



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial

Desarrollo de un biosensor nanofotónico de prolactina
basado en grafeno

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ingeniería Biomédica

AUTOR/A: Zafra Blázquez, Eva

Tutor/a: Martínez Abietar, Alejandro José

Cotutor/a: Pinilla Cienfuegos, Elena

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIERÍA
INDUSTRIAL VALENCIA

TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

Desarrollo de un biosensor nanofotónico de Prolactina basado en grafeno

AUTORA: Eva Zafra Blázquez

COTUTORES: Elena Pinilla Cienfuegos y Alejandro Martínez Abiétar

Curso Académico: 2021-2022

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a mi tutor Alejandro por confiar en mí y darme la oportunidad realizar mi Trabajo de Fin de Grado en el NTC. Pero sobre todo a Elena. Gracias por guiarme durante todo el proyecto, por tu entusiasmo a la hora de trabajar y enseñar y por el compromiso que has tenido desde el primer hasta el último día. Me siento muy afortunada por haberte tenido de tutora.

Por último, quiero agradecer a mi familia y compañeras de piso por el apoyo incondicional durante todo este tiempo.

RESUMEN

Los sensores fotónicos son un tipo de dispositivo que utilizan la interacción de la luz con la materia en sus distintas formas para detectar y cuantificar la presencia de moléculas. Las ventajas que presentan frente a los dispositivos convencionales es que son capaces de detectar diferentes analitos, poseen una alta especificidad y sensibilidad, trabajan a tiempo real y son más rápidos. Otra de las ventajas es que son de tamaño compacto y con simplemente un receptor y un transductor óptico se puede obtener una señal.

Uno de los materiales utilizado para la fabricación de este tipo de dispositivos es el grafeno, ya que gracias a su estructura molecular presenta una serie de propiedades entre las que se encuentra el sensado de moléculas en una concentración muy baja. Por otra parte, la molécula utilizada para el desarrollo de este sensor será la prolactina, debido a que es una biomolécula que está presente en diversos procesos fisiológicos y actualmente hay escasos métodos de detección de dicha molécula a excepción de un análisis de sangre.

Con todo ello, en este trabajo se pretende desarrollar un biosensor nanofotónico basado en grafeno, el cual sea capaz de detectar la presencia de prolactina en pequeñas cantidades. Se trata de un nanochip basado en nanoestructuras de silicio con una monocapa de grafeno funcionalizada que permitirá, con una sola gota de sangre y en escasos minutos, la detección de anticuerpos de la prolactina, permitiendo la monitorización de prolactina evitando la extracción de sangre.

ABSTRACT

Optical sensors are devices that use the interaction of light with matter to detect and quantify the presence of molecules. Their advantages over conventional devices are that they are capable of detecting different analytes, have high specificity and sensitivity, work in real time and are faster. Another advantage is that they are compact in size and with just a receiver and an optical transducer a signal can be obtained.

One of the materials used to design this type of device is graphene, since thanks to its molecular structure it has a series of properties, among which is the sensing of molecules in a very low concentration. On the other hand, the molecule used for the development of this sensor will be prolactin, because it is a biomolecule that is present in various physiological processes and there are currently few detection methods for this molecule except for a blood test.

With all this, in this work we intend to develop a nanophotonic biosensor based on graphene, which is capable of detecting the presence of prolactin in small quantities. It is a nanochip based on silicon nanostructures with a functionalized graphene monolayer that will allow, with a single drop of blood and in a few minutes, the detection of prolactin antibodies, allowing the monitoring of prolactin avoiding the extraction of blood.

RESUM

Els sensors fotònics són un tipus de dispositiu que utilitzen la interacció de la llum amb la matèria en les seues diferents formes per a detectar i quantificar la presència de molècules. Els avantatges que presenten enfront dels dispositius convencionals és que són capaços de detectar diferents anàlits, posseeixen una alta especificitat i sensibilitat, treballen a temps real i són més ràpids. Una altra dels avantatges és que són de grandària compacta i amb simplement un receptor i un transductor òptic es pot obtenir un senyal.

Un dels materials utilitzat per a la fabricació d'aquesta mena de dispositius és el grafé, ja que gràcies a la seua estructura molecular presenta una sèrie de propietats entre les quals es troba el sensat de molècules en una concentració molt baixa. D'altra banda, la molècula utilitzada per al desenvolupament d'aquest sensor serà la prolactina, pel fet que és una biomolècula que és present en diversos processos fisiològics i actualment hi ha escassos mètodes de detecció d'aquesta molècula a excepció d'una anàlisi de sang.

Amb tot això, en aquest treball es pretén desenvolupar un biosensor nanofotònic basat en grafé, el qual siga capaç de detectar la presència de prolactina en xicotetes quantitats. Es tracta d'un nanochip basat en nanoestructures de silici amb una monocapa de grafé funcionalitzada que permetrà, amb una sola gota de sang i en escassos minuts, la detecció d'anticossos de la prolactina, permetent el monitoratge de prolactina evitant l'extracció de sang.

ÍNDICE

DOCUMENTOS CONTENIDOS EN EL TFG

- Documento Memoria
- Documento Presupuesto

CONTENIDO DE LA MEMORIA

1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. GRAFENO	14
1.1.1. <i>Estructura electrónica</i>	14
1.1.2. <i>Transferencia de grafeno</i>	15
1.2. ESPECTROSCOPIA RAMAN MEJORADA EN LA SUPERFICIE (SERS)	17
1.3. PROLACTINA	20
2. ESTADO DEL ARTE	21
2.1. ELECTRODO MODIFICADO CON NANO COMPOSITE DE PARTÍCULAS DE ORO Y CARBONO.....	22
2.2. INMUNOSENSOR ELECTROQUÍMICO PARA LA DETECCIÓN DE PROLACTINA	22
3. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	24
3.1. OBJETIVOS	24
3.2. PLAN DE TRABAJO.....	24
4. MATERIALES Y MÉTODOS	26
4.1. FABRICACIÓN DE SUSTRATOS DIELECTRICOS	26
4.2. TRANSFERENCIA DE GRAFENO A SUSTRATOS DIELECTRICOS	27
4.2.1. <i>Transferencia de grafeno mediante scotch tape a la oblea de silicio</i>	27
4.2.2. <i>Transferencia mediante scotch tape a los discos</i>	27
4.2.3. <i>Transferencia de monocapa de grafeno en película de polímero</i>	28
4.3. FUNCIONALIZACIÓN DE GRAFENO CON PBASE	29
4.4. INMOVILIZACIÓN DE ANTICUERPOS EN EL DISPOSITIVO NANOFOTÓNICO.....	31
4.5. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN.....	31
4.5.1. <i>Microscopía óptica</i>	31
4.5.2. <i>Espectroscopía RAMAN</i>	32
4.5.3. <i>Microscopía de fuerzas atómicas (AFM)</i>	33
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
5.1. OBJETIVO 1. EXFOLIACIÓN DE GRAFENO MEDIANTE EL MÉTODO SCOTCH TAPE Y FUNCIONALIZACIÓN CON PBASE.....	35
5.1.1. <i>Deposición del grafeno mediante el método Scotch tape sobre la oblea</i>	35
5.1.2. <i>Funcionalización del grafeno sobre la oblea con PBASE</i>	39
5.2. OBJETIVO 2. TRANSFERENCIA DEL GRAFENO EXFOLIADO MECÁNICAMENTE AL DISPOSITIVO NANOFOTÓNICO (DISCOS DE SILICIO).....	43
5.2.1. <i>Caracterización de los discos de silicio para verificar que se produce el efecto SERS</i> ..	43
5.2.2. <i>Transferencia del grafeno exfoliado mecánicamente a los discos de silicio</i>	46

