedades los SWCNTs semiconductores para lograr la modulación de la respuesta eléctrica obtenida mediante el V_G aplicado en un CNTFET. (Tans, 1998; Nygard, 1999)

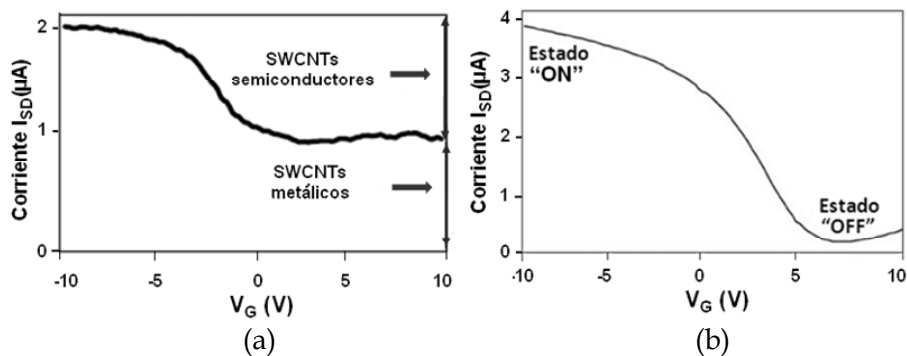


Figura 9. Medida de la corriente eléctrica entre la fuente y el drenador (I_{SD}) vs el voltaje puerta (V_G) obtenida, aplicando un barrido de voltaje puerta de -10 a +10 V con un V_{SD} constante de 0.05 V de dos CNTFETs. (a) Red densa con numerosos SWCNTs metálicos (b) Red poco densa de SWCNTs semiconductores.

En los CNTFETs los electrodos metálicos fuente y drenador están en contacto directo con los SWCNTs. La interface SWCNT-metal es una región de creciente densidad electrónica que genera una banda de valencia en el SWCNT llamada región de agotamiento. La diferencia de energía entre esta banda y la del metal forma una barrera de potencial llamada barrera de Schottky (BS) que genera una resistencia eléctrica que dificulta la transmisión de agujeros electrónicos desde los SWCNT al electrodo metálico. (Derycke, 2002) Igualmente los contactos de los electrodos fuente y drenador en los SWCNTs equilibrarán los niveles de Fermi, como resultado de la donación de electrones desde los metales hacia la banda de valencia de los SWCNTs. (Kim, 2007; Kauffman, 2008)

Asimismo el comportamiento de los CNTFETs como transistores se puede entender en base del transporte a través de la barrera de Schottky en la interfase del contacto metal/SWCNT, (Javey, 2003) la cual a su vez puede depender de los detalles de la geometría del contacto metal-SWCNT, (Heinze, 2005) del diámetro y quiralidad del nanotubo, así como de la temperatura del sistema y del barrido de voltaje usado. (Dresselhaus, 2001; Heinze, 2002; Appenzeller, 2004) Igualmente la elección de los contactos metálicos también afecta al comportamiento del dispositivo. (Chen, 2005)

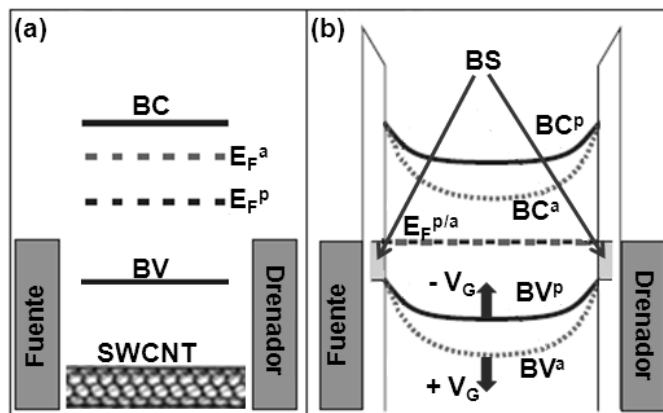


Figura 10. Diagramas de bandas simplificados para (a) antes y (b) después del contacto metálico fuente y drenador (S y D) con un original "p" y aminofuncionalizado "a" SWCNT en la configuración del CNTFET. La donación electrónica desde las fracciones amino de la proteína origina la variación del nivel Fermi (E_F), traduciéndose en una mayor flexión de las BV y BC. La aplicación de voltajes de puerta V_G positivos o negativos aumenta y disminuye la flexión de las bandas respectivamente, como lo indican las flechas gruesas. (Kim, 2007)

Para comprender el comportamiento de las bandas antes y después del contacto metal/SWCNT, encontramos la comparación del comportamiento de un SWCNT sin funcionalizar y otro funcionalizado con grupos amino. Un diagrama de funcionamiento de las bandas de un dispositivo CNTFET

se aprecia en las Figura 10 (a) y (b). (Kim, 2007) Antes del contacto con los electrodos fuente y drenador puede observarse las diferentes energías de Fermi (E_F) antes y después de funcionalizar los SWCNTs. Tras el contacto S-D con los SWCNTs se igualan los niveles de Fermi de los nanotubos (sin funcionalizar y funcionalizados) y los electrodos, lo cual origina la flexión de las bandas de valencia, BV, y de conducción, BC, de los SWCNTs, formándose la barrera de Schottky del contacto SWCNT-metal. (Martel, 1998; Kim, 2007) (Figura 10 (b))

2.3.1. Funcionalización de SWCNTs

Tal como hemos venido hablando los CNTFET presentan grandes ventajas con respecto a otros dispositivos y /o métodos de detección química por su alta sensibilidad. Aun así presentan desventajas como su falta de selectividad, la cual es resultado de la exposición de los átomos de carbono al medioambiente químico que los rodea, por lo que reaccionan fácilmente con las sustancias presentes a su alrededor, siendo necesario recurrir a métodos que les proporcionen selectividad hacia el analito deseado.

La funcionalización de los SWCNTs les permite ampliar su campo de acción, ya que así son aprovechadas tanto las propiedades propias como las que se derivan de la incorporación de grupos funcionales en su superficie. (Star, 2004; Snow, 2005) Por ejemplo, por medio de la funcionalización se logra no sólo la incorporación de receptores adecuados que interactúan específicamente con el analito de nuestro interés, sino también proteger a los nanotubos de las interacciones no-específicas no deseadas.

En la bibliografía se encuentran descritos diferentes métodos covalentes (Balasubramain, 2005) y no covalentes de funcionalización (Tasis, 2006) para la modificación química de los SWCNTs. (Kong, 2001; Lin, 2004; Banerjee, 2005; Balasubramanian, 2005; Tasis, 2006; Balasubramanian, 2008; Lu, 2009) A pesar de que el primer método permite la fijación covalente de grupos moleculares específicos por medio de la modificación química de las paredes y extremos de los SWCNTs; (Boul, 1999; Chen, 2001; Hirsch, 2002; Sun, 2002) de igual forma altera las propiedades electrónicas propias de estas nanoestructuras. (Star, 2004)

Balasubramain y Burghad plantean tres diferentes tipos de funcionalización covalente de los SWCNTs, (Balasubramain, 2005) la funcionalización química termalmente activada, la modificación electroquímica y la funcionalización fotoquímica. A nivel de ejemplo de la funcionalización covalente se encuentra la oxidación de lo SWCNTs para generar grupos carboxilo que permitan el acoplamiento covalente de moléculas a la superficie de los SWCNTs a través de enlaces amino y éster. (Kam, 2005) Asimismo, se pueden incorporar una amplia gama de fracciones orgánicas, mediante el uso de moléculas bifuncionales (como las diaminas) como enlace, igualmente se han empleado para su funcionalización dendrímeros, ácidos nucleicos mediante reacciones que permiten su acoplamiento, (Li, 2005, Wang, 2006, Lee, 2004) numerosas enzimas y proteínas, al igual que complejos metálicos entre otros. (Balasubramanian, 2005)

Por otra parte en la funcionalización no covalente no se da la modificación de las propiedades eléctricas de los nanotubos, ya que consiste en la adsorción de los receptores apropiados sobre las paredes de los SWCNTs.

Asimismo este método de funcionalización presenta dos opciones, la primera consiste en el recubrimiento de los SWCNTs con polímeros y posterior unión covalente del receptor al polímero ya sea de forma directa o por intermedio del uso de moléculas de anclaje y la segunda corresponde al recubrimiento directo por adsorción del receptor en el SWCNT. Al igual que con las proteínas, el ADN y el ARN pueden usarse para funcionalizar nanotubos de carbono de forma no covalente al fijarse por adsorción a la superficie de los SWCNTs (Chen, 2002; Zheng, 2003; Chen, 2007, Han, 2007)

A modo de ejemplo de la funcionalización no covalente está el trabajo desarrollado por Dekker y sus colaboradores, (Besteman, 2003) con el uso CNTFET formados por SWCNT individuales funcionalizados con la enzima glucosa oxidasa (GOx) fijada sobre la superficie del nanotubo a través de una molécula de anclaje (grupo pireno), obteniendo un claro cambio en la conductancia del dispositivo al agregarle glucosa, lo que permitió su detección gracias a la actividad enzimática de la GOx. (Figura 11)

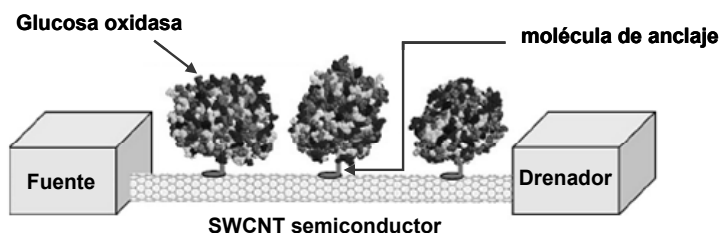


Figura 11. Representación de un SWCNT semiconductor situado entre los electrodos fuente- drenador, con la glucosa oxidasa GOx inmovilizada en su superficie mediante el uso de una molécula de anclaje. (Besteman, 2003)

El uso de polímeros en la funcionalización de SWCNTs cada día es más habitual, ya que éstos pueden ofrecer una doble función. En primer lugar

pueden proteger al SWCNT de interacción inespecíficas con las proteínas y otras sustancias del medio e igualmente pueden usarse para fijar de forma covalente moléculas receptoras a la superficie de los nanotubos, permitiendo de esta forma la obtención de dispositivos sensores selectivos para analito específicos.

Un ejemplo del uso de polímeros esta en el trabajo desarrollado por Star y col. (Star, 2003) mediante el cual recubre al SWCNT con una mezcla de dos polímeros, polietilenimina (PEI) y polietilenglicol (PEG). El primero proporciona los grupos amino para el acoplamiento covalente de la molécula receptora (biotina-N-hidroxi-succinimidil éster) a la superficie del SWCNT y el segundo previene de manera eficiente la adsorción inespecífica de biomoléculas, en este caso de la estreptavidina. (Figura 12)

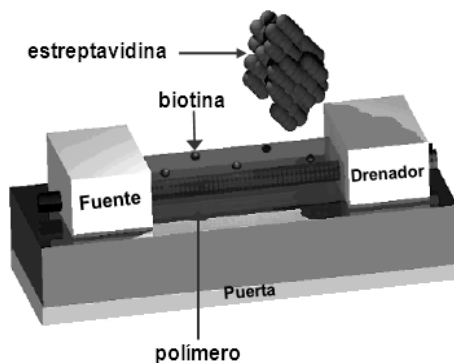


Figura 12. Representación de un CNTFET recubierto por una capa polimérica formada por PEI/PEG (azul) con la posterior inmovilización de biotina como elemento de reconocimiento (rojo) de la estreptavidina. (Star 2003)

Entre las funcionalizaciones desarrolladas mediante el uso de polímeros se encuentran los trabajos con PEI (Star, 2003; Chen, 2004; Hu, 2008), con PEG (Star, 2003; Chen 2004; Hu, 2008) o Tween 20 (Chen, 2003; So, 2005; Villamizar, 2008) entre otros, siendo tal vez el más empleado el PEI. Al

recubrir a los nanotubos con este polímero los transportadores mayoritarios de carga son los electrones, como resultado de la transferencia electrónica de los grupos amino del polímero, por lo que la señal eléctrica del CNTFET cambia de tipo “p” a “n”, con intensidades cada vez mayores al aumentar el V_G (Shim, 2001, Qi, 2003). Este cambio facilita la caracterización eléctrica durante el proceso de funcionalización.

En su gran mayoría los polímeros anteriormente nombrados han sido empleados para la funcionalización de SWCNTs de CNTFETs usados para la detección de moléculas de elevado peso molecular, al contrario del surfactante Tween 20, del cual ya se encuentran trabajos en otros sistemas de detección que hacen referencia a la detección de moléculas pequeñas. (Piao, 2008)

2.3.2. Mecanismos de respuesta en la interacción entre el analito y el nanotubo de carbono

Como sabemos el canal conductor de un CNTFET puede estar formado por un solo SWCNT semiconductor (Tans, 1998; Star, 2003) o por redes de SWCNTs. (Snow 2003, Zhou, 2006) De igual forma la interacción analito-SWCNT generalmente puede darse de formas diferentes, por lo que pueden presentar diferentes mecanismos de respuesta. Por tanto, los trabajos desarrollados de CNTFETs citan a la transferencia de carga o modificación de la barrera de Schottky como factores predominantes ante el mecanismo de respuesta de esta clase de dispositivo sensor. (Heinze, 2002; Chen, 2005) Asimismo Dekker y sus colaboradores partieron del estudio de la conducción de huecos y de electrones para identificar cuatro

mecanismos de detección basados en la adsorción de proteínas. (Heller, 2008)

En la Figura 13 (a) se aprecia el desplazamiento de la curva I_{SD} de un SWCNT (tipo p) a lo largo del eje de voltaje puerta V_G como resultado de la modulación electrostática por parte de especies cargadas eléctricamente, las cuales inducen un dopaje en el SWCNT, de forma tal que la adsorción de especies cargadas negativamente transfieren esta carga negativa al SWCNT, observándose un desplazamiento de la curva I_{SD} hacia V_G más negativos, ocurriendo de igual forma lo opuesto al ser adsorbidas cargas positivas.

Asimismo, en la Figura 13 (b) se observa el efecto de la barrera Schottky en el comportamiento del CNTFET, donde la adsorción de biomoléculas en el contacto metálico cambia la función del metal y altera la alineación de la banda del SWCNT, debido a la existencia de diferentes barreras para el transporte de huecos y electrones ellos sugieren que la modificación de la barrera Schottky puede originar cambios asimétricos para la conducción tipo n (electrones) y p (huecos).

Un cambio en la capacitancia del dispositivo CNTFET se observa en la Figura 13 (c), mediante un ejemplo modelado por el comportamiento de una puerta líquida (electrolito) en el CNTFET que disminuye la adsorción molecular. Para el comportamiento planteado se ha requerido un cubrimiento casi completo de los SWCNT (cerca del 90%).

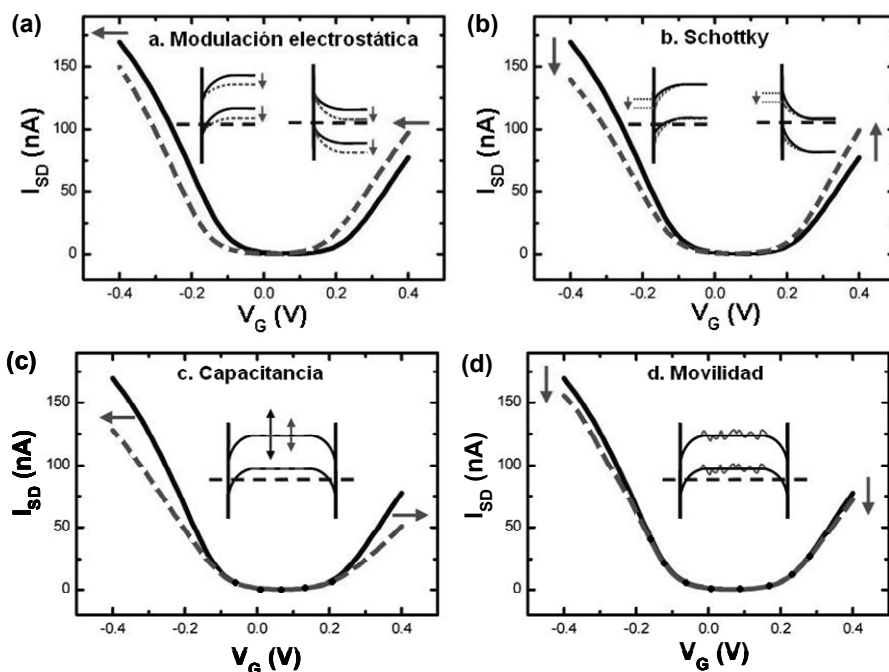


Figura 13. Cambios en la transferencia característica de un CNTFET, antes (—) y después (---) de la adsorción de una proteína. Los insertados muestran el efecto resultante en la estructura de banda del SWCNT. (a) Modulación electrostática en el SWCNT resulta en un desplazamiento lateral en la transferencia característica sin un cambio en la transconductancia. (b) la modificación de la barrera Schottky resulta en efectos opuestos para el transporte de huecos y electrones. Posteriormente, un aumento en la conductividad tipo-n (a V_G positivos) y una disminución en la conductividad tipo-p (a V_G negativos) ocurre. Cambios en (C) capacitancia y (D) movilidad tienen similares efectos en la característica transferencia de un CNTFET. (adaptado de Heller, 2008)

Finalmente, en la Figura 13 (d) se observa que un cambio en la movilidad de la carga se traduce en una reducción en la pendiente de la transferencia característica denominada transconductancia, lo cual lleva a la disminución en la conductancia, aun así es poco probable que la detección sea dominada por este mecanismo, ya que para que haya un cambio significativo en las curvas la movilidad de las cargas debe ser reducida drásticamente, por ejemplo, para las curvas de la Figura 13 (d) la reducción ha sido del 98%.

Sin embargo, para Dekker y sus colaboradores la mayoría de los resultados se explican por combinación de efectos de modulación electrostática y de barrera Schottky, ya que estos mecanismos tienen diferente dependencia del potencial aplicado a puerta, el cual puede afectar fuertemente los resultados de los experimentos de biodetección en tiempo real. Por otra parte, el efecto de la barrera Schottky en el contacto metálico parece menos posible y reproducible que el efecto de modulación electrostática a lo largo de los SWCNT. (Heller, 2008)

2.3.3. Aplicaciones de los CNTFETs

Hasta el día de hoy se han venido desarrollando numerosos trabajos en donde se estudia la aplicación de los dispositivos sensores basados en nanotubos de carbono, (Javey, 2003; Grüner, 2006; Kauffman, 2008; Kim, 2007) en donde al ser funcionalizados con biomoléculas como enzimas, (Besteman, 2003) proteínas (Bradley, 2004; Chen, 2004; Star, 2003), oligonucleótidos (Star, 2006; Wang 2009) entre otros, actúan como biosensores.

Entre estos biosensores encontramos los CNTFET en donde se observan los trabajos que centran su desempeño en la detención electroquímica mediante interacciones biotina-estreptavidina (Star, 2003; Hu, 2008), inmunoglobulinas, (Chen, 2003; Maehashi, 2007; Cid, 2008) aptámeros, (So, 2005; Maehashi, 2007), anticuerpos monoclonales, (Villamizar, 2009), albúmina de suero de cerdo (Abe, 2007), así como la detección electroquímica de secuencias de ADN específicas a través del evento de hibridación mediante uso de redes de SWCNTs (Gui, 2007), polímeros

sintéticos (Martínez, 2009) y oligonucleótidos sintéticos (Star, 2006; Martínez, 2009).

Como puede apreciarse los CNTFETs en su gran mayoría se han encaminado en la detección de moléculas de gran tamaño. (Javey, 2003; Grüner, 2006; Kauffman, 2008; Kim, 2007) Recientemente Zhao y sus colaboradores (Zhao, 2008) desarrollaron un CNTFET funcionalizado con un pequeño receptor sintético, la pirenociclodextrina, con el fin de detectar una serie de sustancias pequeñas. Aún así se hace evidente la necesidad de continuar avanzando en el desarrollo de CNTFETs que faciliten este tipo de detección.

2.4. *Mecanismo de reconocimiento molecular*

La finalidad de un sensor es que este permita la detección de un determinado analito de forma altamente sensible y selectiva, por lo que se recurre a diversas técnicas de detección. Una de ellas incorpora receptores que interactúen exclusivamente con el compuesto de interés y no con otros, por medio de elementos de reconocimiento específicos conocidos como reconocimiento molecular.

Al hablar de reconocimiento molecular hay que hacer mención a la química supramolecular, (Gellman, 1997) también conocida como química receptor-sustrato, o la química que va más allá de la molécula, que se basa en el principio “llave y cerradura” planteado por Fisher en 1894, que corresponde a la capacidad que tienen las moléculas de reconocerse mutuamente, de forma tal que la interacción receptor-sustrato se lleva a cabo acorde a la afinidad y complementariedad que haya entre ambos, dándose así un reconocimiento y fijación del sustrato por parte del receptor, originando un complejo receptor-sustrato.

Dicho reconocimiento se controla por interacciones específicas de naturaleza no covalente, y se da por la forma en que receptor-sustrato se reconocen e interaccionan de forma selectiva. Asimismo se rige por varios aspectos: primero por la complementariedad estérica dada por la afinidad de forma y tamaño entre el receptor y el sustrato, al igual que la complementariedad química que viene determinada por la existencia de sitios de interacción complementaria entre ambas especies, lo que permite enlaces por puentes de hidrógeno, atracción electrostática y/o interacciones

de apilamiento aromático y finalmente por las atracciones de Van der Waals entre regiones hidrofóbicas de las dos especies. (Gellman, 1997; Steed, 2000)

El reconocimiento molecular se halla presente en gran parte de los procesos biológicos. Por ejemplo el sistema inmune está basado en el reconocimiento antígeno-anticuerpo, (Addadi, 2008) o la catálisis enzimática basada en la identificación supramolecular del centro activo de la enzima sobre el sustrato y la acción hormonal mediante la identificación de los ligandos por parte de los receptores celulares entre otros.

Con los sensores se pretende la detección selectiva de analitos a través de diversos mecanismos de reconocimiento molecular mediante el uso de moléculas receptoras apropiadas, asemejando los procesos de reconocimiento que a nivel biológico tienen lugar, generando una respuesta determinada. En estos dispositivos sensores la molécula receptora viene siendo nuestro elemento de reconocimiento (enzimas, anticuerpos, receptores celulares, etc), que se encuentran en contacto directo con transductores que permiten convertir la señal biológica en una señal medible. Estos biosensores se caracterizan por su alta selectividad debido a la gran afinidad que existe entre la biomolécula receptora y su respectivo sustrato, afinidad que les permite la obtención de complejos bastantes estables.

2.4.1. Receptores nucleares

Los receptores nucleares o citoplasmáticos constituyen una gran familia de receptores que comparten una organización estructural común, son

proteínas solubles localizadas en el citoplasma o en el núcleo celular y actúan como factores de transcripción ligando-dependientes que controlan una gran variedad de procesos biológicos como crecimiento, diferenciación, metabolismo y reproducción entre otros. Es por eso que los receptores nucleares desempeñan un papel muy importante en la etiología de numerosas enfermedades, en el uso terapéutico y en el desarrollo de nuevos tratamientos farmacológicos entre otros, poco a poco de igual forma se han ido involucrando en el uso en sistemas de detección.

A nivel de detección química se han realizado diversos trabajos que abarcan los avances en el uso de receptores naturales como elemento de reconocimiento en biosensores (Subrahmanyam, 2002; Rodríguez-Mozaz, 2004) Entre estos trabajos encontramos sensores piezoeléctricos tipo sándwich, que usan elementos de respuesta a estrógenos inmovilizados que permiten la detección del complejo formado al unirse el 17β -estradiol al receptor de estrógenos (RE). (Zhihong, 1999) Igualmente se destaca el desarrollo de sensores basados en la inmovilización de la región de unión al ligando del RE y del receptor de la hormona tiroides sobre electrodos de oro para la detección del 17β -estradiol y de la hormona tiroides respectivamente, creando señales que dependen de la concentración y que pueden ser detectadas mediante voltametría cíclica (Murata 2001; Murata, 2003) Asimismo se ha analizado la cinética de la unión al ligando del RE (α y β) a moléculas pequeñas mediante la detección por resonancia de plasmones superficiales (SPR). (Rich, 2002)

2.4.1.1. Receptor de estrógenos

El receptor del estrógeno (RE) es una proteína perteneciente a la extensa familia de los receptores nucleares de hormonas esteroides/tiroideas cuya actividad depende de la unión a un ligando hormonal (Oostenbrink, 2000). Actualmente se han identificado dos receptores de estrógenos conocidos como RE- α y RE- β , formados por 595 y 530 aminoácidos (aa) distribuidos en diferentes dominios, con pesos moleculares de 66 y 53 kilodalton (KDa) respectivamente. (Kuiper, 1996) Existe un tercero y nuevo receptor de estrógenos conocido como GPR30 (receptor acoplado a la proteína G número 30), localizado en el retículo endoplasmático en donde se une específicamente al estrógeno. Aún así se desconoce si existe alguna similitud estructural entre el GPR30 y los REs que explique la unión del estradiol. (Filardo, 2002; Levin, 2003; Revankar, 2005) Este tercer receptor además actúa de manera independiente del RE- α y RE- β . (Filardo, 2006)

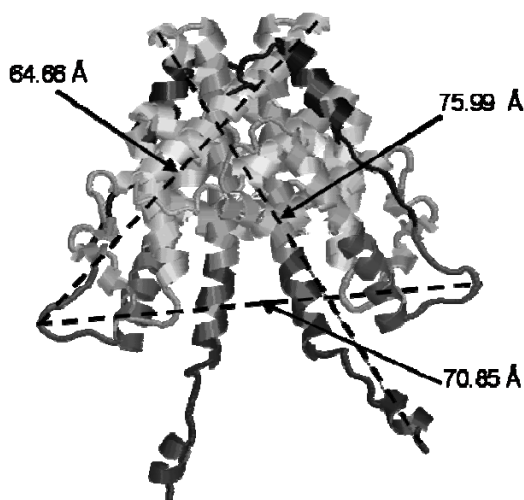


Figura 14. Estructura molecular del receptor de estrógenos alfa (RE- α) con sus dimensiones: 70.85 Å x 75.99 Å x 64.66 Å

Asimismo, estos RE son codificados por genes diferentes y su expresión varía dependiendo del tipo de tejido, (Hiroi, 1999) por lo que el RE- α (Figura 14) se expresa más que todo en los órganos reproductivos (útero, mama y ovarios), al igual que en el hígado y el sistema nervioso central, mientras que el RE- β se expresa predominantemente en los tejidos presentes en huesos, endotelio, pulmones, tracto urogenital, ovario, sistema nerviosos central y la próstata. (Nilsson, 2001; Anderson, 2002, Palmieri, 2002)

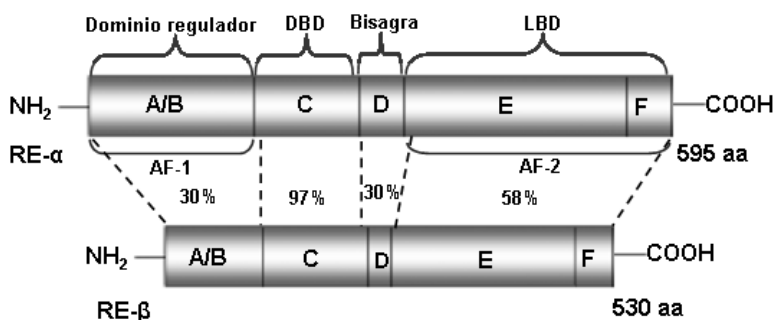


Figura 15. Representación esquemática de la organización de los dominios de los receptores estrogénicos ER- α y ER- β . Un dominio regulador situado en las regiones A/B, un dominio central de unión al ADN (DNA-binding domain, DBD) en la región C, el dominio de bisagra de la región D y el dominio de unión al ligando (ligand-binding domain, LBD) comprendido por las regiones E y F. Obsérvese la homología a nivel porcentual de los dominios de los dos receptores, así como los dominios de transactivación, el AF-1, localizado en el extremo amino terminal (región A/B), y el AF-2, localizado en el extremo carboxilo terminal (región E).

Estos receptores están conformados por seis dominios (Figura 15) denotados de la A a la F, codificados por 8-9 exones (Kuiper, 1998). La región A/B está localizada en el grupo amino terminal de la proteína. Entre los receptores es la región más variable tanto en tamaño como en frecuencia

de aminoácidos. Esta región es conocida como dominio regulador y es importante en la activación de la transcripción génica. Además presenta varios sitios de fosforilación los cuales son importantes en el proceso de activación del receptor. Asimismo la región amino presenta una región de transactivación denominada AF-1, la cual es ligando-independiente. (Noriega-Reyes, 2008)

De forma adyacente se encuentra la región de unión al ADN o dominio C, siendo la más homogénea entre los diferentes receptores nucleares, en ella están presentes nueve residuos del aminoácido cisteína que son invariablemente conservados entre los diferentes receptores esteroideos. Estos residuos se ubican alrededor de dos iones de zinc conocidos como “dedos de zinc”, que facilitan la unión del dominio C al ADN. La unión a una secuencia de ADN está determinada por la composición de los aminoácidos localizados entre dichos iones, conocida como la caja P (*P-Box*).

Entre la región de unión al ADN y el dominio E/F se encuentra la región D (región de bisagra) que es variable y permanece unida al receptor mientras éste se encuentre inactivo. Finalmente, en el extremo (grupo carboxilo) se encuentra la región E/F o dominio de unión al ligando (LBD), donde se une a estrógenos naturales como el 17 β -estradiol y a ligandos sintéticos. Esta región a pesar de que es conservada entre los diferentes receptores esteroideos, es altamente específica, (Oosterkamp, 1997; Barrón, 2001; Murphy, 2002) y además presenta una región de localización nuclear, regiones de homodimerización y un dominio de transactivación denominado AF-2 que es dependiente del ligando. (Routledge, 2000)

2.4.1.2. Estrógenos y xenoestrógenos

Los estrógenos son hormonas endógenas producidas principalmente por los ovarios, en menor proporción por las glándulas suprarrenales y los testículos, cuya función fisiológica en la mujer se asocia al desarrollo y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios, entre otros. En los hombres la actuación fisiológica de los estrógenos no está aun bien definida, pero probablemente participan en la regulación de los niveles de andrógenos y en la conducta sexual.

Asimismo encontramos los estrógenos sintéticos usados en terapia hormonal, entre los que se encuentran el etinilestradiol, metilestradiol, y el dietilestilbestrol, siendo este último considerado como carcinógeno. Además encontramos los fitoestrógenos presentes en los vegetales, considerados ligandos más débiles que los estrógenos naturales y mucho menos que los sintéticos. Los fitoestrógenos más destacados son el cumestrol, genisteina, daidzeina y equol entre otros.

Finalmente se encuentran xenoestrógenos como el bisfenol A (BFA), el pentaclorofenol, el 4-nonilfenol, 2,4-diclorofenol, 4-terbutilfenol, 4-octilfenol entre otros, considerados estrógenos artificiales al igual que disruptores endocrinos (Olea, 1999), ya que se comportan como hormonas cuando se encuentran dentro del organismo, aumentando el efecto de las propias hormonas o bloqueando la acción de estas al ocupar su lugar. (Olea, 1999; Witorsh, 2002; Gutendorf, 2001)

La similitud entre los xenoestrógenos y los estrógenos (ver Figura 16) es la principal razón para el aumento de una serie de enfermedades y la aparición de otras relacionadas con el desarrollo sexual y el aumento de algunos tipos de cáncer (Oosterkamp, 1997; Mueller, 2004, Gehring, 2004). Igualmente, a nivel animal se han encontrado un buen número de anomalías relacionadas con la presencia de estos compuestos.

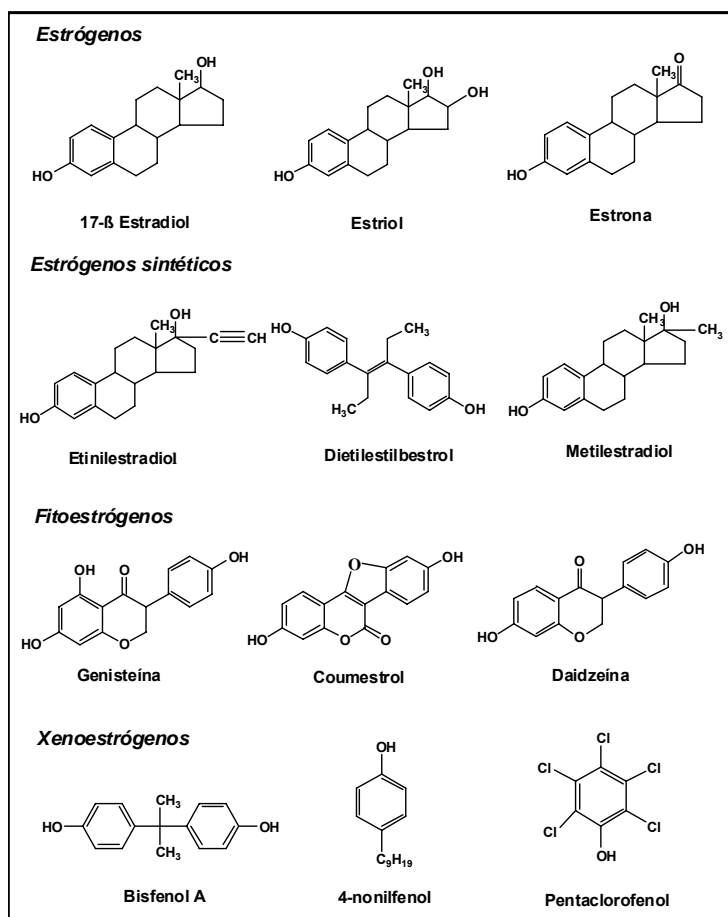


Figura 16. Estructura química de algunos estrógenos y xenoestrógenos

El bisfenol A (BFA) (Figura 17) cuyo peso molecular es 228,29 g/mol se usa ampliamente en la formación de resinas epoxi, alquilfenoles y algunas

resinas de poliéster. Es muy habitual en contenedores de microondas, utensilios de cocina, además de su amplio uso a nivel de plásticos. (Stoker, 2003; Mueller, 2004; Murphy, 2002). También se encuentra presente en la pintura que recubre el interior de las latas de conserva, en los sellantes dentales o en algunos productos farmacéuticos (pastillas anticonceptivas). (Murphy, 2002; Calafat, 2005; Sonnenschein, 1998)

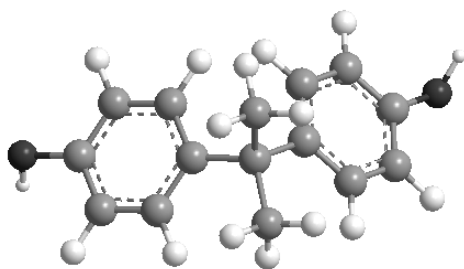


Figura 17. Estructura molecular del bisfenol A (BFA)

Diversos estudios han señalado la capacidad del BFA, para unirse o mimetizar la actuación de los receptores estrogénicos y por tanto inducir la actividad estrogénica, presentando propiedades estrogénicas fuertes y exhibiendo acciones tanto agonistas como antagonistas para el RE- α , mientras que para el RE- β solo presenta acciones agonistas.

2.4.1.3. Dispositivos y sensores basados en nanomateriales para la determinación de compuestos xenobióticos

La creciente presencia de compuestos xenobióticos en el medio ambiente es de vital interés debido a los efectos negativos que ejercer estos contaminantes sobre los animales y seres humanos. Entre las fuentes

principales de estos compuestos se encuentran los pesticidas, herbicidas e insecticidas usados en agricultura, agentes químicos de guerra y los estrógenos sintéticos utilizados por los seres humanos. Por lo tanto su detección y cuantificación son importantes con el fin de prevenir enfermedades y preservar la salud.

