# Detección de la COVID-19 con biosensores basados en transistores de grafeno Detection of COVID-19 disease using graphene-based biosensors

Francisco Gámiz, Carlos Sampedro, Carlos Navarro, Norberto Salazar, Luca Donetti, Carlos Márquez, José Luis Padilla, Cristina Medina, José Carlos Galdón

Laboratorio Singular de Nanoelectrónica, Grafeno y Materiales Bidimensionales Centro de Investigación en Tecnologías de la Información y de las Comunicaciones (CITIC), Universidad de Granada Email: fgamiz@ugr:es

# Resumen

El grafeno es un material bidimensional formado por una lámina de un átomo de espesor de átomos de carbono unidos mediante enlaces covalentes y distribuidos siguiendo un patrón hexagonal. Esta estructura le proporciona unas propiedades físicas excepcionales, lo que lo hacen un candidato idóneo para la fabricación de biosensores. El laboratorio de Nanoelectrónica, Grafeno y Materiales Bidimensionales de la Universidad de Granada, trabaja en el desarrollo de un dispositivo basado en una matriz de sensores de grafeno para la detección del SARS-COV-2. El sistema de análisis será portátil, autónomo, de fácil manejo, rápido (segundos desde la toma de la muestra al resultado) y ultrasensible para detectar inmunoglobulinas (Igs) frente a la proteína S del SARS-CoV-2.

# Abstract

Graphene is a two-dimensional material made up of a one-atom-thick sheet of carbon atoms joined by covalent bonds in a hexagonal pattern. This structure provides it with exceptional physical properties, making it an ideal candidate to be used in the development of biosensors. The Laboratory of Nanoelectronics, Graphene, and Bidimensional Materials at the University of Granada is working on the development of a device based on an array of graphene sensors for the detection of SARS-COV-2. The analysis system will be portable, autonomous, easy to use, fast, and ultrasensitive for the detection of immunoglobulins (Ig) against the protein S of SARS-CoV-2 virus.

# 1. Introducción

La COVID-19 es una enfermedad infecciosa causada por el virus SARS-CoV-2 [1]. A 1 de Septiembre de 2020, hay más de 25 millones de casos confirmados, cerca de 850.000 fallecidos, y las economías de muchos países seriamente afectadas [2]. Ante la ausencia de tratamientos terapéuticos efectivos, y vacunas eficientes, las pruebas de diagnóstico son la única forma eficiente de rastrear y controlar la propagación del SARS-CoV-2. La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda pruebas diagnósticas masivas a nivel mundial. La demanda de pruebas COVID-19 se estima en más de 600 millones, 120 millones de pruebas genéticas y más de 500 millones de pruebas rápidas, lo que implica una necesidad de soluciones tecnológicas que permitan un acceso rápido y fiable al diagnóstico de COVID-19 en respuesta a la pandemia global.

La técnica estándar de referencia para el diagnóstico fiable de COVID-19 es la RT-qPCR (real time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction) [3], que requiere un tiempo de procesado de 2 a 4 horas y un entorno de laboratorio clínico con personal altamente especializado. Además de las pruebas genéticas, las pruebas serológicas de flujo lateral, llamadas "pruebas rápidas", se están convirtiendo en herramientas centrales en la lucha contra la pandemia. Estas se basan en el reconocimiento antígeno-anticuerpo: los anticuerpos del paciente reconocen las proteínas virales marcadas y proporcionan resultados en varios minutos. Su principal problema es que son cualitativas y sólo informan de la presencia de anticuerpos, lo que indica una infección activa o el haber pasado dicha infección. Existe por lo tanto un "gap" en el diagnóstico de la COVID-19 que es necesario cubrir con sistemas que proporcionen una sensibilidad y precisión equiparables a las RT-gPCR y con tiempos de respuesta y sencillez de manejo de los test rápidos, y que permitan conocer el curso de la enfermedad incluso en periodos prepatentes, y todo ello fuera del entorno de un laboratorio clínico, es decir, en aeropuertos, estaciones de tren y autobuses, colegios, universidades, oficinas, residencias de ancianos, etc.. El Laboratorio de Nanoelectrónica de la Universidad de Granada participa en varias iniciativas cuyo objetivo es el desarrollo de un dispositivo preciso de detección inmunológica para evaluar el estado de la infección de una persona por SARS-CoV-2 utilizando un sistema microfluídico integrado en una matriz de sensores FET de grafeno. El sistema de análisis será portátil, autónomo, de fácil manejo, rápido (segundos desde la toma de la muestra al resultado) y ultrasensible para detectar inmunoglobulinas (lgs) frente a la proteína S del SARS-CoV-2. Específicamente, el dispositivo detectará:

- 1. infección temprana (incluso asintomática) cuantificando anticuerpos en saliva.
- 2. el curso de la infección en la fase aguda y
- 3. la superación de la infección y la potencial inmunización del individuo mediante la determinación de anticuerpos en plasma sanguíneo.

La determinación del estado pre-sintomático de la enfermedad es de vital importancia para controlar la difusión de la misma, ya que en el caso de la COVID-19 una persona podría estar infectada y propagar el virus previo a su sintomatología.

Aunque los biosensores modernos ofrecen una sensibilidad y selectividad notables, el uso de grafeno reduce significativamente el umbral de detección al tiempo que proporciona la capacidad de determinar biomarcadores. simultáneamente múltiples Es necesario disponer de varios sensores funcionalizados de manera diferente en la misma capa de grafeno. Por ello proponemos el desarrollo de un chip microfluídico integrado sobre una matriz de sensores FET de grafeno en cuya superficie se han inmovilizado antígenos recombinantes (aislados y purificados) sensibles a inmunogobulinas.