5.3.	OBJETIVO 3. FUNCIONALIZACIÓN DE LA MONOCAPA DE GRAFENO TRANSFERIDA AL DISPOSITIVO NANOFOTÓNICO (DISCOS EN SILICIO) CON PBASE Y POSTERIORMENTE CON LOS ANTICUERPOS DE LA PROLACTINA	48
5.3.1.	<i>Caracterización de los discos de silicio</i>	48
5.3.2.	<i>Transferencia de la monocapa de grafeno sobre la película de polímero en la oblea de SiO2</i>	51
5.3.3.	<i>Funcionalización del grafeno sobre la oblea con PBASE.....</i>	55
5.3.4.	<i>Funcionalización del complejo grafeno + PBASE con el anticuerpo monoclonal.....</i>	58
6.	CONCLUSIONES	66
7.	LINEAS FUTURAS.....	68
8.	REFERENCIAS	69

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1. ESTRUCTURA DEL GRAFENO [8].....	14
FIGURA 1.2. ORBITALES DEL GRAFENO. FIGURA ADAPTADA DE [10].....	14
FIGURA 1.3. RELACIÓN DE DISPERSIÓN $E(k)$ PARA UN ELECTRÓN DEL GRAFENO. LAS BANDAS DE VALENCIA Y CONDUCCIÓN SE TOCAN EN LOS PUNTOS DEL ESPACIO RECÍPROCO DENOTADOS K Y K' . A LA DERECHA APARECE UNA AMPLIFICACIÓN DE LOS ALREDEDORES DE K , INDICÁNDOSE LA ENERGÍA DE FERMI [11].....	15
FIGURA 1.4. DIAGRAMA DE NIVELES DE ENERGÍA DE LOS ESTADOS EN LA DISPERSIÓN RAMAN	18
FIGURA 1.5. PLASMÓN RESONANTE [27].....	19
FIGURA 1.6. ESTRUCTURA DE UN ANTICUERPO TIPO IGG [35].....	20
FIGURA 2.1 CLASIFICACIÓN DE BIOSENSORES ÓPTICOS EN FUNCIÓN DEL TIPO DE INTERACCIÓN QUE SE PRODUZCA ENTRE LA MATERIA Y LA LUZ.....	21
FIGURA 4.1. EXFOLIACIÓN MECÁNICA DEL GRAFENO [42].....	27
FIGURA 4.2. SET-UP ESPECÍFICO DE PARA HACER LA TRANSFERENCIA DE GRAFENO A LOS DISCOS	28
FIGURA 4.3. MONOCAPA DE GRAFENO DE GRAPHENE	29
FIGURA 4.4. ESQUEMA DEL PROCESO DE TRANSFERENCIA DE LA MONOCAPA DE GRAFENO [44].....	29
FIGURA 4.5. ESTRUCTURA MOLECULAR DEL PBASE	30
FIGURA 4.6. ENLACE DE LA MOLÉCULA PBASE CON EL GRAFENO DEPOSITADO EN UNA OBLEA DE SiO_2 ...	30
FIGURA 4.7. ESPECTROS RAMAN DEL GRAFENO (ARRIBA) Y DEL GRAFITO (ABAJO) [47]	32
FIGURA 4.8. BANDA 2D DEL GRAFITO Y DEL GRAFENO [47]	33
FIGURA 5.1. EN LA PARTE DE ARRIBA, BLOQUE DE GRAFITO PIROLÍTICO HOPG USADO PARA EXFOLIAR GRAFENO. EN LA PARTE DE ABAJO, GRAFENO EXFOLIADO EN LA CINTA ADHESIVA.....	35
FIGURA 5.2. IMÁGENES TOMADAS CON EL MICROSCOPIO ÓPTICO DE VARIOS COPOS DE GRAFENO. A) AUMENTO X10 B) AUMENTO X20 C) AUMENTO X50 D) AUMENTO X100.....	36
FIGURA 5.3. ESPECTRO PUNTUAL RAMAN REALIZADO EN LA ZONA DEL COPO DE GRAFENO SEÑALADO EN LA IMAGEN.....	37
FIGURA 5.4. IMÁGENES RAMAN DE LOS PICOS CARACTERÍSTICOS DEL GRAFENO A) PICO D: 1300 cm^{-1} B) PICO G: 1580 cm^{-1} C) PICO 2D: 2700 cm^{-1}	38
FIGURA 5.5. ESPECTROS RAMAN DEL COPO DE GRAFENO INDICADO EN LA IMAGEN SUPERIOR	38
FIGURA 5.6. A) IMAGEN AFM DEL COPO DE GRAFENO. B) TOPOGRAFÍA DEL CORTE INDICADO EN LA IMAGEN A	39
FIGURA 5.7. ESPECTROS RAMAN COMPARATIVOS DEL GRAFENO SIN FUNCIONALIZAR (ROJO), GRAFENO TRAS LA PRIMERA FUNCIONALIZACIÓN (AZUL) Y GRAFENO TRAS LA SEGUNDA FUNCIONALIZACIÓN (VERDE)	41
FIGURA 5.8. ESPECTRO PUNTUAL RAMAN DEL GRAFENO FUNCIONALIZADO CON PBASE.....	41
FIGURA 5.9. IMÁGENES COMPARATIVAS RAMAN DEL COPO A) SIN FUNCIONALIZAR B) TRAS LA PRIMERA FUNCIONALIZACIÓN C) TRAS LA SEGUNDA FUNCIONALIZACIÓN	42
FIGURA 5.10. IMÁGENES DEL COPO TOMADAS CON AFM A) SIN FUNCIONALIZAR B) FUNCIONALIZADO 2 HORAS C) PERFIL DE LOS COPOS EN ROJO SIN FUNCIONALIZAR Y EN VERDE FUNCIONALIZADO.....	43
FIGURA 5.11. IMAGEN TOMADA CON EL MICROSCOPIO ÓPTICO DE LA MATRIZ DE DISCOS COMPUESTA POR 38 FILAS Y 38 COLUMNAS CON UN AUMENTO DE 50X.....	44
FIGURA 5.12. IMÁGENES TOMADAS CON EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (SEM). A) MATRIZ DE DISCOS B) DIMENSIONES DE UN DISCO (DIÁMETRO MEDIO DE 125 nm).....	44
FIGURA 5.13. IMÁGENES RAMAN DE LOS PICOS CARACTERÍSTICOS DEL SILICIO $100 \times 100\ \mu\text{m}$	45
FIGURA 5.14. ESPECTROS RAMAN DE LA MATRIZ DE DISCOS. EN ROJO ESPECTRO TOMADO DENTRO DE UN DISCO Y EN AZUL EL ESPECTRO TOMADO FUERA DE LOS DISCOS QUE SE VE INTENSIFICADO GRACIAS AL EFECTO SERS.....	45