Anexo a este capítulo se encuentra un artículo que consiste en una revisión crítica de los avances en la detección y cuantificación de los compuestos xenobióticos presentes en el medio ambiente mediante el uso de sensores y dispositivos basados en nanomateriales. El artículo se encuentra estructurado en dos apartados. En el primero se resumen brevemente los compuestos xenobióticos a determinar, y el segundo comprende las nanoestructuras usadas actualmente en el desarrollo de sensores, electrodos y dispositivos para la detección y cuantificación de los compuestos xenobióticos, haciendo especial mención tanto en los mecanismos de reconocimiento molecular como de transducción en los distintos sensores desarrollados.

2.5. Bibliografía

- M. Abe, K. Murata, A. Kojima, Y. Ifuku, M. Shimizu, T. Ataka, K. Matsumoto, *J. Phys. Chem. C*, 2007, 111, 8667.
- L. Addadi, N. Rubin, L. Scheffer, R. Ziblat, *Acc. Chem. Res.*, 2008, 41, 254.
- L. Aguí, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, *Anal. Chim. Acta*, 2008, 622, 11.
- B.L. Allen, P.D. Kichambare, A. Star, *Adv. Mater.*, 2007, 19, 1439.
- B.L. Allen, P.D. Kichambare, A. Star, *Advan. Mater.*, 2007, 19, 1439.
- E. Anderson, *Breast Cancer Res.*, 2002, 4, 197.
- R. Andrews, D. Jacques, D. Qian, T. Rantell, *Acc. Chem. Res.*, 2002, 35, 1008.
- R. Antiochia, I. Lavagnini, F. Magno, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, 381, 1355.
- J. Appenzeller, J. Knoch, V. Derycke, R. Martel, S. Wind, P. Avouris, *Phys. Rev. Lett.*, 2002, 89, 126801.
- J. Appenzeller, M. Radosavljević, J. Knoch, Ph. Avouris. *Phys. Rev. Lett.*, 2004, 048301-1.
- Ph. Avouris, *Chem. Phys.*, 2002, 281, 429.
- R. Bacon, *J. Appl. Phys.*, 1960, 31, 283.
- K. Balasubramanian, M. Burghard, *Small*, 2005, 1, 180.
- K. Balasubramanian, M. Burghard, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, 385, 452.
- K. Balasubramanian, M. Burghard, *J. Mater. Chem.*, 2008, 18, 3071.
- S. Banerjee, T. Hemraj-Benny, S. S. Wong, *Adv. Mater.*, 2005, 1, 17.
- A. Barrón González, J. Arias Martínez, I. Castro Romero, *Salud Pública de México*, 2001, 43, 577.
- K. Besteman, J.O. Lee, F.G.M. Wiertz, H.A. Heering, C. Dekker, *Nano Lett.*, 2003, 3, 727.
- D.S. Bethune, C.H. Kiang, M.S. de Vries, G. Gorman, R. Savoy, J. Vazquez, R. Beyers, *Nature*, 1993, 363, 605.

- P.J. Boul, J. Liu, E.T. Mickelson, C.B. Huffman, L.M. Ericson, I.W. Chiang, K.A. Smith, D.T. Colbert, R.H. Hauge, J.L. Margrave, R.E. Smalley, *Chem. Phys. Lett.*, 1999, 310, 367.
- C. Bower, S. Suzuki, K. Tanigaki, O. Zhou, *Appl. Phys. A*, 1998, 67, 47.
- K. Bradley, M. Briman, A. Star, G. Grüner, *Nano Lett.*, 2004, 4, 253.
- M.J. Bronikowski, P.A. Willis, D.T. Colbert, K.A. Smith, R.E. Smalley, *J. Vac. Sci. Technol. A*, 2001, 19, 1800.
- H.R. Byon, H.C. Choi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 2188.
- A.M. Calafat, Z. Kuklenyik, J.A. Reidy, S.P. Caudill, J. Ekong, L.L. Needham, *Environmental Health Perspectives*, 113, 391.
- A.M. Cassell, J.A. Raymakers, J. Kong, H. Dai, *J. Phys. Chem. B*, 1999, 103, 6484.
- V. Catacaldo, A. Vaze, J.F. Rusling, *Electroanalysis*, 2008, 20, 115.
- C.C. Cid, J. Riu, A. Maroto, F.X. Rius, *Analyst*, 2008, 133, 1005.
- M. Consales, S. Campopiano, A. Cutolo, M. Penza, P. Aversa, G. Cassano, M. Giordano, A. Cusano, *Sens. Actuators B*, 2006, 118, 232.
- M. Consales, A. Crescitelli, S. Campopiano, A. Cutolo, M. Penza, P. Aversa, M. Giordano, A. Cusano, *IEEE Sensors J.*, 2007, 7, 1004.
- A. Cusano, M. Consales, A. Cutolo, M. Penza, P. Aversa, M. Giordano, A. Guemes, *Appl. Phys. Lett.*, 2006, 89, 201106-1.
- J. Chen, M.J. Dyer, M.F. Yu, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 6201.
- J. Chen, H. Lui, W.A. Weimer, M.D. Halls, D.H. Waldeck, G.C. Walker, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124, 9034.
- R. J. Chen, S. Bangsaruntip, K. A. Drouvalakis, N. W. S. Kam, M. Shim, Y. Li, W. Kim, P. J. Utz, H. Dai, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2003, 100, 4984.
- R.J. Chen, H.C. Choi, S. Bangsaruntip, E. Yenilmez, X. Tang, Q. Wang, Y.L. Chang, H. Dai, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 1563.

- Z. Chen, J. Appenzeller, J. Knoch, Y.M. Lin, Ph. Avouris, *Nano Lett.*, 2005, 5, 1497.
- Y. Chen, H. Liu, T. Ye, J. Kim, C. Mao, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, 8696.
- H. Dai, A.G. Rinzler, P. Nikolaev, A. Thess, D.T. Colbert, R.E. Smalley, *Chem. Phys. Lett.*, 1996, 260, 471.
- H.J. Dai, *Acc. Chem. Res.*, 2002, 35, 1035.
- C. Dekker, *Physics Today*, 1999, 52, 22.
- V. Derycke, R. Martel, J. Appenzeller, Ph. Avouris, *Appl. Phys. Lett.*, 2002, 80, 2773.
- M.S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, Ph. Avouris. *Carbon Nanotubes. Synthesis, structure, properties and applications Topics in Applied Physics*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2001.
- P. Du, S. Liu, P. Wu, C. Cai, *Electrochim. Acta*, 2007, 53, 1811.
- F. Du, W. Huang, Y. Shi, Z. Wang, K. Cheng, *Biosens. Bioelectron.*, 2008, 24, 415.
- P. Du, B. Zhou, C. Cai, *J. Electroanal. Chem.*, 2008, 614, 149.
- P.S. Fan, F. Xiao, L. Liu, F. Zhao, B. Zeng, *Sens. Actuators. B*, 2008, 132, 34.
- E.J. Filardo, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2002, 80, 231
- E.J. Filardo, C.T. Graeber, J.A. Quinn, M.B. Resnick, D. Giri, R.A. DeLellis, M.M. Steinhoff, E. Sabo, *Clin. Cancer Res.*, 2006, 12, 6359.
- M.S. Fuhrer, B.M. Kim, T. Durkop, T. Brintlinger, *Nano Lett.*, 2002, 2, 755
- S.H. Gellman, *Chem. Rev.*, 1997, 97, 1231.
- M. Gehring, D. Vogel, L. Tennhardt, D. Weltin. B. Bilitewski, *Waste Management and the Environment II*, 2004, 293.
- Y. Gogotsi, *Nanotubes and Nanofibres*, Taylor & Francis, Boca Raton, Florida, 2006.

- J.J. Gooding, R. Wibowo, J. Liu, W. Yang, D. Losic, S. Orbons, F.J. Mearns, J.G. Shapter, D.B. Hibbert, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 9006.
- J.J. Gooding, *Electrochim. Acta*, 2005, 30, 3049.
- V.V. Grebenyukov, E.D. Obraztsova, A.S. Pozharov, N.R. Arutyunyan, A.A. Romeikov, I.A. Kozyrev, *Fullerenes Nanotubes Carbon Nanostruct.*, 2008, 16, 330.
- G. Grüner, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, 384, 322.
- E.L. Gui, L.J. Li, K. Zhang, Y. Xu, X. Dong, X. Ho, P.S. Lee, J. Kasim, Z.X. Shen, J.A. Rogers, S.G. Mhaisalkar, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, 14427.
- B. Gutendorf, J. Westendorf, *Toxicology*, 2001, 166, 79
- N. Hamada, S.I. Sawada, A. Oshiyama, *Phys. Rev. Lett.*, 1992, 68, 1579.
- X. Han, Y. Li, Z. Deng, *Adv. Mater.*, 2007, 19, 1518.
- A.R. Harutyunyan, B.K. Pradhan, U.J. Kim, G. Chen, P.C. Eklund, *Nano Lett.*, 2002, 2, 525.
- S. Heinze, J. Tersoff, R. Martel, V. Derycke, J. Appenzeller, Ph. Avouris, *Phys. Rev. Lett.*, 2002, 89, 106801.
- S. Heinze, J. Tersoff, Ph. Avouris, *Introducing Molecular Electronics*, Springer Berlin/Heidelberg, 2005, 381.
- I. Heller, A.M. Janssens, J. Männik, E.D. Minot, S.G. Lemay, C. Dekker, *Nano Lett.*, 2008, 8, 591.
- H. Hiroi, O. Tsutsumi, M. Momoeda, Y. Takai, Y. Osuga, Y. Taketani, *Endocr. J.*, 1999, 46, 773.
- A. Hirsch, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, 41, 1853
- S. Hrapovic, E. Majid, Y. Liu, K. Male, J.H.T. Luong, *Anal. Chem.*, 2006, 78, 5504.
- L. Hu, D.S. Hecht, G. Grüner, *Nano Lett.*, 2004, 4, 2513.

- P. Hu, A. Fasoli, J. Park, Y. Choi, P. Estrela, S. L. Maeng, W. I. Milne, A. C. Ferrari, *J. Appl. Phys.*, 2008, 104, 074310.
- S. Huang, X. Cai, J. Liu, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 5636.
- W. Huang, W. Hu, J. Song, *Talanta*, 2003, 61, 411.
- S. Iijima, *Nature*, 1991, 354, 56-58.
- S. Iijima, I. Ichihashi, *Nature*, 1993, 363, 603.
- A. Javey, J. Guo, Q. Wang, M. Lundstrom, H. Dai, *Nature*, 2003, 424, 654.
- G. Jin, F. Huang, W. Li, S. Yu, S. Zhang, J. Kong, *Talanta*, 2008, 74, 815.
- S. Jo, H. Jeong, S.R. Bae, S. Jeon, *Microchem. J.*, 2008, 88, 1.
- C. Journet, W.K. Maser, P. Bernier, A. Loiseau, M.L. de la Chapelle, L. Lefrant, P. Deniard, R. Lee, J.E. Fisher, *Nature*, 1997, 388, 756.
- C. Journet, P. Bernier, *Appl. Phys. A*, 1998, 67, 1.
- T. Kato, G.H. Jeong, T. Hirata, R. Hatakeyama, K. Tohji, K. Motomiya, *Chem. Phys. Lett.*, 2003, 381, 422.
- N.W.S. Kam, H. Dai, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 6021.
- D.R. Kauffman, A. Star, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, 37, 1197.
- K. Kerman, Y. Morita, Y. Takamura, E. Tamiya, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, 381, 1114.
- W. Kim, H.C. Choi, M. Shim, D. Wang, H. Dai, *Nano Lett.*, 2002, 2, 703.
- S.N. Kim, J.F. Rusling, F. Papadimitrakopoulos, *Adv. Mater.*, 2007, 19, 3214.
- J. Kong, A.M. Cassell, H.J. Dai, *Chem. Phys. Lett.*, 1998, 292, 567.
- J. Kong, H.J. Dai, *J. Phys. Chem. B*, 2001, 105, 2890.
- H.W. Kroto, J.R. Heath, S.C. O'Brien, R.F. Curl, R.E. Smalley, *Nature*, 1985, 318, 162.
- G.G. Kuiper, E. Enmark, M. Pelto-Huikko, S. Nilsson, *Proc. Natl. Sci. U.S.A.*, 1996, 93, 5925.

- G.G. Kuiper, P.J. Shughrue, I. Merchenthaler, J.A. Gustafsson, *Front. Neuroendocrinol.*, 1998, 19, 253.
- M.C. Kum, K.A. Joshi, W. Chen, N.V. Myung, A. Mulchaldani, *Talanta*, 2007, 74, 370.
- E. Lamouroux, P. Serp, Y. Kihn, P. Kalck, *Appl. Catal. A*, 2007, 323, 162.
- C.S. Lee, S.E. Baker, M.S. Marcus, W. Yang, M.A. Eriksson, R.J. Hamers, *Nano Lett.*, 2004, 4, 1713.
- E. R. Levin, *Mol. Endocrinol.*, 2003, 17, 309.
- S. Li, P. He, J. Dong, Z. Guo, L. Dai, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 14.
- Y. Li, J. Liu, Y.Q. Wang, Z.L. Wang, *Chem. Mater.*, 2001, 13, 1008.
- Y. Lin, S. Taylor, H. Li, K.A. Shiral Fernando, L. Qu, W. Wang, L. Gu, B. Zhou, Y.P. Sun, *J. Mater. Chem.*, 2004, 14, 527.
- Y. Li, D. Mann, M. Rolandi, W. Kim, A. Ural, S. Hung, A. Javey, J. Cao, Y. Li, P. Wang, L. Wang, X. Lin, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 22, 3120.
- D. Wang, E. Yenilmez, Q. Wang, J.F. Gibbons, Y. Nishi, H. Dai, *Nano Lett.*, 2004, 4, 317.
- A. Liu, *Biosens. Bioelectron.*, 2008, 24, 167.
- J. Liu, A.G. Rinzler, H. Dai, J.H. Hafner, R.K. Bradley, P.J. Boul, A. Lu, T. Iverson, K. Shelimov, C.B. Huffman, F. Rodriguez-Macias, Y.S. Shon, T.R. Lee, D.T. Colbert, R.E. Smalley, *Science*, 1998, 280, 1253.
- J. Liu, A. Chou, W. Rahmat, M.N. Paddon-Row, J. Gooding, *Electroanalysis*, 2005, 17, 38.
- F. Lu, L. Gu, M.J. Meziani, X. Wang, P.G. Luo, L.M. Veca, L. Cao, Y.P. Sun, *Advan. Mater.*, 2009, 21, 139.
- K. Maehashi, T. Katsura, K. Kerman, Y. Takamura, K. Matsumoto, E. Tamiya, *Anal. Chem.*, 2007, 79, 782.

- R. Martel, T. Schmidt, H.R. Shea, T. Hertel, P. Avouris, *Appl. Phys. Lett.*, 1998, 73, 2447.
- M. T. Martínez, Y.C. Tseng, N. Ormategui, I. Loinaz, R. Eritja, J. Bokor, *Nano Lett.*, 2009, 9, 530.
- M.R. Maschmann, P.B. Amama, A. Goyal, Z. Iqbal, R. Gat, T.S. Fisher, *Carbon*, 2006, 44, 10.
- R.L. McCreery, *Chem. Rev.*, 2008, 108, 2646.
- A. Merkoçi, M. Aldavert, S. Marín, S. Alegret, *Trends Anal. Chem.*, 2005, 24, 341.
- D.G. Mita, A. Attanasio, F. Arduini, N. Diano, V. Grano, U. Bencivenga, S. Rossi, A. Amine, D. Moscone, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 23, 60.
- S. Mueller, *Bioanal Chem.*, 2004, 378, 582.
- H. Muguruma, Y. Shibayama, Y. Matsui, *Biosens. Bioelectron.*, 2008, 23, 827.
- Y. Murakami, S. Chiashi, Y. Miyauchi, M. Hu, M. Ogura, T. Okubo, S. Maruyama, *Chem. Phys. Lett.*, 2004, 385, 298.
- M. Murata, M. Nakayama, H. Irie, K. Yakabe, K. Fukuma, Y. Katayama, M. Maeda, *Anal. Sci.*, 2001, 17, 387.
- M. Murata, K. Yano, S. Kuroki, T. Suzutani, Y. Katayama, *Anal. Sci.*, 2003, 19, 1569.
- T.C. Murphy, G. Orphanides, *Phytochem. Rev.*, 2002, 1, 199.
- M.Y. Noriega-Reyes, E. Langley McCarron, *Cancerología*, 2008, 2, 29.
- S. Nilsson, S. Mäkelä, E. Treuter, M. Tujaque, J. Thomsen, G. Andersson, E. Enmark, K. Pettersson, M. Warner, J.A. Gustafsson, *Physiol. Rev.*, 2001, 81, 1535.
- J. Nygard, D.H. Cobden, M. Bockrath, P.L. McEuen, P.E. Lindelof, *Appl. Phys., A*, 1999, 69, 297.
- A. Oberlin, M. Endo, *J. Cryst. Growth*, 1976, 32, 335.

- M.J. O'Connell, *Carbon Nanotubes Properties and Applications*, Taylor & Francis, Boca Raton, Florida, 2006.
- J. Okuno, K. Maehashi, K. Kerman, Y. Takamura, K. Matsumoto, E. Tamiya, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 22, 2377.
- N. Olea, *Rev. Toxicol.*, 1999, 16, 1487.
- C. Oostenbrink, J. Pitera, M. Marola, *J. Med. Chem.*, 2000, 43, 4594.
- A.J. Oosterkamp, B. Hock, M. Seifert, H. Irth, *Trends in Anal. Chem.*, 1997, 16, 544.
- K.I. Ozoemena, T. Nyokong, D. Nkosi, I. Chambrier, M.J. Cook, *Electrochim. Acta*, 2007, 52, 4132.
- K.I. Ozoemena, D. Nkosi, J. Pillay, *Electrochim. Acta*, 2008, 53, 2844.
- G. Painter, D.E. Ellis, *Phys. Rev. B*, 1970, 1, 4747.
- C. Palmieri, G.J. Chen, S. Saji, M. Zelada-Hedman, A. Warri, Z. Weihua, S. Van Noorden, T. Wahlstrom, R.C. Coombes, M. Warner; J.A. Gustafsson, *Endocr. Relat. Cancer*, 2002, 9, 1.
- M.H. Piao, M.H. Noh, M.A. Rahman, M.S. Won, Y.B. Shim, *Electroanalysis*, 2008, 20, 30.
- C.P. Poole Jr, F.J. Owens, *Introducción a la Nanotecnología*. Editorial Reverté, Barcelona, 2007.
- P.Qi, O. Vermesh, M. Grecu, A. Javey, Q. Wang, H. Dai, S. Peng, K.J. Cho, *Nano Lett.*, 2003, 3, 347.
- C.N.R. Rao, B.C. Satishkumar, A. Govindaraj, M. Nath, *Chem. Phys. Chem.*, 2001, 2, 78.
- C.M. Revankar, D.F. Cimino, L.A. Sklar, J.B. Arterburn, E.R. Prossnitz, *Science*, 2005, 307, 1625.

- R.L. Rich, L.R. Hoth, K.F. Geoghegan, T.A. Brown, P.K. LeMotte, S.P. Simons, P. Hensley, D.G. Myszka, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2002, 99, 8562.
- S.Rodríguez-Mozaz, M.P. Marco, M.J. Lopez de Alba, D. Barceló, *Pure Appl. Chem.*, 2004, 76, 723.
- E.J. Routledge, R. White, M.G. Parker, J.P. Sumpter, *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 35986.
- A. Salimi, M. Izadi, R. Hallaj, M. Rashidi, *Electroanalysis*, 2007, 19, 1668.
- A. Salimi, L. Miranzandeh, R. Hallaj, H. Mamkhezri, *Electroanalysis*, 2008, 20, 1760.
- R. Seidel, G.S. Duesberg, E. Unger, A.P. Graham, M. Liebau, F. Kreupl, *J. Phys. Chem. B*, 2004, 108, 1888.
- D. Selbmann, B. Bendjemil, A. Leonhardt, T. Pichler, C. Taschner, M. Ritschel, *Appl. Phys. A*, 2008, 90, 637.
- M. Shim, A. Javey, N.W.S. Kam, H. Dai, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 11512.
- E.S. Snow, J.P. Novak, P.M. Campbell, D. Park, *Appl. Phys. Lett.*, 2003, 82, 2145.
- E.S. Snow, F.K. Perkins, E.J. Houser, S.C. Badescu, T.L. Reinecke, *Science*, 2005, 307, 1942.
- H.M. So, K. Won, Y.H. Kim, B.K. Kim, B.H. Ryu, P.S. Na, H. Kim, J.O. Lee, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 11906.
- C. Sonnenschein, A.M. Soto, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 1998, 65, 143.
- A. Star, J. Gabriel, K. Bradley, G. Grüner, *Nano Lett.*, 2003, 3, 459.
- A. Star, V. Joshi, T.R. Han, M.V.P. Altoó, G. Grüner, J.F. Stoddart, *Org. Lett.*, 2004, 6, 2089.
- A. Star, E. Tu, J. Niemann, J.C.P. Gabriel, C.S. Joiner, C. Valcke, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2006, 103, 921.

- J. W. Steed, J.L. Atwood, *Supramolecular Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd. 2000.
- C. Stoker, F. Rey, H. Rodríguez, J.G. Ramos, P. Sirosky, A. Larriera, E.H. Luque, M. Muñoz de Toro, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 2003, 133, 287.
- S. Subrahmanyam, S.A. Piletsky, A.P.F. Turner, *Anal. Chem.* 2002, 74, 3942.
- Y.P. Sun, K. Fu, Y. Lin, W. Huang, *Acc. Chem. Res.*, 2002, 35, 1096.
- D. Sun, X. Xie, Y. Cai, H. Zhanf, K. Wu, *Anal. Chimi. Acta*, 2007, 581, 27.
- C. Suryanarayana, *Adv. Eng. Mater.*, 2005, 7, 983.
- J. Tans, A.R.M. Verschueren, C. Dekker, *Nature*, 1998, 393, 49.
- D. Tasis, N. Tagmatarchis, A. Bianco, M. Prato, *Chem. Rev.*, 2006, 106, 1105.
- A. D. Teppa Garrán, J. Terán Dávila, *Ginecol. Obstet. Mex.*, 2005, 73, 436.
- D.R. Thévenot, K. Toth, R.A. Durst, G. Wilson, *Pure Appl. Chem.*, 1999, 71, 2333.
- J. Tkac, T. Ruzgas, *Electrochem. Commun.*, 2006, 8, 899.
- M. Trojanowicz, *Trends Anal. Chem.*, 2006, 25, 480.
- F. Valentini, G. Palleschi, *Anal. Lett.*, 2008, 41, 479.
- M. Varcárcel, B.M. Simonet, S. Cárdenas, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, 391, 1881.
- R.A. Villamizar, A. Maroto, F.X. Rius, I. Inza, M.J. Figueras, *Biosens. Bioelectron.*, 2008, 24, 279.
- R.A. Villamizar, A. Maroto, F.X. Rius, *Sens. Actuators, B*, 2009, 136, 451.
- A.K. Wanekaya, W. Chen, N.V. Myung, A. Mulchandani, *Electroanalysis* 2006, 18, 533.
- J. Wang, *Electroanalysis*, 2005, 17, 7.
- J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, 3rd ed., Wiley-VCH, New York, 2006, 146.

- X. Wang, F. Liu, G.T.S. Andavan, X. Jing, K. Singh, V.R. Yazdanpanah, N. Bruque, R.R. Pandey, R. Lake, M. Ozkan, K.L. Wang, C.S. Ozkan, *Small*, 2006, 2, 1356.
- Z. Wang, Y. Lu, *J. Mater. Chem.*, 2009, 19, 1788.
- R.J. Witorsch, *Regulatory Toxicology and Pharmacology.*, 2002, 36, 118.
- O.S. Wolfbeis, *Fresenius J. Anal Chem.*, 1990, 337, 522.
- F. Xiao, F. Zhao, J. Li, R. Yan, J. Yu, B. Zeng, *Anal. Chim. Acta*, 2007, 596, 79
- F. Xiao, C. Ruan, J. Li, L. Liu, F. Zhao, B. Zeng, *Electroanalysis*, 2008, 20, 361.
- Y. Zhang, Y. Cai, S. Su, *Anal. Biochem.*, 2006, 350, 285.
- Y. Zhang, Y. Pan, S. Su, L. Zhang, S. Li, M. Shao, *Electroanalysis*, 2007, 19, 1695.
- Q. Zhao, L. Guan, Z. Gu, Q. Zhuang, *Electroanalysis*, 2005, 17, 85.
- Y.L. Zhao, L.B. Hu, J.F. Stoddart, G. Grüner, *Adv. Mater.*, 2008, 20, 1910.
- M. Zheng, A. Jagota, M. S. Strano, A.P. Santos, P. Barone, S.G. Chou, B.A. Diner, M.S. Dresselhaus, R.S. Mclean, G.B. Onoa, G.G. Samsonidze, E.D. Semke, M. Usrey, D.J. Walls, *Science*, 2003, 302, 1545.
- B. Zeng, S. Wei, F. Xiao, F. Zhao, *Sens. Actuator B*, 2006, 115, 240.
- M. Zhihong, L. Xiaohui, F. Weiling. *Anal. Commun.*, 1999, 36, 281.
- Q. Zhou, J. Xiaom W. Wang, G. Liu, Q. Shi, J. Wang, *Talanta*, 2006, 68, 1309.
- L. Zhu, R. Yang, J. Zhai, C. Tian, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 23, 528.

2.6. **Anexo:** Review *“Nanomaterial-based devices and sensors for the determination of xenobiotic compounds”*

Nanomaterial-based devices and sensors for the determination of xenobiotic compounds

Zayda C. Sánchez-Acevedo# · Jordi Riu* · F. Xavier Rius ·

Department of Analytical and Organic Chemistry
Rovira i Virgili University
C/ Marcel·lí Domingo s/n. 43007 Tarragona (Spain)

ZC Sánchez- Acevedo in on leave from the University of Pamplona
(Colombia)

* Please address correspondence to:

Jordi Riu
Department of Analytical and Organic Chemistry
University Rovira i Virgili
Campus Sescelades
C/ Marcel·lí Domingo s/n
43007 Tarragona
Catalonia - Spain

Tel.: +34 977 559 562
Fax.: + 34 977 558 446
e-mail: jordi.riu@urv.cat

Abstract

The detection and quantitative determination of xenobiotic compounds is important because nowadays they are present in all natural waters and have a negative impact on animals and human beings. In this review, we summarize the sensors and devices devised for analysing xenobiotic compounds that incorporate nanomaterials in their mechanisms. Nanosize technology has led to the development of new sensors and devices that incorporate nanoparticles, carbon nanotubes or other nanostructured materials in their transduction mechanism. We briefly discuss the working principles of the nanomaterials used, their advantages and their future potential. Several, well known molecular recognition events add their detection power to the new transducers and, as a result, improve such analytical quality parameters as sensitivity, time and cost.

Keywords: environmental pollution, nanomaterial, sensors, xenobiotic compounds, xenoestrogens.

1. Introduction

The present study is a critical review of the advances made in the detection and quantification of xenobiotic compounds in the environment using nanomaterial-based sensors and devices. Xenobiotic compounds are environmental contaminants because they are present throughout the aquatic system and have invaded, and changed quite profoundly, several biological cycles of animals and humans. There are several sources of these compounds, some of the most important of which are pesticides, herbicides

and insecticides used in agriculture, chemical-warfare agents and synthetic estrogens used by humans. Therefore, it is important that they be detected and quantified in freshwater systems so that disease can be prevented and health preserved.

Xenobiotic compounds can be detected and quantified by a wide variety of techniques. Among the most commonly used analytical techniques are gas chromatography coupled with electron capture detection (GC/ECD) or gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS), solid phase extraction (SPE), ion-trap coupled to GC/MS, high performance liquid chromatography/diode array detector (HPLC/DAD), electrospray ionization (ESI), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), liquid chromatography (LC) coupled to MS, HPLC with fluorescent detection, solid phase micro extraction (SPME), graphite furnace/atomic absorption spectroscopy (GF/AAS), accelerated solvent extraction (ASE) [1-3], matrix solid phase dispersion (MSPD), response surface methodology (RSM) [4], microwave-assisted extraction (MAE) ligand binding assays, mammalian receptor-reporter systems [5], microarray analysis [6], androgen receptor-mediated luciferase expression (AR-LUX) assay [7] and many others that have been used in the detection and/or quantification of xenobiotics at both the environmental and biological level. Of all of them, the chromatographic techniques are undoubtedly the most commonly used in this field combined with several other types of detection.

However, in recent years there has been a substantial increase in analytical techniques based on materials structured on the nanometric scale because of the special features inherent in this “nano” scale. Those structures that

have at least one dimension in the order of less than 100 nm are commonly included within this field. Nanosensors take advantage of the fact that nanostructures have new properties and behaviour that are not exhibited by the bulk matter of the same composition. This is so because the particles that are smaller than the characteristic lengths associated with specific phenomena often have physical and chemical properties that give rise to new properties that depend on the size. Therefore, although reducing the size of the sensors is important in the miniaturization process, nanoscience deals with new phenomena, and new sensor devices are being built that take advantage of these phenomena. As a result, important characteristics and quality parameters of sensors based on nanomaterials can be better than those of the same systems based on bulk materials. For example, sensitivity can increase because conduction properties are better, the limits of detection can be lower, very small quantities of samples can be analysed, labels are not required for direct detection, and some reagents can be eliminated.

Currently there are significant advances in the field of electrochemical detection by the incorporation of nanostructures in the development of electrochemical sensors for biomonitoring the effects of different chemicals in the human body. Therefore these sensors are widely used for determining the level of exposure to pesticides, enzymatic activity or detecting biomarkers among others. The benefits of the incorporation of nanotechnology in these electrochemical sensors are low cost, fast response, high performance in addition to ultrasensitive bioassays for biomonitoring an array of biochemical markers [8].

This review has been structured in two sections. The first provides a brief summary of the main xenobiotic compounds to be determined, ordered in their main groups: organophosphorus compounds, organochloride compounds and others, including phthalate esters, n-methyl carbamates, perchlorate ion and phenolic compounds. In the second, we discuss several nanostructures that are currently used in the development of sensors, electrodes and devices for detecting and quantifying xenobiotic compounds. Particular reference is made to the mechanisms of molecular recognition and transduction in the various sensors that have been developed. In each section we first describe the type of nanomaterial used—basically nanoparticles, carbon nanotubes and cantilevers—and explain the properties related to the nanostructure. We then briefly describe the experimental set up and discuss the main advantages and quality parameters of sensing devices. We also cite those studies that use nanostructures only in the stages prior to the analytical process (extraction, for example) but we do not go into any great detail because they not focus on the detection stages, the main aim of sensors.

2. Xenobiotic compounds

Xenobiotic compounds are those compounds that are synthesized by man and have structures that are not found (or only very rarely) in nature. Nevertheless, they contain functional groups that are very similar to natural products, which means that they can invade the biological mechanisms of animals. Therefore, the term xenobiotic is generally associated to contaminating agents. In a considerable number of cases they are considered to be endocrine disruptors because many of them interfere

with the function of the endocrine system by inhibiting or increasing hormone activity [9]. They are also considered to be precursors of cancer-type pathologies. In general terms, they can be grouped into organophosphorus and organochloride pesticides, phthalate esters, dihydroxybenzenes, carbamates, perchlorate and phenol derivatives.

2.1. Organophosphorus compounds

Organophosphorus compounds—otherwise known as organophosphates (OP)—are among the most toxic substances known and are generally used in pesticides, insecticides and chemical-warfare agents. Early detection of OP neurotoxins is important to protect water resources and food supplies, to defend against terrorist activities, and to supervise disintoxication processes. Their toxicity is associated with the capacity of the chemical product to inhibit the enzyme activity of acetylcholinesterase (AChE) in the nervous tissue [10]. A large number of these compounds are recognised for their effect on reproduction and fetotoxicity. The traditional analytical methods used to determine these compounds are chromatographic techniques (of gases and liquids), followed by biosensors based on the action of AChE (not selective and slow), and amperometric, potentiometric and optical mechanisms based on organophosphorus hydrolase (OPH) among others [11].

Among the most common organophosphorus compounds are acephate, chlorpyrifos, diazinon, paraoxon, malathion, methyl parathion, parathion, azinphos methyl, disulfoton, demeton-S-methyl, omethoate and many others.

2.2. Organochloride compounds

This family of compounds contains insecticides and acaricides. They are considered to be stimulants of the central nervous system and they are dangerous largely because they accumulate in the adipose, cerebral and hepatic tissues. They are to a large extent carcinogenic, fetotoxic and mutagenic, and some of the most common are DDT (1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl) ethane), dicofol, endosulfan, lindane and dienochlor.

Also worthy of mention in this large family of compounds are triazine herbicides, among which are atrazine and simazine. They are well known both for their effectiveness as weed killers and for their contaminating effect, to such an extent that they are great endocrine disruptors and carcinogenic agents [12].

2.3. Other compounds

Phthalate esters are chemical compounds with carcinogenic and estrogenic characteristics that are environmental contaminants. Some examples are di-n-butyl phthalate, di-ethyl-phthalate and benzyl n-butyl phthalate and they are widely used in plastics, pesticides and cosmetics [13].

Hydroquinone, catechol and resorcinol are three isomers of dihydroxybenzenes that are often used in dyes, cosmetics, and the chemical and pharmaceutical industry. Dihydroxybenzenes are important environmental contaminating agents and, because their structure is similar to that of hydroquinone, catechol and resorcinol, they generally coexist in

products such as suntan lotions, cosmetics, dyes, and chemical and pharmaceutical products [14].

In recent years, perchlorate ion has also been seen to be an environmental contaminant. It has been found in sewage largely because it is used as an oxidizing agent in the propulsion systems of missiles and rockets, and as an essential component in explosives, grenades, flame throwers and other incendiary products. Its contaminating effect is particularly evident in the water of towns near to armament manufacturers or testing sites. Likewise, the Environmental Protection Agency of the US (EPA) considers perchlorate to be an endocrine disruptor because of its role in the inhibition of the thyroid gland and the possible negative effect on its development. It also has a negative effect on the development of fetuses and it can damage brain of children [15-17].

Other well known xenobiotic compounds are n-methyl carbamates, which are mainly insecticides and acaricides. These compounds inhibit AChE just as OP compounds do, but the effect is reversible. They influence the nervous system and enter into the bloodstream. Some are considered to be environmental estrogens that affect endocrine and reproduction processes. Others are considered to be carcinogenic and mutagenic. Among the best known are aldicarb, carbaryl, carbofuran, methiocarb and methomyl.

Of the environmental contaminants that have been found nowadays, phenolic compounds should also be mentioned because they are extensively used in daily compounds and are highly toxic. These

compounds include phenol, 4-aminophenol, 2,4-dichlorophenol, 4-chlorophenol and p-cresol [18-20].

3. Nanosensors for the detection and quantification of xenobiotics

3.1. Molecular recognition mechanisms

The molecular recognition mechanism in a sensor enables the detection of a compound of interest obtaining an instrumental response, which will be converted by the transducer into a signal that can be measured by the instrument. The molecular recognition mechanism may involve direct binding between the receptor molecule and the analyte of interest (e.g. antigen-antibody) or can also involve a catalytic element that facilitates this interaction (enzyme-receptor molecule-analyte)

Apart from the electrochemical techniques in which the sensing and transduction mechanisms occur simultaneously on the same layer, the substances that are most commonly used for detecting xenobiotics using nanostructured sensors are enzymes and antibodies.

3.1.1. Enzymes

Enzymes are highly efficient and specific biocatalysts consisting of a protein component known as the apoenzyme and, on occasions, of a non-protein component known as the coenzyme. One of the most used enzymes in the field of chemical detection is organophosphorus hydrolase (OPH), which is an organophosphotriester enzyme that has been effectively used

to hydrolyse OP compounds such as parathion, paraoxon and demeton-S, as well as carbamates and chemical-warfare agents such as sarin and soman, among others [21]. Other enzymes that have been used to detect pesticides are alkaline phosphatase, ascorbate oxidase, tyrosinase and acid phosphatase. Pesticides and insecticides inhibit cholinesterases, and AChE and butyrylcholinesterase have been widely used because of their stability and sensitivity [22]. Tyrosinase is an enzyme that can catalyse the orthohydroxylation of monophenols and also the oxidation of o-diphenols to o-quinones, so it has been used to make amperometric sensors that can effectively detect phenolic compounds.