# 2. Biosensores

Según la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) [4] un biosensor es un dispositivo de medida formado por la integración de tres componentes:

- una molécula bioactiva capaz de reconocer y reaccionar con la sustancia que se pretende analizar (analito);
- un transductor físico-químico íntimamente conectado con la molécula bioactiva y capaz de generar una señal susceptible de ser amplificada cuando se produce la interacción específica con el analito.
- 3. un dispositivo electrónico que amplifica y trata la señal.

La figura 1 esquematiza el funcionamiento de un biosensor. El receptor bioactivo interacciona específicamente con las moléculas de analito para las que está diseñado. Como consecuencia de esta interacción se produce una señal eléctrica en el transductor. Las características más destacables de estos dispositivos, que los convierten en opciones altamente atractivas como herramientas analíticas, son: su especificidad, alta sensibilidad, capacidad de respuesta que conduce a un corto tiempo de análisis, su capacidad de inclusión en sistemas integrados, facilidad de automatización, capacidad de trabajar en tiempo real, su versatilidad y bajo coste, entre otras. Por tales motivos, los biosensores han recibido especial atención durante los últimos años. Actualmente el desarrollo de biosensores compromete a diferentes campos de investigación que convergen en tres líneas fundamentales:

- 1. elementos de reconocimiento molecular,
- 2. herramientas y técnicas para su construcción y
- 3. diseño de dispositivos sensores básicos.

Como elementos de reconocimiento se han utilizado numerosos instrumentos biológicos como las enzimas, anticuerpos, cadenas de ácidos nucleicos (ADN) y proteínas. Las cada vez más consolidadas técnicas de microfabricación, incluidas las de fabricación a nanoescala, han abierto un panorama de gran porvenir para el desarrollo y aplicación de los biosensores, dada la reducción de costes que la miniaturización conlleva y la posibilidad de producirlos a gran escala. Si además estos biosensores se integran en una plataforma microelectrónica integrada CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor) su procesamiento posterior es mucho más sencillo, lo que incide en bajos costes, alta fiabilidad y rendimiento en el proceso de integración y fabricación, alta integración, lo que a su vez permite su uso lejos de centros hospitalarios (Laboratory-on-Chip, Point-of-care).



17

# 3. Grafeno: qué es y cómo se obtiene.

Las propiedades físicas de los materiales dependen de los átomos que los constituyen y del tipo de enlace químico que se produce entre esos átomos. De hecho, existen en la naturaleza diferentes materiales sólidos cristalinos, con exactamente la misma composición química, pero en los que los átomos que los constituyen se unen de forma distinta, lo que les confiere propiedades distintas. Son los denominados alótropos. El carbono, que es el cuarto material en abundancia en el universo y el guinceavo en la corteza terrestre, presenta diferentes formas alótropas siendo el diamante y el grafito las más abundantes. A pesar de ser químicamente la misma sustancia, carbono puro, las propiedades físicas de ambos materiales son completamente diferentes. El diamante que une sus cuatro electrones de valencia mediante fuertes enlaces covalentes con otros cuatro átomos de carbono siguiendo una estructura cubica centrada en las caras y denominada estructura del diamante, es el material más duro de la corteza terrestre (10 en la escala de Mohs) es transparente y aislante eléctrico. Por el contrario, el grafito es un material opaco, muy blando (de 1 a 2 en la escala de Mohs) y buen conductor eléctrico. A diferencia del diamante, en el grafito los átomos de carbono solo utilizan tres de sus electrones de valencia para formar enlaces covalentes con otros átomos de carbono en el mismo plano, disponiéndose éstos en una estructura plana hexagonal o de "panel de abeja" en la que cada átomo de carbono ocupa un vértice del hexágono base. El apilamiento de estos planos mediante fuerzas de van der Waals, mucho más débiles que los enlaces atómicos, da lugar a la estructura del grafito, y a sus propiedades. Las débiles fuerzas de van der Waals hacen que el grafito se exfolie fácilmente, es decir, se descomponga en capas ó láminas, bajo una pequeña presión, propiedad que se utiliza desde la el siglo XVI para escribir, y que le ha dado el nombre al material (el término grafito deriva del griego γραφειν (grafein) que significa "escribir"). La figura 2 muestra las estructuras cristalinas del diamante y el grafito:



Figura 2. Estructuras cristalinas del diamante y el grafito. Figure 2. Crystalline structure of diamond and grafite.

Precisamente cada una de estas capas de un solo átomo de espesor se conocen con el nombre de grafeno y aunque se conocía teóricamente desde los años 50 [5], durante muchos años se consideró que era imposible obtenerlo de forma aislada pues se creía que como película monoatómica sería termodinámicamente inestable. Sin embargo, en el año 2004, en el laboratorio de los profesores Andre Geim y Konstantin Novoselov en la Universidad de Manchester en el Reino Unido se consiguió aislar experimentalmente por primera vez una lámina monoatómica de grafeno a partir de la exfoliación mecánica de grafito pirolítico altamente orientado (2004) [6]. Este descubrimiento les valió a Geim y Novoselov el premio Nobel de Física en 2010 [7]. En un experimento poco convencional, Geim y Novoselov utilizaron una estructura de grafito tridimensional a la que mediante una cinta adhesiva fueron despegando láminas de grafeno. Recursivamente aplicaron la misma técnica a la parte adherida a la cinta adhesiva hasta quedarse únicamente con una capa de un átomo de espesor que colocaron sobre un substrato de  $SiO_2/Si$ . De esta forma no sólo demostraron que era posible aislar una capa bidimensional de un solo átomo de espesor, sino que además, aplicando una tensión al substrato de silicio, demostraron que era posible modular la conductividad de la lámina de grafeno por efecto del campo eléctrico transversal generado.