FIGURA 5.15. IMAGEN DE TOPOGRAFÍA DE AFM DE LA MATRIZ DE DISCOS. A) TOPOGRAFÍA B) PERFIL DE LOS DISCOS.	46
FIGURA 5.16. IMÁGENES DE MICROSCOPIO ÓPTICO DEL COPO DE GRAFENO TRANSFERIDO SOBRE UNA MATRIZ DE DISCOS. A) AUMENTO 20X B) AUMENTO 50X C) AUMENTO 100X.....	46
FIGURA 5.17. IMÁGENES RAMAN DE LOS PICOS A) 520 cm^{-1} B) 1580 cm^{-1} C) 2700 cm^{-1}	47
FIGURA 5.18. ESPECTRO RAMAN EN ROJO DEL GRAFENO SOBRE LOS DISCOS Y EN AZUL DEL GRAFENO SOBRE LA MUESTRA	47
FIGURA 5.19. IMÁGENES AFM DEL COPO DE GRAFENO SOBRE LOS DISCOS A) TOPOGRAFÍA 2D B) PERFIL DEL COPO INDICADO EN EL CORTE DE LA FIGURA A C) TOPOGRAFÍA 3D.....	48
FIGURA 5.20. REPRESENTACIÓN DE UNA FILA DE DISCOS DE TODA LA MATRIZ CON LAS DIMENSIONES TEÓRICAS.....	49
FIGURA 5.21. DISPOSICIÓN DE LAS MATRICES DE LOS DISCOS SOBRE LA MUESTRA.....	49
FIGURA 5.22. IMÁGENES AFM DE LOS DISCOS DE SILICIO A) TOPOGRAFÍA B) PERFIL DE LOS DISCOS SEÑALADOS EN LA FIGURA A INDICANDO LA ALTURA DE LOS DISCOS.....	50
FIGURA 5.23. IMÁGENES RAMAN CORRESPONDIENTES CON LOS PICOS CARACTERÍSTICOS DEL SILICIO. A) 520 cm^{-1} B) 950 cm^{-1}	50
FIGURA 5.24. ESPECTROS RAMAN EN AZUL DENTRO DE UN DISCO Y EN ROJO FUERA DEL DISCO	51
FIGURA 5.25. FOTOGRAFÍAS TOMADAS EN LA SALA LIMPIA DE A) MONOCAPA DE GRAFENO PREVIA A LA INMERSIÓN EN EL AGUA ULTRAPURA B) MUESTRA DE LOS DISCOS CON LA MONOCAPA DE GRAFENO	51
FIGURA 5.26. ESQUEMA DE LAS MATRICES DE LOS DISCOS DE SILICIO CON LA MONOCAPA TRANSFERIDA..	52
FIGURA 5.27. IMÁGENES AFM DEL BORDE DE LA LÁMINA DE GRAFENO A) TOPOGRAFÍA DE LA LÁMINA, EN LA ESQUINA SUPERIOR IZQUIERDA ES GRAFENO B) PERFIL DE LA MUESTRA, INDICADO CON UNA LÍNEA AZUL EN LA IMAGEN A.....	52
FIGURA 5.28. ESPECTRO PUNTUAL DE RAMAN TOMADO EN LA MONOCAPA DE GRAFENO.....	53
FIGURA 5.29. IMÁGENES RAMAN DE LOS DISCOS CON LA LÁMINA DE GRAFENO ENCIMA A) PICO 521 cm^{-1} CORRESPONDIENTE AL SILICIO B) PICO 1580 cm^{-1} CORRESPONDIENTE AL PICO G DEL GRAFENO C) PICO 2680 cm^{-1} CORRESPONDIENTE AL PICO 2D DEL GRAFENO.....	53
FIGURA 5.30. ESPECTROS PUNTUALES RAMAN: EN ROJO DENTRO DE UN DISCO Y EN AZUL FUERA DEL DISCO	54
FIGURA 5.31. IMÁGENES AFM DE LA MONOCAPA DE GRAFENO SOBRE LOS DISCOS A) TOPOGRAFÍA B) PERFIL	54
FIGURA 5.32. IMÁGENES RAMAN DE LOS PICOS CARACTERÍSTICOS DEL GRAFENO Y EL SILICIO. A) GRAFENO B) GRAFENO FUNCIONALIZADO CON PBASE.....	55
FIGURA 5.33. ESPECTROS RAMAN TRAS LA FUNCIONALIZACIÓN. EN ROJO DENTRO DE UN DISCO (MÁS INTENSOS GRACIAS AL EFECTO SERS) Y EN AZUL FUERA DE UN DISCO.....	56
FIGURA 5.34. PERFIL DEL BORDE DE LA MONOCAPA DE GRAFENO A) GRAFENO SIN FUNCIONALIZAR B) GRAFENO FUNCIONALIZADO CON PBASE. EN AMBOS PERFILES SE INDICA LA ALTURA DE LA CAPA..	57
FIGURA 5.35. PERFILES OBTENIDOS DE IMÁGENES DE AFM A) DISCOS B) DISCOS DESPUÉS DE LA TRANSFERENCIA DE GRAFENO Y C) DISCOS DESPUÉS DE LA TRANSFERENCIA DE GRAFENO FUNCIONALIZADO CON PBASE. EN TODOS LOS PERFILES SE INDICA LA ALTURA DE LOS DISCOS.....	57
FIGURA 5.36. DEPOSICIÓN DE LA DISOLUCIÓN DEL ANTICUERPO SOBRE EL SUSTRATO	58
FIGURA 5.37. IMÁGENES TOMADAS CON EL MICROSCOPIO ÓPTICO CON UN AUMENTO DE 100X A) GRAFENO B) GRAFENO + PBASE C) GRAFENO + PBASE + AB.....	59
FIGURA 5.38. IMÁGENES RAMAN DE LOS PICOS CARACTERÍSTICOS DEL GRAFENO.....	59
FIGURA 5.39. ESPECTROS PUNTUALES DE LOS DISCOS TRAS LA FUNCIONALIZACIÓN CON EL ANTICUERPO. EN ROJO FUERA DE UN DISCO Y EN AZUL DENTRO DE UN DISCO. EL ESPECTRO DENTRO DEL DISCO MUESTRA LA SEÑAL TÍPICA DE LA CAPA DE GRAFENO GRACIAS AL EFECTO SERS.....	60
FIGURA 5.40. IMAGEN TOMADA CON EL MICROSCOPIO ÓPTICO DE LA MATRIZ DE LOS DISCOS TRAS LA FUNCIONALIZACIÓN. EN NARANJA ESTÁ RODEADO EL DISCO SIN AGLOMERADO DONDE SE TOMÓ UN ESPECTRO PUNTUAL Y EN AMARILLO UN DISCO CON AGLOMERADO.....	60

FIGURA 5.41. ESPECTRO RAMAN SOBRE UN CRISTAL DE PBS. EN VERDE DEL GRAFENO, EN ROJO DEL GRAFENO CON PBASE Y EL AZUL GRAFENO CON PBASE Y ANTICUERPO.	61
FIGURA 5.42. ESPECTROS RAMAN SOBRE UN DISCO CON ANTICUERPO. EN VERDE DEL GRAFENO, EN ROJO DEL GRAFENO CON PBASE Y EN AZUL DEL GRAFENO CON PBASE Y ANTICUERPO SARS-CoV-2.	62
FIGURA 5.43. IMÁGENES AFM DE LA MATRIZ DE DISCOS TRAS LA FUNCIONALIZACIÓN CON EL ANTICUERPO. A) TOPOGRAFÍA B) PERFIL	63
FIGURA 5.44. ESPECTROS PUNTUALES TOMADOS EN UN DISCO TRAS LA INMOVILIZACIÓN DEL ANTICUERPO ANTI-PRL	64
FIGURA 5.45. IMÁGENES RAMAN DE LA MATRIZ DE DISCOS DE LOS PICOS CARACTERÍSTICOS DEL GRAFENO. A) GRAFENO FUNCIONALIZADO CON PBASE B) SUSTRATO TRAS LA INMOVILIZACIÓN DEL ANTICUERPO	65
FIGURA 5.46. ESPECTROS PUNTUALES TOMADOS FUERA Y DENTRO DEL DISCO. EN AZUL FUERA DE LOS DISCOS Y EN ROJO DENTRO DEL DISCO	65