3.1.2. *Antibodies*

Antibodies are proteins that are produced during immunization by plasma cells in response to an infection. The antibodies bond selectively to a particular substance known as the antigen and small molecules known as haptens. The structure of all antibodies is similar to that of immunoglobulins, like as IgG for example, which consist of two heavy and two light chains linked by disulphur bonds that can react with certain parts of the antigen called epitopes [23].

Among the bio-affinity sensors the immunosensors probably are the most used, taking advantage of the selectivity provided by the use of antibodies for the detection of specific analytes through molecular recognition that is based on the principle "key and lock" proposed by Fisher in 1894, which corresponds to the ability of molecules recognize each other, so that the

receptor-substrate interaction is carried out according to the affinity and complementarity between them.

The best known bioassay is the enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA) which is based on the bonding of an antigen to an antibody. The latter is detected because it is conjugated to a particular enzyme which, when it acts on the substrate, gives rise to a coloured reaction. Therefore in this immunoassay, the role of the enzyme is to amplify the signal that is obtained from the molecular recognition process between the antigen and the antibody. Unlike ELISA, in the detection of xenobiotic compounds using specific electrodes, enzymes have been used to directly detect the presence of the target analyte without having to use markers

3.2. Recognition events and transduction mechanism

The transducer is the part of the sensor that enables the signals associated with the chemical interaction of the recognition event to be converted into a measurable and interpretable response by the user. The associated signal, often recorded instrumentally, may be electrical (like the measurement of electric conductivity), optical (like the measurement of absorbance or fluorescence), mass change, temperature, etc. Depending on the nature of the response generated by the transducer, different types of detector are used.

Nanosensors use nanomaterials in the transduction mechanisms. In this way, they take advantage of the fact that structures 100 nm in size or less have properties that larger materials of the same composition do not. The

principal nanotransducers used to detect xenobiotic compounds are nanoparticles, carbon nanotubes and cantilevers.

3.2.1. Nanoparticles

Nanoparticles are clusters that are round in shape, with a diameter of approximately 2-50 nm (containing in the order of 200-1000 atoms). Their size gives those advantages such as the surface/volume ratio and special electronic and magnetic properties, among others. They are covered with a protective coating of organic and inorganic materials so that they remain isolated and do not cluster. This coating has several effects: the particles are stabilized, they become biocompatible and they can be functionalised with specific functional groups (eg. COO⁻, -NH₂), enzymes, antibodies, aptamers and other compounds. This functionalization enables them to be used in processes of molecular recognition, and for this reason they are often used in various types of sensors, or as catalysts in chemical reactions with applications in the biomedical, dietary or environmental fields, among others.

Because of the characteristics of these nanostructures, their use has been increasing for the development of chemical sensors. Wang and Hu reviewed the applications of nanoparticles in the electrochemical detection of organic or inorganic molecules [24].

3.2.1.1. *Optical methods*

Possibly the most known optical biosensor is the surface plasmon resonance (SPR), based on the change in reflectivity of a metal layer in contact with a biological element. This variation is a result of the receptor molecule-analyte interaction, generating a change of the refractive index on the metal surface and therefore a shift in the resonance angle. The SPR, which can use fluorescent molecules for labelling or not use labels, allows measurements in real time and without any purification process [25].

Nanoparticles of noble metals are of considerable interest for their optical properties. The optical property typical of nanoparticles made up of noble metals is the so-called localized surface plasmon resonance (LSPR), which is characterized by a substantial increase in absorption. This absorption occurs when light, with a particular wavelength, strikes a metal nanoparticle and causes a resonance with the collective oscillation of the electrons in the conduction band. This LSPR phenomenon has two effects: the selective absorption of the photon and the generation of electromagnetic fields locally enhanced or amplified on the surface of the nanoparticle. As a result, the noble-metal nanoparticles between twenty and a few hundred nanometres in size have absorptions in the visible/near-UV region [26].

Another technique that uses the surface plasmon of the nanoparticles is the surface enhanced Raman scattering (SERS), which is a technique that provides a greatly enhanced Raman signal from molecules that have been adsorbed onto certain specially prepared metal surfaces. The SERS effect

resulting from the surface plasmon enhancement of Raman scattering has been used by Wang's group to carry out several assays that enable ClO_4^- to be quantitatively determined. The Au nanoparticles were strongly adsorbed on silica previously modified surfaces with $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ and $-\text{NH}_2$, which promote the sorption of ClO_4^- in the Au aggregates. Moreover the enhanced SERS signals for detection were obtained in perchlorate solution with a detection of limit of $1 \times 10^{-3} \text{mM}$ (0.1mg/L) [27].

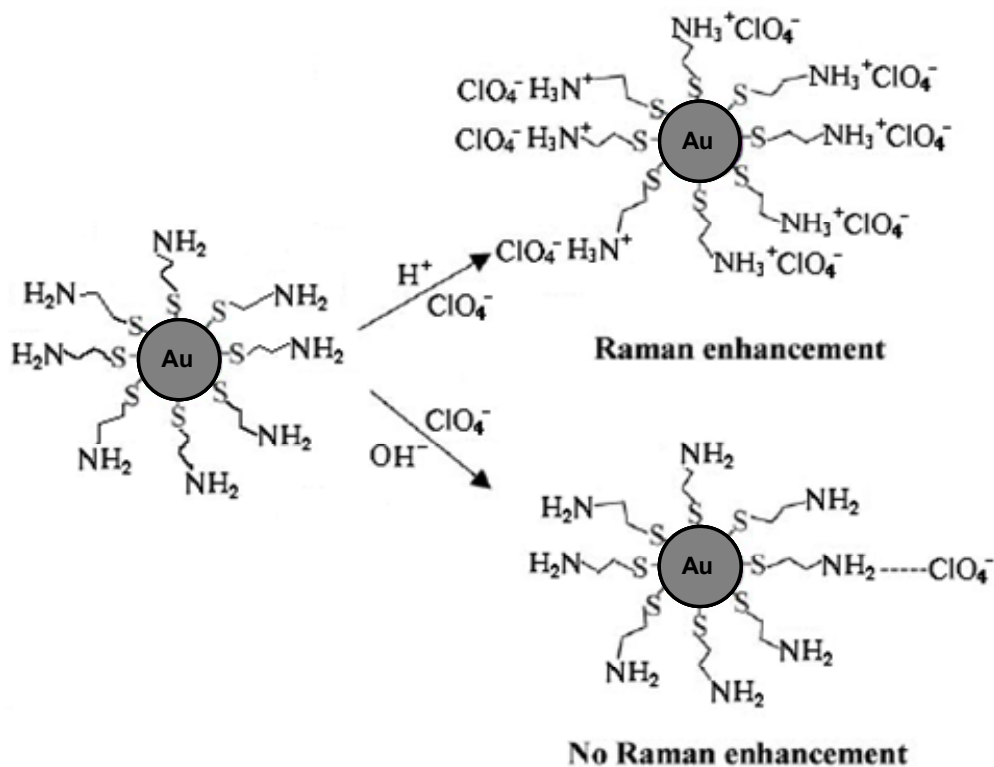


Figure 1. Illustration of the interactions between perchlorate and protonated or deprotonated cystamine-modified gold nanoparticles under both acidic and alkaline pH conditions and their effect on SERS detection of perchlorate. (Reprinted from *Anal Chim Acta* 567, Ruan Ch, Wang W, Gu B, Surface-enhanced Raman scattering for perchlorate detection using cystamine-modified gold nanoparticles, 114-120., copyright 2006, with permission from Elsevier)

Nevertheless if gold nanoparticles are modified with cystamine at low pHs are used, the response is fast, the sensibility good and, specially important, the reproducibility is much better. The adsorption of the ClO_4^- is the result of the action of the amino groups of the cystamine on Au nanoparticles by electrostatic attraction. (Figure 1), which results in a detection limit of $\sim 5.03 \times 10^{-3}$ mM (0.5 mg/L) ClO_4^- [28].

Feng et al. [29] take advantage of the fluorescence characteristics of Eu_2O_3 to devise an immunoassay for atrazine in which the nanoparticles of the lanthanide oxide are used as labels. The nanoparticles react with 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS) in such a way that they are capped with a layer of $\text{Si-O-(CH)}_2\text{-NH}_2$ that is covalently bound to the Eu_2O_3 particles. This coating allows the preservation of the properties of nanoparticles and provides the amine groups for biological conjugation. The use of these Eu_2O_3 particles leads to limits of detection of $\sim 2.32 \times 10^{-6}$ mM (0.5×10^{-3} mg/L), similar to those obtained using the conventional enzyme linked immunosorbent assay, ELISA, of $\sim 1 \times 10^{-6}$ mM (0.21×10^{-3} mg/L). The sensitivity of the assay makes it possible to detect the herbicide at the $\mu\text{g/L}$ level, which is the level at which it affects the gonadal development of amphibians. Equally this assay is easy and fast that the conventional ELISA, as it allows the elimination of two steps. Also with the use of organic fluorophores in this assay, the speed increases and signal-to-noise ratio is reduced.

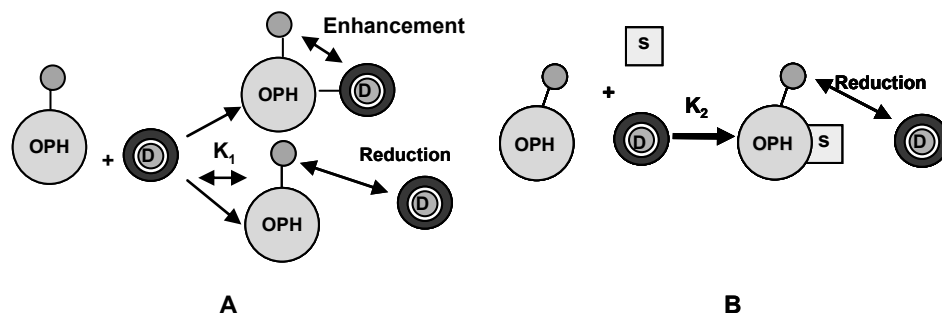


Figure 2. (A) Schematic of decoy-enzyme interaction for enhancement in the absence of substrate. Decoy (D) binds to enzyme-nanogold conjugate (OPH), leading to a surface enhanced fluorescence of the decoy; (B) Schematic of analyte (S) displacement of decoy (D) from OPH-gold complex (OPH), leading to decrease fluorescence signal from the decoy.

Among several other studies on the determination of several organophosphorous compounds (OP)—paraoxon being the most popular—is the one made by Simonian et al. [30] They were based on the change in the fluorescence properties of a fluorophore for the detection nanomolar levels of DNA oligonucleotides. In their study, observed that the specificity of enzyme-substrate interactions (organophosphate hydrolase, OPH, which hydrolyses the OP substrate) could be used in similar systems (Figure 2). They incubated the organophosphate hydrolase-Au nanoparticle conjugates with a fluorescent enzyme inhibitor or decoy. In this way the fluorescence intensity of decoy was sensitive to the proximity of the Au nanoparticles, therefore could be used to indicate that the decoy was bound to the OPH. Then different OP concentrations were introduced into the OPH-nanoparticle-conjugate-decoy mixtures for measure of the fluorescence intensity, so a change in intensity was related to the OP concentration in the solution. The minimum concentration detected in the case of the paraoxon was 20×10^{-3} mM (5.50 mg/L), and the paraoxon

concentrations were observed to have good linearity (up to 0.24 mM (66.05 mg/L)).

More recently, it has been exploited the fluorescence of the nanoparticles, like the studies developed by Dasaray et al. They used gold nanoparticles for surface enhanced fluorescence (SEF) for the detection of organophosphorus agents with high sensitivity (1 μ M), exhibiting a linear relationship between the emission intensity change and the concentration of the organophosphorus compounds [31].

3.2.1.2. *Electrochemical methods*

It is well known that electrochemical sensors have interesting characteristics. They are particularly useful for interfacing many different recognition events to several signal transduction mechanisms. They are very suitable for in-situ and field analysis, because of their quality operational parameters such as size, cost, operational simplicity and power consumption among others. Similarly, metal nanoparticles have been utilized due to their electrocatalytic properties for electrode development. Several amplification processes have been used to improve the sensitivity of biosensors based on nanoparticles.

Hu et al. have also used nanoparticles and electroanalytical techniques to determine paraoxon in aqueous samples [23]. They developed a voltammetric immunosensor that permits the label-free direct determination of paraoxon. This involved functionalizing the gold nanoparticles with paraoxon antibodies, and then immobilizing them on a

glassy carbon electrode (GCE) and coating them with a film of nafion, a well known conductive polymer that is permeable to small molecules. Experimental results showed that the presence of Fe^{+3} in the solution to be analysed can interfere with the immunosensor's ability to detect paraoxon (other ions did not have this effect). This interference could be counteracted by adding NH_4F , which acts as a masking agent. What is more, the specific affinity of the antibody removes the interferences of other contaminating agents that coexist with the paraoxon in solution. The limit of detection was 4.36×10^{-2} mM (12 mg/L).

The same compound was determined by J. Wang's group using nanoparticles of CuFeCN . Nitrophenol, the enzyme product of organophosphorus hydrolase (OPH), accelerates the formation of CuFeCN nanoparticles. These nanoparticles grow on a carbon paste electrode (CPE) and their accumulation amplifies the voltammetric detection of the xenobiotic agent. The voltammograms obtained show a rapid increase in the intensity of the current, which is almost linear with the concentration of paraoxon (between 25×10^{-3} - 150×10^{-3} mM (6.88 - 41.28 mg/L)). The limit of detection was low (5×10^{-3} mM (1.38 mg/L)), similar to the one found for other analyses based on optical fibre that use OPH or potentiometric biosensors and a little higher than the ones obtained using amperometry with OPH electrodes [32].

Liu and Lin [33] used zirconia nanoparticles as selective sorbents, which were deposited by cyclic voltammetry on the surface of polycrystalline gold electrodes. A because of the strong affinity between zirconia with the organophosphate group of the OP compounds, the nitroaromatic OPs

linked strongly to surface of the particles. So, the OPs were detected with square-wave voltammetry (SWV) without interference with other compounds found in the solution analyzed.(Figure 3). The limit of detection obtained with this modified electrode was 3.8×10^{-6} mM (1×10^{-3} mg/L) and the adsorption times were 10 minutes, which means that the potential for detecting OP compounds in the environment is considerable. The method is restricted to the detection of nitroaromatic OPs, so they suggest that non-electroactive OPs can be monitored by combining the zirconium nanoparticles with enzymes or with nanoparticles coated with antibodies.

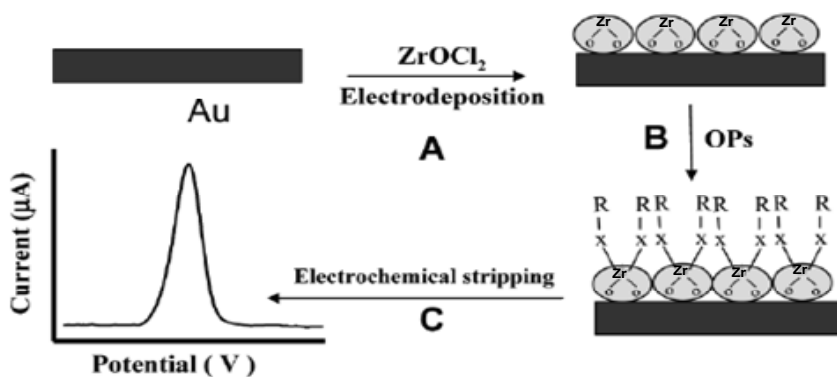


Figure 3. Scheme of electrochemical sensing nitroaromatic OP compounds. (A) Electrodeposition ZrO₂ nanoparticle to gold electrode surface; (B) nitroaromatic OP compounds adsorb to ZrO₂ nanoparticle surface; (C) electrochemical stripping detection of nitroaromatic OP compounds; X= O or S and R= nitroaromatic OP group. (Reprinted with permission from *Anal Chem* 77, Liu G, Lin Y, Electrochemical sensor for organophosphate pesticides and nerve agents using zirconia nanoparticles as selective sorbents, 5894-5901. Copyright 2006 American Chemical Society).

Liu et al. [34] used the magnetic properties of MgFe₂O₄-SiO₂ nanoparticles to develop an enzyme electrode with amperometric detection for the determination of phenol. The sensor takes advantage of the fact that tyrosin

catalyses two reactions in the presence of oxygen: the first is the orthohydroxylation of phenols to catechol and the second is the oxidation of catechol to orthoquinones. Magnetic nanoparticles are attracted to the carbon-paste electrode by means of a permanent magnet. Their surface is modified with 3-aminopropyl-triethoxysilane (APTES), which provides amino groups on the surface of the nanoparticle. Glutaraldehyde is used as a cross-linker so that APTES can bond to tyrosinase and form the magnetic bionanoparticle. The electrode retains 70% of the original response after one month. Interference was only observed in the case of ascorbic acid, but it was reduced with orthoquinone. The biosensor presented relatively fast and highly sensitive responses, with limits of detection of 6.0×10^{-4} mM (56.47×10^{-3} mg/L) and a sensitivity of $54.2 \mu\text{A}/\text{mM}$ [34].

Also have been used gold nanoparticles (AuNPs) to the detection of pesticides in water, as the work presented by Kim et al. These AuNPs were electrodeposited by double pulse onto the surface of pretreated GCE, and then the AuNPs were modified with the formation of self-assembled monolayer (SAM), followed by the immobilization of tyrosinase (TYR) (TYR-AuNPGCE). The electrode was characterized by cyclic voltammetry, with 1.62 pM (0.35×10^{-6} mg/L) as limit of detection obtained for atrazine [35].

Likewise a biosensor for detection on organophosphorus insecticide was developed by Du et al. First the tetrathoxysilane (TEOS) was mixed with chitosan solutions and gold nanoparticles suspension, this mixture form the AuNPs-SiSG composite (sol-gel) and was deposited onto the surface of the pretreated GCE . Finally, the electrode was coated with AChE solution, and

then was incubated to obtain the AChE-AuNPs-SiSG/GCE. The presences of a large number of hydroxyl groups provide a suitable microenvironment for enzymatic activity of the AChE by obtaining thiocholine (enzymatic product). The biosensor was characterized by cyclic voltammetric, since the current response is based on the inhibition of organophosphorous insecticide on the enzymatic activity of AChE. The inhibition of monocrotophos was proportional to its concentration with a limit of detection of 2.69 nM (0.6×10^{-3} mg/L) [36].

Du et al. continued to work on the development of Biosensors for pesticide detection based on AuNPs in chitosan hydrogel and in the enzymatic action of AChE. They develop a new biosensor with a planar gold electrode with electrochemical deposition of AuNPs-SiSG composite, which provides better conditions for the enzymatic action of AChE. In addition this biosensor was based on the chemisorption/desorption process of thiocholine. In this way, improving the detection limits obtained earlier, with 0.1 nM (0.03×10^{-3} mg/L) for malathion [37].

Wang et al. [38] was developed an amperometric biosensor based on based on Fe₃O₄ nanoparticles–chitosan nanocomposite for detection of phenolic compounds. To obtain the film, first the chitosan solution was mixed with nanoparticles suspension and tyrosinase solution (previously prepared), then this mixture was used to cover the GCE (pretreated). The surface of NPs and porous morphology of chitosan provide an appropriate environment for the enzymatic activity. Hence the principle of this biosensor is based in the amperometric detection of the o-quinone (enzymatic product) by the tyrosinase catalyzed oxidation of phenolic

compounds, in this case the limit of detection of catechol, p-cresol and phenol is 25 nM (2.75×10^{-3} , 2.71×10^{-3} and 2.35×10^{-3} mg/L respectively) [38].

Another enzyme sensor for the amperometric determination of formaldehyde was developed by Vastarella and Nicastrì [39]. They used the charge carrier properties of CdS nanoparticles which are immobilized onto a gold working electrode by self-assembled monolayer techniques. The enzyme formaldehyde dehydrogenase, covalently immobilized onto a protecting membrane of nylon that covers the nanoparticles, catalyzes the oxidation of formaldehyde, which occurs after light stimulation of the semiconductor through the electron/hole recombination. All the experiments took place in the absence of cofactor NAD⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide), which is commonly used as a mediator. With this biosensor, the limit of detection was 1.36 μ M (41×10^{-3} mg/L) and the operational stability was 6 hours under flow conditions [39].

The use of film has been combined with the use of nanoparticles in detection systems. For example polypyrrole (PPy) film was used for biosensor applications by Fredj et al. [40] they developed a electrochemical biosensor for atrazine detection, in this sensor PPy films were prepared by electropolymerization on surface of gold electrode, then streptavidin labeled magnetic particles (Fe_2O_3) were immobilized on PPy films using a controlled magnetic field, resulting in an organized distribution of the NPs in the film, to improve the sensitivity. The next step was the immobilization of biotin-Fab fragment K47 on the streptavidin labeled magnetic particles and finally the use of the BSA as blocking layer. All processes were

characterized with cyclic voltammetry, with a low detection limit of 23 nM (5×10^{-3} mg/L) for atrazine [40].

More recently Gong et al. developed an electrochemical biosensor for OP pesticides, also they used PPy films. This sensor immobilized AChE onto Au nanoparticles-polypyrrole nanowires composite film modified glassy carbon electrode (AChE-Au-PPy/GCE). This nanocomposite film exhibits a porous structure with ideal conditions for good conductivity and catalytic activity, also the electron transfer is facilitated and therefore the OPs immobilization by the action of the AChE, with detection limit of 0.01 mM (2×10^{-3} mg/L) for methyl parathion [41].

3.2.2. Carbon nanotubes

Carbon nanotubes, CNTs, were discovered by S. Iijima [42] in 1991 and are empty cylinders of pure carbon atoms, as if a single layer of graphene had been rolled into a tube. Depending on the number of concentric tubes in their structure, CNTs can be single-walled carbon nanotubes, SWCNTs or multi-walled carbon nanotubes, MWCNTs (see Figure 4). Their dimensions are varied: diameters can be as little as ~ 1.3 nm for the SWCNTs and between 10-20 nm for the MWCNTs and with lengths of 0.5 to several hundreds of μm [43].

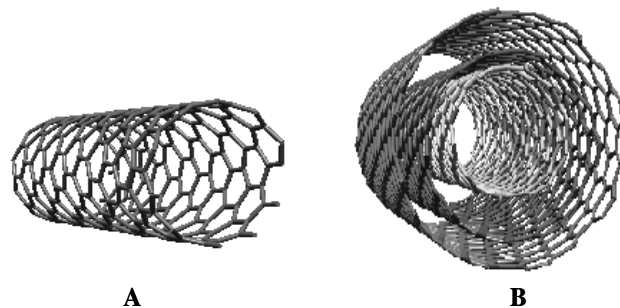


Figure 4. Scheme of structure of carbon nanotube: (A) Single-wall carbon nanotube, SWCNT; (B) Multi-wall carbon nanotube, MWCNT.

Carbon nanotubes have several outstanding physical properties (mechanical, optical and electric, among others) [44]. However, it is their size and electronic properties, derived from the 'free' electrons left on the surface of the tubes after the sp^2 hybridization of the carbon orbitals, which are of special interest for the purpose of this overview. CNTs are particularly attractive for electronic detection because of their high surface-to-volume ratio and novel electron transport properties [45]. The following factors have all been shown to be extremely useful for the development of CNT-based sensors: CNT can promote electron transfer reactions, because they have edge plane defects at their end caps; minor differences in their chemical environment, such as those associated with the presence of molecules, have a considerable influence on their electronic conductance; surface fouling in CNT-modified electrodes is hindered; and the sensitivity of the signal in redox reactions is enhanced by the electrocatalytic activity of CNT.

3.2.2.1. *Non-enzymatic detection*

Of all the non-enzymatic sensors with CNTs developed for the determination of phenolic compounds, particular reference should be made to the one produced by Huang et al. [18] to develop an amperometric sensor for determining 4-aminophenol. The glassy carbon electrode (GCE) used was coated with a suspension of SWCNT-nafion, and the solvent was left to evaporate at room temperature. The increase in the maximum current and the decrease in the potential of the oxidation with respect to the unmodified electrode is clear evidence that the coating of the electrodes exerts catalytic effects on the oxidation of 4-aminophenol, of which up to 0.8 nM (8.73×10^{-5} mg/L) was detected with great stability [18].

Continuing the study on the oxidation process of phenolic compounds by the action of the coating layer to the modified electrodes, we found the research developed by Wang et al. [19], therefore GCEs (pretreated) were coated with a MWCNT-suspension for stable and sensitive detection of (phenol, 2,4-diclorophenol, 4-clorophenol and p-cresol) with high sensitivity and low noise, obtaining detection limits of 1.5×10^{-2} mM (1.41mg/L). Equally Sun et al. [46] developed a biosensor based in a GCE coated by a MWCNTs dispersion formed by oil of turpentine and emulsifier OP TX-100. This coverage allows the oxidation and amperometric determination of the estrogens (estradiol, estrone and estriol). In this way the limit of detection for estradiol was 1×10^{-5} mM (2.73×10^{-3} mg/L) [46].

Following the same line of GCE-modified with MWCNTs for the oxidation and subsequent detection of xenobiotics compounds we found the sensor developed by Ding et al. [14]. In this case a suspension of MWCNTs in *N,N*-dimethylformamide (DMF) was used for coated the GCE, with this layed the voltammograms increased and the peak potentials of oxidation changed negatively at the presence of dihydroxybenzene isomers in artificial wastewater. This detection took place simultaneously and quantitatively with limits of detection for catechol, resorcinol and hydroquinone of 6×10^{-4} , 1×10^{-3} and 6×10^{-4} mM, respectively (6.61×10^{-2} , 11.01×10^{-2} and 6.61×10^{-2} mg/L).

For their part, Qi and Zang [47] developed a similar sensor for the simultaneous detection of hydroquinone and catechol. The MWNTs were functionalised with carboxylic acid groups and dispersed in DMF. Subsequently they were deposited on the surface of a GCE. Hydroquinone or catechol were determined in water samples by differential pulse voltammetry (DPV). Hydroquinone presents a limit of detection of 7.5×10^{-4} mM (82.58×10^{-3} mg/L) while catechol can be determined up to a limit of detection of 2.0×10^{-4} mM (22.02×10^{-3} mg/L) [47].

Chicharro et al. [48] made a study on the detection of amitrole (3-amino-1H-1,2,4-triazole) using the electrocatalytic activity of a carbon nanotube paste electrode. The electrode was prepared by placing a mixture of MWCNTs and mineral oil into a teflon tube. The amitrole oxidation signal shifted 250 mV toward more negative potential and the sensitivity increased, which showed that pretreating the CNT-paste electrode is useful

for the sensitive determination of amitrole. The limit of detection obtained was 0.6 mM (50.45mg/L).

The use of the CNTs as transducer elements in sensor devices field-effect transistor (CNTFETs) has been increasing, but their use was leading in most cases to detect proteins or high molecular weight analytes. Recently Sánchez-Acevedo et al. [49] developed a biosensor that allows for rapid detection of bisphenol A (BPA) in water at picomolar concentrations. This CNTFET based on the use of low density of SWCNTs, which act as transducers, moreover for the first time the CNTFET was functionalized by a nuclear receptor, the human estrogen receptor (ER- α), which was adsorbed onto the surface of SWCNTs. (Figure 5) This ER- α acts as recognition element to take advantage the high affinity of the receptor to xenobiotic compounds like BPA. Therefore allows the fast (2 min) and selective detection of BPA, with limit of detection of 2.19 pM (5×10^{-7} mg/L)

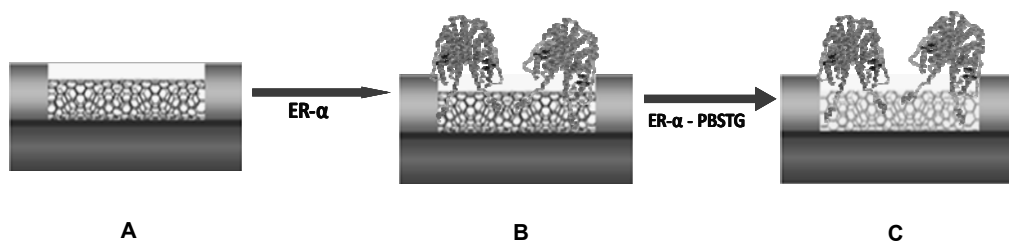


Figure 5. Scheme of functionalization process of the SWCNTs; (a) Image of a SWCNTs network; (b) adsorption of ER- α onto the SWCNTs network; (c) the gaps left on the SWCNTs after the adsorption of the ER- α are covered by a PBSTG blocking solution (0.05% Tween 20 and 0.8% gelatin in PBS). (Sánchez-Acevedo, 2009)

3.2.2.2. *Enzymatic detection*

One of the first biosensors to include carbon nanotubes for the detection of OP pesticides and nerve agents was developed by Joseph Wang's group [9]. The surface of a carbon electrode was coated with a solution of MWCNTs in DMF, using an electrochemical oxidation to create carboxylic groups in the CNTs to immobilise acetylcholinesterase (AChE)/choline oxidase (CHO) enzymes on the electrode by reaction between the carboxylic groups on the surface of the MWCNTs and the amine residues of the proteins. The biosensor shows high sensitivity and linearity with a low detection limit of 5×10^{-5} mM (13.16×10^{-3} mg/L) for the detection of methyl parathion. These results are a product of both the catalytic activity of the SWCNTs and the enzymatic activity of the AChE, which facilitates the obtaining of hydrogen peroxide. Similarly the high surface of MWCNTs gives a greater chance of anchor points of the enzyme [9].

With a similar methodology, Joshi et al. [50] developed a biosensor based on a screen-printed electrode (SPE) that incorporates MWCNTs and acetylcholinesterase (AChE) for the detection of OP pesticides (AChE inhibitors). The authors used acetylthiocholine iodide as the substrate for the enzymatic reaction and thus measure the activity of AChE by OP nerve agents.. The increased current obtained on the measurement with SPE modified with MWCNTs can be attributed to the catalytic behavior of CNTs toward thiocholine (enzymatic product) and the electrocatalytic oxidation of thiocholine. The sensor response was linear, with sensitivity of 6.018 mA/M and with a limit of detection of 0.5 nM (1.45×10^{-4} mg/L) for paraoxon.

Later the same authors developed a MWCNT-SPE based on the enzyme organophosphorus hydrolase (OPH) to determine the thiol-containing hydrolysis products of the OP compounds used as nerve agents 2-(diethylamino)ethanethiol (DEAET) and 2-(dimethylamino)ethanethiol (DMAET). Similarly the increase in the electrical response was attributed to the electrocatalytic activity of MWCNTs and the enzymatic activity of the OPH that allows the hydrolysis. The limits of detections were as low as 2 mM (210.42 mg/L) and 0.8 mM (106.57 mg/L) for DMAET and DEAET respectively [21].

Similarly Liu et al. developed an enzymatic amperometric sensor, based on the detection of thiocholine(enzymatic product) to assess the activity of AChE in the detection of OP compounds. They coated a GCE with a film of MWCNTs and the enzyme adsorbed onto it. In this GCE the layer of CNTs allows improve detection of thiocholine and therefore improve the detection limits obtained with other transducers used until now for the same purpose, among which are carbon-based electrodes such as glassy carbon, carbon paste electrodes, and bulk metal electrodes as gold electrodes,even with others modified electrodes. In addition flow injection analysis involves improvements in sensitivity and reproducibility of the sensor,thus obtaining a low detection limit of 0.3 μM (82.56×10^{-3} mg/L) [51].

The same group developed a flow-injection amperometric biosensor for OP pesticides and nerve agents based on the self-assembly of the AChE in a GCE modified with CNTs [52]. On this electrode, the AChE is immobilized on the surface of the CNTs by assembling a coating of

poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDDA) and a coating of AChE. The microenvironment created by the structure (PDDA/AChE/PDDA) located on the surface of CNTs facilitated the enzymatic activity of AChE, in addition to the CNTs allow the electrochemical detection of thiocholine. (Figure 6) So that the biosensor presented good precision, reproducibility and stability, with a limit of detection of 0.4 pM (0.11×10^{-6} mg/L) for paraoxon

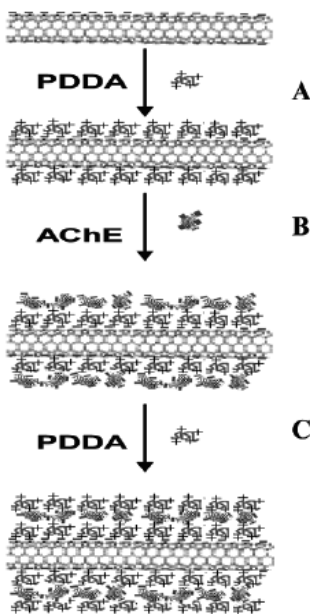


Figure 6. Schematics of layer-by-layer electrostatic self-assembly of AChE on carbon nanotube: (A) assembling positively charged PDDA on negatively charged CNT; (B) assembling negatively charged AChE; (C) assembling the second PDDA layer. (Reprinted with permission from *Anal Chem* 78, Liu G, Lin Y, *Biosensor based on self-assembling acetylcholinesterase on carbon nanotubes for flow injection*, 835-843. Copyright 2006 American Chemical Society).

Equally Chen et al. [53] developed an AChE-based electrochemical pesticide sensor. In this sensor the enzyme acetylcholinesterase was

immobilized on GCE modified with MWCNTs, so as to the electrodes significantly increase surface areas and enhanced the enzymatic activity of AChE, facilitating the electrochemical polymerization of prussian blue (PB) a redox mediator for the electrochemical oxidation of the enzymatic product, thiocholine. Then the MWNT-AChE/PB/MWNT sensor could detect 0.18 nM (0.04×10^{-3} mg/L) and 0.45 nM (0.1×10^{-3} mg/L) for the pesticides dichlorvos and carbofuran respectively in aqueous solution, moreover with the MWNTs is significantly reduced the response time of the sensor.

Zhao et al. [20] produced a biosensor by using tyrosinase for the amperometric determination of phenolic compounds. They coated the surface of the GCE with SWCNTs and then deposited the tyrosinase solution which, in turn, they covered with nafion. The results obtained made it possible to use this sensor to determine phenol, catechol, *m*-cresol and *p*-chlorophenol with high sensitivity. Likewise, the limit of detection for phenol was found to be 0.02 μ M (1.88×10^{-3} mg/L). The presence of benzoic acid was also detected on the basis of the inhibition in tyrosinase activity.

Likewise Mita et al. [54] used tyrosinase to develop an enzyme sensor for the detection of BPA based on the use of carbon paste electrodes. They initially mixed graphite carbon powder with tyrosinase and oil for preparing the carbon paste, later similar mixtures were made using SWCNTs and MWCNTs. These carbon pastes were used for the preparation of the electrode using Teflon for the body of the electrode and copper wire for electrical contact. The detection limits obtained by

electrodes with different composition of the carbon paste based on graphite carbon powder, SWCNT and MWCNT by amperometric measures were of 0.1 μM (22.83×10^{-3} mg/L), 0.02 μM (4.56×10^{-3} mg/L) and 1 μM (0.23 mg/L) respectively. The low detection limit and high selectivity are probably a result of the characteristics of the oil used in the carbon paste, and the properties of SWCNTs and its ability to interact with the BPA. Although the electrodes based on graphite powder provided the widest linear range, however the electrodes based on SWCNTs and MWCNTs evidence increased sensitivity.