Precisamente esta estructura hexagonal bidimensional de un solo átomo de espesor, también conocida como "honeycomb" o panel de abeja, le confiere al grafeno unas propiedades físicas espectaculares, tanto estructurales como eléctricas, ópticas y térmicas. El grafeno es un material muy resistente, flexible y transparente con excelentes propiedades conductoras tanto térmicas cómo eléctricas. Es alrededor de 200 veces más resistente que el acero, más duro que el diamante, tan ligero como las fibras de carbono, pero aún más flexibles

que éstas, tan denso que ni el helio puede penetrarlo y conduce la electricidad mejor que el cobre. El grafeno es un material muy ligero: una lámina de un metro cuadrado pesa tan sólo 0,77 miligramos, y con un gramo podríamos cubrir completamente la superficie de un estadio de fútbol. La movilidad de los portadores de carga en el grafeno es extremadamente alta lo que lo hace un material con una conductividad eléctrica excepcional. Es químicamente estable y sus propiedades eléctricas son muy sensibles a su entorno, que pueden modificarse mediante la aplicación de campos eléctricos o con la colocación de especias cargadas próximas a su superficie. Precisamente gracias a esta última propiedad, el grafeno puede emplearse como canal en dispositivos de efecto campo (Field-Effect transistors, FET) [6] . Un transistor de efecto campo es un dispositivo electrónico en el que la conductividad de un trozo

de material llamado canal (en este caso grafeno) y que contacta a dos zonas de alta concentración de portadores de carga (drenador (drain), y fuente (source) generalmente metales como cromo (Cr) y oro (Au)) puede modificarse significativamente dependiendo del valor de un campo eléctrico externo aplicado y que se controla con la tensión aplicada a un terminal denominado puerta y que se acopla capacitivamente al grafeno mediante un aislante (SiO<sub>2</sub>) o una solución electrolítica (Figura 3) [8], [9].



**Figura 3.** (a)Transistor de efecto campo de grafeno (GFET) con puerta posterior. (b) Transistor GFET con puerta de electrolito.

**Figure 3.** (a) Graphene Filed Effect transistor with back gate. (b) Graphene FET with liquid gate.

Las figuras 3-a y 3-b muestran un esquema de un transistor FET de grafeno: sobre un substrato de SiO<sub>2</sub>/Si se depositan los contactos metálicos (Cr/Au) de drenador y fuente, y entre estos se coloca la monocapa de grafeno. Si se aplica una diferencia de tensión entre los contactos de drenador y fuente, se establece entre ellos una corriente eléctrica,

corriente de drenador,  $I_D$ , cuyo valor depende de la tensión aplicada al terminal de control, o puerta (Gate). Las características eléctricas (curva  $I_D-V_G$ ) del transistor FET de grafeno presentan un claro comportamiento ambipolar. En equilibrio, es decir, sin tensión aplicada, se obtiene el mínimo de corriente, también conocido como punto de Dirac [10].



**Figura 4.** (a) Características eléctricas del transistor FET de grafeno (b) Desplazamiento de las características eléctricas del transistor FET de grafeno al colocar cargas en su superficie.

**Figure 4.** (a) Electrical characteristic of a GFET. (b) Drift of I-V curves in a GFET after the deposition of charges in the surface of the graphene.

Aplicando una tensión positiva a la puerta, aumenta la concentración de electrones (portadores de carga negativa) que son los responsables de la conducción, y aumentando por tanto la corriente. Cuando se aplica una tensión negativa a la puerta, se produce un aumento de huecos (carga positiva) en el grafeno, que son ahora los responsables de la conducción de corriente. De esta forma, la curva característica corriente/tensión (I/V) tiene forma de valle, de ahí el comportamiento ambipolar (Figura 4-a). Además, la posición del punto de Dirac en un transistor FET de grafeno puede controlarse mediante la adición de cargas eléctricas en la superficie del grafeno. La presencia de cargas positivas en la superficie desplaza el punto de Dirac hacia tensiones negativas, mientras que la presencia de cargas negativas en la superficie del grafeno desplaza el punto de Dirac hacia tensiones positivas (Figura 4.b). Este último resultado será clave para la utilización de transistores de efecto campo de grafeno como biosensores.

#### Obtención de grafeno

A pesar de sus excelentes propiedades, a día de hoy existe la problemática de no haber encontrado un método económico y escalable, que permita obtener muestras de grafeno de tamaño lo suficientemente grande como para poder ser usado a nivel industrial.



#### Escalabilidad

Figura 5. Métodos de obtención de grafeno. Figure 5. Methods of growth os graphene.

Por este motivo, en la actualidad existe un amplio abanico de técnicas para producir grafeno, las cuales suelen agruparse en técnicas "top-down", cuando se obtienen estructuras de espesor nanométrico a partir de un material de mayores dimensiones (método de exfoliación mecánica), o "bottom-up", en los que se parte de los átomos de carbono, generalmente en forma gaseosa, generados mediante la descomposición de moléculas orgánicas, para formar la estructura del grafeno (métodos de crecimiento epitaxial, deposición química de vapor o síntesis química).

#### a) Exfoliación mecánica

La exfoliación mecánica se refiere al proceso en el que se utiliza la fuerza mecánica para separar las capas de grafeno del grafito. Esto implica bien utilizar una cinta adhesiva para fijar la superficie del grafito y el uso de la fuerza para despegar la cinta junto a las capas de grafeno que se han quedado adheridas a la misma, o frotar la superficie del grafito contra otro material para desprender las láminas de grafeno del volumen. Este método es posible gracias al débil acoplamiento de tipo van der Waals entre las capas de grafeno que constituyen el grafito. La facilidad de producción y el bajo coste en el instrumental requerido, hacen que la exfoliación del grafito sea la técnica más generalizada para preparar el grafeno [11]. La exfoliación micromecánica con cinta adhesiva es fácil y rápida, y proporciona grandes láminas de grafeno (varias micras) de alta calidad que son útiles para diversos estudios a nivel de laboratorio (usando esta técnica, Geim y Novoselov consiguieron obtener, de forma fiable y reproducible, películas de grafeno de pocas capas con tamaños de hasta 10 µm y espesores de menos de 10 nm). El principal inconveniente de esta técnica es que no proporciona

el suficiente rendimiento de producción para su uso en aplicaciones que no sean exclusivamente experimentales. Además, la pureza del material a menudo se ve afectada, ya que pueden aparecer restos de agentes exfoliantes y se pueden introducir varios tipos de defectos, como defectos atómicos, arrugas, u ondulaciones microscópicas, debido a las tensiones inducidas en la capa de grafeno durante la deposición sobre el sustrato final.