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 3.1. PLAN DE TRABAJO.....	25
TABLA 5.1. PICOS CARACTERÍSTICOS DEL GRAFENO FUNCIONALIZADO CON PBASE [48], [49].	40



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIERÍA
INDUSTRIAL VALENCIA

MEMORIA DEL PROYECTO

Desarrollo de un biosensor nanofotónico para la detección
de prolactina basado en grafeno

1. INTRODUCCIÓN

La prolactina (PRL) es una hormona polipeptídica sintetizada y secretada por la glándula pituitaria situada en la base del cerebro [1]. Esta hormona es producida por hombres y mujeres, que no estén embarazadas, en pequeñas cantidades. No obstante, cuando una mujer está encinta los niveles de prolactina son más altos debido a que esta hormona estimula la producción de leche durante el embarazo [2].

Si bien durante la lactancia unos niveles elevados de prolactina no son indicadores de ninguna patología, si estos niveles altos están presentes en mujeres que no están amamantando o en hombres, pueden ser un indicador de la prolactinoma, un tumor generalmente benigno en la hipófisis [3]. Los prolactinomas son adenomas hipofisarios productores de prolactina. Es el tumor hipofisario secretor más frecuente observado en la clínica, y constituyen aproximadamente el 40% de todos los adenomas hipofisarios. Por lo general el prolactinoma es el motivo principal de la hiperprolactinemia, no obstante, hay otros muchos factores que se han estudiado y confirmado que causan este aumento de la prolactina: el uso de fármacos como estrógenos, antipsicóticos o antidepresivos, patologías de la hipófisis, insuficiencia renal o el estrés [4]. Aunque son tumores de naturaleza benigna, los síntomas son derivados de la hipersecreción hormonal y de la compresión de estructuras vecinas, así como cefalea. Los grandes tumores pueden comprimir el nervio óptico produciendo defectos en el campo visual y también producir síntomas por sangrado intratumoral.

Por otro lado, los niños y adolescentes presentan un mayor riesgo de hiperprolactinemia, probablemente debido a una disminución de receptores relacionada con la edad. El uso de antipsicóticos en niños y adolescentes es necesario para tratar algunos trastornos de la conducta (como el TDHA) pero se asocian a efectos cardiometabólicos y endocrinos. En este sentido, la hiperprolactinemia es un posible efecto secundario de los antipsicóticos y puede producir supresión de la hormona liberadora de gonadotropina e hipogonadismo. Con el aumento del uso de medicamentos psicotrópicos en la población pediátrica, es crucial la realización de una monitorización de su seguridad para proporcionar un análisis informado de riesgo-beneficio en esta población [5].

En relación con la problemática expuesta, monitorizar los niveles de prolactina hoy en día se lleva a cabo mediante un simple análisis de sangre [2]. Esto puede conducir a resultados no del todo concluyentes ya que hay personas a las que el propio pinchazo para la extracción de sangre les supone una situación de estrés, pudiendo esto aumentar los niveles de prolactina y que los resultados se vean alterados. Esto, además, es especialmente sensible en niños.

El presente trabajo tiene como objetivo el **desarrollo de un biosensor basado en grafeno para la detección a tiempo real de la prolactina con la capacidad de detectar concentraciones muy bajas de anticuerpos de la PRL.**

Se trata de un nanochip basado en nanoestructuras de Silicio con una monocapa de grafeno funcionalizada que permitirá, con una sola gota de sangre y en cuestión de minutos, la detección de anticuerpos de la PRL utilizando los últimos avances en nanofotónica, nanofabricación y química de superficies. El dispositivo tendría la capacidad de detectar concentraciones muy bajas de estos anticuerpos en la sangre, permitiendo la monitorización de la PRL sin necesidad de extracción de sangre (tan solo una gota), lo que facilita el diagnóstico y tratamiento de posibles enfermedades derivadas del aumento de la PRL.

El nanodispositivo tiene un gran potencial como herramienta para diagnóstico. Se espera que desarrolle una alta fiabilidad y sensibilidad. Es un dispositivo de bajo coste, que tendría fácil portabilidad, lo que permitiría transportarlo a lugares remotos con dificultades de acceso en hospitales y clínicas médicas.

Por una parte, se implementará la parte fotónica, encargada de transducir un cambio químico en un cambio óptico, la cual estará constituida por un sustrato dieléctrico de silicio basado en el efecto SERS, que se encargará de intensificar la señal de los anticuerpos para hacer posible la detección de cantidades mínimas de muestra. Por otra parte, se realizará la parte química del sensor, la cual consiste en una lámina de grafeno situada sobre el sustrato SERS que será funcionalizada para inmovilizar los anticuerpos específicos sobre la zona sensible de detección.

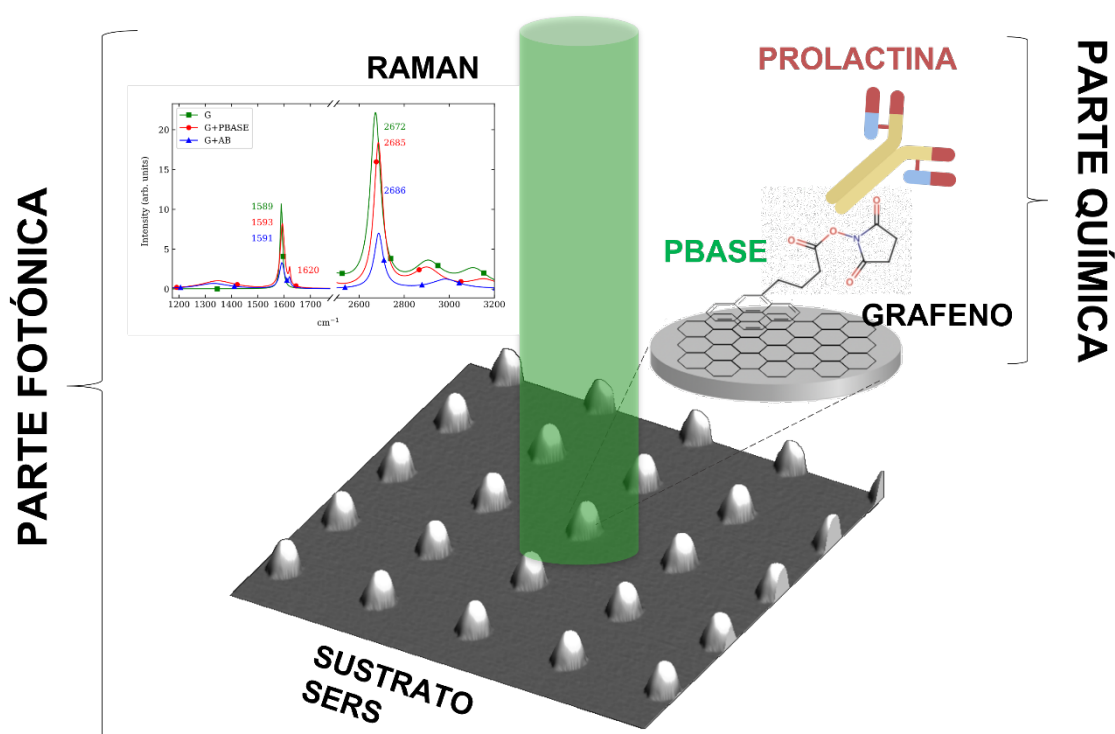


Figura 1.1. Esquema ilustrativo del sensor fotónico

1.1. Grafeno

1.1.1. Estructura electrónica

El grafeno es uno de los materiales más prometedores en el campo de la nanoelectrónica debido a sus exóticas propiedades electrónicas. Este material está conformado por una sola capa de átomos de carbono estructurados en forma de hexaedro donde la distancia entre dos átomos de carbono consecutivos es de aproximadamente 1.42 \AA [6]. En el caso de que hubiera dos capas de grafeno superpuestas y enlazadas mediante interacciones de Van Der Waals, se estaría hablando de grafito (Figura 1.2), el cual, a pesar de estar formado por capas de grafeno, cuenta con unas propiedades distintas al grafeno. Es por esto que al ser un material de dimensiones atómicas es considerado el más fino que existe [7].