Deo et al. [11] constructed an amperometric biosensor for OP pesticides based on MWCNTs. In this sensor, the enzyme organophosphorus hydrolase (OPH) was immobilized on GCEs modified with MWCNTs. The presence of the CNTS improves the detection level of *p*-nitrophenol (enzymatic product), while the OPH electrode presented problems to quantify near the limit of detection, contrary to the responses obtained with the OPH / MWCNT detector. So that when comparing the amperometric signals of paraoxon and methyl parathion in the OPH and OPH/MWCNT electrochemical detectors, the results were much better when MWCNTs were used, to the extent that nanomolar levels were achieved and limits of detection were about 0.15 μM (0.04 mg/L) for paraoxon and 0.8 μM (0.21 mg/L) for methyl parathion.

The carbon nanofibers (CNF) are a generation of materials with properties superior to conventional materials, in addition to a low-cost manufacturing. These relatively new nanostructures have been implemented in detection systems, such as the work developed by Zhang

et al. [55] They developed an amperometric biosensor for phenols detection, they propose a novel polyaniline-ionic liquid-carbon nanofiber (PANI-IL-CNF) composite, first the GCE was pre-treated (polished and rinsing), then the GCE was used for preparation of the composite film on its surface by cyclic scanning (between -0.2 and $0.9V$) in a CNF solution previously prepared, finally the enzyme tirosinase was immobilized on the nanocomposite film via the cross-linking step with glutaraldehyde. The cyclic number for the electropolymerization of the nanocomposite determines the thickness of the film formed on the surface of GCE, which is important for the behavior of the sensor, consequently the amperometric response increased with the increasing cyclic number, for example in the catechol detection the responses are stable after the ninth cyclic number. Consequently, the limit detection of catechol, p-cresol, phenol and m-cresol are 0.1 nM (11.01×10^{-6} mg/L), 0.1 nM (10.81×10^{-6} mg/L), 0.1 nM (9.41×10^{-6} mg/L), and 0.5 nM (54.07×10^{-6} mg/L), respectively.

4. Conclusions and future prospects

In this article we have reviewed the principal techniques based on nanostructures for the analysis of xenobiotic compounds in environmental samples. Of particular interest are nanoparticles, because they have the advantages of their size, the surface/volume ratio and the magnetic and fluorescent properties of some of them. Also important are the techniques based on carbon nanotubes. The properties of these nanostructures have been used, among other things, for immunoassays, for implementing new techniques such as SERS, and for producing electrodes and biosensors. In many cases, these techniques were functionalized with biomolecules

(enzymes and specific antibodies) to increase their selectivity and to carry out analyses in less time and at less cost. The limits of detection of some of the techniques are better than those of traditional analytical techniques can be achieved even at concentrations pM not obtained so far, furthermore in most samples require no pretreatment for chemical detection, which can be done with very small volumes of sample.

Glossary

AChE	Acetylcholinesterase
APTMS	3-aminopropyltrimethoxysilane
BSA	Bovine Serum Albumin
CNT	Carbon Nanotube
CHO	Choline Oxidase
CPE	Carbon Paste Electrode
DDT	Dichlorodiphenyltrichloroethane
DMF	N,N-dimethylformamide
GCE	Glassy Carbon Electrode
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
LSPR	Localized Surface Plasmon Resonance
MWCNT	Multi-Walled Carbon Nanotube
OP	Organophosphorous Compounds
OPH	Organophosphate Hydrolase
SERS	Surface Enhanced Raman Spectroscopy
SWCNT	Single-Walled Carbon Nanotube
RSD	Relative Standard Deviation
SPE	Screen-Printed Electrode

Acknowledgements

The authors acknowledge economic support from the MEC (project nº BQU2003-500). Zayda Sánchez would also like to thank the University of Pamplona (Colombia) for her doctoral fellowship and the Rovira i Virgili University for providing economic support.

5. References

1. Holland P (2003) *Pure Appl Chem* 75:1843-1857.
2. Furuichi T, Kannan K, Giesy JP, Masunaga Sh (2004) *Water Res* 38:4491-4501.
3. Cespedes R, Petrovic M, Raldua D, Saura U, Pina B, Lacorte S, Viana P, Barcelo D (2004) *Anal Bioanal Chem* 378: 697-708.
4. Hu YY, Zheng P, He YZ, Sheng GP (2005) *J Chromatogr A* 1098:188-193.
5. Janosek J, Hilscherová K, Bláha L, Holoubek I (2006) *Toxicol in Vitro* 20:18-37.
6. Wang D, Mckague B, Liss S, Edwards E (2004) *Environ Sci Technol* 38:6396-6406.
7. Blankvoort B, Rodenburg R, Murk A, Koeman J, Schilt R, Aarts J (2005) *Environ Toxicol Pharmacol* 19:263-272.
8. Barry RC, Lin Y, Wang J, Liu G, Timchalk CA (2009) *J Expo Sci Environ Epidemiol* 19: 1-18.
9. Mueller SO (2004) *Anal Bioanal Chem* 378: 582-587.
10. Lin Y, Lu F, Wang J (2004) *Electroanalysis* 16:145-149.
11. Deo RP, Wang J, Block I, Mulchandani A, Josi K, Trojanowicz M, Scholz F, Chen W, Lin Y (2005) *Anal Chim Acta* 530:185-189.

12. Zhou Q, Xiao J, Wang W, Liu G, Shi Q, Wang W, Liu G, Shi Q, Wang J (2006) *Talanta* 68:1309-1315.
13. Moore NP (2000) *Reprod Toxicol* 14:183-192.
14. Ding YP, Liu WL, Wu QS, Wang XG (2005) *J Electroanal Chem* 575:275-280.
15. Kirk AB (2006) *Anal Chim Acta* 567:4-12.
16. Tikkanen MW (2006) *Anal Chim Acta* 567:20-15.
17. Martinelango PK, Tian K, Dasgupta PK (2006) *Anal Chim Acta* 567:100-107.
18. Huang W, Hu W, Song J (2003) *Talanta* 61:411-416.
19. Wang J, Deo RP, Musameh M (2003) *Electroanalysis* 15:1830-1831.
20. Zhao Q, Guan L, Gu Z, Zhuang Q (2005) *Electroanalysis* 17:85-88.
21. Joshi KA, Prouza M, Kum M, Wang J, Tang J, Haddon R, Chen W, Mulchandani A (2006) *Anal Chem* 78:331-336.
22. Kandimalla VB, Ju H (2006) *Chem.--Eur J* 12:1074-1080.
23. Hu Sh, Xie J, Xu Q, Rong K, Shen G, Yu R (2003) *Talanta* 61:769-777.
24. Wang F, Hu S (2009) *Microchim Acta* 165: 1-22.
25. Kreibig U, Vollmer M. (1995) (vol 25) *Optical Properties of Metal Clusters*, vol. 25. Springer Verlag, Heidelberg, 532.
26. Baker GA, Moore DS (2005) *Anal Bioanal Chem* 382:1751-1770.
27. Wang W, Ruan Ch, Gu B (2006) *Anal Chim Acta* 567:121-126.
28. Ruan Ch, Wang W, Gu B (2006) *Anal Chim Acta* 567:114-120.
29. Feng J, Shan G, Maquieira A, Koivunen M, Guo B, Hammock B, Kennedy I (2003) *Anal Chem* 75:5282-5286.
30. Simonian A, Good T, Wang D, Wild J (2005) *Anal Chim Acta* 534:69-77.
31. Dasaray SSR, Rai US, Yu H, Anjaneyulu Y, Dubey M, Ray PC (2008) *Chem. Phys. Lett.* 460: 187-190.

32. Sánchez A, Vázquez T, Wang J, Mulchandani A, Chen W (2005) *Electrochem Commun* 7:1371-1374.
33. Liu G, Lin Y (2005) *Anal Chem* 77:5894-5901.
34. Liu Z, Liu Y, Yang H, Yang Y, Shen G, Yu R (2005) *Anal Chim Acta* 533:3-9.
35. Kim GY, Shim J, Kang MS, Moon SH (2008) 156: 141-147.
36. Du D, Chen S, Cai J, Zhang A (2007) *Biosens Bioelectron* 23: 130-134.
37. Du D, Ding J, Tao Y, Chen X (2008) *Sens Actuators B* 134 : 908-912.
38. Wang S, Tan Y, Zhao D, Liu G (2008) *Biosens Bioelectron* 23: 1781-1787.
39. Vastarella W, Nicastrì R (2005) *Talanta* 66:627-633.
40. Fredj HB, Helali S, Esseghaier C, Vonna L, Vidal L, Abdelghani A (2008) *Talanta* 75: 740-747.
41. Gong J, Wang L, Zhang L (2009) *Biosens Bioelectron* 24: 2285-2288.
42. Iijima S (1991) *Nature* 354:56-58.
43. Chen RJ, Bangsaruntip S, Drouvalakis KA, Kam NWSH, Shim M, Li Y, Kim W, Utz PJ, Dai H (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* 100:4984-4989.
44. Dresselhaus M S, Dresselhaus G, Eklund PC (1996) *Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes*, Academic, San Diego.
45. Gooding JJ, Mao BW (2005) *Electrochim Acta* 50: 3049-3060.
46. Sun Y, Wu K, Hu Sh (2003) *Microchim Acta* 142:49-53.
47. Qi H, Zhang Ch (2005) *Electroanalysis* 17:832-838.
48. Chicharro M, Bermejo E, Moreno M, Zapardiel A, Rivas G (2005) *Electroanalysis* 17:476-482.
49. Sánchez-Acevedo ZC, Riu J, Rius FX (2009) *Biosens Bioelectron* 24:2842-2846.
50. Joshi KA Tang J, Haddon R, Wang J, Chen W, Mulchandani A (2005) *Electroanalysis* 17:54-58.

51. Liu G, Riechers ShL, Mellen M, Lin Y (2005) *Electrochem Commun* 7:1163-1169.
52. Liu G, Lin Y (2006) *Anal Chem* 78:835-843.
53. Chen H, Zuo X, Su S, Tang Z, Wu A, Song S, Zhang D, Fan C (2008) *Analyst* 133: 1182-1186.
54. Mita DG, Attanasio A, Arduini F, Diano N, Grano V, Bencivenga Y, Rossi S, Amine A, Moscone D (2007) *Biosens Bioelectron* 23:60-65
55. Zhang J, Lei J, Liu Y, Zhao J, Ju H (2009) *Biosens Bioelectron* 24: 1858-1863.

Tercer Capítulo

Desarrollo experimental

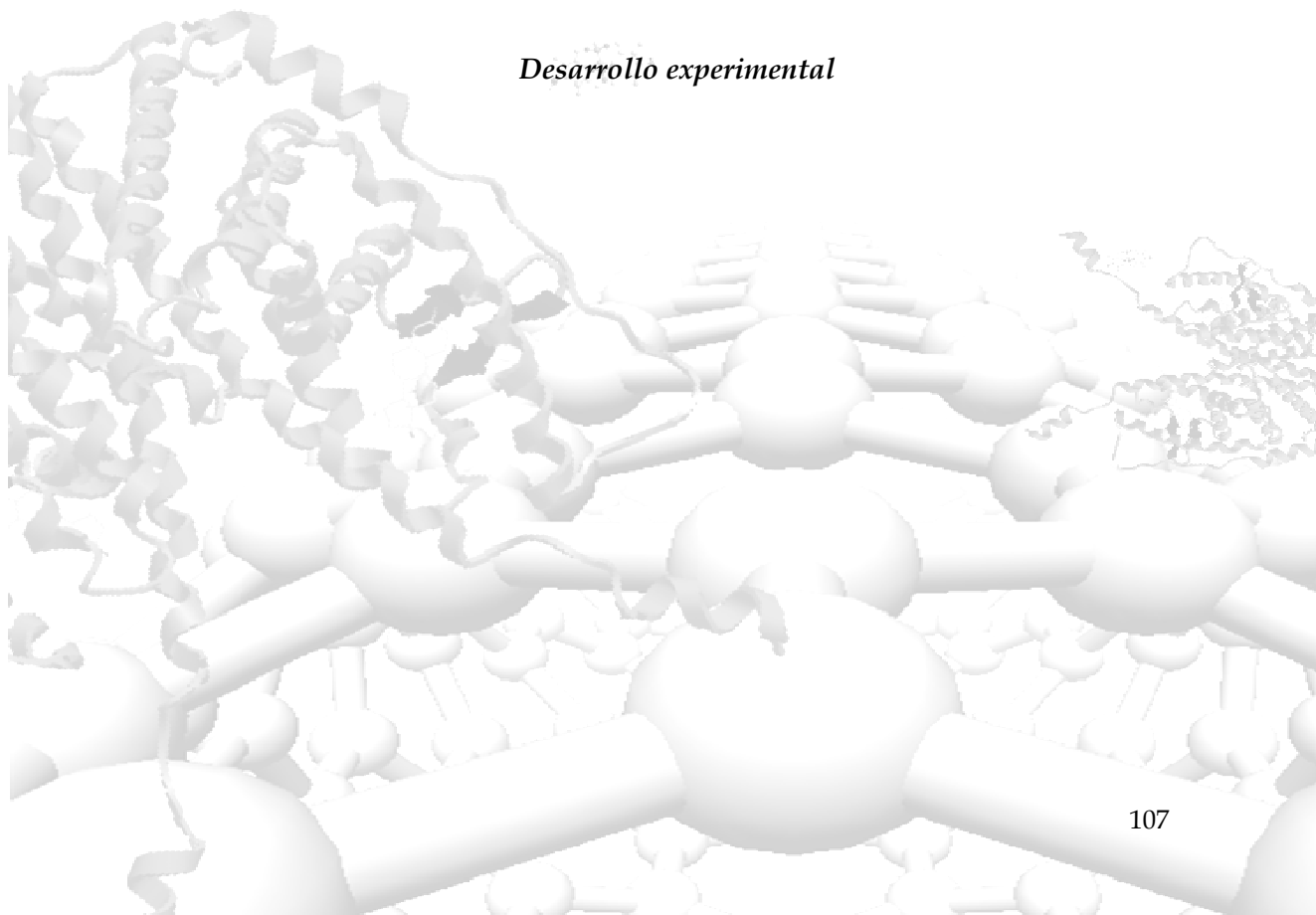


Tabla de Contenidos

3.1. Introducción.....	111
3.2. Materiales.....	112
3.2.1. Síntesis de SWCNTs por CVD (<i>Chemical Vapour Deposition</i>).....	112
3.2.1.1. Equipos de laboratorio.....	112
3.2.1.2. Reactivos y otros materiales.....	112
3.2.2. Construcción del CNTFET.....	113
3.2.2.1. Reactivos y otros materiales.....	113
3.2.3. Proceso de funcionalización.....	113
3.2.3.1. Reactivos.....	113
3.2.4. Caracterización del CNTFET.....	114
3.2.4.1. Caracterización por microscopía.....	114
3.2.4.2. Caracterización eléctrica.....	114
3.3. Métodos.....	115
3.3.1. Síntesis de SWCNTs por CVD (<i>Chemical Vapour Deposition</i>).....	115
3.3.2. Construcción del CNTFET.....	118
3.3.2.1. Inserción de electrodos de plata.....	119
3.3.2.2. Inserción por fotolitografía de electrodos de Au/Cr.....	120
3.3.3. Proceso de funcionalización.....	121
3.3.3.1. Cubrimiento de los SWCNTs con un polímero, posterior uso de una molécula de anclaje e incorporación de un receptor celular.....	121
3.3.3.2. Adsorción de la molécula receptora en la superficie de los	

SWCNTs y posterior uso de un agente bloqueante.....	123
3.3.4. Caracterización del CNTFET.....	126
3.3.4.1. Caracterización por microscopía.....	127
3.3.4.2. Caracterización eléctrica.....	129
3.4. Bibliografía.....	133

3.1. *Introducción*

En los capítulos anteriores hemos pretendido sentar las bases que permiten, desde un punto de vista teórico, el desarrollo de un dispositivo sensor basado en el uso de redes de nanotubos de carbono de pared sencilla en un transistor efecto campo CNTFET para la determinación de compuestos xenoestrogénicos en agua. El presente capítulo da a conocer los materiales, reactivos y equipos empleados para la síntesis de los SWCNTs, para la construcción del CNTFET y funcionalización de los nanotubos, al igual que los métodos usados para la caracterización del dispositivo durante cada una de las etapas anteriormente enunciadas.

Para una mejor comprensión se ha tratado de abarcar de forma detallada cada uno de los pasos desarrollados en cada etapa experimental que permiten la obtención y posterior uso del dispositivo sensor.

3.2. *Materiales*

3.2.1. Síntesis de SWCNTs por CVD (*Chemical Vapour Deposition*)

3.2.1.1. Equipos de laboratorio

- Reactor tubular de cuarzo de 4 cm de diámetro y 120 cm de largo (*Afora, Barcelona, España*)
- Horno tubular tipo *sandwich* (*Carbolite HST 12/600*) (*Hope Valley, UK*)
- 2 controladores máxicos, para metano e hidrógeno (*Bronkhorst, Ruurlo, The Netherlands*)
- Ordenador y software para el control de los controladores máxicos: FlowView y FlowDDE (*Bronkhorst, Ruurlo, The Netherlands*)
- Manómetro para gas argón EK-KD34 (*Muurame, Finland*)
- Bomba de vacío (*Laurell Technologies Corporation, North Wales, PA, USA*)
- Aparato de *spin-coating* modelo WS - 400-6NPP (*Laurell Technologies Corporation, North Wales, PA, USA*)
- Baño de ultrasonidos de 100W (*Selecta, Barcelona, España*)

3.2.1.2. Reactivos y otros materiales

- Nitrato de hierro (III) nonahidratado 99.99 % (*Sigma, Tres Cantos, España*)
- Acetona 99.5 % (*Sigma, Tres Cantos, España*)
- Isopropanol 99.5 % (*Sigma, Tres Cantos, España*)
- Agua milli-Q/desionizada y agua tratada con carbon vegetal (resistividad de 18,2 M Ω .cm) obtenida con un sistema de agua de grado reactivo Milli-Q Plus (*Millipore, Billerica, MA, USA*)
- Substratos de SiO₂/Si, formados por una capa de 500 nm de SiO₂ crecido por oxidación térmica sobre obleas de Si tipo n de baja resistividad.

Dimensiones: 1 x 1 cm y 0.5 x 0.5 cm (*D+T Centro Nacional de Microelectrónica, CSIC, Bellatera, España*).

- Gas metano C-45 (*Carbueros Metálicos, Barcelona, España*)
- Gas hidrógeno C-50 (*Carbueros Metálicos, Barcelona, España*)
- Gas argón C-50 (*Carbueros Metálicos, Barcelona, España*)
- Gas nitrógeno C-50 (*Carbueros Metálicos, Barcelona, España*)

3.2.2. Construcción del CNTFET

3.2.2.1. Reactivos y otros materiales

- Tinta conductora Electrodag® 1415 M (*Acheson Industries, Scheemdam, Netherlands*)
- Plumilla conductora de punto ultra fino CW2200MTP (*Circuitworks, ITW Chemtronics®, Kennesaw, Georgia, USA*)

3.2.3. Proceso de funcionalización

3.2.3.1. Reactivos

- Polietilenimina (PEI) de alto peso molecular (*Sigma-Aldrich, Tres cantos, España*)
- Glutaraldehído grado I, 25% en agua (almacenado a 0°C) (*Sigma-Aldrich, Tres cantos, España*)
- Receptor de estrógenos alfa RE- α (almacenado a -70°C) (*Invitrogen, Paisley, UK*)
- Tampón fosfato salino Dulbecco (PBS), 150 mM, pH : 7.1 – 7.5 (*Sigma-Aldrich, Tres cantos, España*).
- Tween 20 (*Sigma-Aldrich, Tres cantos, España*)

- Gelatina extraída a partir de piel de pescado de agua fría (*Sigma-Aldrich, Tres Cantos, España*)

3.2.4. Caracterización del CNTFET

3.2.4.1. Caracterización por microscopía

- Microscopio electrónico de barrido ambiental (*environmental scanning electron microscope, ESEM*), Quanta 600 (*FEI, Hillsboro, OR, USA*)
- Microscopio de fuerza atómica (*atomic force microscope, AFM*), Pico Plus (*Molecular Imaging, Tempe, AZ, USA*)

3.2.4.2. Caracterización eléctrica

- Caja de Faraday (*SIRM, Badalona, España*) sobre mesa antivibración (*SIRM, Badalona, España*)
- Mesa de puntas manual (MP 1008) (*Wentworth Laboratories, Sandy, UK*)
- Analizador paramétrico modular de materiales semiconductores y software correspondiente Agilent 4157 A (*Agilent Technologies, Las Rozas, España*)

3.3. Métodos

3.3.1. Síntesis de SWCNTs por CVD (*Chemical Vapour Deposition*)

El primer paso en el desarrollo del CNTFET es la síntesis de los SWCNTs empleados como canal conductor de nuestro dispositivo. Tal como se planteó en el primer capítulo, la CVD es la técnica más usada por las ventajas que ofrece, (Dai, 1996; Kong, 1998; Cassell, 1999; Li, 2001; Harutyunyan, 2002; Murakami, 2004; Seidel, 2004; Lamouroux, 2007) por lo cual nos inclinamos por este método para la obtención de nuestros SWCNTs.

En nuestro proceso de síntesis se utilizó metano (CH_4) como fuente de carbono y nitrato de hierro nonahidratado ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) como precursor del catalizador metálico, ya que el elemento activo es el metal en estado elemental. El uso de hidrógeno (H_2) permite la reducción de la sal férrica e induce la nucleación de partículas catalíticas en el sustrato (activación del catalizador). De igual forma, durante el crecimiento de los nanotubos, el H_2 inhibe la formación de carbono amorfo. Asimismo como el catalizador ha de estar en todo momento en atmósfera controlada libre de aire se utiliza argón (Ar) como gas de purga. A continuación se explica de forma detallada el proceso llevado a cabo.

Inicialmente se procede a la preparación del catalizador para su posterior deposición sobre obleas de SiO_2/Si , sustrato sobre el cual se va a dar el crecimiento de los SWCNTs. Estas piezas o placas se sometieron a un

proceso de limpieza por ultrasonido en baños de 2 minutos consecutivos de acetona, isopropanol y agua milli-Q. Finalmente se secan con nitrógeno.

El catalizador usado es $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ en una concentración de 100 ppm en isopropanol, dejado 10 minutos en baño ultrasonidos para su total disolución. El uso del isopropanol como solvente permite asegurar una mejor evaporación del mismo durante la deposición del catalizador mediante *spin-coating*.

A continuación el catalizador se deposita mediante *spin-coating* sobre las placas previamente limpiadas, aplicándose 3 volúmenes consecutivos de 20 μl a 3000 r.p.m., lo cual permite una deposición homogénea del catalizador.

En el siguiente paso las placas de SiO_2/Si con el catalizador depositado se introducen en el reactor tubular, procediendo al calentamiento. Al llegar a 750°C para obtener una atmósfera inerte se deja fluir argón a un flujo constante de 1000 ml/min. Al llegar a 900°C cesa el flujo de argón y se procede a la introducción de los gases empleados para la síntesis, usándose metano con un flujo constante de 600 ml/min e hidrógeno con un flujo de 200 ml/min.

Las condiciones de flujo de los gases se regulan mediante controladores máxicos operados mediante ordenador. Asimismo el equipo se encuentra ubicado dentro de una campana extractora dadas las características inflamables y explosivas de los gases. En la figura 1 se encuentra un diagrama del equipo usado para la síntesis y en la Figura 2 la imagen del

equipo formado por un reactor tubular y el horno tubular tipo sándwich dentro del sistema extractor.

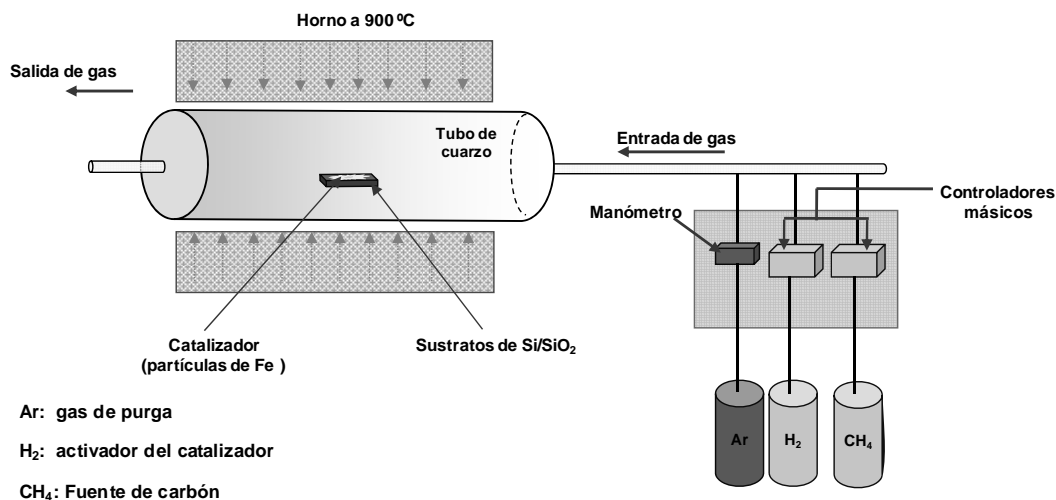


Figura 1. Diagrama del equipo usado para la síntesis de SWCNTs mediante la técnica de CVD

El tiempo usado para la síntesis fue de 10 a 20 minutos. Dependiendo del tiempo de exposición y del flujo de metano empleado se puede controlar el crecimiento de nanotubos de carbono ya sea en pequeños agrupaciones (manojos) o en redes, obteniendo de este modo el dispositivo CNTFET. (Dai, 2002; Dresselhaus, 2001; Zhou, 2004) Tan pronto se acaba la síntesis y cesa el flujo de metano e hidrógeno se deja enfriar el horno en presencia nuevamente de argón con las mismas condiciones de flujo anteriormente descritas.

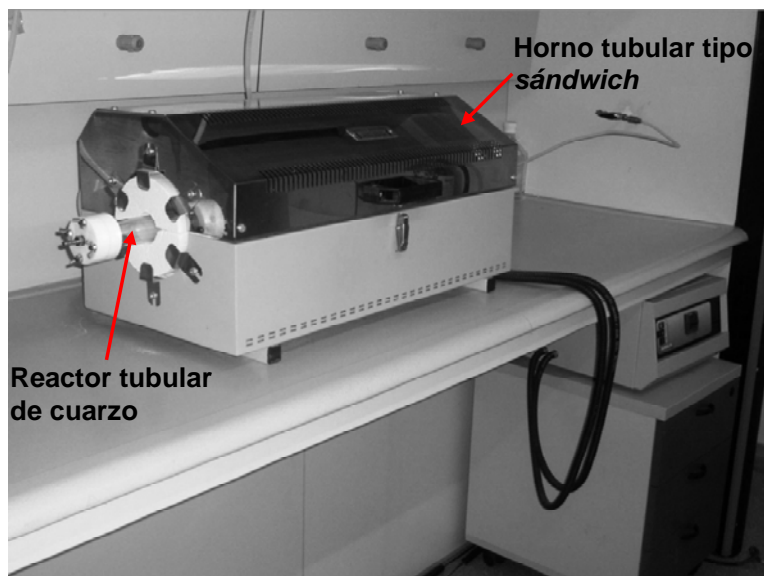


Figura 2. Imagen del reactor tubular y el horno tubular tipo sándwich empleados para la síntesis usando el método CVD, dentro del sistema extractor.

Cuando se ha alcanzado la temperatura ambiente las placas con las redes de SWCNTs se retiran, procediendo a su caracterización mediante microscopía para verificar las condiciones de los SWCNTs obtenidos.

3.3.2. Construcción del CNTFET

Una vez obtenidos los SWCNTs sobre el soporte de SiO_2/Si , se procedió a insertar los electrodos fuente y drenador, con el fin de obtener la configuración CNTFET presentada en el capítulo anterior. Se emplearon dos alternativas diferentes, una rápida y más económica de deposición manual de los electrodos de plata y la otra mediante fotolitografía de electrodos de Au/Cr.

3.3.2.1. Inserción de electrodos de plata

Este método es muy sencillo y rápido, y consiste en aplicar sobre la placa de SiO_2/Si y SWCNTs pequeños puntos de una solución de tinta conductora de plata adquirida comercialmente, denominada *Electrodag*® o utilizando una plumilla conductora de punto ultrafino (*Conductive pen - micro tip*) formando pares de electrodos (superficie alrededor de 4 mm^2 cada uno) separados entre si 5 mm aproximadamente. (Figura 3) A continuación el sustrato con los SWCNTs y los electrodos se someten durante 5 minutos a un termocurado (entre 121 a $149 \text{ }^\circ\text{C}$), lo que permite obtener la máxima conductividad de los electrodos.

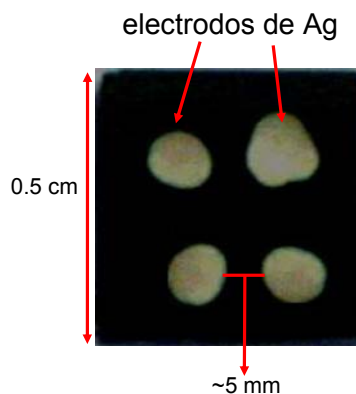


Figura 3. Placas de SiO_2/Si con SWCNTs y 2 pares de electrodos de plata depositados manualmente.

Este método se aplicó para caracterizar eléctricamente las muestras de CNTs de forma rápida y directa, con el fin de poder ajustar los parámetros de síntesis para obtener una densidad adecuada en la red de nanotubos que actúa como canal entre los dos electrodos. El hecho de utilizar esta técnica para la inserción de los electrodos permite una gran versatilidad ya que a continuación de cada síntesis por CVD podemos disponer de los correspondientes CNTFETs sin tener que necesitar lentos y costosos

procesos de fotolitografía. Esto nos permitió efectuar muchas más pruebas para encontrar las condiciones idóneas tanto de síntesis como de los procesos de funcionalización.

3.3.2.2. Inserción por fotolitografía de electrodos de Au/Cr

En este caso los electrodos fuente y drenador están compuestos por una doble capa metálica de Au/Cr con un espesor de 2/30 nm respectivamente. En primer lugar se deposita la capa de cromo que proporciona adherencia a los electrodos, y a continuación la capa de oro, la cual establece la conducción eléctrica. La distancia entre los pares de electrodos oscila entre 2 y 2.5 μm . (Figura 4)

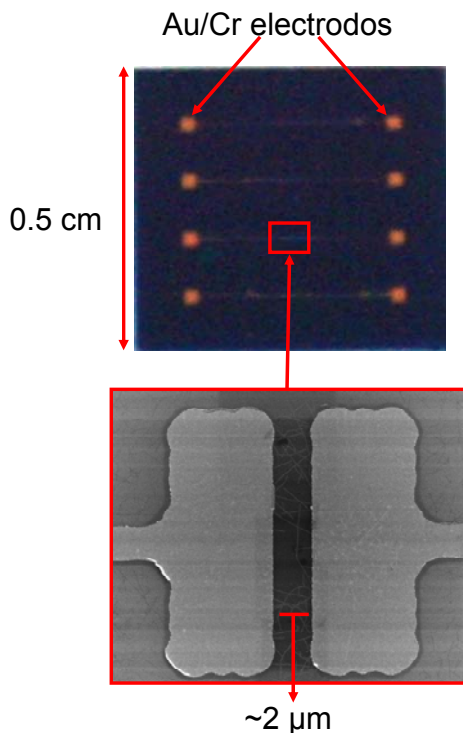


Figura 4. (a) Placa de SiO_2/Si con SWCNTs y cuatro pares de electrodos de Au/Cr depositados por fotolitografía con un espesor de 2/30 nm respectivamente. (b) Imagen ESEM de la red de SWCNTs contactada por los electrodos de Au/Cr

3.3.3. Proceso de funcionalización

Finalizada la construcción del CNTFET, el siguiente paso consiste en conseguir selectividad hacia el analito que queremos determinar. Para esta finalidad se plantearon inicialmente dos opciones. La primera consiste en cubrir los SWCNTs con un polímero que impide la interacción no específica de proteínas y otras sustancias del medio, seguido por la utilización de una molécula de anclaje al polímero que facilita la incorporación de la molécula receptora. La segunda opción consiste en la adsorción directa de la molécula receptora sobre la superficie de los SWCNTs y posterior recubrimiento de los huecos dejados por las diferentes moléculas receptoras sobre la superficie de los SWCNTs con un agente bloqueante.

3.3.3.1. Cubrimiento de los SWCNTs con un polímero, posterior uso de una molécula de anclaje e incorporación de un receptor celular

Para este procedimiento se eligió la polietilenimina PEI, dado su notable uso en procesos de funcionalización de CNTFETs. (Star, 2003; Chen, 2004; Hu, 2008). Se sumerge el dispositivo CNTFET en una solución al 10% de PEI en agua desionizada durante varias horas, al cabo de las cuales se retira el dispositivo, se lava con agua desionizada y se seca con nitrógeno. En esta etapa se hace necesario comprobar diferentes tiempos de recubrimiento del CNTFET por la solución de PEI y comprobar mediante medidas eléctricas el que proporciona mejor protección al CNT.

Una gran ventaja del uso del PEI es que al hacerse la caracterización eléctrica se observa un claro cambio de conductividad de tipo “p” a tipo “n”, (Shim, 2001, Qi, 2003) lo que facilita la caracterización eléctrica durante

la funcionalización del dispositivo CNTFET. Tal cambio se debe a que el PEI fijado por adsorción transfiere parcialmente los electrones libres de los nitrógenos de los grupos amino a los átomos de los nanotubos de carbono. (Figura 5(a))

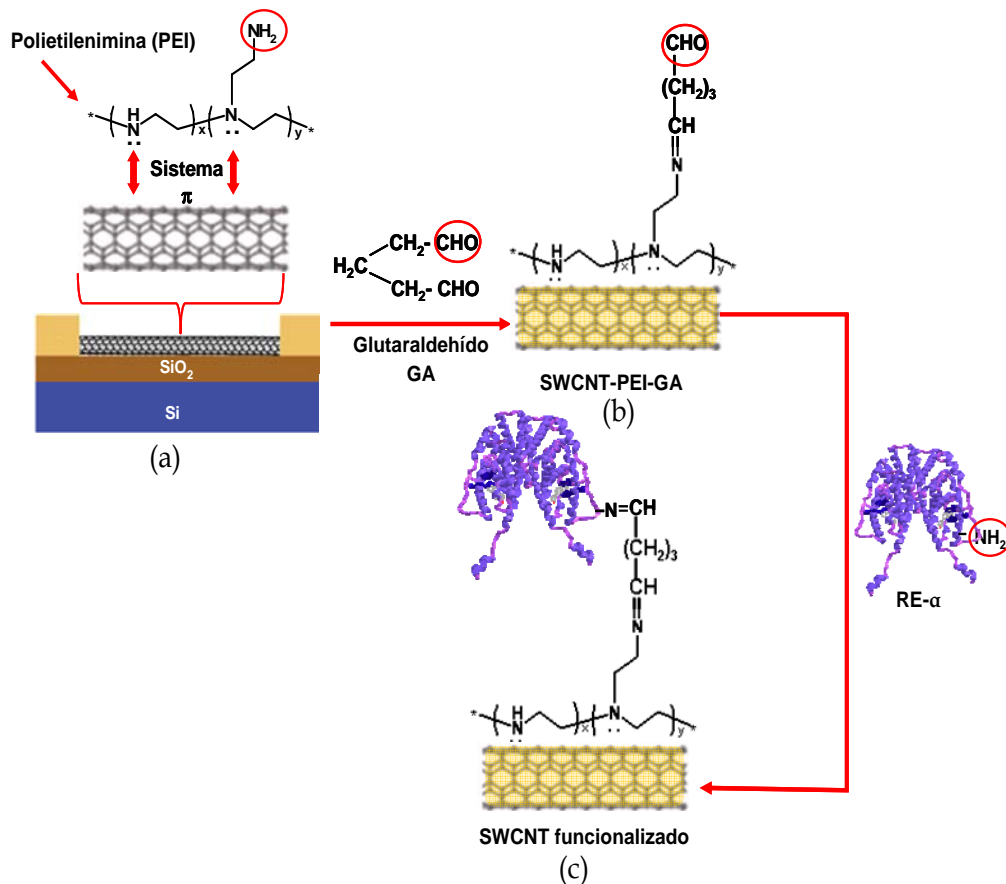


Figura 5. Representación de proceso de funcionalización: (a) Recubrimiento con PEI, (b) Uso de glutaraldehído como molécula de anclaje y (c) fijación del RE-α por acción del glutaraldehído. (Las imágenes no se encuentran a escala)

A continuación el CNTFET recubierto con PEI se pone en contacto con una solución de 2.5% de glutaraldehído (GA) (ajustado a pH= 7.4 con NaOH 0.1 M) sumergiendo el dispositivo CNTFET en la solución de GA durante un

periodo de dos horas (ver Figura 5(b)), con posterior lavado con agua desionizada y secado con nitrógeno. La presencia del GA facilita la funcionalización con el receptor de estrógenos alfa RE- α , mediante el enlace entre un grupo aldehído del GA y un grupo amino del RE- α . (Figura 5(c))

Finalmente, para poder lograr la adhesión de la molécula receptora se sumerge el CNTFET, probando diferentes tiempos de inmersión en la solución de RE- α (10 ppm de RE- α en PBS al 10% en agua milli-Q), con el fin de determinar el tiempo adecuado para la funcionalización, lavando posteriormente con agua milli-Q para eliminar el exceso de moléculas de receptor y secado con nitrógeno. La caracterización se hace posteriormente a cada etapa con el fin de verificar el comportamiento eléctrico y corroborar la presencia del RE- α fijado.