# b) Crecimiento epitaxial

La epitaxia utiliza la estructura atómica de un sustrato cristalino para sustentar el crecimiento de un material depositado sobre éste. En el caso del crecimiento epitaxial de grafeno se utiliza carburo de silicio (SiC) como substrato. Tras un proceso de calentamiento a temperaturas muy elevadas, alrededor de los 1200°C, y en condiciones de ultra alto vacío (UHV), se produce la sublimación de los átomos de silicio de las capas superiores, dejando atrás los átomos de carbono del SiC que se reordenan para formar algunas capas de grafeno sobre la superficie [12]. El número de capas puede controlarse limitando el tiempo o la temperatura en la etapa de calentamiento. La calidad y el número de capas en las muestras también dependen de la cara de SiC utilizada para su crecimiento: la superficie terminada en carbono produce pocas capas, pero estas tienen una baja conductividad, mientras que la superficie terminada en silicio produce varias capas de grafeno pero con conductividad movilidad. Los valores de conductividad medidos en el grafeno epitaxial son inferiores a los medidos en el grafeno exfoliado [13]. Se ha comprobado que las películas de grafeno preparadas en UHV exhiben una morfología rugosa y muestran áreas de diferentes grosores, que potencialmente podrían ser responsables de la disminución de la movilidad registrada para estas películas.

#### c) Deposición química en fase de vapor (CVD)

Una de las técnicas más populares para la síntesis a gran escala de películas de grafeno es la deposición química de vapor (CVD) sobre superficies de metal, debido a su bajo coste, reproductibilidad y razonablemente alta calidad de producción [14]. A diferencia de las láminas disgregadas aleatoriamente que se obtienen en los métodos de exfoliación, el crecimiento por CVD produce grandes superficies de grafeno continuas y uniformes, aunque no necesariamente monocristalina. Aunque históricamente, la formación de las capas de grafito a partir del procesado de metales de transición y la exposición a fuentes de carbono en forma de hidrocarburos o de carbono evaporado se conoce desde hace más de 50 años [15], el actual interés sobre este material ha llevado a una renovada tendencia por obtener láminas de grafeno con un número de capas controlado, sobre varios tipos de sustratos de metal (Ni, Co, Ru, Ir, Re, Pt, Pa y Cu entre otros) mediante esta técnica de deposición.



**Figura 6.** Esquema de crecimiento de grafeno por el método CVD. 1 y 2) Horno CVD en el laboratorio de Nanoelectrónica de la UGR; 3) Sustrato de cobre; 4) Introducción del sustrato de cobre en el tubo de cuarzo; 5) Reducción de la superficie del cobre y crecimiento de grafeno; 6) Eliminación del substrato de cobre mediante ataque químico con cloruro férrico; 7) Enjuague de la lámina de grafeno en agua desionizada; 8) Transferencia sobre substrato PET (tereftalano de polietileno); 9) Resultado final.

Figure 6. Growth of Graphene by CVD method. 1 and 2) CVD furnace at Nanoelectronics Laboratory at UGR; 3) copper foil; 4) Introduction of copper foil inside the quartz tube; 5) Reduction of copper surface and graphene growth; 6) Etching of copper foil by chemical attack; 7) Rinse of graphene in de-ionized water 8) Transfer of graphene to PET (polyethylene terephthalate); 9) Final result.

Para el crecimiento CVD se introduce en un horno de cuarzo una delgada lámina policristalina de un metal (generalmente Cu o Ni) y se calienta a una temperatura en el rango de 950 a  $1050^{\circ}$ C generalmente a baja presión y en un ambiente rico en hidrógeno y argón para producir la reducción de la superficie del metal y eliminar el posible óxido que pudiese encontrarse en la misma. Una vez alcanzada la temperatura y realizado el "annealing" se introduce la fuente gaseosa de carbono, habitualmente metano, CH<sub>4</sub> o acetileno C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>.

El crecimiento del grafeno es consecuencia de la descomposición catalítica y la posterior segregación o adsorción de átomos de carbono, durante las etapas de calentamiento y enfriamiento del substrato metaestable catalizador como es el caso del substrato de cobre empleado. El potencial catalítico de los metales de transición, surge de que estos proporcionan fases de baja energía para llevar a cabo las reacciones, cambiando los estados de oxidación fácilmente o mediante la formación de compuestos intermedios que pueden absorber y activar el medio de reacción. Una vez que el carbono se ha descompuesto, este puede ser absorbido por el metal y luego precipitar para formar grafeno en su superficie.

Una vez obtenido el grafeno sobre el substrato metálico, el paso siguiente es la separación del grafeno del substrato, operación que puede realizarse mediante diferentes métodos desde el ataque químico y disolución del metal, hasta el "peeling" electroquímico ó mecánico [16].

Después de la separación del grafeno del substrato metálico, éste se transferiere a otros sustratos, proporcionando capas de grafeno de alta calidad sin tratamientos mecánicos o químicos complicados, y sobre el que puede fabricar dispositivos electrónicos utilizando técnicas de fabricación de la industria microelectrónica.