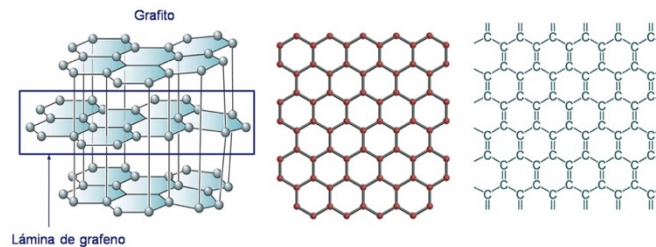


Figura 1.2. Estructura del grafeno [8]

En cuanto a la estructura electrónica del grafeno, cada átomo de carbono cuenta con cuatro electrones de valencia. De esos cuatro, tres de ellos tienen una hibridación sp^2 y forman enlaces covalentes de tipo σ en un mismo plano con un ángulo de 120° (Figura 1.3). El electrón restante está localizado en un orbital perpendicular tipo p , siendo el solapamiento lateral de estos orbitales el responsable de la formación de enlaces tipo π . Por otra parte, los enlaces π del grafeno se encuentran formando un gran orbital molecular, comúnmente conocido como nube π [9].

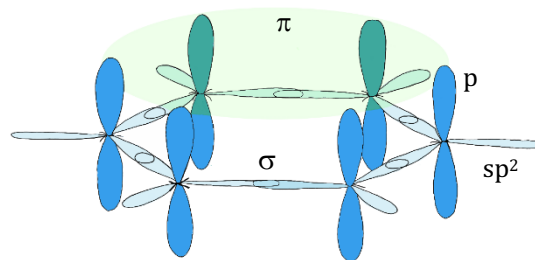


Figura 1.3. Orbitales del grafeno. Figura adaptada de [10]

En la Figura 1.4, se pueden observar los puntos K y K' , conocidos como puntos de Dirac, responsables de la estructura cristalina de este material. Estos puntos determinan las propiedades y estructura electrónicas del grafeno debido a que poseen una estructura de bandas electrónicas un tanto particular, denominada el cono de Dirac (representan los niveles de energía) donde se juntan la banda de valencia y la banda de conducción en un solo punto. La importancia de esto reside en que, si la banda de valencia y la de conducción están solapadas, el material en cuestión se comportaría como un metal. En cambio, si estas bandas están separadas por un gap lo suficientemente pequeño como para que los electrones pasen de una banda a otra se trata de un material semiconductor. [9]. En el caso del grafeno, las bandas se tocan en un solo punto. Por

otra parte, los electrones situados cerca del vértice del cono se conocen como electrones de Dirac y se comportan como partículas sin masa con la capacidad de viajar a una velocidad cercana a la de la luz [6].

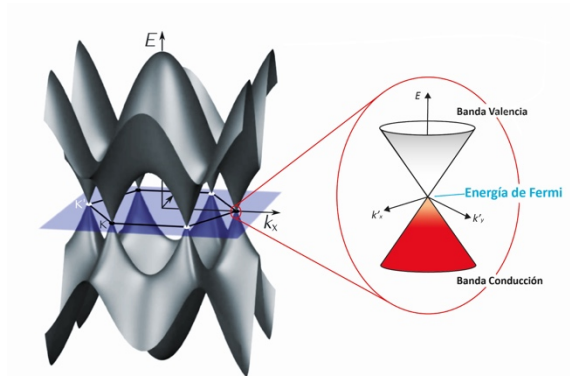


Figura 1.4. Relación de dispersión $E(k)$ para un electrón del grafeno. Las bandas de valencia y conducción se tocan en los puntos del espacio recíproco denotados K y K' . A la derecha aparece una ampliación de los alrededores de K , indicándose la energía de Fermi [11]

La característica disposición de átomos del grafeno lo dota de una serie de propiedades y características que han sido objeto de estudio durante los últimos años. Entre ellas cabe destacar su alta conductividad térmica y eléctrica, su alta dureza, elasticidad y flexibilidad, efecto antibacteriano, no le afectan las radiaciones ionizantes y su capacidad de generar electricidad cuando es expuesto a la luz solar [12].

Centrándonos en el ámbito biomédico, el grafeno cuenta con una multitud de aplicaciones. En primer lugar, es utilizado en sensores para registrar señales electrofisiológicas como las del cerebro o del corazón. La ventaja que proporciona frente a otros sensores es que este material ofrece una **estabilidad química excelente** cuando está sometido a ciertas condiciones fisiológicas. Asimismo, otros de los usos del grafeno en la industria médica es la detección de DNA y la fabricación de implantes empleados en la ingeniería tisular. Por último, una de las aplicaciones con más interés y en la que se ha centrado este trabajo son los sensores de afinidad de grafeno, en los que se usa un receptor inmovilizado en la superficie como por ejemplo un anticuerpo o en enzima para la detección de una biomolécula concreta [13].

1.1.2. Transferencia de grafeno

Las técnicas utilizadas para sintetizar grafeno en la actualidad incluyen cualquier proceso para fabricarlo o extraerlo. Por una parte, el grafeno producido mediante las técnicas ‘top-down’ se produce separando las capas del grafito o de sus derivados. En cambio, las técnicas ‘bottom-up’ a partir de entes de menor tamaño, como por ejemplo moléculas, se sintetiza el grafeno [14]. No obstante, en este trabajo se va a centrar el estudio en las técnicas existentes para transferir grafeno a distintos sustratos ya que dos de los objetivos de este trabajo es la transferencia de grafeno utilizando distintos métodos.

El primer copo de grafeno extraído de un bloque de grafito y transferido a un sustrato, demostró contar con todas las propiedades eléctricas, mecánicas y químicas atribuidas al grafeno monocapa.

No obstante, las dimensiones de este copo eran sumamente pequeñas de manera que apenas se llegó a plantear su uso para aplicaciones prácticas. Sin embargo, los recientes avances en la síntesis de grafeno y técnicas de transferencia han permitido el desarrollo de varias aplicaciones macroscópicas como la fabricación de un electrodo transparente [15].

Exfoliación mecánica

Fueron Geim y Novoselov los primeros en obtener la primera lámina de grafeno aislada se obtuvo por un método denominado Scotch Tape a partir de un pequeño bloque de grafito altamente orientado con cinta adhesiva [16]. Otro procedimiento que se ha llevado a cabo de la mano del equipo de Zhang *et al.* [17] fue anclar un trozo de grafito pirolítico altamente orientado a una punta del cantiléver de un AFM funcionando en modo contacto, de manera que cuando la punta se ponía en contacto con el sustrato, el grafito se iba delaminando quedando capas más finas en el sustrato. Las ventajas de estos dos métodos es que el grafeno obtenido era de alta calidad y su estructura cristalina estaba bien ordenada. Sin embargo, la dimensión lateral de los copos está limitada por unos pocos micrómetros el grosor varía en un rango de entre 10 y 100 nm.