3.3.3.2. Adsorción de la molécula receptora en la superficie de los SWCNTs y posterior uso de un agente bloqueante

Este procedimiento consta de dos etapas fundamentales. En la primera se aprovecha la gran capacidad de adsorción que experimentan las proteínas sobre los CNTs (Chen, 2004; Bradley 2004) para la fijación de moléculas del RE- α , usado como elemento de reconocimiento de nuestro dispositivo sensor. En la segunda etapa se trabajan dos opciones para la protección del SWCNT contra las uniones no selectivas de otras proteínas o sustancias del medio. Una opción es el uso del surfactante Tween 20 (Chen, 2003; So, 2005; Villamizar, 2008) y la otra es el uso de un agente bloqueante formado por gelatina y Tween 20 en PBS (0.05% de Tween 20 y 0.8% de gelatina en PBS) conocida como PBSTG. (Piao, 2008)

El RE- α se fija por adsorción a la superficie de los SWCNTs, siendo importante la orientación de la proteína fijada al nanotubos con el fin de que pueda interactuar con el BFA. En este caso, la adsorción es producto en gran parte de atracciones hidrofóbicas, las cuales se deben tanto al carácter hidrofóbico de los SWCNTs como a la presencia de numerosos aminoácidos hidrofóbicos en el RE- α . Por tanto, la adsorción a la superficie de los SWCNTs puede darse por distintos sitios. Asimismo, al ser un dímero hay muchas más probabilidades que una de las regiones de unión al BFA quede libre, tal como puede apreciarse en la Figura 6, en donde se observa el RE- α con los aminoácidos hidrofóbicos en rojo y representada en verde la región de unión al BFA.

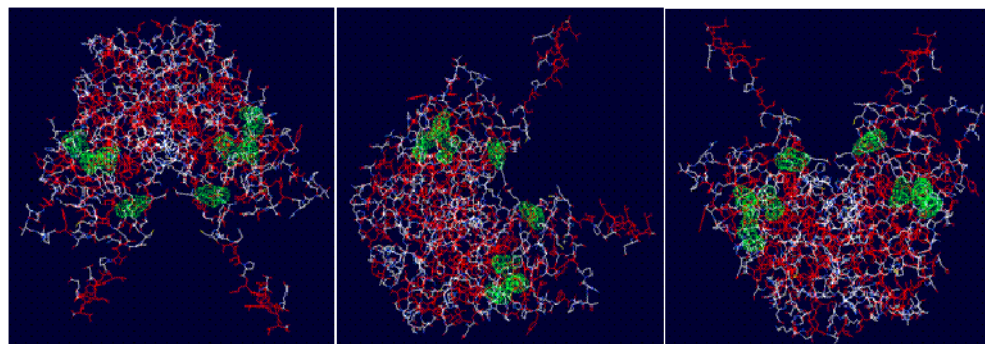


Figura 6. Representación tridimensional de la estructura molecular del RE- α con los aminoácidos hidrofóbicos (rojo) y la región de unión al BFA (verde).

Antes de iniciarse este tipo de funcionalización (Figura 7) es necesario determinar la concentración y tiempo de exposición del SWCNT al Tween 20 ya que no hay evidencia de su uso en la detección de analitos de bajo peso molecular, como el bisfenol A, para lo cual el CNTFET se expuso a diferentes concentraciones del surfactante y diferentes tiempos de

inespecíficas de otras proteínas o sustancias. Por tanto, se parte del CNTFET con el RE- α fijado por adsorción, el cual se deja en inmersión en una solución de Tween 20 (condiciones de concentración y tiempo seleccionadas previamente). Posteriormente se lava con agua milli-Q y se seca con nitrógeno. A continuación se efectúa la caracterización eléctrica del CNTFET funcionalizado para el posterior uso en la detección del analito de interés.

Para la segunda opción de este tipo de funcionalización se parte igualmente del CNTFET con el RE- α fijado por adsorción, el cual se sumerge en el agente bloqueante PBSTG durante tres horas a temperatura ambiente. (Piao, 2008; Sánchez-Acevedo, 2009) Asimismo se procede al lavado del CNTFET con agua milli-Q y posterior secado con nitrógeno, continuando con la correspondiente caracterización.

Hay que tener en cuenta que el RE- α ha de mantenerse a -70°C almacenado, que la funcionalización y detección del analito se efectúa a temperatura ambiente y en condiciones similares a las que este receptor actúa a nivel biológico, por lo que hay que evitar en la medida de lo posible numerosos ciclos de congelado y descongelado del RE- α , ya que se puede correr el riesgo de limitar su actividad o de desnaturalizar la proteína.

3.3.4. Caracterización del CNTFET

La caracterización del dispositivo es esencial durante todo el proceso experimental. Asimismo, es importante utilizar estas mismas técnicas durante la detección del analito, ya que permite evidenciar cómo va

variando la señal eléctrica a medida que se adicionan diferentes concentraciones de analito.

3.3.4.1. Caracterización por microscopía

Para la caracterización de estructuras de dimensiones del orden de los nanómetros se utiliza frecuentemente el microscopio de fuerza atómica (*atomic force microscopy*, AFM) y el microscopio electrónico de barrido ambiental (*environmental scanning electron microscopy*, ESEM), cada uno de los cuales proporciona informaciones complementarias, de ahí la importancia de su implementación en la caracterización de nuestro CNTFET.

Microscopio de fuerza atómica AFM: Proporciona información de una pequeña área de visualización (máximo 100 μm x 100 μm). Trabaja a presión atmosférica. Puede usarse sobre toda clase de muestras, siempre que sean suficientemente planas. En estas condiciones no necesitan tratamiento previo, proporcionando información topográfica, lo que permite la toma de medidas de altura y diámetro de SWCNTs individuales. Información que no puede obtenerse mediante SEM o ESEM. Igualmente proporciona imágenes de alta resolución de estructuras de dimensiones nanométricas, pero el tiempo de adquisición de las mismas es bastante lento. (Figura 8)

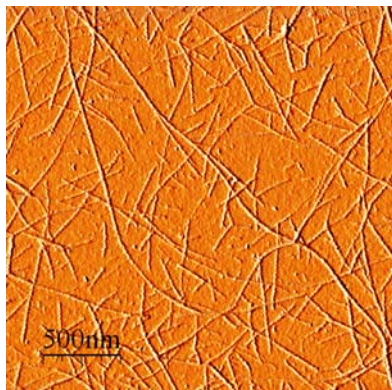


Figura 8. Imagen AFM de una red densa de SWCNTs sin funcionalizar

Microscopio electrónico de barrido ambiental ESEM: proporciona información de una mayor área de visualización que el AFM. Presenta la posibilidad de operar a tres modos de vacío: alto vacío, bajo vacío y modo ambiental. Trabaja tanto con muestras que son eléctricamente conductoras como las que no lo son. No requiere tratamiento previo de la muestra, por lo que las muestras pueden observarse en su estado natural, lo que hace que las imágenes obtenidas sean más reales.

Asimismo permite la obtención de información morfológica y topográfica de materiales orgánicos e inorgánicos. Permite la obtención de imágenes de alta resolución de muestras de diferente tamaño, en un corto periodo de tiempo (más rápida que el AFM) (Figura 9)

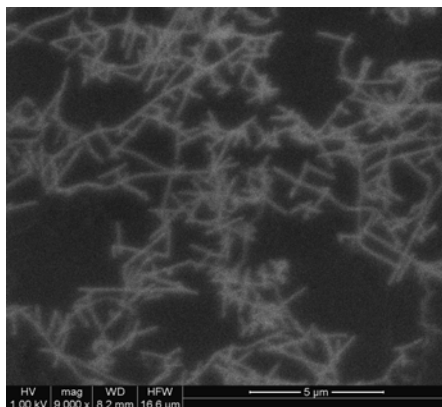


Figura 9. Imagen ESEM de una red densa de SWCNTs sin funcionalizar

3.3.4.2. Caracterización eléctrica

Para la caracterización eléctrica se trabaja con una mesa de puntas provista de tres terminales. (Figura 10) Las terminales fuente y drenador consisten en puntas de oro o tungsteno montadas en los posicionadores incorporados a la mesa, lo cual permite su ubicación sobre los correspondientes electrodos del CNTFET. Dado el pequeño tamaño del dispositivo, se trabaja también con un microscopio óptico que facilita la visualización de los electrodos para el contacto de las puntas. A diferencias de las anteriores, la terminal puerta está conectada a la lámina metálica sobre la que se ubica el CNTFET para la caracterización.

Las tres terminales (Figura 10(b)) están conectadas a su vez a un analizador paramétrico de materiales semiconductores, controlado por ordenador, el cual permite aplicar los voltajes deseados en el dispositivo y medir la intensidad de corriente desarrollada.

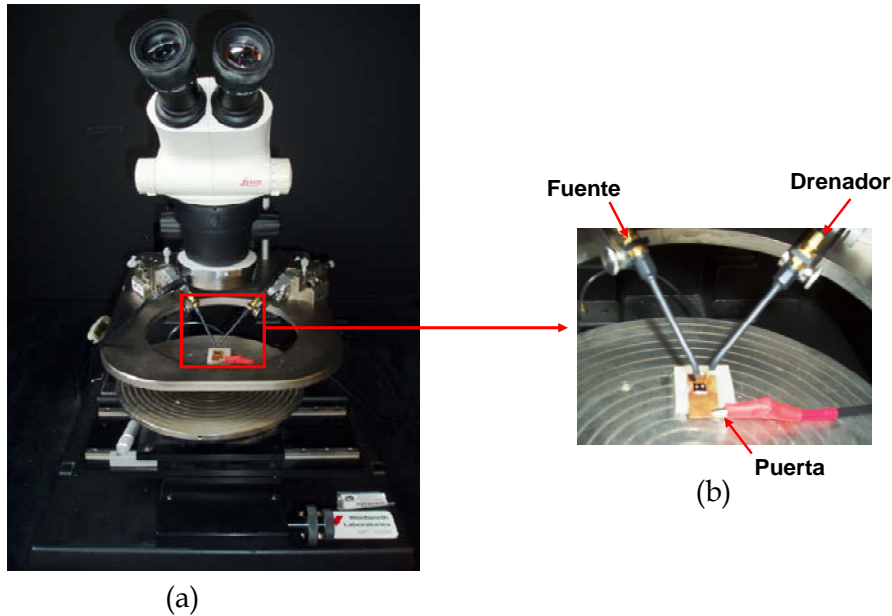


Figura 10. (a) Mesa de puntas empleada en las pruebas de caracterización eléctrica. (b) Dispositivo CNTFET en donde puede apreciarse las terminales fuente, drenador y puerta con sus correspondientes posicionadores.

Con el fin de evitar que cualquier interferencia ambiental de tipo electromagnético o mecánico pueda afectar la señal eléctrica obtenida por la mesa de puntas, se aisló el equipo del entorno introduciendo la mesa de puntas en una caja de Faraday, la cual a su vez esta ubicada sobre una mesa antivibración para minimizar las vibraciones mecánicas. Quedando de este modo listo el equipo para la caracterización eléctrica a lo largo de toda la parte experimental.

Para dar inicio a la caracterización eléctrica es necesario verificar la existencia de un canal eléctrico a través de la red de nanotubos entre los electrodos fuente y drenador. Esto se realiza aplicando un barrido de voltaje entre la fuente y el drenador V_{SD} a un voltaje de puerta $V_G=0$,

asimismo es fundamental evitar que los barridos V_{SD} manejen valores altos de voltaje, ya que se corre el riesgo de quemar los SWCNTs. Igualmente, el valor apropiado de V_{SD} es el que permite la obtención de corrientes eléctricas del orden de microamperios, lo cual se logra con valores de V_{SD} entre 0.1 y 0.25 V.

La experimentación descrita permite tanto la obtención de la resistencia del canal mediante la ley de Ohm, al igual que el valor de la corriente entre el electrodo fuente y la puerta, I_{SG} (fuga de puerta), ya que si esta es cercana al orden de la I_{SD} no puede usarse el dispositivo (por ejemplo para I_{SD} del orden de μA , la I_{SG} puede ser máximo del orden de nA). En caso de que los valores de la I_{SG} sean elevados, puede ser debido a la presencia de pequeñísimas roturas en la capa del SiO_2 .

El siguiente paso consiste en aplicar un barrido de V_G (por ejemplo de +5 a -5 V) a un voltaje fijo V_{SD} . De acuerdo con la señal eléctrica registrada I_{SD} se corrobora si el comportamiento es el típico de un CNTFET con SWCNTs semiconductores tipo "p" y si las características eléctricas del CNTFET son adecuadas para nuestras determinaciones (ver Figura 8 del apartado 2.3.), en caso de ser así se procede a realizar las correspondientes pruebas de funcionalización y de detección.

La caracterización eléctrica se llevó a cabo durante todo el proceso experimental, iniciándose después de insertados los electrodos, con el fin de estudiar el comportamiento eléctrico de la red de SWCNTs obtenida. Las medidas eléctricas se registran también después de cada etapa del proceso de funcionalización y durante cada una de las pruebas realizadas

con las soluciones del analito a detectar. Asimismo, con los posibles interferentes con el fin de verificar tanto la sensibilidad como la estabilidad del dispositivo sensor.

Con el fin de comprobar la estabilidad de las señales eléctricas obtenidas, se efectuaron tres réplicas consecutivas. Asimismo se eligió un valor V_G como punto de comparación de todo el proceso desarrollado, siendo seleccionado como el valor de V_G que produce el valor más alto de I_{SD} y en donde se observa mayor modulación de la señal.

3.4. Bibliografía

- K. Bradley, M. Briman, A. Star, G. Grüner, *Nano Lett.*, 2004, 4, 253.
- A.M. Cassell, J.A. Raymakers, J. Kong, H. Dai, *J. Phys. Chem., B*, 1999, 103, 6484.
- R. J. Chen, S. Bangsaruntip, K. A. Drouvalakis, N. W. S. Kam, M. Shim, Y. Li, W. Kim, P. J. Utz, H. Dai, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2003, 100, 4984.
- R. J. Chen, H.C. Choi, S. Bangsaruntip, E. Yenilmez, X. Tang, Q. Wang, Y.L. Chang, H. Dai, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 1563.
- C. C. Cid, J. Riu, A. Maroto, F. X. Rius, *Analyst*, 2008, 133, 1005.
- H. Dai, A.G. Rinzler, P. Nikolaev, A. Thess, D.T. Colbert, R.E. Smalley, *Chem. Phys. Lett.*, 1996, 260, 471.
- H. J. Dai, *Acc. Chem. Res.*, 2002, 35, 1035.
- M.S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, P. Avouris. *Carbon Nanotubes. Synthesis, structure, properties and applications Topics in Applied Physics*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2001.
- A.R. Harutyunyan, B.K. Pradhan, U.J. Kim, G. Chen, P.C. Eklund, *Nano Lett.*, 2002, 2, 525.
- P. Hu, A. Fasoli, J. Park, Y. Choi, P. Estrela, S. L. Maeng, W. I. Milne, A. C. Ferrari, *J. Appl. Phys.*, 2008, 104, 074310.
- J. Kong, A.M. Cassell, H.J. Dai, *Chem. Phys. Lett.*, 1998, 292, 567.
- E. Lamouroux, P. Serp, Y. Kihn, P. Kalck, *Appl. Catal. A*, 2007, 323, 162.
- Y. Li, J. Liu, Y.Q. Wang, Z.L. Wang, *Chem. Mater.*, 2001, 13, 1008.
- Y. Murakami, S. Chiashi, Y. Miyauchi, M. Hu, M. Ogura, T. Okubo, S. Maruyama, *Chem. Phys. Lett.*, 2004, 385, 298.
- M. H. Piao, M. H. Noh, M. A. Rahman, M. S. Won, Y. B. Shim, *Electroanalysis*, 2008, 20, 30.

- P. Qi, O. Vermesh, M. Grecu, A. Javey, Q. Wang, H. Dai, S. Peng, K. J. Cho, *Nano Lett.*, 2003, 3, 347.
- Z. C. Sánchez-Acevedo, J. Riu, F. X. Rius, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, 24, 2842.
- R. Seidel, G.S. Duesberg, E. Unger, A.P. Graham, M. Liebau, F. Kreupl, *J. Phys. Chem. B*, 2004, 108, 1888.
- M. Shim, A. Javey, N. W. S. Kam, H. Dai, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 11512.
- H. M. So, K. Won, Y. H. Kim, B. K. Kim, B. H. Ryu, P. S. Na, H. Kim, J. O. Lee, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 11906.
- A. Star, J. Gabriel, K. Bradley, G. Grüner, *Nano Lett.*, 2003, 3, 459.
- R. A. Villamizar, A. Maroto, F. X. Rius, I. Inza, M. J. Figueras, *Biosens. Bioelectron.*, 2008, 24, 279.
- Z. Zhou, L. Ci, L. Song, X. Yan, D. Liu, H. Yuan, Y. Gao, J. Wang, L. Liu, W. Zhou, G. Wang, S. Xie, *J. Phys. Chem. B*, 2004, 108, 10751.

Cuarto Capítulo

*Detección de compuestos xenobióticos usando transistores de efecto campo
funcionalizados con receptores nucleares*

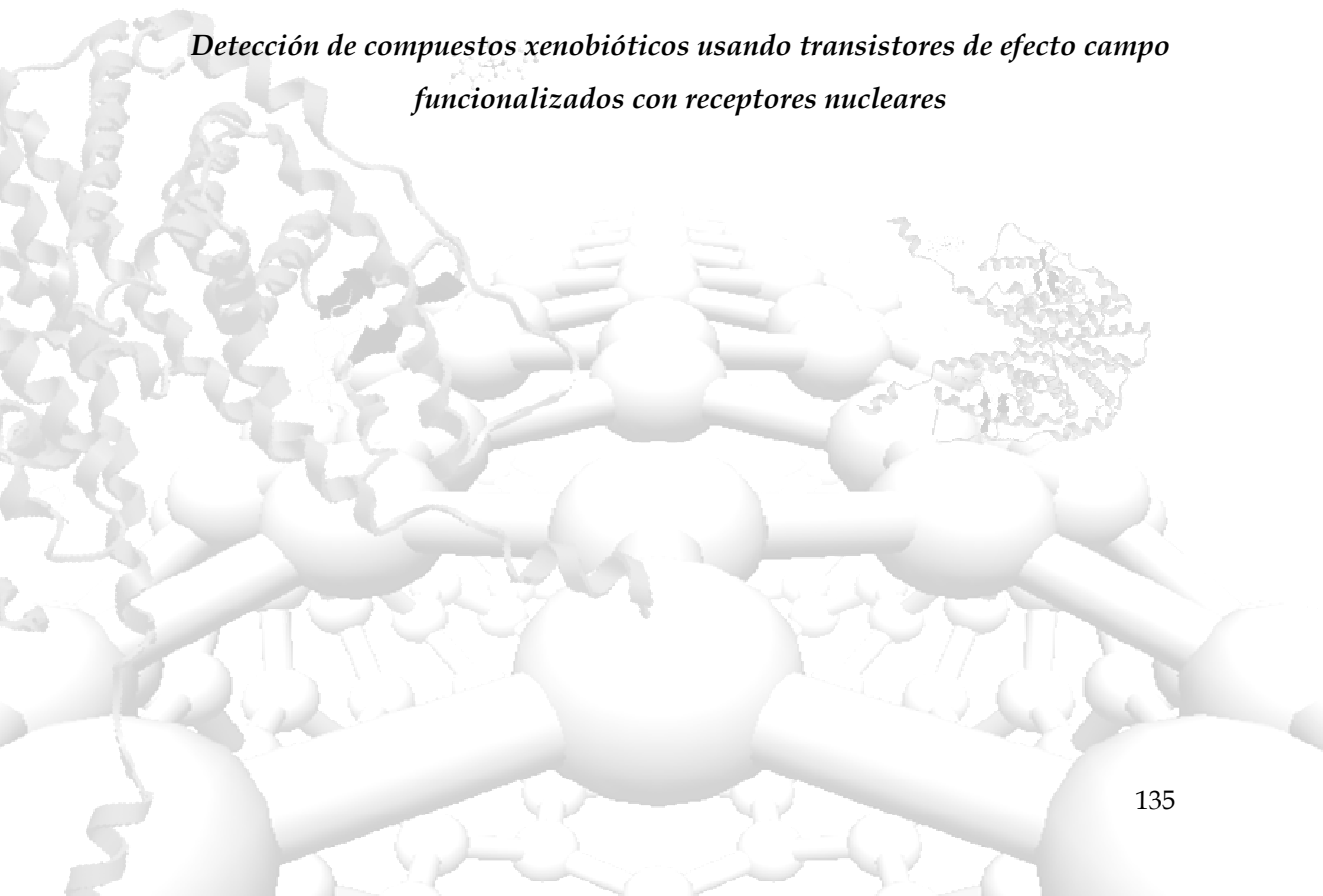


Tabla de Contenidos

4.1.	<i>Introducción</i>	138
4.2.	<i>Resultados y discusión</i>	139
4.2.1.	Síntesis de SWCNTs por CVD.....	139
4.2.2.	Construcción del CNTFET.....	141
4.2.3.	Proceso de funcionalización.....	142
4.2.3.1.	Cubrimiento de los SWCNTs con un polímero, posterior uso de una molécula de anclaje e incorporación de un receptor nuclear.....	143
4.2.3.2.	Adsorción de la molécula receptora en la superficie de los SWCNTs y posterior uso de un agente bloqueante.....	145
4.2.4.	Validación del CNTFET.....	151
4.2.4.1.	Protección de la sustancia bloqueante.....	151
4.2.4.2.	Tiempo de análisis.....	154
4.2.4.3.	Sensibilidad del CNTFET.....	156
4.2.4.4.	Selectividad del CNTFET.....	161
4.2.4.5.	Estabilidad del CNTFET.....	167
4.3.	<i>Bibliografía</i>	168
4.4.	<i>Anexo: Artículo “Fast picomolar selective detection of bisphenol A in water using a carbon nanotube field effect transistor functionalized with estrogen receptor-α” Biosens. Bioelectron., 2009, 24, 2842</i>	169

4.1. *Introducción*

A lo largo de los anteriores capítulos se ha tratado de profundizar acerca de las propiedades características de los SWCNTs que les permite ser usados como elemento transductor y canal conductor de FETs. Asimismo se ha profundizado acerca del conocimiento de los compuestos xenobióticos, de los cuales en la actualidad su presencia ha ido en aumento. De igual forma a estos compuestos se les atribuye la incidencia en enfermedades a nivel humano, debido a lo cual se ha visto la necesidad de mejorar los parámetros de detección de estos contaminantes en el medio ambiente.

En el presente capítulo se pretende demostrar no solo la viabilidad del uso de receptores nucleares para funcionalizar SWCNTs y proporcionar selectividad a un CNTFET, sino como gracias a la fuerte afinidad entre el RE- α y estrógenos naturales como el 17 β -estradiol, al igual que a ligandos sintéticos como el bisfenol A (BFA) se logran detecciones rápidas de concentraciones por debajo no solo de la dosis de referencia para el hombre planteada por la Agencia Americana de Protección Ambiental (US-EPA) de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ al día (0.22×10^{-6} M), sino de los límites de detección y tiempos de análisis reportados hasta el momento en la detección de BFA en agua, entre los que caben mencionar el uso de anticuerpos en el bioensayo basado en el sistema de dos híbridos (*yeast two-hybrid*) con un límite de detección de 1.75×10^{-9} M en 6 minutos de medida (Schwartz, 2005), al igual que métodos potenciométricos con tiempos de respuesta de 5 minutos y límite de detección de 2.63×10^{-9} M (Piao, 2008) o inmunosensores ópticos con tiempo de análisis por muestra de 15 minutos y límite de detección de 6.13×10^{-11} M (Rodríguez-Mozaz, 2005).

4.2. Resultados y discusión

4.2.1. Síntesis de SWCNTs por CVD

Con las condiciones de síntesis descritas en el apartado 3.3.1. del anterior capítulo se logra la obtención de redes de SWCNTs, las cuales están relacionadas con el tiempo de síntesis empleado en la CVD, con la cantidad de catalizador usado y por la forma de deposición del mismo.

En la Figura 1 pueden apreciarse la alta densidad de SWCNTs obtenidos en una síntesis CVD de 20 minutos y en los cuales se han depositado 3 volúmenes consecutivos de 30 μl de catalizador mediante *spin-coating* a 3000 r.p.m sobre las placas de SiO_2/Si previamente limpiadas.

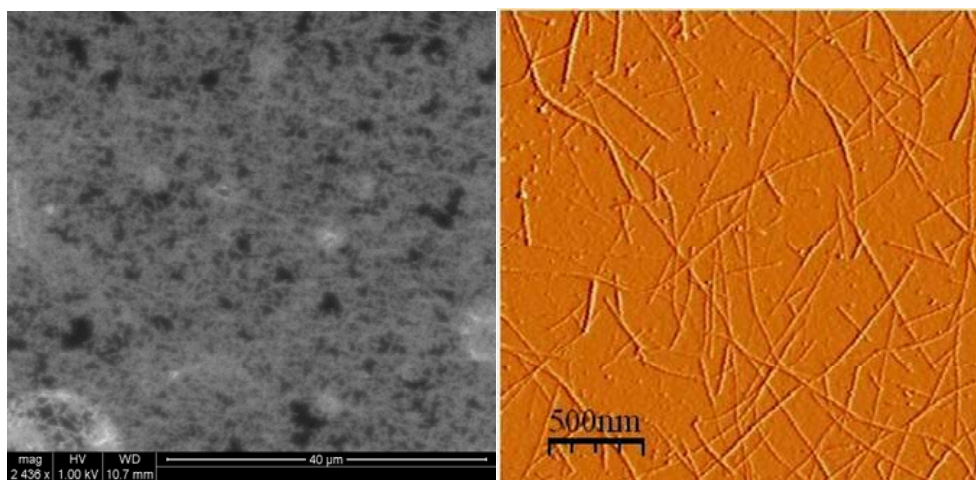


Figura 1. Imágenes (a) ESEM y (b) AFM de redes densas de SWCNTs obtenidos por CVD mediante el uso de Fe como catalizador.

Al necesitar baja densidad de SWCNTs para el CNTFET a desarrollar, se continuaron probando tanto los tiempos de síntesis como la cantidad de catalizador empleado, llegando a la determinación de que 20 minutos de síntesis y 3 deposiciones por *spin-coating* de 20 μl a 3000 r.p.m permite la obtención de redes poco densas y homogéneas de SWCNTs. (Figura 2)

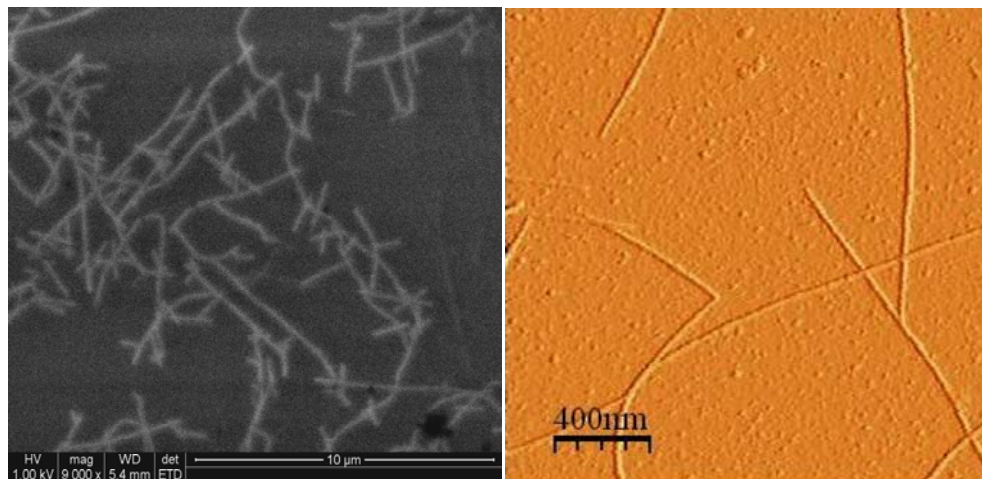


Figura 2. Imágenes (a) ESEM y (b) AFM de redes poco densas de SWCNTs obtenidos por CVD y usadas para el desarrollo del CNTFET.

Asimismo, la obtención casi homogénea de SWCNTs sobre el sustrato o la formación de agregados puede relacionarse con el método de deposición del catalizador. Al depositar por gota o dejar en inmersión el sustrato de SiO_2/Si en una solución del catalizador y posterior secado con N_2 , hay más posibilidad de que haya formación de agregados de SWCNTs (Figura 3), mientras que el *spin-coating* permite una deposición más homogénea del catalizador y la rápida y completa evaporación del solvente.

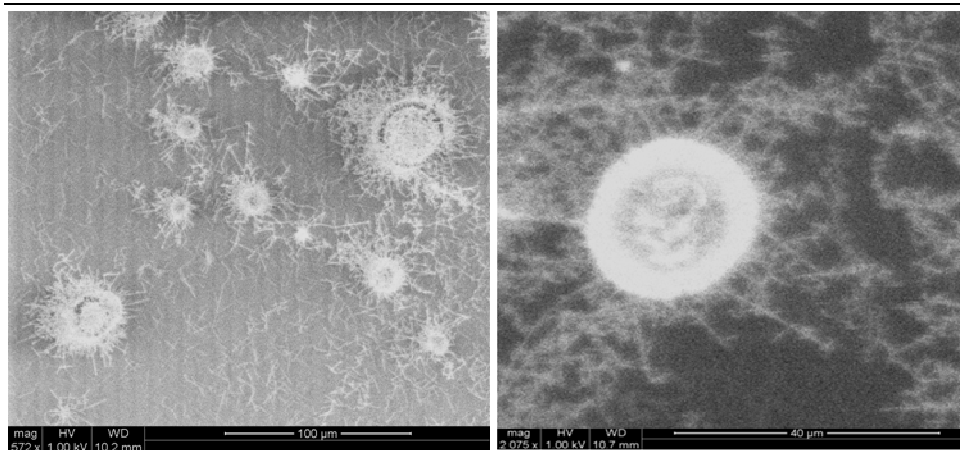


Figura 3. Imágenes ESEM de agregados de SWCNTs formados durante la CVD

4.2.2. Construcción del CNTFET

La deposición de los electrodos inicialmente se realizó manualmente como se puede apreciar en la Figura 3 del apartado 3.3.2 del anterior capítulo. Dado que es una técnica más rápida y económica, es apropiada para el inicio de las experiencias con el fin de determinar las condiciones adecuadas para el desarrollo del dispositivo. Aún así, los resultados que en la tesis se muestran son los correspondientes a los obtenidos con los electrodos de oro depositados por fotolitografía, ya que aunque son similares a los obtenidos con los electrodos de plata, estos presentan la gran desventaja de que con los procesos de funcionalización y posteriores pruebas de detección y caracterización se van deteriorando, por lo que la fiabilidad de las respuestas se va reduciendo.

Antes de proceder al proceso de funcionalización de los SWCNTs fue necesario realizar la caracterización eléctrica y microscópica del CNTFET,

con el fin de seleccionar aquellos que tuvieran redes poco densas y que presentaran una adecuada modulación de la corriente eléctrica (Figura 8 apartado 2.3). En la Figura 4.4 pueden apreciarse imágenes ESEM de redes de SWCNTs contactados por electrodos de Au/Cr. Para el desarrollo del dispositivo CNTFET se seleccionaron redes como la que se aprecia en la Figura 4 (b) en donde la densidad de SWCNTs presentes en la red fue aproximadamente de 1.5 nanotubos/ μm^2 , justo por debajo del límite de percolación, tal y como se ha discutido en el apartado 2.3. (Hu, 2004)

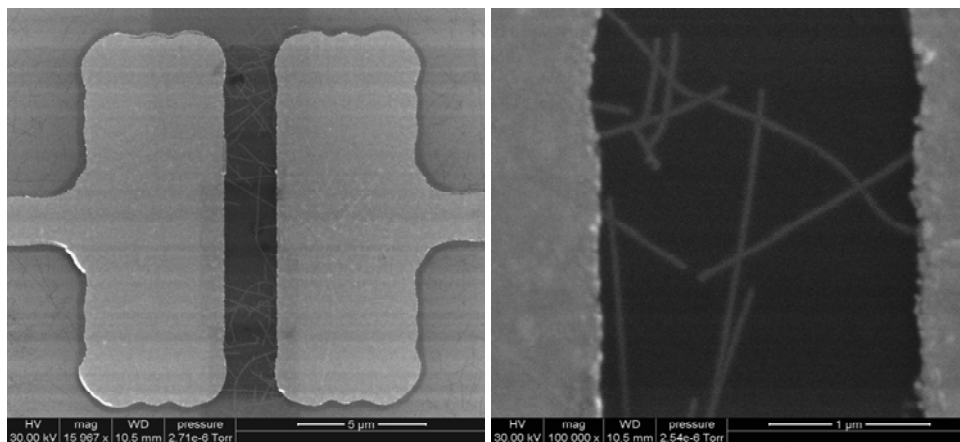


Figura 4. Imágenes ESEM de electrodos de Au/Cr depositados por fotolitografía contactando (a) redes densas y (b) con poca densidad de SWCNTs.

4.2.3. Proceso de funcionalización

Inicialmente se propusieron dos métodos de funcionalización de los SWCNTs. El primero se basa en la fijación covalente del receptor nuclear (RE- α) sobre la superficie de los SWCNTs que han sido previamente recubiertos con un polímero, al polietilenimina (PEI), seguida por una inclusión del glutaraldehído (GA) como molécula de anclaje. La segunda

opción se basa en la adsorción no específica de el RE- α sobre la superficie de los SWCNTs y posterior uso de un agente bloqueante que impide la adsorción no específica de otras proteínas o especies interferentes. Todas las etapas de la funcionalización se caracterizaron mediante microscopía y eléctricamente midiendo la dependencia de la corriente fuente-drenador (I_{SD}), con respecto a barridos de voltaje puerta (V_G) de +5V a -5 V, a un voltaje fuente-drenador constante (V_{SD}) de 250 mV. Se realizaron tres réplicas de cada medida, representándose la curva promedio.

4.2.3.1. Cubrimiento de los SWCNTs con un polímero, posterior uso de una molécula de anclaje e incorporación de un receptor celular.

El PEI se ha usado ampliamente en la funcionalización de CNTFET como polímero de cubrimiento, (Star, 2003; Chen, 2004; Hu, 2008) al igual que el GA como molécula de anclaje, con el fin de detectar analitos de elevado peso molecular como las proteínas. Sin embargo, no hay evidencias de su desempeño en la detección de analitos pequeños. En primer lugar se procedió a dejar el dispositivo CNTFET durante cuatro horas en una solución de PEI (10% en agua), lavándose con agua desionizada y secándose con N_2 , para la correspondientes caracterización por microscopía y caracterización eléctrica (Figura 5).