# d) Reducción de óxido de grafeno

El término "óxido de grafeno", es el nombre que se da al grafeno que ha sido tratado por un fuerte oxidante para alterar la naturaleza cristalina de su red atómica incorporando grupos funcionales epóxido e hidróxilo. En la actualidad, la síntesis química del óxido de grafeno a partir del grafito, ha surgido como una ruta viable para producir láminas de grafeno a gran escala [17]. Por lo general, el óxido de grafito se sintetiza a través de la oxidación del grafito, basándose en el método de Hummers [18], en el que se utilizan oxidantes como el ácido sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), el ácido nítrico concentrado (HNO<sub>3</sub>) y el permanganato potásico (KMnO<sub>4</sub>). La reacción sólo tarda 2 horas en completarse y la temperatura no sobrepasa los 45°C, minimizando la posibilidad de explosión durante el proceso. Comparado con el grafito prístino, el óxido de grafeno está fuertemente oxigenado, portando grupos funcionales hidroxilo (-OH) y epóxido (C-O-C) en el plano basal de los átomos de carbono de hibridación sp3, además

de los grupos carboxilo (COOH) situados en los bordes de la lámina de hibridación sp2 del carbono. Estos grupos funcionales proporcionan una amplia variedad de reacciones de modificación de superficie para desarrollar materiales basados en óxido de grafeno funcionalizado, lo que abre nuevas vías para la combinación del grafeno con otros materiales y superficies para mejorar su aplicabilidad. Sin embargo, debido a la alteración de la estructura electrónica provocada por estos grupos funcionales, el óxido de grafeno contiene defectos y desordenes irreversibles que degradan sus propiedades eléctricas haciéndolo eléctricamente aislante, aunque su posterior reducción, puede restaurar parcialmente la conductividad, pero a valores siempre por debajo de los del grafeno prístino [19]. Esto hace que este método sea menos atractivo, en comparación con la exfoliación mecánica, para aplicaciones que sean muy estrictas en cuanto a los requisitos de calidad del cristal. Una vez que el grafito ha sido oxidado, este puede exfoliarse ya sea por sonicación o por una agitación prolongada en agua, produciendo una dispersión homogénea e indefinidamente estable que consiste principalmente en láminas de una sola capa (óxido de grafeno). La naturaleza hidrófila del óxido de grafeno implica que las moléculas de agua se pueden intercalar fácilmente en el óxido de grafito, provocando la separación interlaminar. Además, las cargas superficiales en el óxido de grafeno son altamente negativas cuando se dispersa en agua, debido a la ionización del ácido carboxílico y los grupos hidroxilo fenólicos [20], provocando una repulsión electrostática que evita que los coloides de óxido de grafeno se re-agreguen. Finalmente, el óxido de grafeno puede ser depositado como una película fina sobre casi cualquier superficie, y convertirse a grafeno (u óxido de grafeno reducido) por métodos químicos que suponen el uso de agentes reductores como la hidracina (N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) [19] o el

borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>) [21], ácido L-ascórbico [22], o por tratamientos térmicos o fototérmicos mediante láser [23]. Este método presenta cuatro ventajas fundamentales frente a los procedimientos de reducción química:

- Permite controlar la eficiencia de reducción a través de la potencia fototérmica aplicada con el láser. Las variables de control son la potencia del láser, la longitud de onda del láser y la velocidad de excursión del haz sobre la superficie de la muestra.
- El láser controlado por una unidad de control numérico (CNC) permite realizar patrones litográficos directamente, sin necesidad de un proceso litográfico posterior o el uso de máscaras. La resolución viene determinada por el sistema de posicionamiento del láser.
- Es un procedimiento económico (sólo es necesario invertir inicialmente en la adquisición de los equipos láser).
- 4. Es un procedimiento ecológico (frente a otras aproximaciones que requieren del uso de reactivos que provocan reacciones altamente exotérmicas como la hidrazina).

En la Figura 7.b se muestra una fotografía de un equipo de reducción láser de baja potencia. La Figura 7.c presenta un ejemplo de muestra de óxido de grafeno, con motivos litográficos en forma de cuadrado de 1cm x1cm de óxido de grafeno reducido a potencias de láser crecientes. A medida que la potencia del láser aumenta, el óxido de grafeno va perdiendo su transparencia tornándose oscuro, consecuencia de la recuperación de las estructuras grafíticas. El procedimiento de reducción láser permite modular la conductividad de la muestra directamente a través de la potencia fototérmica de forma muy precisa.



**Figura 7.** (a) Esquema del proceso de reducción laser; de izquierda a derecha: lámina de óxido de grafeno presentando grupos funcionales; proceso de reducción fototérmico láser; óxido de grafeno reducido una vez eliminados los grupos funcionales. (b) Detalle de unas de las unidades de control numérico (CNC) con una cabeza láser. (c) Detalle de una muestra de óxido de grafeno con motivos cuadrados de 1cm<sup>2</sup> de óxido de grafeno reducido obtenidos a potencias láser crecientes.

**Figure 7.** (a) (a) Illustration of GO reduction with laser diode irradiation; from left to right: layer of graphene oxide with a large amount of functional groups; the functional groups are broken during the reduction process for obtaining the partial restoration of the graphene layers, although some defects remain in the structure (right). (b) Image of the experimental setup based on a numerical control unit with interchangeable laser head. (c) An example of 1 cmx1cm rGO samples on a PET substrate reduced at increasing laser power intensities.