Otros métodos que se han llevado a cabo ha sido el crecimiento epitaxial de grafeno sobre un sustrato en concreto y tras la síntesis de grafeno realizar la transferencia al sustrato de interés. Unarunotai *et al.* [18] tras la obtención del grafeno, realizaron su transferencia al sustrato de interés depositando una capa de PI/Au, lo que facilitó que el grafeno se desprendiera del sustrato inicial. Caldwell y su equipo [19] crecieron de la misma manera el grafeno y a la hora de desprenderlo del sustrato para llevar a cabo su transferencia, se realizó mediante la liberación de la capa con calor. Las ventajas de estos métodos es que, al ser un proceso controlado, el grafeno obtenido es bidimensional. Por el contrario, el grafeno puede verse dopado por alguna sustancia empleada en el proceso de síntesis y perder propiedades intrínsecas al material. Además, existe una alta probabilidad de mostrar defectos en la estructura y esto conlleva una pérdida de sus propiedades electrónicas [15].

Grabado en polímero de soporte y transferencia

Por lo general, la transferencia de grafeno sobre polímeros de soporte se centra en grafeno sintetizado mediante CVD. El sustrato de metal que se usa inicialmente para la síntesis de grafeno se utiliza con propósito catalítico, por lo que normalmente una vez finalizado el crecimiento de grafeno, se busca transferirlo a un sustrato de interés. Dentro de este apartado se pueden hacer dos clasificaciones: transferencia en seco o en presencia de una disolución. Por ejemplo, Kim *et al* [20] crecieron grafeno en níquel depositado sobre silicio mediante CVD y llevaron a cabo la transferencia mediante estos dos métodos. El primer método fue utilizando un sello de PDMS y en presencia de FeCl_3 transferirlo al mismo para poder depositar posteriormente el grafeno en el sustrato de interés. El segundo método que llevaron a cabo para la transferencia fue una vez crecido el grafeno sobre el níquel, sumergir el sustrato en una disolución de ácido fluorhídrico, de manera que el grafeno quedó flotando sobre la disolución, se introdujo la muestra a la disolución y se depositó el grafeno sobre la misma.

Una alternativa al sello de PDMS es el PMMA. Wang *et al.* [21] llevaron a cabo un trabajo en el que, tras haber crecido grafeno sobre una capa de cobre, lo sumergieron en una celda electrolítica donde una disolución de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ cumple la función de electrolito, el conjunto PMMA/grafeno/Cu de ánodo y un carbón vítreo de cátodo. Haciendo uso de las burbujas de hidrógeno producidas, el grafeno junto con el PMMA se despegó cuidadosamente y quedó listo para hacer la transferencia.

Transferencia continua a gran escala

Los métodos explicados anteriormente han sido exitosos a escala de laboratorio. No obstante, aún queda mucho campo por estudiar la producción de grafeno a gran escala. El método ‘roll to roll’ es un procedimiento que se llevó a cabo para transferir una capa de grafeno de unos 70 centímetros de diagonal. El proceso ‘roll to roll’ es un proceso comúnmente utilizado en la industria metálica en la que dos rodillos giran juntos a la vez que se aplica calor y una presión controlada de manera que se va moldeando el material en cuestión. En el caso del grafeno Juang et al. [22] realizaron este procedimiento creciendo grafeno sobre cobre, introduciéndolo en un reactor y aplicando calor se despega el grafeno y se transfiere a un polímero que en este caso es PET. La ventaja de estas técnicas es que son capaces de producir grafeno a gran escala.

En el presente trabajo se utilizará por una parte la exfoliación mecánica de grafito (HOPG) mediante el método Scotch Tape para la obtención de grafeno y su posterior transferencia al sustrato con un set-up micromecánico para la transferencia de monocapas de materiales bidimensionales a dispositivos, disponible en el NTC. Por otra parte, se hará uso de una monocapa de grafeno sintetizada mediante CVD sobre un polímero de soporte que será transferida al sustrato nanofotónico en presencia de una disolución.

1.2. Espectroscopía Raman mejorada en la superficie (SERS)

La espectroscopía RAMAN es una técnica fotónica cuyo objetivo principal es proporcionar información acerca de la estructura química de compuestos orgánicos e inorgánicos. El fundamento de esta técnica reside en la dispersión inelástica de la luz. Cuando un haz de luz monocromática con una frecuencia conocida ν_0 , incide sobre un material se produce una dispersión inelástica de la luz, donde una parte de ella presenta la misma frecuencia ν_0 y no aporta información relevante de la estructura química del compuesto. No obstante, hay una pequeña parte de la luz dispersada, que no presenta la misma longitud de onda ν_0 . Esta luz sí que contiene información acerca de la composición molecular y es conocida como dispersión RAMAN [23]. La frecuencia de los fotones dispersados inelásticamente tiene un valor $\nu = \nu_0 \pm \nu_R$, donde ν_R corresponde con la frecuencia Raman siendo su valor es único para cada material e independiente de la frecuencia de la luz incidente.

Es importante saber que estas variaciones de frecuencias presentes en la dispersión Raman, son análogas a variaciones de energía y se producen debido a los cambios de polarización presentes en la molécula cuando incide sobre ellas un haz de luz. Además, las variaciones de frecuencia producidas son características de cada material. Los átomos que conforman una molécula están sometidos a vibraciones con una frecuencia determinada y a cada movimiento vibracional le corresponde un valor de energía [23].

En la Figura 1.5 se ilustran los diferentes tipos de dispersión cuando la luz interacciona con la materia [23]:

- Dispersión Rayleigh: es una dispersión elástica donde el fotón dispersado posee la misma frecuencia que el fotón incidente debido a que no hay variaciones en los estados energéticos de la molécula.
- Dispersión Raman Stokes: el fotón dispersado tiene una frecuencia menor a la frecuencia del fotón incidente.
- Dispersión Raman anti-Stokes: el fotón dispersado tiene una frecuencia mayor a la frecuencia del fotón incidente.

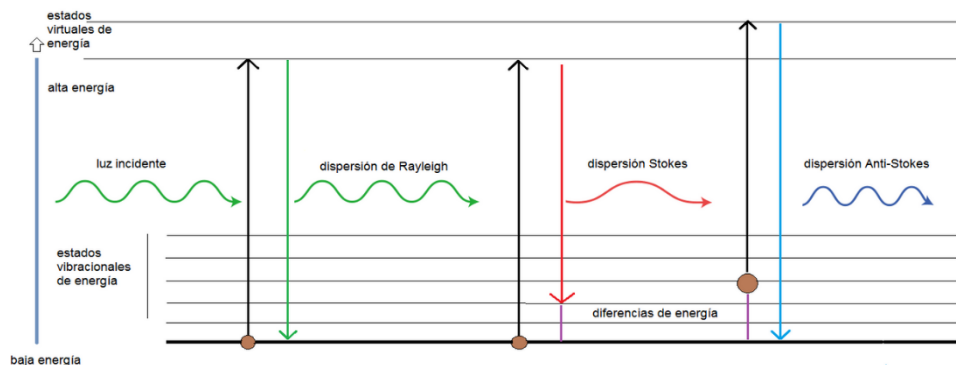


Figura 1.5. Diagrama de niveles de energía de los estados en la dispersión Raman

La principal desventaja de esta técnica es que es un fenómeno sumamente débil, ya que solo un fotón de 10^7 sufre dispersión inelástica. Una posible solución es utilizar fuentes de excitación láser con una luz intensa, pero muchas ocasiones la concentración de la molécula a detectar es baja y la señal RAMAN sigue siendo insuficiente. No obstante, con la aparición de la Espectroscopía Raman de Superficie Mejorada o también conocida como SERS este problema pasó a un segundo plano. En 1976 fue descubierta esta técnica ya que se observó que la señal Raman se veía intensificada si se colocaba la muestra sobre un sustrato rugoso conformado por un metal noble [24].