Con el PEI se aprecia tanto una disminución en la señal eléctrica, como un cambio de conductividad de tipo "p" a tipo "n", lo cual es debido a la transferencia parcial de electrones de los nitrógenos de los grupos amino del PEI a los SWCNTs.

A continuación se procedió a la fijación de GA utilizando las condiciones descritas en el apartado 3.3.3.1. Con el GA se observa que la corriente eléctrica tiende nuevamente a recuperar el comportamiento tipo “p”, lo cual es debido la reacción de los grupos amino primarios del PEI con los grupos aldehído del GA formándose grupos imina, lo que lleva a un aumento en la corriente a voltajes de puerta negativos V_G (-) debido a la reducción de la carga electrónica en la superficie de los SWCNTs. (Star, 2003)

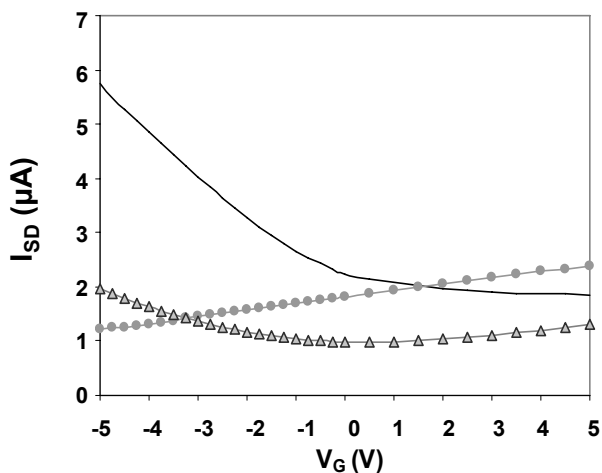


Figura 5. Caracterización eléctrica del proceso de funcionalización. Corriente fuente-drenador (I_{SD}) vs voltaje puerta (V_G) de un típico CNTFET después de cada etapa de la funcionalización. (—) SWCNTs sin funcionalizar, (●) después de la adsorción del PEI sobre los SWCNTs y (▲) después de reaccionar con el glutaraldehído

No se culminó este proceso de funcionalización por dos razones, la primera por observar falta de estabilidad de la respuesta eléctrica en el transcurso del tiempo, ya que después de haber usado el GA no sólo se tiende a la recuperación del comportamiento tipo “p” sino a la adquisición de un

comportamiento casi bipolar que no es estable. Igualmente de forma paralela se probó la protección del PEI sobre los SWCNTs, comprobando con diferentes soluciones de BFA la falta de protección por parte del polímero

4.2.3.2. Adsorción de la molécula receptora en la superficie de los SWCNTs y posterior uso de un agente bloqueante.

Con esta funcionalización se aprovecha la capacidad de adsorción que presentan las proteínas, lo que les permite fijarse a la superficie de los SWCNTs, (Chen, 2004; Bradley 2004) lo cual se da en parte por las interacciones hidrofóbicas entre los SWCNTs y el RE- α , el cual presenta numerosos aminoácidos hidrofóbicos. (Figura 6 apartado 3.3.3.2) Antes de dar inicio a este proceso de funcionalización se tomaron las alturas de los SWCNTs (Figura 6) mediante el uso del AFM con el fin de compararlas con las mismas medidas después de la fijación del RE- α , la altura promedio determinada de los nanotubos sin funcionalizar fue de 1.4 nm.

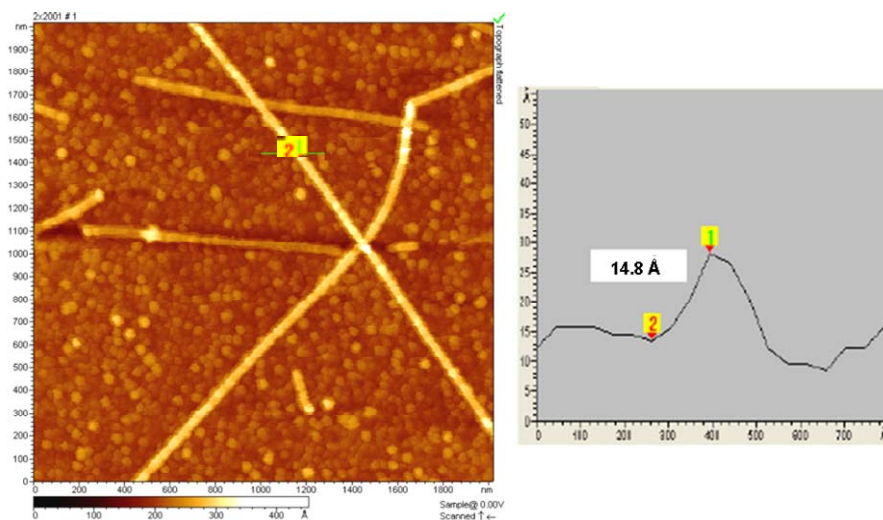


Figura 6. Imagen y medidas AFM de SWCNTs sin funcionalizar

A continuación se procedió a la funcionalización no covalente de los nanotubos dejando durante 12 horas y a temperatura ambiente el CNTFET en una solución de 10 ppm de RE- α al 10% en PBS. Posteriormente se lava el dispositivo con agua milli-Q y se seca con N₂. Para verificar la adsorción del RE- α sobre los SWCNTs se procede a las caracterizaciones eléctrica y microscópica.

La Figura 7 (a) corresponde a la imagen ESEM de una red de SWCNTs con el RE- α fijado por adsorción en su superficie, obsérvese los puntos brillantes que corresponden al receptor nuclear, lo cual es constatado con la Figura 7 (b) en la que se aprecia las redes de SWCNTs y la medida de las alturas de los SWCNTs con el RE- α fijado por adsorción (recubrimiento blanco observado). Las dimensiones de el RE- α son (7.6 x 7.9 x 6.5 nm), la altura de los SWCNTs sin funcionalizar es de 1.5 nm. Por tanto, como puede observarse las dimensiones del SWCNTs con el receptor adsorbido de 9.4 nm como promedio son concordantes con los resultados esperados. (Figura 7 (c))

Para la caracterización eléctrica se midió la dependencia de la I_{SD} con respecto al V_G de +5 a -5 V a un V_{SD} constante de 250 mV, se realizaron tres réplicas para observar la estabilidad de la señal, representándose la curva promedio, asimismo todas las medidas se realizaron en seco. Los SWCNTs sin funcionalizar presentan el típico comportamiento tipo “p”, (Figura 8 apartado 2.3.) por el efecto electroatractor del oxígeno del aire, que retira los electrones de los SWCNTs dejando un exceso de huecos ‘positivos’. (Derycke, 2002)

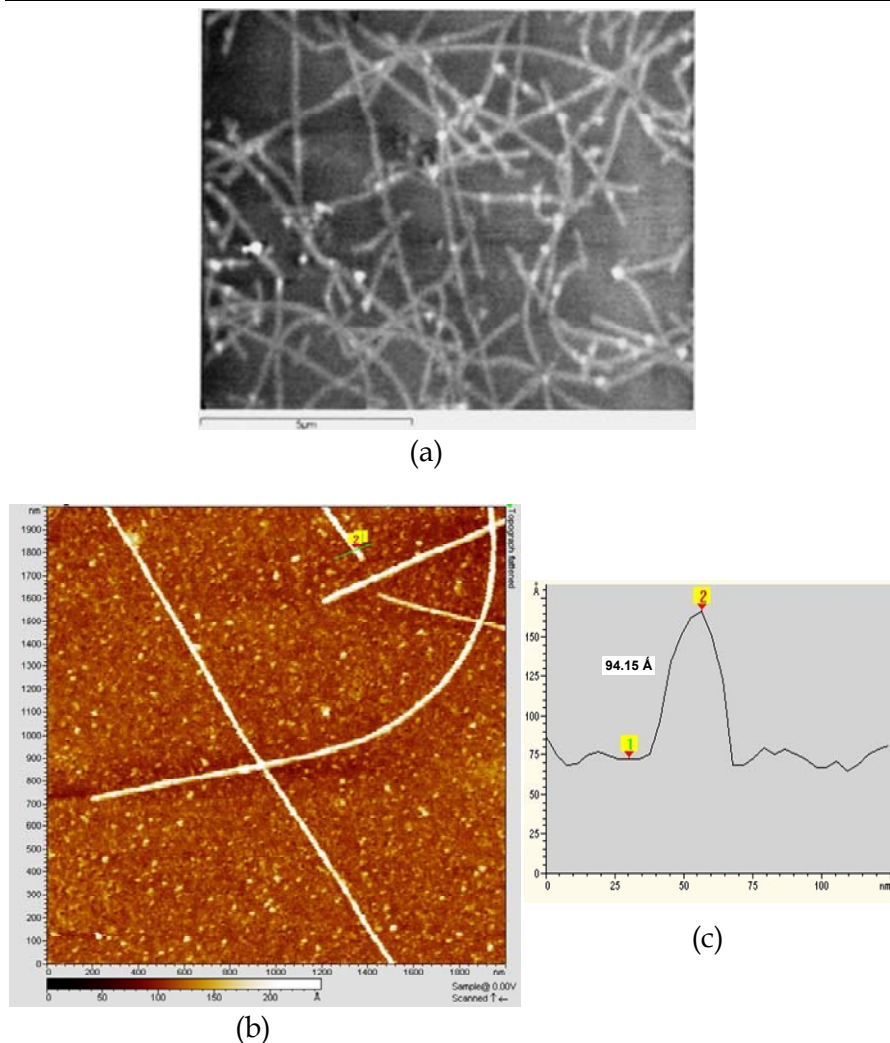


Figura 7. Imágenes (a) ESEM y (b) AFM de SWCNTs recubiertos por RE- α y las correspondientes medidas AFM (c) después de 12 horas de funcionalización

Con la adsorción del RE- α se observa una disminución de la corriente eléctrica, lo cual es independiente de la carga neta de la proteína adsorbida. (Chen, 2003). El desplazamiento de la curva por la adsorción del ER- α hacia voltajes de puerta más negativos V_G (-) pareciera indicar que dicha disminución es debido a transferencia de carga. (Heller et al., 2008) causada

por la liberación de los electrones de los grupos amino del RE- α (por ejemplo de residuos arginina y lisina) a los SWCNTs (Bradley, 2004; Chen, 2004). Igualmente, dicho cambio puede presentarse debido a la dispersión de potencial originada por la adsorción del RE- α que disminuye la movilidad de los agujeros en los SWCNTs. (Star, 2003)

A partir de este punto se da inicio a la segunda etapa de la funcionalización mediante la incorporación de un agente bloqueante sobre los SWCNTs con el RE- α fijado por adsorción, de forma paralela se darán a conocer los resultados obtenidos en las dos opciones planteadas, la del uso del Tween 20 y la de la solución PBSTG.

Uso de Tween 20 como agente bloqueante: Como se había expresado en el apartado 3.3.3.2, fue necesario probar tanto las concentraciones de Tween 20 como los tiempos de cubrimiento sobre los SWCNTs. Debe considerarse que este surfactante se ha empleado con muy buenos resultados como agente bloqueante que inhibe la unión no específica de proteínas pero no de analitos de bajo peso molecular, por lo que tales condiciones no son aplicables, ya que fueron usadas sin observarse protección alguna para nuestro dispositivo. La concentración determinada para el Tween 20 es de 2% en agua milli-Q durante 1 hora de cubrimiento (a temperatura ambiente ~ 22 °C). Los substratos se lavaron con agua milli-Q (para eliminar el exceso del Tween 20) y finalmente se secaron con N₂, procediendo a continuación con la caracterización eléctrica del dispositivo. (Figura 8)

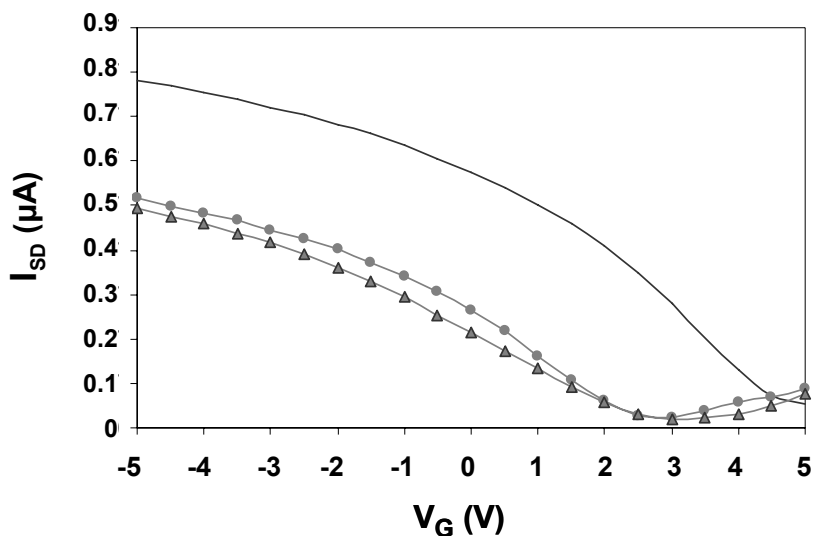


Figura 8. Caracterización eléctrica del proceso de funcionalización. I_{SD} vs V_G del dispositivo CNTFET: SWCNTs sin funcionalizar (—), RE- α (■) y Tween 20 (▲).

Uso de la solución PBSTG como agente bloqueante: Después de fijar por adsorción las moléculas del receptor RE- α a los SWCNTs, los dispositivos se lavaron con agua milli-Q, se secaron con N_2 y se sumergieron durante tres horas a temperatura ambiente en una solución de PBSTG. El CNTFET se lavó nuevamente con agua milli-Q, se secó con N_2 y se caracterizó eléctricamente midiendo tres réplicas y representando el valor medio de estas medidas. El CNTFET está en este momento listo para ser utilizado en la detección de BFA. La Figura 9 demuestra un esquema del proceso de funcionalización.

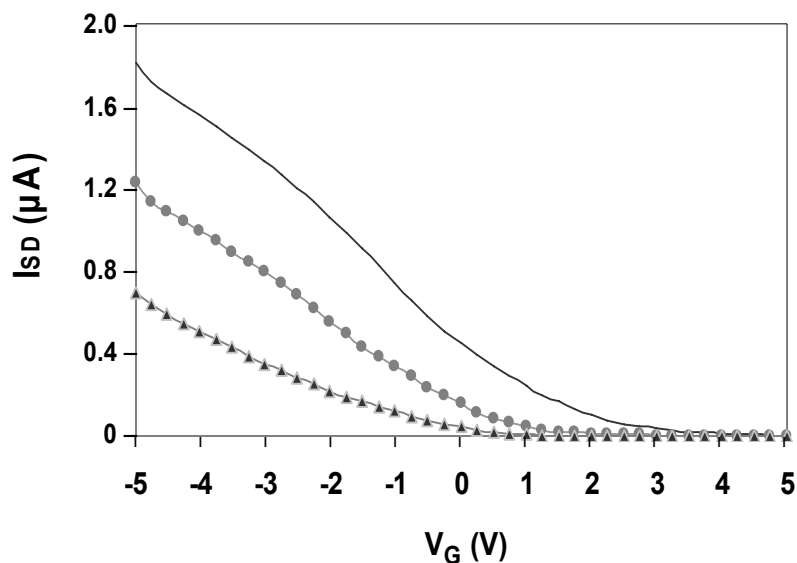


Figura 9. Caracterización eléctrica del proceso de funcionalización. I_{SD} vs V_G del dispositivo CNTFET: SWCNTs sin funcionalizar (—), RE-a (■) y PBSTG (▲).

En las dos opciones de funcionalización planteadas se observa que la señal eléctrica decrece después del cubrimiento con cada agente bloqueante, siendo mayor la reducción de la señal con la solución PBSTG que con el Tween 20. Dichas reducciones probablemente se deben a la cadena lineal alifática con alta densidad electrónica del Tween 20 que puede donar electrones a los SWCNTs. Asimismo las soluciones bloqueantes empleadas se adsorben sobre los SWCNTs debido a interacciones hidrofóbicas, protegiéndolos de uniones no específicas de proteínas y otros analitos. (Chen, 2003, So, 2003; Chen, 2004)

4.2.4. Validación del CNTFET

4.2.4.1. Protección de la sustancia bloqueante

Se realizaron diversas pruebas control con el fin de demostrar que el dispositivo CNTFET sin funcionalizar (sin RE- α) no presenta alguna respuesta a la presencia de BFA. De este modo se comprueba que la respuesta eléctrica proporcionada con el CNTFET funcionalizado es debida a la interacción específica entre el RE- α y el BFA y no por la adsorción no específica de otros interferentes sobre los SWCNTs.

Se trabajaron con dispositivos CNTFETs sin RE- α adsorbido en la superficie de los SWCNTs, para lo cual se sumergieron durante una hora en una solución de Tween 20 al 2% y otros igualmente fueron sumergidos por tres horas en una solución de PBSTG, lavándose posteriormente los CNTFETs con agua milli-Q y secándose con N₂, para realizar las correspondientes caracterizaciones eléctricas. A continuación los CNTFETs se expusieron inicialmente a una solución blanco que contiene solamente PBS al 10%, y luego a cuatro soluciones con concentraciones diferentes de BFA que van desde 4.38x10⁻¹² M a 4.38x10⁻⁶ M, registrando la respuesta eléctrica obtenida en cada caso.

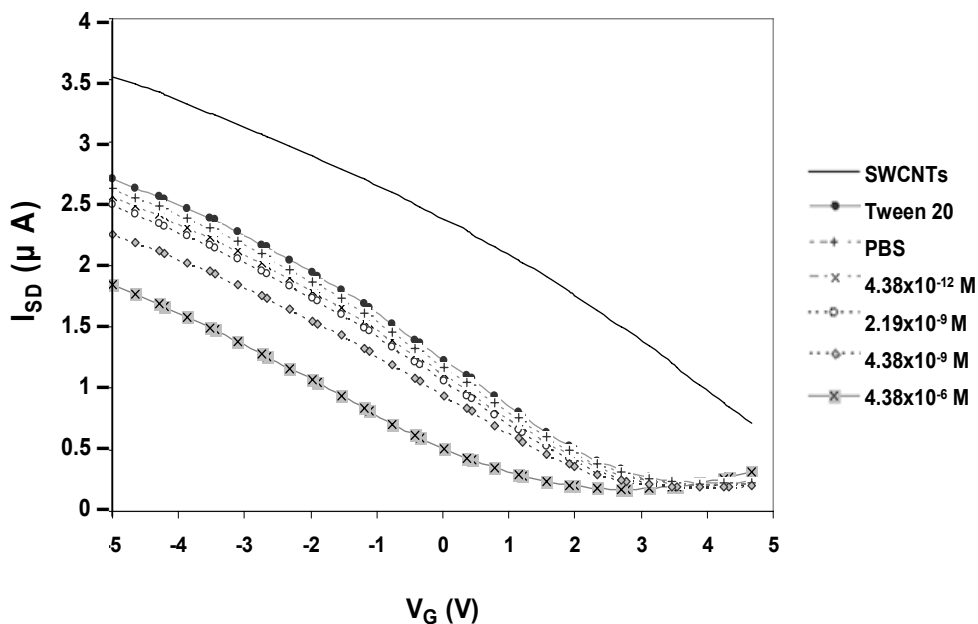


Figura 10. Representación de la dependencia de la I_{SD} con respecto al V_G de un CNTFET sin RE- α fijado por adsorción y recubierto por Tween 20 (—●—) que es expuesto inicialmente a una solución de PBS al 10% y a diferentes soluciones de BFA en concentraciones desde $4.38 \times 10^{-12} M$ (—×—) hasta $4.38 \times 10^{-6} M$ (—×—). Cada curva corresponde al valor promedio de tres réplicas a un $V_{SD} = 250 mV$.

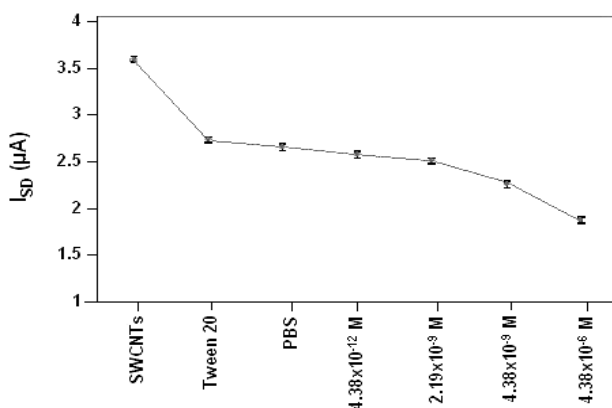


Figura 11. Comportamiento de la corriente I_{SD} a diferentes concentraciones de BFA (M) a $V_G = -5V$, las barras de error corresponden al intervalo de la I_{SD} obtenida para tres réplicas en un CNTFET recubierto por Tween 20.

La ausencia de variación de la señal obtenida inicialmente con el PBSTG, demuestran que la solución PBSTG protege eficazmente a los SWCNTs, de forma tal que la variación de la señal eléctrica es producto solamente de la interacción entre el RE- α y el BFA. En caso de los CNTFETs recubiertos por Tween 20 (Figuras 10 y 11) se observa una menor protección ya que a concentraciones elevadas del BFA la señal eléctrica varía un poco, lo que no ocurre con el PBSTG (Figura 12 y 13), por lo que se deduce que el mejor agente bloqueante es este último.

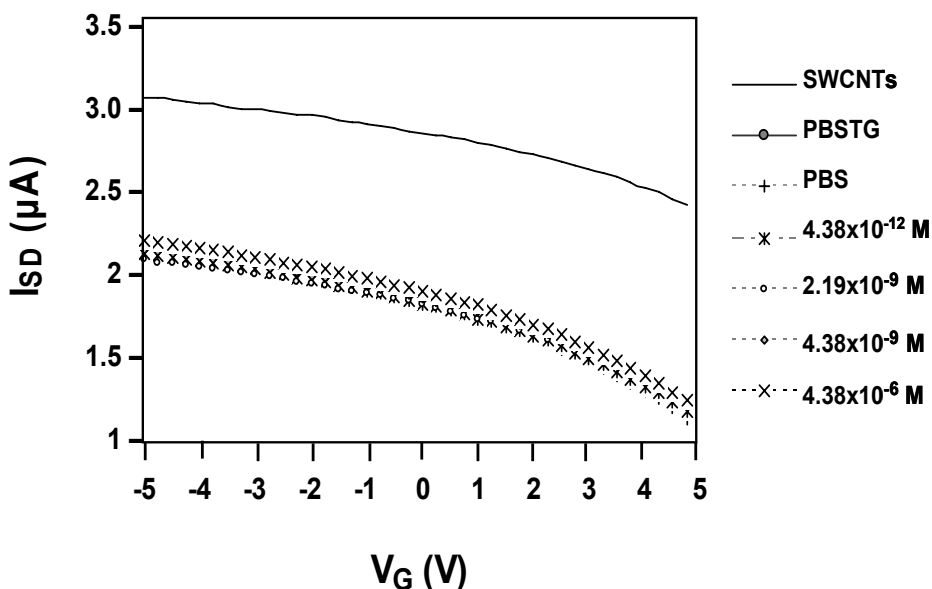


Figura 12. Representación de la dependencia de la I_{SD} con respecto al V_G de un CNTFET sin RE- α fijado por adsorción y recubierto por PBSTG ($\text{---}\bullet\text{---}$), siendo expuesto inicialmente a una solución de PBS al 10% y a diferentes soluciones de BFA en concentraciones desde 4.38×10^{-12} M ($\text{---}\ast\text{---}$) hasta 4.38×10^{-6} M ($\text{---}\times\text{---}$) Cada curva corresponde al valor promedio de tres réplicas a un $V_{SD} = 250$ mV

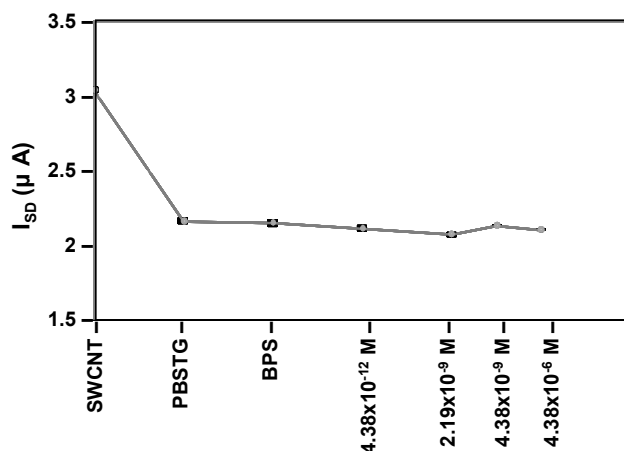


Figura 13. Comportamiento de la corriente I_{SD} a diferentes concentraciones de BFA (M) a $V_G = -5V$, las barras de error corresponden al intervalo de la I_{SD} obtenida para tres réplicas del CNTFET recubierto por PBSTG.

4.2.4.2. Tiempo de análisis

Para determinar el tiempo de análisis a usar durante la detección del BFA por parte del RE- α fue necesario hacer una prueba inicial, para lo cual dispositivos CNTFET funcionalizados se expusieron a la solución de $4.38 \times 10^{-11} M$ de BFA durante diferentes intervalos de tiempo (de 0.5 hasta 5 minutos) registrándose la respuesta eléctrica obtenida en cada caso. (Figuras 14 y 15) Las respuestas obtenidas demuestran que 0.5 minutos es tiempo suficiente para que se de la reacción entre el RE- α y BFA, ya que la señal eléctrica no presenta cambio significativo en todos los tiempos de análisis comprobados. Aunque para la detección del BFA son suficiente 0.5 minutos, se decidió trabajar con 2 minutos para asegurar que el proceso de reconocimiento ha tenido lugar en su totalidad. Así mismo, en los resultados de trabajos previos reportados hasta el momento no hay registros tan rápidos de análisis.

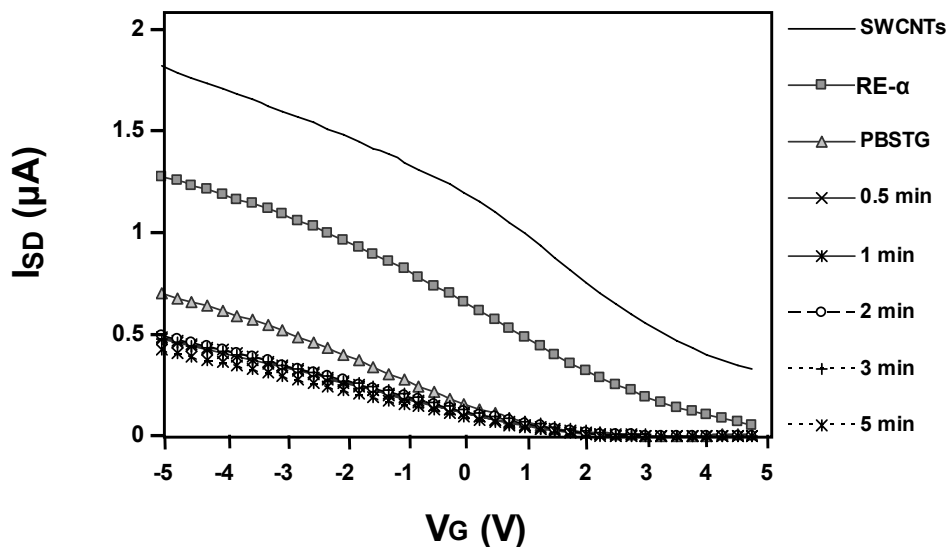


Figura 14. Dependencia de la I_{SD} con respecto al V_G de un CNTFET funcionalizado (\triangle), expuesto a soluciones de BFA a una concentración 4.38×10^{-11} M a diferentes tiempos de análisis desde 0.5 minutos (\times), hasta 5 minutos (\ast).

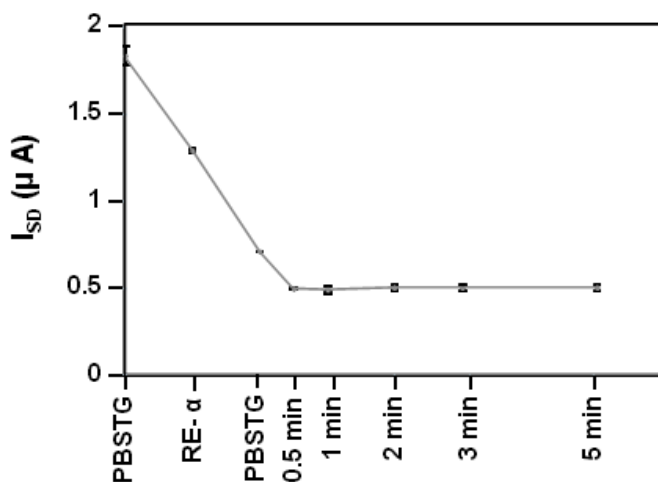


Figura 15. Corriente I_{SD} a un $V_G = -5$ V. Las barras de error que corresponden al intervalo de la corriente eléctrica obtenida para tres réplicas en un CNTFET funcionalizado expuesto a una solución de BFA (4.38×10^{-11} M) en diferentes tiempos de análisis.

4.2.4.3. Sensibilidad del CNTFET

La sensibilidad del sensor se evaluó mediante el registro de la respuesta instrumental del CNTFET funcionalizado al ser expuesto a diferentes concentraciones de soluciones de BFA (desde 2.19×10^{-12} M hasta 4.38×10^{-4} M) con el posterior proceso de lavado con agua milli-Q y secado con N_2 en cada caso. Las medidas eléctricas se efectuaron a las mismas condiciones de V_{SD} y de V_G . Como las medidas se llevan a cabo en seco no hay dependencia de la fuerza iónica. Las condiciones de temperatura (~ 22 ° C) son las aconsejadas para el trabajo del RE- α . Se efectuaron tres réplicas de cada medida, representándose solo la curva promedio. Sin embargo hay que tener en cuenta que sólo se representaron las curvas a partir de las cuales empezó a observarse un cambio en la respuesta eléctrica respecto a la línea base, definida por las curvas del Tween 20 y el PBSTG, según sea en cada caso el bloqueante utilizado. Debido a esto, en las gráficas correspondientes al Tween 20 el intervalo de medida va de 4.38×10^{-8} M a 2.19×10^{-4} M, (Figuras 16 y 17) y para el PBSTG aparece representado todo el intervalo desde 2.19×10^{-12} M hasta 4.38×10^{-4} M. (Figuras 18 y 19)

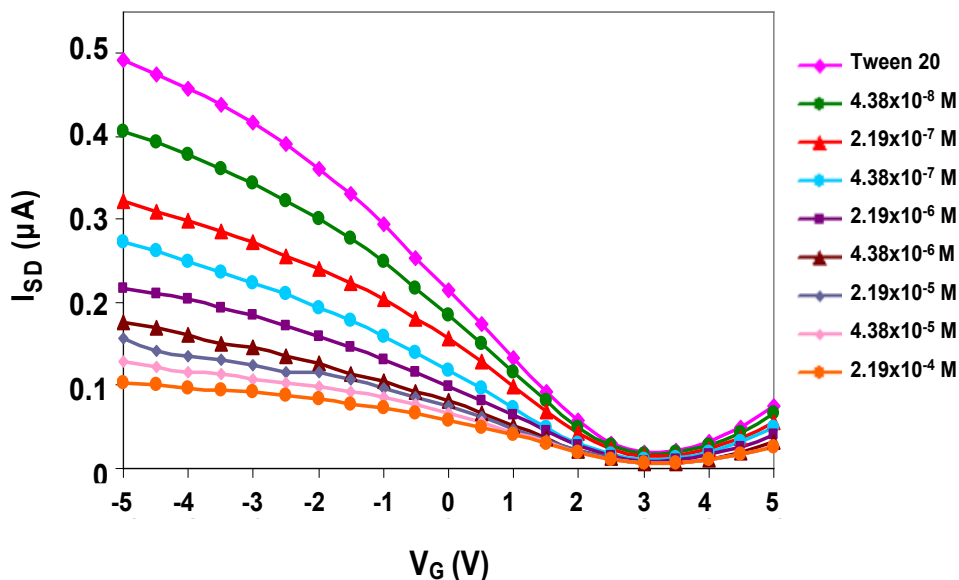


Figura 16. Respuesta del dispositivo CNTFET con Tween 20 (◆) como agente bloqueante al ser expuesto a diferentes concentraciones de BFA, desde $4.38 \times 10^{-8} M$ (●) a $2.19 \times 10^{-4} M$ (○).

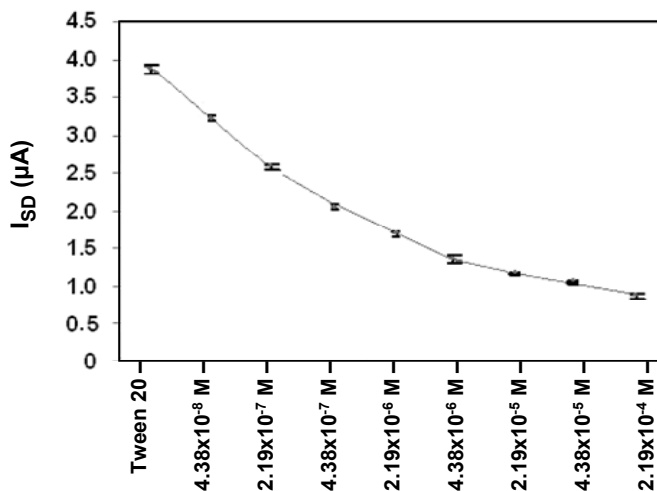


Figura 17. Variación de la corriente I_{SD} del CNTFET protegido por Tween 20, con respecto a diferentes concentraciones de BFA (M) a $V_G = -5 V$. Las barras de error corresponden al intervalo de la corriente eléctrica para tres réplicas.

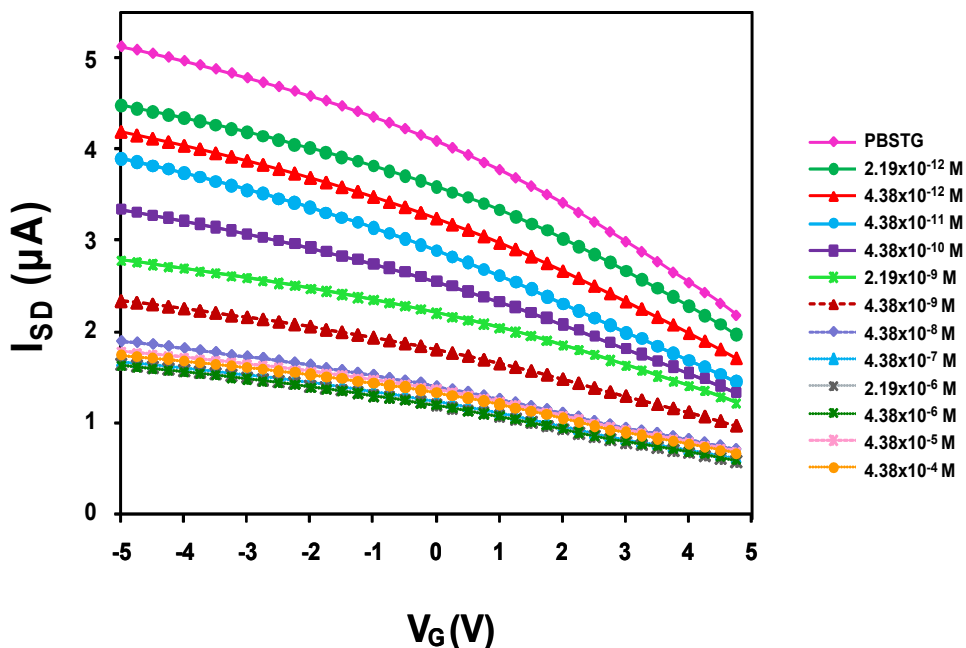


Figura 18. Caracterización eléctrica de un dispositivo CNTFET que usa PBSTG como agente bloqueante (—◆—) al ser expuesto a diferentes concentraciones de BFA, desde 2.19×10^{-12} M (—●—) hasta 4.38×10^{-4} M (—○—).