La modulación de la conductividad permitirá crear zonas aislantes que constituyan la pasivación de los circuitos (óxido de grafeno sin reducir), y zonas conductoras que pueden formar las líneas de conducción o los electrodos (óxido de grafeno completamente reducido). Todo ello bajo un mismo proceso litográfico cuya resolución viene determinada por el sistema de control numérico del láser. Este procedimiento ya se ha mostrado efectivo para la fabricación de circuitos eléctricos pasivos básicos como estructuras condensadores y filtros (Figura 7.c). Al realizarse el proceso de reducción y la fotolitrografía en el sustrato final que soporta el circuito, no son necesarios los procesos de transferencia que pueden degradar las características eléctricas. Además, el sustrato final puede ser flexible como el ejemplo de la Figura 7.c en el que se ha empleado un sustrato de tereftalano de polietileno (PET).

# 4. Biosensores basados en transistores de grafeno

Como se mencionó anteriormente, la posición del punto de Dirac en un transistor FET de grafeno puede controlarse mediante la adición de cargas eléctricas en la superficie del grafeno. La presencia de cargas positivas en la superficie desplaza el punto de Dirac hacia tensiones negativas, mientras que la presencia de cargas negativas en la superficie del grafeno desplaza el punto de Dirac hacia tensiones positivas (Figura 4.b). Las biomoléculas (DNA, microRNA, proteínas, antígenos, anticuerpos, etc.) cuando se fijan a la superficie del grafeno quedan cargadas positiva o negativamente [24], resultando en el desplazamiento del punto de Dirac. Por lo tanto, se pueden detectar proteínas e iones mediante desplazamientos del punto de Dirac en transistores FET de grafeno [25].

De esta forma, se han desarrollado biosensores basados en GFETs mediante la fijación de biomoléculas diana sobre la superficie del grafeno. Por ejemplo, Chen et al. [26] han desarrollado un método rápido para la detección de la Escherichia Coli usando un FET de óxido de grafeno reducido. Kim et al. [27] han desarrollado un GFET para detectar un biomarcador de cáncer de próstata a nivel femtomolar. Ohno et al. [28] usaron un GFET con puerta de electrolito para la detección de la adsorción de proteínas sobre la superficie del grafeno sin ninguna funcionalización de grafeno. Li et al. [29] construyeron un GFET con puerta líquida sobre grafeno CVD para detección de DNA sin etiquetas (label-free DNA). La superficie de grafeno se funcionalizó con sondas de DNA para la detección del DNA diana complementario con un límite muy bajo de detección (1pM).

Recientemente, Cai et al. [30] han desarrollado un biosensor GFET a partir de óxido de grafeno reducido que permite la detección de DNA en concentraciones tan bajas como100fM, un orden de magnitud inferior a los límites reportados en biosensores

GFET de DNA previos. La reducción en el límite de detección se consigue gracias a la utilización de PNA (ácido peptidonucleico) como sonda de captura para funcionalizar la superficie del grafeno, en vez de utilizar DNA. La detección se realiza a través de la hibridación PNA-DNA que resulta en un efecto dopante tipo p sobre el grafeno. Además, estos autores han demostrado que la respuesta del biosensor es altamente especifica ya que la hibridación del PNA con DNA no complementario, o DNA con un error en una base, no produce respuesta alguna del sensor. Estos mismos autores, han conseguido reducir el límite de detección a 10fM, en este caso de microRNAs, usando grafeno decorado con nanopartículas de oro sobre las que fijan las sondas de PNA. Las partículas de oro actúan como amplificadoras de la respuesta biológica [31].

Hay muchas ventajas al usar FETs de grafeno como biosensores frente a los biosensores basados en semiconductores convencionales, nanotubos de carbono o nanohilos de silicio. La sensibilidad a cambios de carga del FET de grafeno es grande debido a que la razón área superficial/volumen del grafeno es mayor que en dispositivos de volumen. Para detectar las moléculas en una solución, los biosensores tienen que estar sumergidos en ellas. En el caso de materiales semiconductores convencionales como Si y GaAs, es necesario depositar una película de pasivación para evitar la oxidación, puesto que estos materiales se oxidan fácilmente en una solución sometidos a una tensión pequeña. Por otro lado, el grafeno no se oxida fácilmente, y por lo tanto los transistores FET de grafeno pueden usarse en una solución sin pasivación alguna. Los niveles de corriente que pueden medirse en un FET de grafeno pueden ser más de 1000 veces mayor que la corriente de un nanotubo de carbono (CNT). En consecuencia, la relación señal ruido en un GFET es mucho mayor que la que se puede obtener en CNT-FETs.

Usando transistores FET de grafeno fabricados en el Laboratorio de Nanoelectrónica, Grafeno y Materiales Bidimensionales de la Universidad de Granada, se está desarrollando un sistema de diagnóstico de COVID-19, con la financiación de la Junta de Andalucía y el Fondo Supera COVID de la CRUE y el Banco de Santander. Este proyecto es fruto de una colaboración con el grupo de Bioquímica y Parasitología Molecular, del Instituto de Biotecnología de la UGR, dirigido por el Prof. Antonio Osuna, y con el grupo de Glicoquímica y Biocojugación del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Granada dirigido por el Prof. Francisco Santoyo.

El dispositivo consiste en una matriz de sensores de grafeno (varios sensores fabricados simultáneamente sobre el mismo substrato y actuando sobre la misma muestra a analizar) con un sistema microfluídico que distribuye la muestra sobre los distintos sensores. El sistema consta de un pequeño chip donde se fabrican los sensores, y donde se depositará la muestra del paciente a analizar. Este chip, que es desechable y de bajo coste, se inserta en un equipo electrónico portátil y autónomo que realiza la medida eléctrica de los sensores y proporciona el valor de la concentración de anticuerpos en saliva o plasma del paciente, de forma muy rápida a partir de la determinación de la corriente del transistor GFET.