El **efecto SERS** es un fenómeno que produce un aumento de la señal de RAMAN cuando una molécula está situada sobre de una nanoestructura metálica rugosa específicamente preparada. Los tipos de sustratos utilizados para conseguir el efecto SERS se pueden clasificar de la siguiente manera: sustratos plasmónicos y sustratos no plasmónicos o dieléctricos.

Sustratos plasmónicos

La técnica SERS comúnmente se lleva a cabo mediante sustratos plasmónicos, es decir, nanoestructuras metálicas. Sin embargo, la intensificación de la señal Raman depende en gran medida del metal utilizado, la morfología de las nanoestructuras y el analito a estudiar, entre otras [25]. El mecanismo por el cual se genera una señal de Raman intensificada puede ser explicado mediante dos principios: el químico y el electromagnético. Se va a centrar el estudio en el electromagnético pues es el más aceptado y el más entendido.

Cuando un sustrato metálico nanoestructurado es irradiado con una láser cuya frecuencia es resonante con la frecuencia resultante de la banda de conducción de electrones, se produce una oscilación de los electrones de dicha banda. En regiones concretas denominadas ‘hot spots’ se produce una intensificación del campo cercano lo que genera un dipolo oscilante (Figura 1.6) en las regiones próximas a la nanopartícula y en consecuencia se ve intensificada la eficiencia de la

radiación, dando lugar al fenómeno que se conoce como Resonancia de Plasmón de Superficie Local. No obstante, este tipo de técnicas cuentan con una serie de desventajas como son la dificultad a la hora de reproducir un sustrato y la baja estabilidad del sustrato en el tiempo, ya que muchos sustratos plasmónicos sufren oxidación y como consecuencia pierden la capacidad de producir SERS [26].

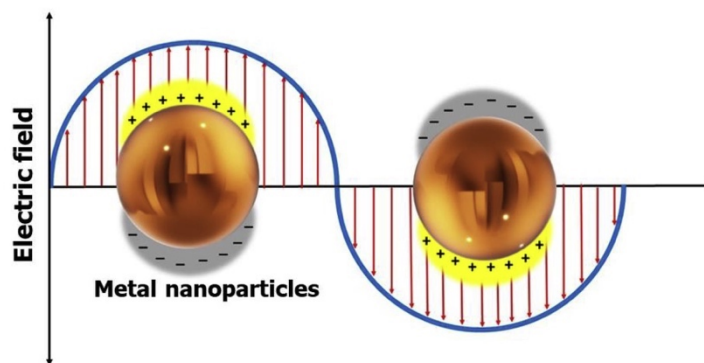


Figura 1.6. Plasmón resonante [27]

Sustratos dieléctricos

Los sustratos no plasmónicos o dieléctricos representan una nueva frontera para la Espectroscopía Raman mejorada de superficie como alternativa a los sustratos convencionales plasmónicos [28].

La interacción de la luz y un sustrato dieléctrico nanoestructurado con un tamaño menor a la longitud de onda de la radiación incidente genera corrientes de desplazamiento y un consecuente campo electromagnético intensificado en el interior de las estructuras. Por otra parte, si se trabaja con frecuencias resonantes, se producen respuestas dipolares eléctricas y magnéticas. Este tipo de respuestas se pueden explicar según la teoría de Mie. [29]. El dipolo magnético correspondiente con la resonancia de Mie de menor energía se produce cuando el campo eléctrico dentro de la nanoestructura produce un circuito circular de corriente alterna semejante al comportamiento de un dipolo magnético. Por otra parte, la resonancia eléctrica, también denominada resonancia de mie de energía más baja produce una distribución de campo eléctrico dipolar en los alrededores de la estructura.

Si la frecuencia de la luz incidente aumenta, aparecen resonancias de orden superior como por ejemplo el momento dipolar toroidal. De esta manera, la interacción entre resonancias magnéticas y dipolares eléctricas produce un estado electromagnético no radiante conocido como anapolo. Cuando se habla de estructuras dieléctricas, la presencia de estos estados anapolares genera una supresión de la radiación de campo lejano así como el aumento en campo cercano gracias al confinamiento del campo eléctrico en el interior de la estructura. [30].

Los materiales utilizados para esta técnica están condicionados por una serie de requisitos como por ejemplo que exhiban un índice de refracción mayor que el medio, siendo los sustratos más utilizados actualmente SiO_2 y CaF_2 o Al_2O_3 [28].

Este fenómeno es una herramienta de gran valor en el ámbito biomédico pues permite la detección de moléculas en cantidades muy bajas, incluso del orden de una sola molécula, con una alta sensibilidad y especificidad molecular.

En el presente trabajo se va a llevar a cabo el desarrollo de un biosensor conformado por sustratos no plasmónicos (o dieléctricos), pues presentan ciertas ventajas frente a los plasmónicos. Los sustratos plasmónicos están condicionados por pérdidas en metales, calentamiento y la reproducibilidad de dichos sustratos, mientras que los dieléctricos no presentan tantas pérdidas.

Los sustratos a utilizar son superficies dieléctricas litografiadas con nanoestructuras, en concreto discos de silicio diseñados para que presenten estructura anapolar y por lo tanto confinen el campo eléctrico de manera muy eficiente. En trabajos previos se ha demostrado el comportamiento SERS de los discos pequeñas biomoléculas [31], [32].

1.3. Prolactina

La prolactina es una proteína de tipo globular conformada por una cadena de 199 aminoácidos y tres puentes de disulfuro. Como se ha mencionado antes, la prolactina es una proteína cuya función principal es la estimulación de producción de leche materna durante la lactancia, de ahí su nombre. No obstante, se ha demostrado que esta proteína posee más de 300 funciones en el cuerpo humano. Cabe destacar que, aunque la mayor parte de esta proteína es producida en la glándula pituitaria, se sabe que hay otros órganos implicados en la producción de esta hormona. Entre ellos se encuentran el cerebro, el endometrio durante la gestación, la placenta, el útero, las glándulas mamarias o el propio sistema inmune [33].

Por otra parte, los anticuerpos o inmunoglobulinas son moléculas presentes en nuestro cuerpo y son producidos por linfocitos tipo B cuando son estimulados por un antígeno. Tienen la capacidad de unirse y atacar a los patógenos que atacan el cuerpo humano, así como para detectar la presencia de una molécula.

En este proyecto se trabajarán con anticuerpos IgG (Figura 1.7) anti-PRL para la detección de la presencia de prolactina. Estos anticuerpos presentan forma de Y, y están conformados por una parte variable la cual se enlaza con el antígeno y de una parte constante común a los anticuerpos del tipo en cuestión [34].