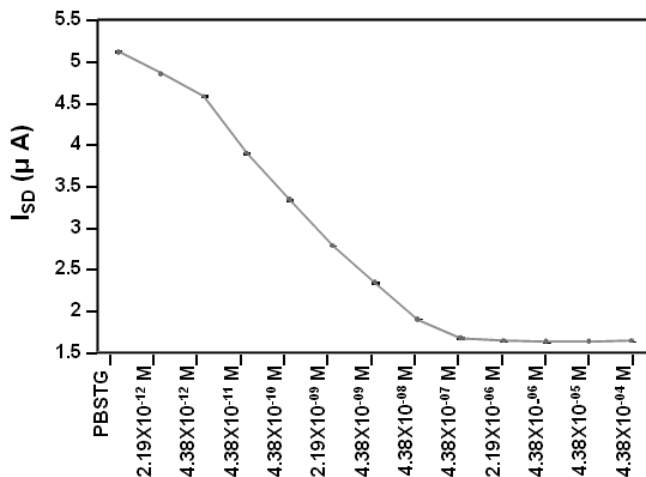


Figura 19. Variación de la corriente I_{SD} del CNTFET, protegido con PBSTG, con respecto a diferentes concentraciones de BFA (M) a $V_G = -5$ V. Las barras de error corresponden al intervalo de la corriente eléctrica para tres réplicas.

Como se aprecia en las gráficas los resultados obtenidos con los CNTFETs que usan PBSTG como agente bloqueante presentan mejores resultados que los que se cubrieron con Tween 20, lo cual concuerda con los resultados del estudio de protección obtenidos anteriormente pudiendo concluir de esta forma que el PBSTG proporciona una mejor protección a los SWCNTs, lo que permite igualmente un mejor desempeño del CNTFET, por lo que los resultados y análisis planteados a continuación se centran en los CNTFETs protegidos con PBSTG. Así mismo se observa que el uso del PBSTG permite obtener un intervalo más amplio de medida.

En la Figura 18 se aprecia la señal eléctrica del CNTFET funcionalizado, tomando como curva base la señal del PBSTG, observándose la variación de la señal eléctrica a medida que el dispositivo se expone a soluciones más concentradas de BFA (de 2.19×10^{-12} M a 4.38×10^{-4} M). Así mismo en la Figura 19 se encuentra representada la variación de la corriente eléctrica a un $V_G = -5V$, siendo este el punto en el que se observa mayor variación de la señal, lo que demuestra que la presencia del BFA hace disminuir de forma significativa la corriente eléctrica a $V_G (-)$. Observándose de igual forma que la reacción que tiene lugar entre el RE- α y el BFA hace disminuir considerablemente la señal eléctrica hasta aproximadamente 4.38×10^{-7} M de BFA, con disminuciones que van desde un 5.23% para 2.19×10^{-12} M de BFA, hasta un 67.94% para 4.38×10^{-7} M de BFA. En esta última concentración la señal tiende a estabilizarse posiblemente debido a la saturación del RE- α .

Asimismo, la desviación estándar relativa más alta de las tres réplicas efectuadas a una determinada concentración es de 0.43% que corresponde a la concentración 4.38×10^{-11} M de BFA. La Figura 19 muestra las barras de

error correspondientes al intervalo de corriente eléctrica medida para las tres réplicas en cada concentración, pudiéndose apreciar que los errores son muy pequeños, posiblemente debido a que todas las medidas se hicieron en seco.

El dispositivo CNTFET desarrollado es capaz de detectar concentraciones de BFA a niveles picomolares, muy por debajo de los límites legales y de los límites de detección obtenidos por métodos anteriormente usados para el mismo fin. La rápida respuesta eléctrica obtenida con el CNTFET ante las diferentes concentraciones de BFA, así como el nivel de detección alcanzado puede deberse a:

- La transferencia de carga como resultado del proceso de reconocimiento molecular entre el RE- α y el BFA, probablemente con enlaces hidrógeno entre el grupo fenólico del BFA y la región de enlace del RE- α , al igual que las propiedades hidrofóbicas y estéricas del BFA. (Rich, 2002) Este evento de reconocimiento puede inducir modificaciones estéricas del RE- α adsorbido, incrementando la transferencia de carga desde el RE- α a los SWCNTs.
- La modulación del efecto de la barrera Schottky producida por las moléculas adsorbidas muy cerca de los contactos metal-SWCNT. Como el BFA es una molécula mucho más pequeña que el RE- α , es dudoso que este mecanismo pueda atribuirse a una dispersión de potencial generada por la interacción entre el BFA y el RE- α . Asimismo es factible que el mecanismo principal tampoco sea la disminución de la movilidad de carga, ya que como Heller y col. sostienen, es poco

probable que este mecanismo sea el que domine la detección. (Heller, 2008)

4.2.4.4. Selectividad del CNTFET

Para comprobar la selectividad del dispositivo CNTFET, este se usó en la detección de otros contaminantes que se han encontrado junto con el BFA en muestras de agua, por lo que pueden comportarse como interferentes. Los compuestos seleccionados son fluoranteno, pentacloronitrobenzenu y malatión, los cuales son altamente tóxicos y de amplio uso como pesticidas, fungicidas y acaricidas. (Figura 20)

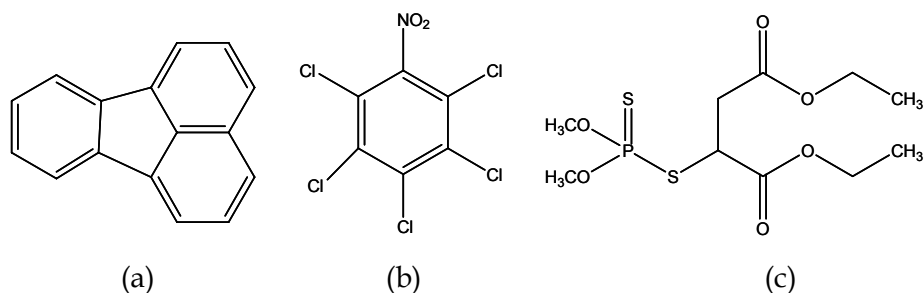


Figura 20. Estructuras químicas de los compuestos usados como interferentes: (a) Fluoranteno (b) Pentacloronitrobenzenu y (c) Malatión.

Para esta comprobación CNTFETs funcionalizados se sumergieron por dos minutos a temperatura ambiente en las soluciones de cada uno de los interferentes. A continuación se lavaron con agua mili-Q y se secaron con N₂ para seguidamente realizar las correspondientes medidas eléctricas, con las condiciones usadas anteriormente y mediante la obtención de tres réplicas, usando la curva promedio para la representación de cada una de

las gráficas. Las concentraciones usadas fueron de 4.95×10^{-12} M a 4.95×10^{-5} M para el fluoranteno, de 3.39×10^{-12} M a 3.39×10^{-5} M para el pentacloronitrobenceno y de 3.03×10^{-12} hasta M a 3.03×10^{-5} M para el malatión.

En las Figuras 21 y 22 pueden apreciarse las curvas del dispositivo CNTFET funcionalizado después de verificarse su comportamiento ante diferentes concentraciones de fluoranteno. Los resultados obtenidos son similares a los obtenidos con pentacloronitrobenceno (Figuras 23 y 24) y malatión (Figuras 25 y 26). Se puede observar que incluso a concentraciones elevadas de interferentes no se presenta cambio significativo en la señal con respecto a la curva base que corresponde al cubrimiento con PBSTG.

Asimismo se ha verificado la selectividad realizando detecciones de concentraciones de BFA (4.38×10^{-12} M, 4.38×10^{-9} M, 4.38×10^{-6} M y 4.38×10^{-5} M) en presencia de fluoranteno (4.95×10^{-6} M). Los resultados se aprecian en las Figuras 27 y 28, por lo que a pesar de encontrarse el fluoranteno en una concentración elevada, esto no impide la detección de BFA manteniendo el comportamiento eléctrico anteriormente presentado, lo que nos permite concluir que la detección del BFA en presencia de alta concentración de interferentes es viable.

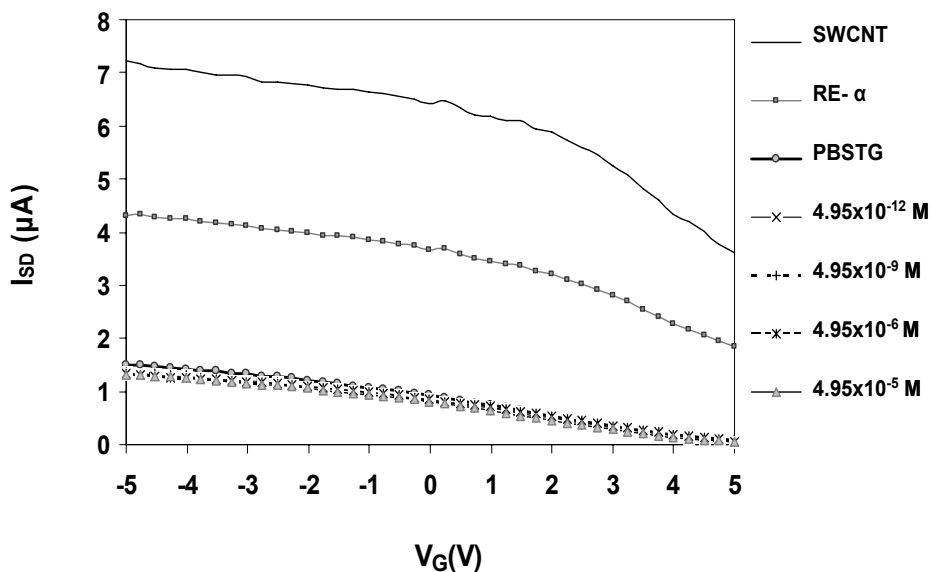


Figura 21. Respuesta eléctrica del dispositivo CNTFET funcionalizado (—○—) ante diferentes concentraciones de fluoranteno (M) a un $V_{SD} = 250$ mV

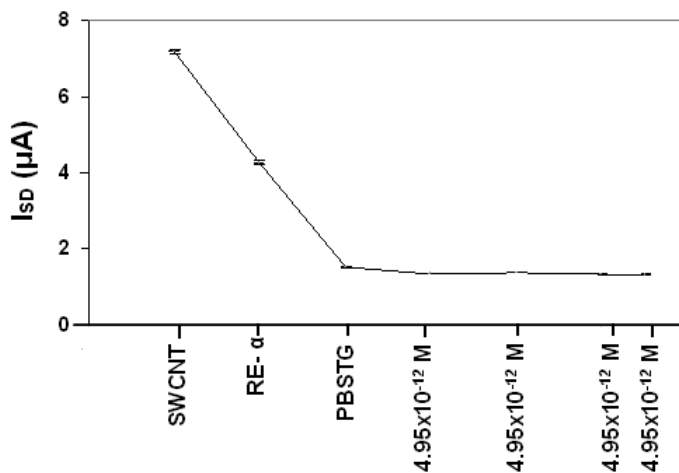


Figura 22. Variación de la I_{SD} frente a diferentes concentraciones de fluoranteno (M) a $V_G = -5$ V. Las barras de error corresponden al intervalo de la corriente eléctrica para tres réplicas

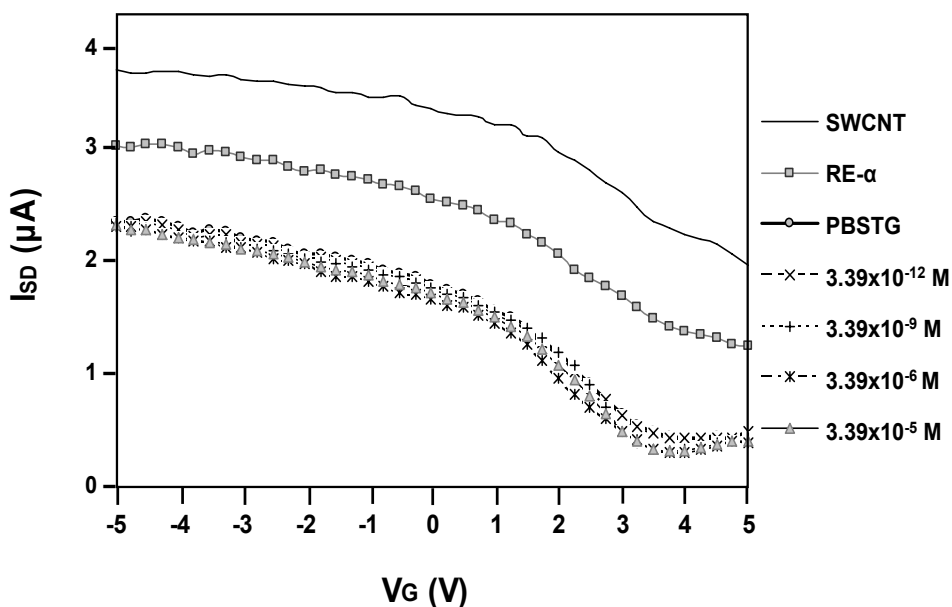


Figura.23 Respuesta eléctrica del CNTFET funcionalizado en presencia de diferentes soluciones de pentacloronitrobenceno (M) a un $V_{SD} = 250 mV$. La curva base corresponde a la señal obtenida para el PBSTG ($\text{---}\circ\text{---}$).

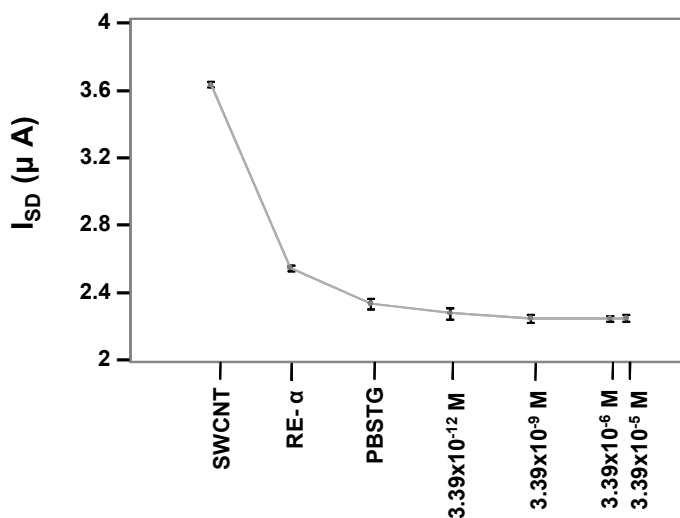


Figura 24. Variación de la I_{SD} frente a diferentes concentraciones de pentacloronitrobenceno (M) a $V_G = -5V$. Las barras de error corresponden al intervalo de la corriente eléctrica para tres réplicas

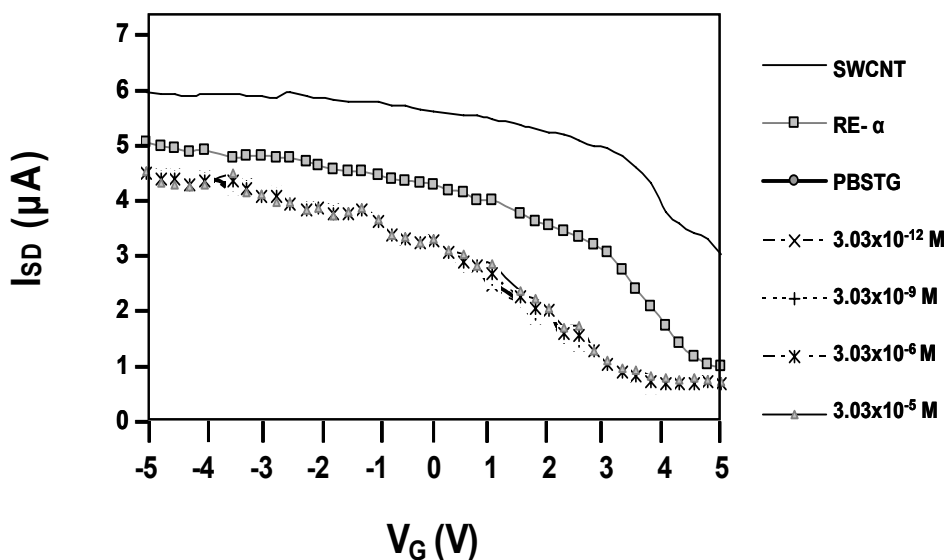


Figura.25. Respuesta eléctrica del CNTFET funcionalizado en presencia de diferentes soluciones de malatión (M) a un $V_{SD} = 250$ mV. La curva base corresponde a la señal obtenida para el PBSTG (\blacktriangledown).

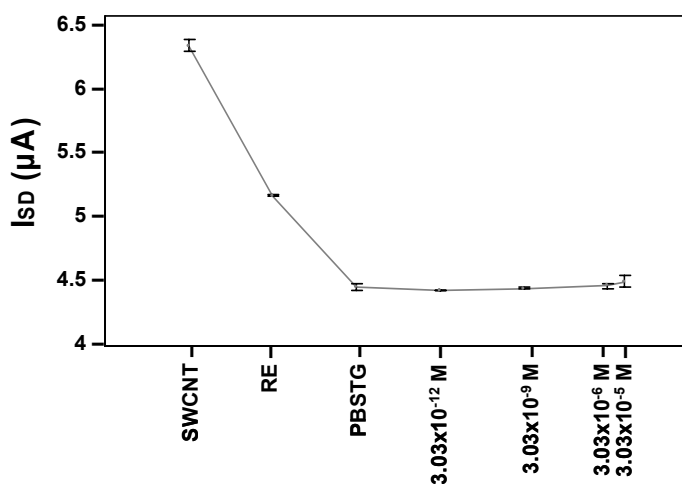


Figura 26. Variación de la I_{SD} frente a diferentes concentraciones de malatión (M) a $V_G = -5$ V. Las barras de error corresponden al intervalo de la corriente eléctrica para tres réplicas

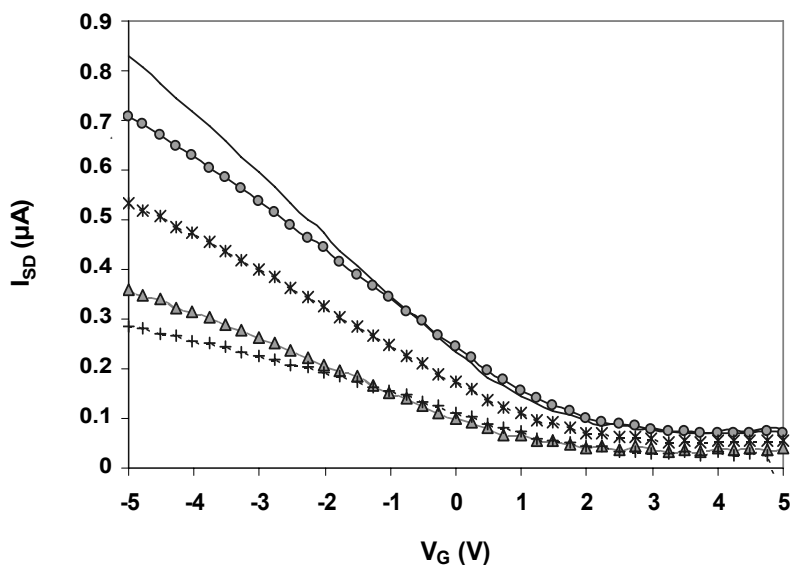


Figura 27. Respuestas eléctricas de la medida de BFA en presencia de fluoranteno (4.95×10^{-6} M): CNTFET funcionalizado (—), 4.38×10^{-12} M (—○—), 4.38×10^{-9} M (—*—), 4.38×10^{-5} M (—△—) y 4.38×10^{-4} M (—+—)

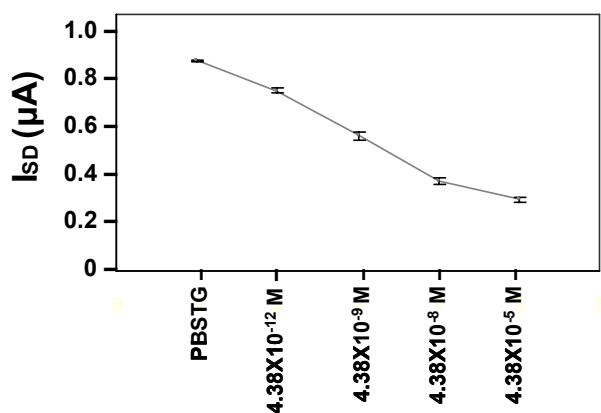


Figura 28. Variación de la I_{SD} de un CNTFET funcionalizado con respecto a diferentes concentraciones de BFA (M) en presencia de fluoranteno (4.95×10^{-6} M) a $V_G = -5$ V. Las barras de error corresponden al intervalo de la corriente eléctrica para tres réplicas

4.2.4.5. Estabilidad del CNTFET

Con el fin de comprobar la estabilidad del dispositivo sensor desarrollado algunos CNTFETs funcionalizados se guardaron a temperatura ambiente ($\sim 22^{\circ}\text{C}$) y otros a 8°C . Cada 24 horas los CNTFETs se expusieron durante 2 minutos a diversas concentraciones de BFA (4.38×10^{-12} M, 4.38×10^{-9} M, 4.38×10^{-6} M y 4.38×10^{-5} M), registrándose la respuesta eléctrica en cada caso. EL comportamiento eléctrico apreciado en la Figura 18 se observó durante los primeros cuatro días solo en los CNTFETs almacenados a temperatura ambiente. Por lo tanto, el dispositivo es estable hasta un máximo de cuatro días al ser almacenado a temperatura ambiente.

La glicina ha sido usada en procesos de regeneración de sistemas de detección química, en donde ha sido empleada en diferentes concentraciones para la regeneración de inmunosensores ópticos (Preininger, 2000), amperométricos (Inonescu, 2007), al igual que de aptasensores (Snejdárková, 2008), entre otros. Por esta razón se intentó la regeneración del CNTFET desarrollado mediante el uso de la solución (0.4 M glicina/HCl, pH 2.2 y NaCl 0.5 M), siendo sin embargo imposible la recuperación de la señal base inicial.

4.3. Bibliografía

- K. Bradley, M. Briman, A. Star, G. Grüner, *Nano Lett.*, 2004, 4, 253.
- R.J. Chen, S. Bangsaruntip, K.A. Drouvalakis, N. Wong Shi Kam, M. Shim, Y.M. Li, W. Kim, P.J. Utz, H. Dai, *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2003, 100, 4984.
- R.J. Chen, H.C. Choi, S. Bangsaruntip, E. Yenilmez, X. Tang, Q. Wang, Y.L Chang, H. Dai, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 1563.
- V. Derycke, R. Martel, J. Appenzeller, Ph. Avouris, *Appl. Phys. Lett.*, 2002, 80, 2773.
- I. Heller, A.M. Janssens, L. Männik, E.D. Minot, S.G. Lemay, C. Dekker, *Nano Lett.*, 2008, 8, 591.
- L. Hu, D.S. Hecht, G. Grüner, *Nano Lett.*, 2004, 4, 2513.
- P. Hu, A. Fasoli, J. Park, Y. Choi, P. Estrela, S. L. Maeng, W. I. Milne, A. C.Ferrari, *J. Appl. Phys.*, 2008, 104, 074310.
- R. E. Ionescu, S. Cosnler, S. Herrmann, R. S. Marks, *Anal. Chem.*, 2007, 79, 8662.
- C. Preininger, A. Mencaglia, F. Baldini, *Anal. Chim. Acta*, 2000, 403, 67.
- M. Snejdárková, L. Svobodová, V. Polohová, T. Hianik, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, 390, 1087.
- H.M. So, K. Won, Y.H. Kim, B.K. Kim, B.H. Ryu, P.S. Na, K. Kim, J.O. Lee, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 11906.
- A. Star, J. Gabriel, K. Bradley, G. Grüner, *Nano Lett.*, 2003, 3, 459.

- 4.4. **Anexo:** Artículo *"Fast picomolar selective detection of bisphenol A in water using a carbon nanotube field effect transistor functionalized with estrogen receptor- α "* Biosens. Bioelectron., 2009, 24, 2842.

Fast picomolar selective detection of bisphenol A in water using a carbon nanotube field effect transistor functionalized with estrogen receptor- α

Zayda C. Sánchez-Acevedo⁺, Jordi Riu* and F. Xavier Rius

Department of Analytical and Organic Chemistry

University Rovira i Virgili,

43007 Tarragona, Spain

*Please address correspondence to:

Jordi Riu

Department of Analytical and Organic Chemistry

Universitat Rovira i Virgili

Campus Sescelades

C/ Marcel·lí Domingo s/n

43007 - Tarragona

Catalonia - Spain

Tel.: +34 977 558 491

Fax.: +34 977 558 446

e-mail: jordi.riu@urv.cat

+ ZC Sánchez-Acevedo is on leave from the University of Pamplona (Colombia)

Abstract

In this paper we report a biosensor for the fast, ultrasensitive and selective determination of bisphenol A in water. It is based on a field effect transistor (FET) in which a network of single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) acts as the conductor channel. SWCNTs are functionalized for the first time with a nuclear receptor, the estrogen receptor alpha (ER- α), which is adsorbed onto the SWCNTs and acts as the sensing part of the biosensor. SWCNTs are subsequently protected to prevent the non-specific binding of interferences. With this biosensor we can detect picomolar concentrations of BPA in only two minutes of analysis. Selectivity has been tested against possible interferences such as fluoranthene, pentachloronitrobenzene and malathion, and this is the first device that experimentally shows that small molecules can also be selectively detected at ultralow concentrations using a CNTFET biosensor.

Keywords: carbon nanotubes, nuclear receptor, BPA, nanotechnology; picomolar detection

1. Introduction

Nowadays, due to the fabrication of a large variety and quantity of chemical products, xenobiotic compounds can be found in the human organism, even though they should be absent from them. Some of these xenocompounds, called xenoestrogens, have a similar structure to estrogens and hence exhibit an affinity for the human estrogen receptor (ER). ER is a member of the nuclear receptor family and can exist in two

species, ER- α and ER- β , with different tissue distribution (Hiroi et al., 1999). The similarity between xenoestrogens and estrogens is the main reason for the increase of a series of diseases and the appearance of others related to the estrous cycle, among which we can identify masculine infertility, functional alterations of sexual development and an increase in some types of cancer (Oosterkamp et al. 1997; Mueller, 2004). Among xenoestrogens, bisphenol A (BPA), which is widely used as a primary monomer in plastics or resins, as an antioxidant in plasticizers and as a polymerization inhibitor in PVC (polyvinyl chloride), has been shown to possess strong estrogenic properties and exhibits both agonistic and antagonistic actions for ER- α while only exhibits agonistic actions for ER- β .

Although the current BPA US-EPA reference dose for humans is 50 $\mu\text{g kg}^{-1}\text{day}^{-1}$, research shows that recently discovered estrogen receptors associated with the cell membrane can stimulate physiological responses at BPA concentrations of picograms per ml (ppt) (Walsh et al., 2005; Wozniak et al., 2005; Zsarnovszky et al., 2005). This makes BPA equipotent to 17 β -estradiol (Hiroi et al., 1999; Vom Saal et al., 2007). Xenoestrogenic compounds can be detected and quantified using a wide variety of analytical techniques. Amongst them, chromatographic techniques are undoubtedly the most commonly used and combined with different detection methods (Moors et al. 2007; Inoue et al., 2006; Peng et al., 2006). However, the methodologies employed so far require complex equipment. Also, pretreatment stages such as pre-concentration and other sample treatments are time-demanding and labour intensive (Kawaguchi et al., 2004; Gatidou et al, 2007; Hu et al., 2007). Recent detection methods of BPA in water include, among others, the use of antibodies in a yeast two-hybrid

bioassay (Schwartz-Mittelman et al., 2005) with a limit of detection of 1.75×10^{-9} M in 6 minutes of measurement, potentiometric methods with response times of 5 minutes and a limit of detection of 2.63×10^{-9} M (Piao et al., 2008) or optical immunosensors with an analysis time per sample of 15 minutes and a limit of detection of 6.13×10^{-11} M. (Rodríguez-Mozaz et al., 2005)

New types of sensors have been developed in recent years with the emergence of nanostructured materials. The nanometric size related to these new materials (usually less than 100 nm in at least one dimension) is important for revealing new properties which are different from those exhibited by the same materials in bulk size. Sensors incorporating nanoparticles, carbon nanotubes or cantilevers (among other nanostructures), potentially display several advantageous performance characteristics such as increased sensitivity, improved detection limits, faster instrumental responses or the use of smaller amounts of test samples (Riu et al., 2007). A group of these new nanomaterials is formed by the carbon nanotubes (CNTs) discovered by S. Iijima in 1991 (Iijima, 1991). One specific type of electrochemical CNT sensor is the so called carbon nanotube field-effect transistor (CNTFET), built using single-walled carbon nanotubes (SWCNT). (Star et al., 2003; Star et al., 2004) One of the main advantages of these CNTFET is their high sensitivity, attributed to the outstanding capacity of SWCNTs to promote electron transfer between heterogeneous phases. (Chen et al, 2003) Nevertheless, SWCNTs sensitivity to the presence of different molecules in their surrounding chemical environment is also a drawback due to interference from these molecules or their influence on selectivity. Since carbon nanotubes are sensitive to many

substances, it is necessary to protect and functionalize SWCNTs to become selective to the selected target molecule. The CNFET developed so far (Grüner, 2006; Kauffman and Star, 2008; Kim et al., 2007) have been mostly devoted to detecting large compounds such as proteins, (Star et al., 2003; Shim et al., 2002; Byon and Choi, 2006) DNA sequences, (Star et al, 2006) immunoglobulins (Chen et al., 2003; Maehashi et al., 2007; Cid et al., 2008) or bacteria. (Villamizar et al., 2008; So et al., 2008) Recently Zhao et al. (Zhao et al., 2008) developed a CNTFET functionalized with a small synthetic receptor, pyrenecyclodextrin, that was able to detect a range of small chemicals, although no experimental influence from any other compounds was reported in this paper. Therefore, interferences and selectivity still need to be checked from a practical point of view for the selective detection of small compounds using CNTFET devices. Silicon nanowires field-effect transistors, which are closely related to CNTFET devices, have been also successfully used for detecting small molecules such as calcium ions (Bi et al., 2008) or dopamine (Lin et al., 2008).

In this paper we are reporting a CNTFET functionalized for the first time with a nuclear receptor, the human estrogen receptor α (ER- α), which allows the selective detection of picomolar concentrations of bisphenol A (BPA) in water. In this way we are showing for the first time that CNTFETs functionalized with large compounds can successfully detect small molecules at ultralow concentrations checking the selectivity from a practical point of view. The recognition layer of this sensor is the ER- α . We therefore take advantage of the molecular recognition principles while trying, at the same time, to mimic nature. The ER- α is adsorbed onto the surface of a network of SWCNTs which act as transducers. A PBSTG

solution (Piao et al., 2008) (0.05% Tween 20 and 0.8% gelatin in phosphate buffered saline, PBS) has been used as a blocking agent in order to avoid nonspecific adsorption of interferences over the SWCNTs. With this sensor we are able to detect 2.19×10^{-12} M of BPA in aqueous solution. This is the lowest concentration of BPA reported in the literature and was detected in only 2 minutes of analysis. The presence of interferences that can also be found in water samples like fluoranthene, pentachloronitrobenzene and malathion do not produce any electrical response to our biosensing device.

2. Experimental

2.1 Materials

The ER- α was purchased from Invitrogen Ltd (Paisley, UK). Milli-Q water/deionized and charcoal-treated water, 18.2 M Ω .cm specific resistance, was obtained with a Milli-Q Plus reagent-grade water system (Millipore, Billerica, MA). Sigma-Aldrich (Tres Cantos, Spain) supplied the remaining reagents: Tween 20, gelatin from cold water fish skin, Dulbecco's PBS (phosphate buffered saline, 15 mM, pH=7.4), BPA, fluoranthene, pentachloronitrobenzene, malathion, isopropanol and iron (III) nitrate nonahydrate.

2.2 Apparatus

Environmental scanning electron microscopy (ESEM) FEI Quanta model 600 was used to obtain the images of the networks of SWCNTs. Electrical

measurements were made using a 4157A Agilent semiconductor parameter analyzer and a Wentworth Laboratories MP1008 probe station.

2.3 Development of the CNTFETs

The network of SWCNTs was synthesized by chemical vapour deposition (CVD) on top of a layer of silicon dioxide (500 nm thickness) thermally grown on heavily n-type-doped silicon substrates. A solution of 100 mgL⁻¹ of iron nitrate in isopropanol was deposited by spin coating over the SiO₂ layer as a catalyst for synthesis. CVD was performed at 900 °C for 20 min with 600 sccm of methane and 200 sccm of hydrogen. About 70% of synthesised SWCNTs are semiconductor and the rest are metallic (Kim et al., 2002), which means that overall the network's behaviour is semiconducting. The National Microelectronics Centre CNM/CSIC (Bellaterra, Spain) then deposited source and drain electrodes of chromium/gold (2/30 nm thick, respectively) over the substrate containing the SWCNTs using photolithography and leaving a distance of 2.5 μm between them. The gate electrode was a layer of aluminium covering the back side of the Si substrate. Control experiments were conducted to show that there was no electrical current between the source and drain electrodes when only the particles of iron from the catalyst were deposited over the SiO₂ substrate (i.e. just before the CVD). AFM images show that the particles of iron are scattered over the SiO₂ substrate without forming a layer.

2.4 Functionalization of the CNTFETs

The CNTFETs were functionalized as follows. ER- α , the recognition molecule, is immobilized over the surface of the SWCNTs by immersing the devices overnight in a 10 mg L⁻¹ solution of ER- α in PBS. After adsorbing the ER- α , the devices were rinsed with Milli-Q water, dried with nitrogen and immersed for three hours at room temperature in a PBSTG solution (0.05% Tween 20 and 0.8% gelatin in PBS). The CNTFETs were again thoroughly rinsed with Milli-Q water, dried with nitrogen and electrically characterized by measuring three replicates and by plotting the mean value of these measurements. The CNTFETs were then ready to be used to detect BPA. Fig. 1 shows a scheme of the functionalization process

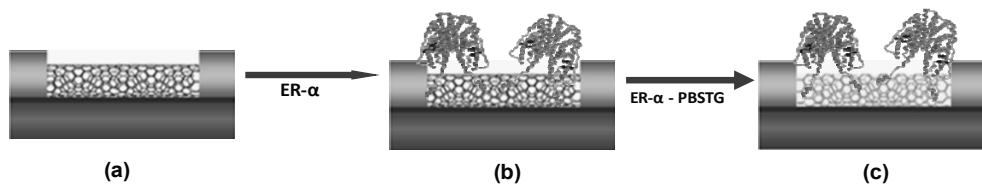


Fig. 1: Functionalization process of the SWCNTs; (a) scheme of a SWCNTs network; (b) adsorption of ER- α onto the SWCNTs network; (c) the gaps left on the SWCNTs after the adsorption of the ER- α are covered by a PBSTG blocking solution (0.05% Tween 20 and 0.8% gelatin in PBS).

2.5 Detection of BPA

In order to avoid the ionic strength of the samples containing BPA, all the measurements were performed in dry conditions. The functionalized CNTFETs were exposed to increasing concentrations of BPA (from $2.19 \times 10^{-}$

10^{-12} M to 4.38×10^{-4} M of BPA; all the solutions were prepared in 10% PBS in milli-Q water). For each concentration, the CNTFETs were immersed for 2 minutes at room temperature in the corresponding solution of BPA. Then they were rinsed thoroughly with milli-Q water and dried with nitrogen. Three replicates of each sample containing BPA were also measured.

2.6 Selectivity of the CNTFETs

Selectivity was checked in the presence of three interferences: fluoranthene, pentachloronitrobenzene and malathion. A functionalized CNTFET was immersed for two minutes at room temperature in the solution of the corresponding interference. Then it was rinsed thoroughly with milli-Q water, dried with nitrogen and electrically characterized by measuring three replicates and by plotting the mean value of these measurements. The concentrations tested are from 4.95×10^{-12} M up to 4.95×10^{-5} M for fluoranthene, from 3.39×10^{-12} M up to 3.39×10^{-5} M for pentachloronitrobenzene and from 3.03×10^{-12} M up to 3.03×10^{-5} M for malathion.