**Figura 8.** Esquema de funcionamiento de un biosensor de grafeno para detección de anticuerpos de COVID-19 **Figure 8.** Functional diagram of a graphene biosensor for detection of COVID-19 antibodies

El esquema de funcionamiento del sistema de detección se resume en la Figura 8. El primer paso consiste en la fabricación del transistor FET de grafeno usando técnicas microelectrónicas. Se deposita la lámina de grafeno obtenido bien por CVD, bien por reducción de óxido de grafeno, sobre un substrato que puede ser SiO<sub>2</sub>/Si, cuarzo, o incluso un substrato flexible como algún polímero. continuación, se depositan los contactos А metálicos de drenador y fuente sobre el grafeno. Una vez fabricado el transistor el siguiente paso es la modificación de la superficie del grafeno con los bio-receptores, en nuestro caso, proteínas del virus, sintetizadas y aisladas en los laboratorios de la UGR y que son reconocibles por los anticuerpos que queremos detectar. Este proceso se conoce con el nombre de funcionalización de la superficie del grafeno. Una vez funcionalizado el transistor se recubre la superficie del grafeno con una solución líquida electrolítica y un electrodo metálico (Ag/AgCI) que constituirán el electrodo de control del GFET. La medida de la corriente en el dispositivo entre drenador y fuente cuando se aplica una pequeña tensión constante al drenador, mientras se varia la tensión del electrodo de control nos proporciona la característica curva I-V en forma de "V" de donde se obtiene el punto de mínima conductividad o punto de Dirac (curva de control). A continuación, se añade a la solución electrolítica la muestra del paciente a analizar. En este momento pueden ocurrir dos casos:

a. La muestra del paciente contiene los anticuerpos frente al virus SARS-COV-2 (representados por las esferas en la figura). En este caso, se produce la reacción antígeno-anticuerpo ya que los bioreceptores inmovilizados en la superficie del grafeno son específicos para estos anticuerpos. Como consecuencia de esta reacción antígenoanticuerpo, se modifica la carga eléctrica en la superficie de grafeno, y en consecuencia se produce un desplazamiento del punto de Dirac,  $\Delta V$ , que además es proporcional a la cantidad de anticuerpos de la muestra analizada.

b. Por el contrario, si la muestra analizada no contiene anticuerpos específicos frente al virus SARS-COV-2 (puede contener otros anticuerpos, representados con triángulos en la figura) no se produce la reacción antígeno-anticuerpo, y por lo tanto no se modifica la carga en la superficie de grafeno, por lo que, al medir el sensor, obtenemos una curva I-V similar a la curva de control, y sin ningún desplazamiento apreciable del punto de Dirac. De esta forma, y con una simple medida eléctrica en un dispositivo portátil puede cuantificarse la concentración de anticuerpos frente al SARS-COV-2 de la muestra analizada.

# 5. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por la Junta de Andalucía (proyecto CV20-36685) y el Fondo Supera COVID19 de la CRUE-Banco Santander (Proyecto DRAINCOV).

# Bibliografía

<sup>[1]</sup> Rothan, H. A., & Byrareddy, S. N., «The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak» *Journal of autoimmunity*, vol. 109, n° 5, p. 102433, 2020.

<sup>[2]</sup> Johns Hopkins University, «Coronavirus Resource Center» 1 Septiembre 2020. [En línea]. Available: https:// coronavirus.jhu.edu/map.html <sup>[3]</sup> Gibson, U. E., Heid, C. A., & Williams, P. M., «A novel method for real time quantitative RT-PCR» *Genome research*, vol. 6, nº 10, pp. 995-1001, 1996.

<sup>[4]</sup> Turner, A.P.F., Karube, I., Wilson, G.S., Biosensors: Fundamentals and Applications, Oxford: Oxford University Press, 1987.

<sup>[5]</sup> Wallace, P. R., «The band theory of graphite» *Physical review*, vol. 71, n<sup>o</sup> 9, p. 622, 1947.

<sup>[6]</sup> Novoselov, K. S., Geim, A. K., Morozov, S. V., Jiang, D., Zhang, Y., Dubonos, S. V., ... & Firsov, A. A, «Electric field effect in atomically thin carbon films» *science*, vol. 306, n° 5696, pp. 666-669, 2004.

<sup>[7]</sup> Dresselhaus, M. S., & Araujo, P. T., «Perspectives on the 2010 nobel prize in physics for graphene» *ACS Nano*, vol. 4, nº 11, pp. 6297-6302, 2010.

<sup>[8]</sup> Millman,J., Halkias, C.C., Electronic Devices and Circuits, International Student Edition, New York: McGraw-Hill, 1967.

<sup>[9]</sup> Reddy, D., Register L.F., Carpenter, G.D., Banerjee, S.K., «Graphene field-effect transistors» *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 44, n<sup>o</sup> 31, p. 313001, 2011.

<sup>[10]</sup> Kedzierski, J., Hsu, P. L., Healey, P., Wyatt, P. W., Keast, C. L., Sprinkle, M., ... & De Heer, W. A. , «Epitaxial graphene transistors on SiC substrates» *IEEE Transactions on Electron Devices*, vol. 55, n° 8, pp. 2078-2085, 2008.

<sup>[11]</sup> A. A. Green and M. C. Hersam, «Emerging methods for producing monodisperse graphene dispersions» *Journal of Physical Chemistry Letters*, vol. 1, n° 2, pp. 544-554, 2010.

<sup>[12]</sup> C. Berger, Z. Song, X. Li, X. Wu, N. Brown, C. Naud, D. Mayou, T. Li, J. Hass, A. N. Marchenkov, E. H. Conrad, P. N. First, and W. A. de Heer, «Electronic confinement and coherence in patterned epitaxial graphene» *Science*, vol. 312, nº 5, pp. 1191-1196, 2006.