3. Results and discussion

Fig. 2 shows an environmental scanning electron microscopy (ESEM) image of the source and drain electrodes and of the network of SWCNTs. The average height of the SWCNTs is estimated to be ca. 1.4 nm from atomic force microscope (AFM) measurements. The average height of the functionalized SWCNTs is ca. 9.3 nm. The density of the network was estimated to be around 1.5 nanotubes/ μm^2 , just above the percolation

threshold, (Hu et al., 2004) to avoid a high number of conduction paths through metallic SWCNTs. This latter situation would lead to a reduction in the on/off ratio of the CNTFET and hence a reduction in the sensitivity of the sensing device. Several papers in the literature claim that proteins are strongly and non-specifically adsorbed onto carbon nanotubes. (Star et al., 2003; Chen et al., 2003) The strong adsorption can be due to the hydrophobic interactions between the functional groups of the protein and the nanotube surface. (Chen et al., 2004; Bradley et al., 2004)

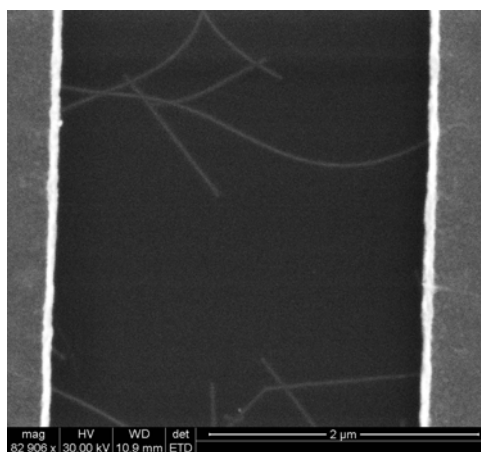


Fig.2: ESEM image of the source and drain electrodes and of the network of SWCNTs

Fig. 3 shows the electrical characterization of the CNTFET during the different functionalization steps. All the measurements were made at room temperature in dry conditions by measuring three times the dependence of the source-drain current, I , with a constant bias voltage (V_{sd}) of 0.25 V, sweeping the back gate voltage, V_g , in the range of +5 V to -5 V. Each curve in Fig. 3 corresponds to the mean value of the three replicates. After adsorbing the ER- α over the SWCNTs there is a decrease in the electrical

current through the CNTFET channel. These changes have been shown to be independent of the net charge of the adsorbed protein. The fact that the curve corresponding to the adsorption of ER- α in Fig. 3 is shifted toward more negative gate voltages seems to indicate that this decrease can be due to a charge transference (Heller et al., 2008) caused by a release of the electrons of the ER- α 's amine groups (i.e. arginine and lysine residues) to the SWCNTs (Bradley et al., 2004; Chen et al., 2004). However, the change observed may also be due to a scattering potential effect originated by the adsorption of ER- α which decreases the mobility of holes in SWCNTs. (Star et al., 2003)

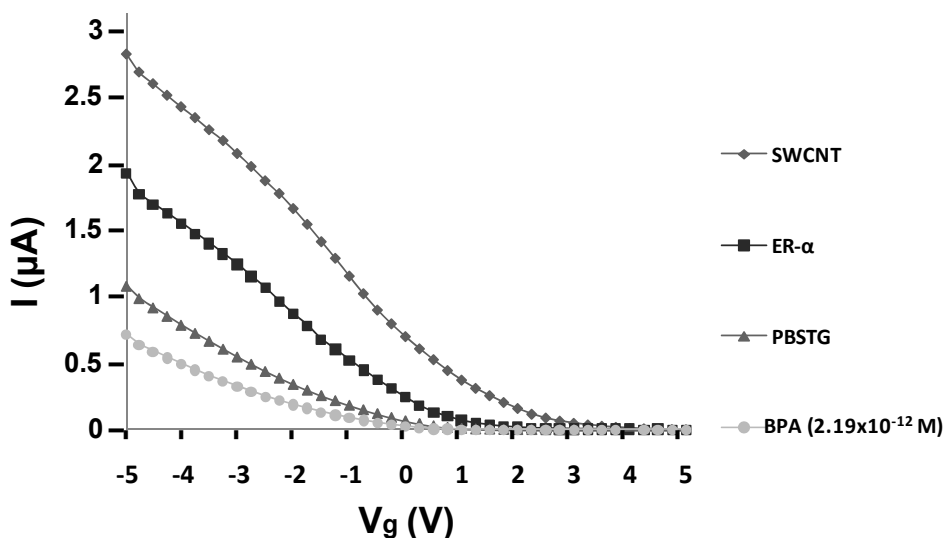


Fig.3: Electrical characterization. Source-drain current (I) vs. gate voltage (V_g) of a typical CNTFET after each functionalization step: as-grown nanotubes (\blacklozenge), ER- α (\blacksquare), PBSTG (\blacktriangle) and 2.19×10^{-12} M of BPA (\blacklozenge). $V_{sd} = 0.25$ V.

The electrical current of the CNTFET also decreased after the adsorption of PBSTG. Fig. 3 shows that when a small concentration of 2.19×10^{-12} M of

BPA is added to the functionalized CNTFET there is a change in the electrical conductivity, which shows the interaction between BPA and the functionalized CNTFET.

The response time of the interaction between ER- α and BPA was monitored to determine the analysis time of the CNTFET. The CNTFET functionalized device was exposed to a 4.38×10^{-11} M solution of BPA for different times (from 0.5 minutes to 5 minutes) and we recorded the electrical responses. We found that 0.5 minutes is enough for the interaction between ER- α and BPA to take place, because increasing this time (up to 5 minutes) does not significantly change the electrical response. Although the response time is 0.5 minutes, we decided to work with 2 minutes in order to be sure that the recognition process was completely fulfilled.

Control experiments were conducted to demonstrate that CNTFET devices functionalized without ER- α did not show any response in the presence of BPA. In order to check that the electrical response provided by the CNTFETs was given by the specific interaction between ER- α and BPA and not because of the non-specific adsorption of interferences over the SWCNTs, a control blank experiment was conducted. A CNTFET without ER- α adsorbed over the SWCNTs was immersed for 3 h in a solution of PBSTG. The CNTFET was washed with milli-Q water and dried with nitrogen for subsequent electrical characterization. The exposure of this CNTFET device to a blank solution containing only PBS and to a four different concentrations of BPA ranging from 4.38×10^{-12} M to 4.38×10^{-6} M gave the same electrical curves (not shown) as the CNTFET device coated with the PBSTG solution. This shows that the PBSTG solution effectively

coats the SWCNTs, and if there is a variation in the electrical signal, it is because the interaction between ER- α and BPA. In this way we proved that PBSTG was effectively protecting the SWCNTs against non-specific binding and that the decrease in the electrical current shown in Fig. 3 when adding BPA was only due to the interaction between ER- α and BPA.

Fig. 4a shows the electrical current of the functionalized CNTFET before (the PBSTG curve) and after exposure to different solutions from 2.19×10^{-12} M to 4.38×10^{-4} M of BPA. Fig. 4b shows that the presence of BPA significantly decreases the electrical current at negative gate voltages and shows that the interaction of ER- α with BPA significantly decreases the electrical current up to approximately 4.38×10^{-7} M of BPA (i.e. a decrease from 5.23% for 2.19×10^{-12} M of BPA to 67.94% for 4.38×10^{-7} M of BPA). From this latter concentration the signal tends to stabilize possibly due to the saturation of the ER- α . The highest relative standard deviation from the three replicates at a defined concentration is 0.43%, which corresponds to a BPA concentration of 4.38×10^{-11} M. Fig. 4b also shows the error bars corresponding to the range of electrical current measured for the three replicates at each concentration of BPA. The fact that the range of the error bars in Fig. 4b is so small is probably due to the fact the measurements are made in dry conditions. The CNTFET is able to detect concentrations of BPA at the picomolar range well below the legal limits and also below the limits of detection obtained in previous methods for analyzing BPA

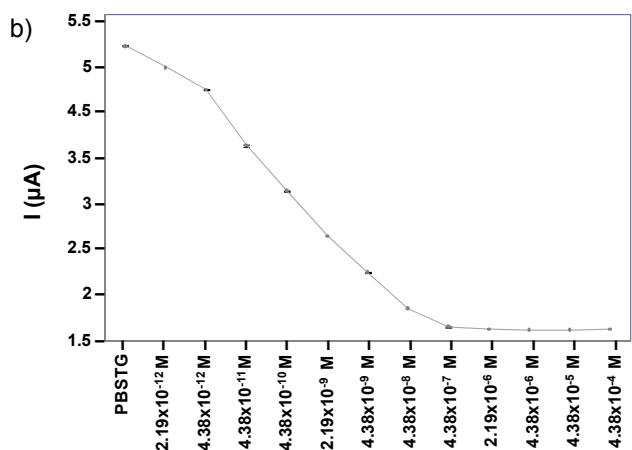
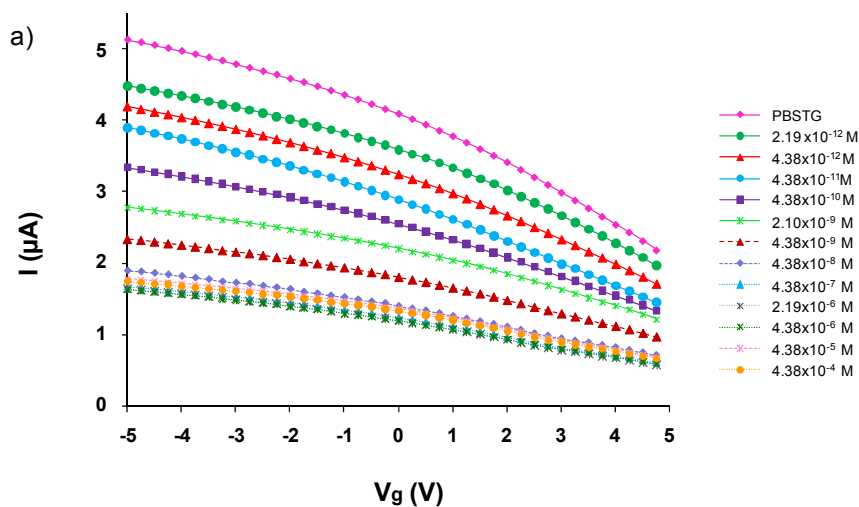


Fig. 4: Electrical characteristics of the CNTFET. Fig. 4a: Gate voltage (V_g) dependence of the source-drain current (I) of a typical functionalized CNTFET before exposure to BPA ($\text{---}\blacklozenge\text{---}$) and after exposure to different solutions from 2.19×10^{-12} M ($\text{---}\bullet\text{---}$) up to 4.38×10^{-4} M ($\text{---}\bullet\text{---}$) of BPA. Each electrical curve corresponds to the mean value of three replicates. $V_{sd} = 0.25$ V. Fig. 4b: Behaviour of the source-drain current vs. increasing BPA concentrations (M) at $V_g = -5$ V.

The decrease in the electrical current in Fig. 4a after the addition of the different concentrations of BPA can be attributed to different reasons: (i) a

charge transfer produced by the molecular recognition process between ER- α and BPA, probably through hydrogen bonding between the phenolic group of the BPA and the binding site in ER- α , as well as the hydrophobic and steric properties of BPA. (Rich et al., 2002) This recognition event may induce a steric modification of the adsorbed ER- α , increasing the charge transfer from the nuclear receptor to the nanotubes; (ii) the Schottky barrier modulation effect produced by molecules adsorbed very near to the metal-SWCNT contacts. Since BPA is a much smaller molecule than ER- α , we do not think that in this case the main mechanism can be attributed to a scattering potential generated by the interaction between BPA and ER- α . We also do not think that the main mechanism is a decrease in the carrier mobility because Heller et al. (Heller et al., 2008) claim that this mechanism is unlikely to dominate sensing.

The selectivity of the CNTFETs was checked by measuring other pollutants that can be found together with BPA and which therefore can behave as interferences. The tested compounds are fluoranthene, pentachloronitrobenzene and malathion. These compounds were selected because they have been found, like BPA, in water samples. They are also highly toxic and are widely used as pesticides, fungicides and acaricides. Fig. 5 shows the electrical curve of the functionalized CNTFET device after the addition of different concentrations of fluoranthene. These results were similar with pentachloronitrobenzene and malathion (see supplemental information). We can see in Fig. 5 that even concentrations of 10^{-5} M of the interference do not change the electrical current with respect to the response generated by the functionalized CNTFET (the PBSTG curves in Fig. 5a). We have also carried out the detection of increasing BPA

concentrations (4.38×10^{-12} M, 4.38×10^{-9} M, 4.38×10^{-6} M and 4.38×10^{-5} M) in the presence of fluoranthene (4.95×10^{-6} M). The electrical behaviour shown in Fig. 4 was observed showing that determination of BPA in presence of high concentration of interferences is possible.

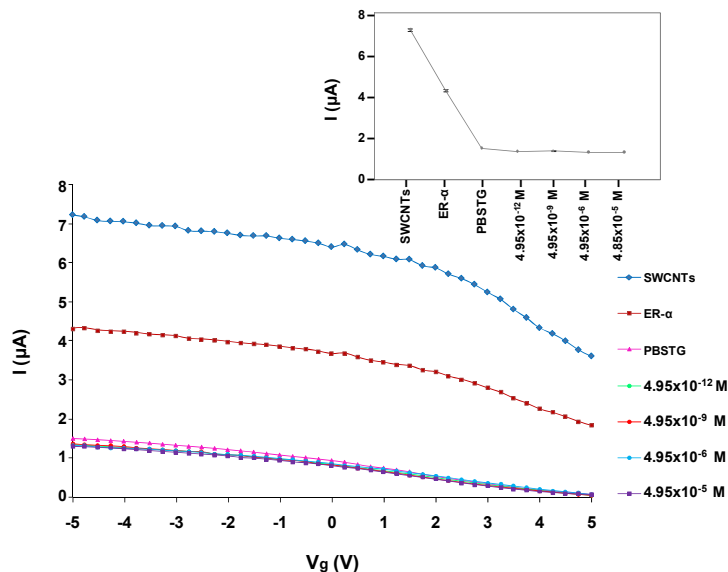


Fig. 5: Electric response of the CNTFET in the presence of fluoranthene. $V_{sd} = 0.25$ V. The baseline corresponding to the functionalized CNTFET is the ($\text{---}\blacktriangle\text{---}$) PBSTG curve. The inset shows the behaviour of the source-drain current vs. increasing fluoranthene concentrations (M) at $V_g = -5$ V

To check the stability of the functionalized CNTFETs, some functionalized CNTFET devices were stored at room temperature and other ones at 8°C . Every 24 hours the CNTFET devices were exposed for 2 min to increasing BPA concentrations (4.38×10^{-12} M, 4.38×10^{-9} M, 4.38×10^{-6} M and 4.38×10^{-5} M) and the electrical responses were recorded. The electrical behaviour shown

in Fig. 4 was observed the first four days only for the CNTFETs stored at room temperature. So the CNTFET devices are stable at least for four days stored at room temperature. We tried to regenerate the sensor by using several regeneration solutions (0.4 M glycine/HCl, pH 2.2, and 0.5 M NaCl). However, we were not able to fully recover the initial baseline again.

4. Conclusions

In this paper we have developed a fast and selective biosensor device for detecting BPA. It is based on using ER- α as a recognition layer adsorbed onto the nanotubes of our CNTFET device. For the first time a CNTFET has been functionalized with a nuclear receptor, and we show that large molecules (i.e. ER- α) can be successfully used as the recognition layer for the ultrasensitive and selective detection of small molecules such as BPA. The concentrations of BPA detected with this device (pM) are smaller than any other detection method of BPA reported so far in the literature. The analysis time is also very short (2 minutes), which shows that this biosensor can be a useful label-free platform for detecting other small analytes by using an adequate nuclear receptor.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Spanish Ministry of Science and Education (projects NAN2004-09306-C05-05 and CTQ2007-67570/BQU) and the European Union (project STRP 01071) for financial support. ZS also acknowledges the University of Pamplona and the Rovira i Virgili

University for providing economic support. The authors would also like to thank Francesc Pérez and his research group in CNM/CSIC (Bellaterra, Spain) for providing the lithographic processes.

References

- Bi, X., Wong, W.L., Ji, W., Agarwal, A., Balasubramanian, N., Yang, K.L., 2008. *Biosens. Bioelectron.* 23, 1442-1448.
- Bradley, K., Briman, M., Star, A., Grüner, G., 2004. *Nano Lett.* 4, 253-256.
- Byon, H.R., Choi, H.C., 2006. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 2188-2189.
- Cid, C.C., Riu, J., Maroto, A., Rius, F.X., 2008. *Analyst.* 133, 1005-1008.
- Chen, R.J., Bangsaruntip, S., Drouvalakis, K.A., Wong Shi Kam, N., Shim, M., Li, Y.M., Kim, W., Utz, P.J., Dai, H., 2003. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 4984-4989.
- Chen, R., Choi, H., Bangsaruntip, S., Yenilmez, E., Tang, X., Wang, Q., Chang, Y., Dai, H., 2004. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 1563-1566.
- Gatidou, G., Thomaidis, N.S., Stasinakis, A.S., Lekkas, T.D., 2007. *J. Chromatogr. A.* 1138, 32-42.
- Grüner, G., 2006. *Anal. Bioanal. Chem.* 384, 322-335.
- Heller, I., Janssens, A.M., Männik, L., Minot, E.D., Lemay, S.G., Dekker, C., 2008. *Nano Lett.* 8, 591-595.
- Hiroi, H., Tsutsumi, O., Momoeda, M., Takai, Y., Osuga, Y., Taketani, Y., 1999. *Endocr. J.* 46, 773-778.
- Hu, L., Hecht, D.S., Grüner, G., 2004. *Nano Lett.* 4, 2513-2517.
- Hu, Y., Zheng, Y., Zhu, F., Li, G., 2007. *J. Chromatogr. A.* 1148, 16-22.
- Iijima, S., 1991. *Nature.* 354, 56-58.

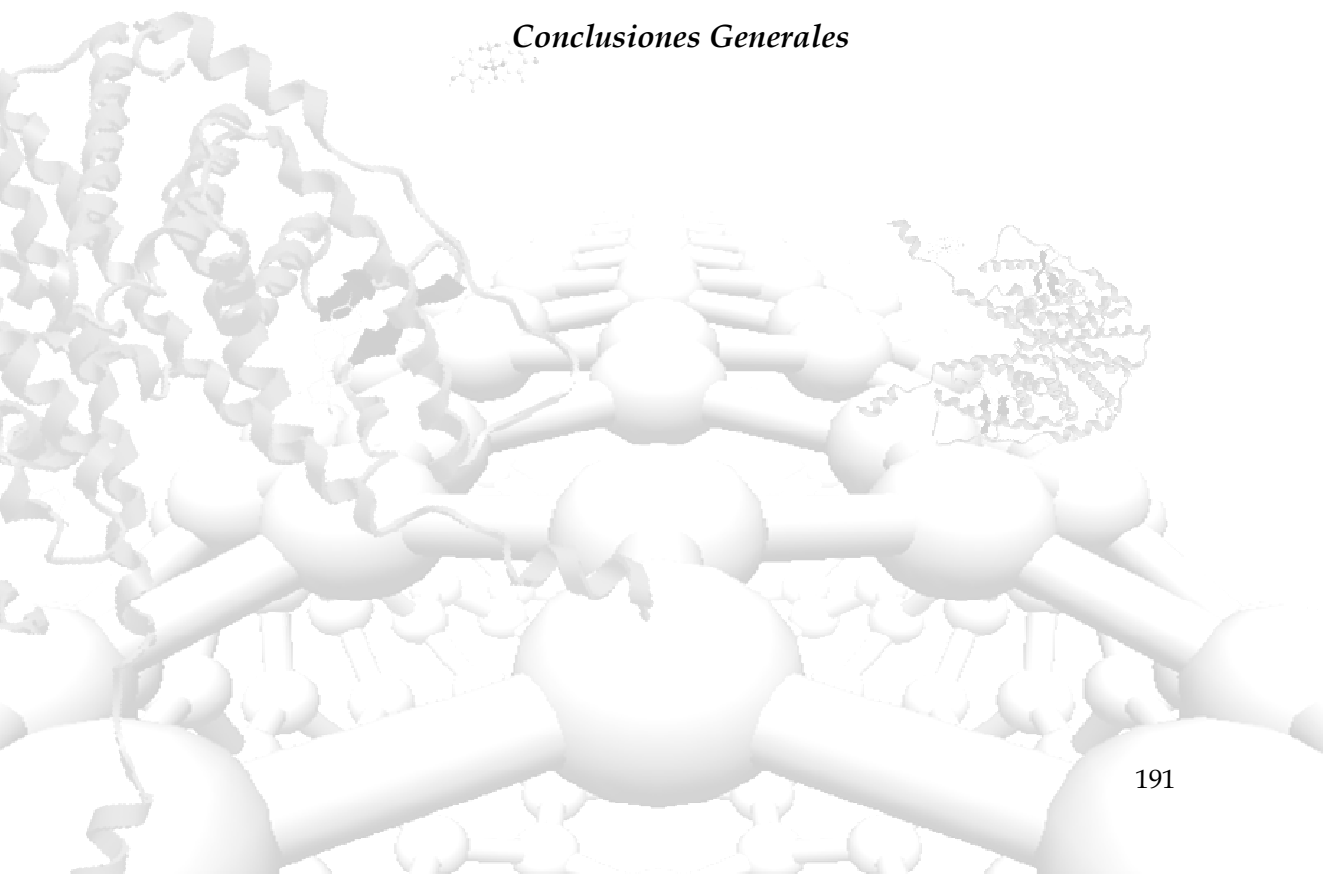
- Inoue, K., Yoshida, S., Nakayama, S., Ito, R., Okanouchi, N., Nakazawa, H., 2006. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 503-508.
- Kauffman, D.R., Star, A., 2008. *Chem. Soc. Rev.* 37, 1197-1206.
- Kawaguchi, M., Inoue, K., Yoshimura, M., Sakui, N., Okanouchi, N., Ito, R., Yoshimura, Y., Nakazawa, H., 2004. *J. Chromatogr. A.* 1041, 19-26.
- Kim, W., Choi, H.C., Shim, M., Li, Y., Wang, D., Dai, H., 2002. *Nano Lett.* 7, 703-708.
- Kim, S.N., Rusling, J.F., Papadimitrakopoulos, F., 2007. *Adv. Mater.* 19, 3214-3228.
- Lin, C.H., Hsiao, C.Y., Hung, C.H., Lo, Y.R., Lee, C.C., Su, C.J., Lin, H.C., Ko, F.H., Huang, T.Y., Yang, Y.S., 2008. *Chem. Commun.* 5749-5751.
- Maehashi, K., Katsura, T., Kerman, K., Takamura, Y., Matsumoto, K., Tamiya, E., 2007. *Anal. Chem.* 79, 782-787.
- Moors, S., Blaszkewicz, M., Bolt, H.M., Degen, G.H., 2007. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 787-798.
- Mueller, S., 2004. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 582-587.
- Oosterkamp, A., Hock, B., Seifert, M., Irth, H., 1997. *Trends Anal. Chem.* 16, 544- 553.
- Peng, X., Wang, Z., Yang, C., Chen, F., Mai, B., 2006. *J. Chromatogr. A.* 1116, 51-56.
- Piao, M.H., Noh, M.H., Rahman, M.A., Won, M.S., Shim, Y.B., 2008. *Electroanalysis.* 20, 30-37.
- Rich, R.L., Hoth, L.R., Geoghegan, K.F., Brown, T.A., LeMotte, P.K., Simons, S.P. Hensley, P., Myszka, D.G., 2002. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 8562-8567.
- Riu, J., Maroto, A., Rius, F.X., 2007. *Talanta.* 69, 288-301.

- Rodriguez-Mozaz, S., Lopez de Alda, M., Barceló, D., 2005. *Water Res.* 39, 5071-5079.
- Schwartz-Mittelman, A., Baruch, A., Neufeld, T., Buchner, V., Rishpon, J., 2005. *Bioelectrochemistry.* 65,149-156.
- Shim, M., Wong Shi Kam, N., Chen, R.J., Li, Y.M., Dai, H., 2002. *Nano Lett.* 2, 285-288.
- So, H.M., Park, D.W., Jeon, E.K., Kim, Y.H., Kim, B.S., Lee, C.K., Choi, S.Y., Kim, S.C., Chang, H., Lee, J.O., 2008. *Small.* 4, 197-201.
- Star, A., Gabriel, J., Bradley, K., Grüner, G., 2003. *Nano Lett.* 3, 459-463.
- Star, A., Joshi, V., Han, T.R., Altoé, M.V. P., Grüner, G., Stoddar, J.F., 2004. *Org. Lett.* 6, 2089-2092.
- Star, A., Tu, E., Niemann, J., Gabriel J-C.P., Joiner, C.S., Valcke, C., 2006. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 921-926.
- Villamizar, R.A., Maroto, A., Rius, F.X., Inza, I., Figueras, M.J., 2008. *Biosens. Bioelectron.* 24, 279-283.
- Vom Saal, F.S., Akingbemi, B.T., Belcher, S.M., Birnbaum, L.S., Crain, D.A., Eriksen, M., Farabollini, F., Guillette, L.J., Hauser, R., Heindel, J.J., Ho, S.M., Hunt, P.A., Iguchi, T., Jobling, S., Kanno, J., Keri, R.A., Knudsen, K.E., Laufer, H., LeBlanc, G.A., Marcus, M., McLachlan, J.A., Myers, J.P., Nadal, A., Newbold, R.R., Olea, N., Prins, G.S., Richter, C.A., Rubin, B.S., Sonnenschein, C., Soto, A.M., Talsness, C.E., Vandenberg, J.G., Vandenberg, L.N., Walser-Kuntz, D.R., Watson, C.S., Welshons, W.V., Wetherill, Y., Zoeller, R.T., 2007. *Reprod. Toxicol.* 24, 131-138.
- Walsh, D.E., Dockery, P., Doolan, C.M., 2005. *Mol. Cell. Endocrinol.* 230, 23-30.

- Wozniak, A.L., Bulayeva, N.N., Watson, C.S., 2005. Environ. Health. Perspect. 113, 431-9.
- Zhao, Y.L., Hu, L.B., Stoddart, J.F., Grüner, G., 2008. Adv. Mater. 20, 1910-1915.
- Zsarnovszky, A., Le, H.H., Wang, H.S., Belcher, S.M., 2005. Endocrinology. 146, 5388-5396.

Quinto Capítulo

Conclusiones Generales



En el presente capítulo se encuentran las conclusiones generales de la tesis, abarcando aquellas que se derivan del trabajo experimental y las que se derivan de la adquisición de capacidades y habilidades.

Se ha evidenciado que dentro del amplio espectro de las biomoléculas que se han utilizado en la funcionalización dispositivos CNTFETs, los receptores celulares ofrecen una novedosa alternativa. Por primera vez hemos demostrado que la funcionalización de los SWCNTs es posible con receptores celulares, proporcionando una gran selectividad al dispositivo CNTFET. Se logra así la obtención de un CNTFET capaz de reconocer diversas concentraciones de bisfenol A (BFA) en presencia de compuestos que pueden actuar como interferentes. Esta investigación puede ser el punto de partida para futuras funcionalizaciones de SWCNTs con otros receptores celulares en CNTFETs.

Con el dispositivo sensor desarrollado se ha logrado no sólo la detección de un analito de bajo peso molecular, complementando la mayoría de los CNTFETs descritos hasta la fecha, sino que de igual forma se ha logrado la detección a niveles pM del BFA, muy por debajo de los límites de detección en agua alcanzados por otros métodos de detección y por debajo de la dosis de referencia para el hombre planteada por la Agencia Americana de Protección Ambiental (US-EPA) de 50 µg/kg al día (0.22×10^{-6} M).

Con el CNTFET desarrollado se obtiene respuesta en la detección del BFA con muy bajos tiempos de análisis de hasta 0.5 minutos, aunque los resultados que se han reportado han sido los obtenidos con 2 minutos de

análisis, con el fin de asegurar el tiempo necesario para la reacción de reconocimiento RE- α - BFA.

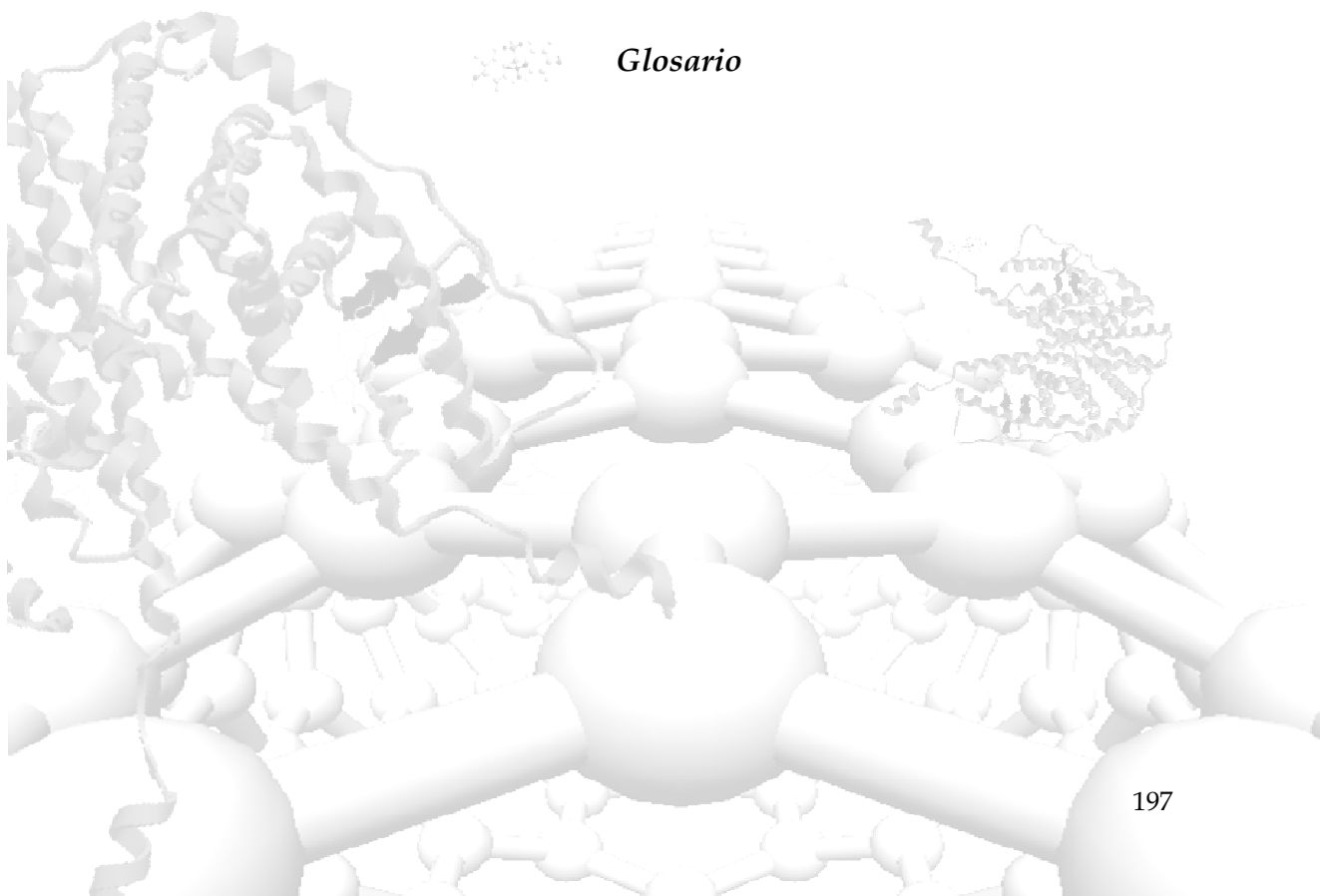
Se han analizado los avances sobre la detección de compuestos xenobióticos que han tenido lugar gracias al uso de nanoestructuras en dispositivos utilizados en el desarrollo de inmunoensayos, electrodos y biosensores, entre otros. Se ha observado que el uso de dichas nanoestructuras ha permitido, en muchos casos, la mejora de los límites de detección, así como de la selectividad y tiempos de análisis. Así mismo, los costos son más bajos que en los análisis utilizando muchas otras técnicas tradicionales empleadas hasta el momento con el mismo propósito.

La realización de la presente tesis me ha permitido no sólo llevar a cabo la ejecución del proyecto de investigación, sino la adquisición de conocimientos en el campo de la Química Analítica y, más específicamente, en el de la Nanociencia y Nanotecnología y en los avances que gracias a ellas se vienen desarrollando actualmente. Asimismo, el cumplimiento de los objetivos científicos propuestos se complementa con las competencias transversales adquiridas, entre las que encontramos como más destacadas: la capacidad de evaluar y sistematizar bibliografía concerniente al campo de investigación que se esta realizando, lo que me permitió el desarrollo de habilidades y destrezas tanto en la búsqueda de información pertinente como en la evaluación crítica de la misma, permitiéndome no solo la comprensión de una serie de conceptos y terminología sino la capacidad de discernir y seleccionar la información útil al trabajo que he venido adelantando. También he adquirido la capacidad de expresar y dar a conocer los resultados de forma oral y escrita. Finalmente, al formar parte

de un equipo de investigación, me ha permitido aprender a trabajar y colaborar en grupo.

ANEXOS

Glosario



A continuación se presentan las abreviaturas utilizadas con mayor frecuencia en esta tesis, incluyéndose los términos originales en inglés.

Abreviatura	Significado
A	Amperio
aa	Aminoácido
Å	Angstrom (10^{-10} m)
AFM	Microscopio de fuerza atómica (<i>atomic force microscope</i>)
BC	Banda de conducción
BV	Banda de valencia
BFA	Bisfenol A
BS	Barrera de Schottky
CNTs	Nanotubos de carbono (<i>carbon nanotubes</i>)
CNTFETs	Transistor de efecto campo basado en nanotubos de carbono (<i>carbon nanotube field effect transistor</i>)
CVD	Deposición química en fase de vapor (<i>chemical vapour deposition</i>)
D	Electrodo drenador (<i>drain</i>)
1D	Unidimensional
DBD	Dominio de unión al ADN (<i>DNA-binding domain</i>)
E_F	Nivel de Fermi
ESEM	Microscopio electrónico de barrido ambiental (<i>environmental scanning electron microscope</i>)

FET	Transistor de efecto campo (<i>field effect transistor</i>)
G	Electrodo puerta (<i>gate</i>)
GA	Glutaraldehído
GOx	Glucosa oxidasa
GCE	electrodo de carbón vítreo (<i>glassy carbon electrode,</i>)
I	Intensidad de corriente eléctrica
I _{SD}	Intensidad de corriente que circula entre los electrodos fuente y drenador
I _{SG}	Intensidad de corriente que circula entre los electrodos fuente y puerta
kDa	Kilodalton
LBD	Dominio de unión al ligando (<i>ligand-binding domain</i>)
MWCNTs	Nanotubos de carbono de múltiples capas (<i>multi walled carbon nanotubes</i>)
nm	Nanómetro (10 ⁻⁹ m)
PBS	Tampón fosfato salino
PBSTG	0.05% de Tween 20 y 0.8% de gelatina en PBS
PEI	Polietilenimina
pM	Picomolar (10 ⁻¹² M)
ppm	Partes por millón
RE-α	Receptor de estrógeno α
RE-β	Receptor de estrógeno β
r.p.m.	Revoluciones por minuto

S	Electrodo fuente (<i>source</i>)
SWCNTs	Nanotubos de carbono de única capa (<i>Single walled carbon nanotubes</i>)
V	Voltio
V_G	Voltaje o potencial eléctrico aplicado entre el electrodo puerta y fuente de un FET
V_{SD}	Voltaje o potencial eléctrico aplicado entre los electrodos fuente y drenador de un FET
μm	Micrómetro (10^{-6} m)
Ω	Ohmio