<sup>[13]</sup> G. Gu, S. Nie, R. M. Feenstra, R. P. Devaty, W. J. Choyke, W. K. Chan, and M. G. Kane, «Field effect in epitaxial graphene on a silicon carbide substrate» *Applied Physics Letters*, vol. 90, pp. 1-3, 2007.

<sup>[14]</sup> L. Gao, G.X. Ni, B. Liu, A.H. Neto, K.P. Loh, « Face-toface transfer of wafer-scale graphene films» *Nature*, vol. 505, pp. 190-194, 2014.

<sup>[15]</sup> C. Mattevi, H. Kim, and M. Chhowalla, «A review of chemical vapour deposition of graphene on copper» *Journal of Materials Chemistry*, vol. 21, pp. 3324-3334, 2011.

<sup>[16]</sup> Ma, L. P., Ren, W., & Cheng, H. M., «Transfer methods of graphene from metal substrates: a review» *Small Methods*, vol. 3, nº 7, p. 1900049., 2019.

<sup>[17]</sup> C. Gomez-Navarro, R. T. Weitz, A. M. Bittner, M. Scolari, A. Mews, M. Burghard, and K. Kern, «Electronic transport properties of individual chemically reduced graphene oxide sheets» *Nano Letters*, vol. 7, nº 11, pp. 3499-3503, 2007.

<sup>[18]</sup> J. William S. Hummers and R. E. Offeman, , «Preparation of Graphitic Oxide» *J. Am. Chem. Soc*, vol. 80, n<sup>o</sup> 6, p. 1339, 1958.

<sup>[19]</sup> S. Stankovich, D. A. Dikin, R. D. Piner, K. A. Kohlhaas, A. Kleinhammes, Y. Jia, Y. Wu, S. T. Nguyen, and R. S. Ruo, «Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide» *Carbon*, vol. 45, n<sup>o</sup> 3, pp. 1558-1565, 2007.

<sup>[20]</sup> D. Li, M. B. Muller, S. Gilje, R. B. Kaner, and G. G. Wallace, «Processable aqueous dispersions of graphene

nanosheets» Nature nanotechnology, vol. 3, nº 1, pp. 101-105, 2008.

<sup>[21]</sup> A. B. Bourlinos, D. Gournis, D. Petridis, T. Szabo, A. Szeri, and I. Dekany, «Graphite oxide: Chemical reduction to graphite and surface modi\_cation with primary aliphatic amines and amino acids» *Langmuir*, vol. 19, n<sup>o</sup> 6, pp. 6050-6055, 2003.

<sup>[22]</sup> Zhang, J., Yang, H., Shen, G., Cheng, P., Zhang, J., & Guo, S., «Reduction of graphene oxide via L-ascorbic acid» *Chemical Communications*, vol. 46, n° 7, pp. 1112-1114, 2010.

<sup>[23]</sup> C. Marquez, N. Rodriguez, R. Ruiz, F. Gamiz, «Electrical characterization and conductivity optimization of laser reduced graphene oxide on insulator using point-contact methods» *Royal Society of Chemistry Advances*, vol. 6, p. 46231, 2016.

<sup>[24]</sup> Lin, C. T., Loan, P. T. K., Chen, T. Y., Liu, K. K., Chen, C. H., Wei, K. H., & Li, L. J., «Label-Free Electrical Detection of DNA Hybridization on Graphene using Hall Effect Measurements: Revisiting the Sensing Mechanism» *Advanced Functional Materials*, vol. 23, n<sup>o</sup> 18, pp. 2301-2307, 2013.

<sup>[25]</sup> Georgakilas, G., Otyepka, M., Athanasios, M., Chandra, V., Kim, N., Kemp, N., Hobza, P., Zboril, K.S. Kim,, «Functionalization of graphene: covalent and noncovalent approaches, derivatives and applications» *Chem. Rev.*, vol. 112, p. 6156–6214, 2012.

<sup>[26]</sup> Chang, J., Mao, S., Zhang, Y., Cui, S., Zhou, G., Wu, X., Yang, C. H., Chen, J., «Ultrasonic-Assisted Self-Assembly of Monolayer Graphene Oxide for Rapid Detection of Escherichia coli Bacteria» *Nanoscale*, vol. 5, p. 3620– 3626., 2013.

<sup>[27]</sup> Kim, D. J., Sohn, I. Y., Jung, J. H., Yoon, O. J., Lee, N. E., Park, J. S., «Reduced Graphene Oxide Field-Effect Transistor for Label-Free Femtomolar Protein Detection» *Biosens. Bioelectron*, vol. 41, p. 621–626, 2013.

<sup>[28]</sup> Ohno, Y., Maehashi, K., Yamashiro, Y., Matsumoto, K., «Electrolyte-Gated Graphene Field-Effect Transistors for Detecting pH and Protein Adsorption» *Nano Lett,* vol. 9, p. 3318–3322., 2009.

<sup>[29]</sup> Chen, T. Y., Loan, P. T., Hsu, C. L., Lee, Y. H., Tse-Wei Wang, J., Wei, K. H., Lin, C. T., Li, L. J., «Label-Free Detection of DNA Hybridization Using Transistors Based on CVD Grown Graphene» *Biosens. Bioelectron*, vol. 41, pp. 103-109, 2013.

<sup>[30]</sup> Cai, B., Wang, S., Huang, L., Ning, Y., Zhang, Z., & Zhang, G. J., «Ultrasensitive label-free detection of PNA– DNA hybridization by reduced graphene oxide field-effect transistor biosensor» *ACS nano*, vol. 8, n° 3, pp. 2632-2638, 2014.

<sup>[31]</sup> «Cai, B., Huang, L., Zhang, H., Sun, Z., Zhang, Z., & Zhang, G. J. (2015). Gold nanoparticles-decorated graphene field-effect transistor biosensor for femtomolar MicroRNA detection» *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 74, pp. 329-334, 2015.