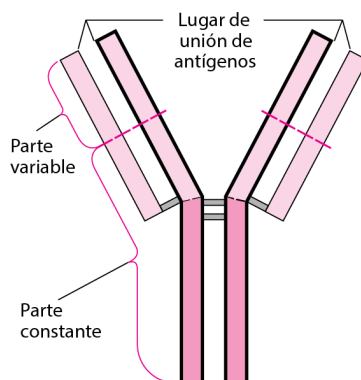


Figura 1.7. Estructura de un anticuerpo tipo IgG [35].

2. ESTADO DEL ARTE

Los biosensores son dispositivos cuya función principal es detectar la presencia de una sustancia, en este caso una biomolécula. Están formados por un componente biológico que trabaja como elemento de reconocimiento. Estos elementos pueden ser tejidos, anticuerpos, proteínas o enzimas y son determinantes para la elección del sistema de transducción [36]. Cuando el analito se enlaza con el elemento de reconocimiento, se produce un cambio en las propiedades ópticas, fisicoquímicas o eléctricas y este cambio generará una señal (Figura 2.1).

Dentro de la clasificación de tipos de biosensores, se va a centrar el análisis en los **sensores ópticos**, pues el sensor propuesto en este trabajo es de tipo óptico, en concreto un sensor basado en la espectroscopía Raman mejorada de superficie. Los sensores ópticos son un tipo de dispositivo que utilizan la interacción de la luz con la materia en sus distintas formas para detectar y cuantificar la presencia de moléculas [37]. Actualmente, la clasificación de los biosensores ópticos se puede llevar a cabo con dos criterios. El primer criterio es si utilizan etiqueta o no y el segundo criterio es según el tipo de interacción que se produce entre la materia y la luz (Figura 2.1). Esta última clasificación engloba sensores basados en la resonancia de plasmón de superficie, en la fluorescencia de onda evanescente o en el efecto SERS.

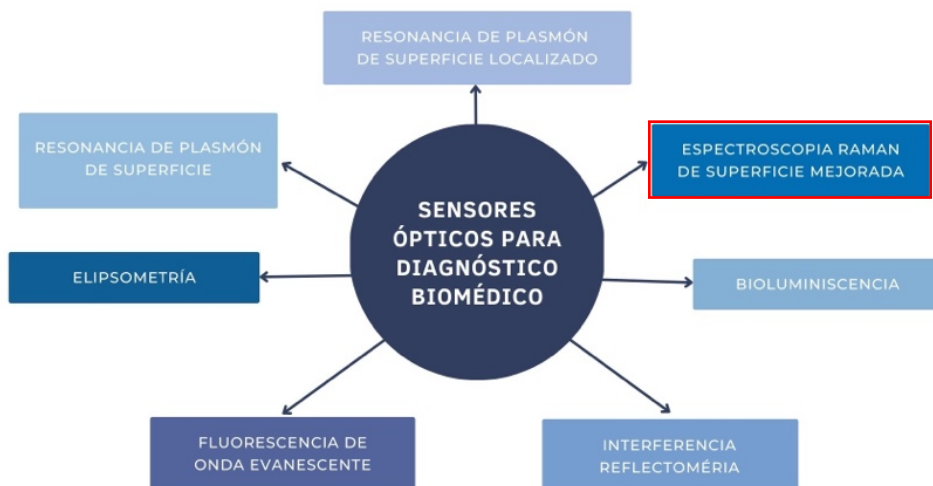


Figura 2.1 Clasificación de biosensores ópticos en función del tipo de interacción que se produzca entre la materia y la luz

En concreto los biosensores ópticos basados en SERS desarrollados en la actualidad han demostrado la optimización de los sustratos nanoestructurados, ya que se tiene evidencia de que la calidad del efecto SERS depende de la geometría de los sustratos. Hoy en día, las aplicaciones que tienen dichos sensores son los ensayos genéticos (llegando a demostrar una mayor sensibilidad que las PCR convencionales), discriminación de células cancerosas y sanas, detección de cáncer colorrectal y cáncer de mama [38].

Las ventajas que presentan frente a los dispositivos convencionales es que son capaces de detectar diferentes analitos, poseen una alta especificidad y sensibilidad, trabajan a tiempo

real y son más rápidos. Otra de las ventajas es que **son de tamaño compacto y con simplemente un receptor y un transductor óptico se puede obtener una señal** [39].

Existen pocos ejemplos en la literatura de sensores basados en grafeno para la detección de la prolactina, en particular existen dos tipos: un electrodo modificado con nano composite de partículas de oro y carbono [40] y un inmunosensor electroquímico para la detección de prolactina [41]. A continuación se va a proceder a un breve análisis de estos sensores:

2.1. Electrodo modificado con nano composite de partículas de oro y carbono

Este biosensor se conforma mediante la deposición de nanotubos de carbono de pared múltiple en un electrodo de carbón vítreo, con el objetivo de modificar la superficie del electrodo, que sea bioestable ya que los nanotubos de carbono favorecen a la bioestabilidad y la adhesión de moléculas. Una vez modificado el electrodo se funcionalizó con PPA (ácido poli (pirrol propiónico)). Para que la prolactina se uniera al electrodo fue inmovilizada con la química de EDC/NHSS. Una vez llevado a cabo este proceso, se realizó un ensayo indirecto competitivo, en el que este electrodo se sumergió en una disolución de prolactina y AP-anti-PRL (anticuerpo de la prolactina).

Por otra parte, se demostró que este sensor se podría utilizar para la detección de prolactina en muestras de orina, ya que la presencia de prolactina en la orina es un síntoma de preclamsia (hipertensión arterial durante el embarazo). En este caso, el límite de detección es de 3 pg mL⁻¹, siendo más bajo de lo esperado y una respuesta lineal a la prolactina entre 10⁻² y 10⁴ ng mL⁻¹.

2.2. Inmunosensor electroquímico para la detección de prolactina

El dispositivo desarrollado en este ensayo es un inmunosensor electroquímico de tipo sándwich. Este tipo de experimento funciona inmovilizando el anticuerpo, en este caso se inmoviliza sobre el electrodo. Cuando se añade la muestra con el antígeno en cuestión, se unirá con otro anticuerpo denominado anticuerpo de captura o anticuerpo secundario. Finalmente, el antígeno se enlazará con el anticuerpo primario y quedará enlazado entre los dos anticuerpos, de ahí el nombre sándwich. Este enlace proporcionará una señal que será proporcional a la cantidad de antígeno detectada.

La fabricación de este sensor se llevó a cabo mediante la deposición de una capa de grafeno sobre un electrodo de carbón vítreo. Para el enlace del anticuerpo primario se depositaron sobre el grafeno partículas de oro mediante electroposición, se bañó el electrodo modificado en una disolución con el anticuerpo primario y se incubó finalmente con BSA (suero bovino). Para la detección de prolactina se incubó el inmunosensor con una disolución del anticuerpo secundario además de la prolactina y luego se depositó en dicha disolución ST-AP, una molécula cuya función es la generación de una señal para la cuantificación de la prolactina en el caso de que esté presente.

El nanocomposite formado por el grafeno y las partículas de oro ofrece un microambiente apropiado para la inmovilización de los anticuerpos primarios, mantiene la actividad biológica de

los mismos además de acelerar la transferencia de electrones entre las proteínas inmovilizadas y el sustrato. El sensor presenta una respuesta lineal a la prolactina entre 100 pgr mL^{-1} y $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ con un límite de detección de $38.9 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Por último, el sensor presenta una reproducibilidad y una especificad alta, lo que hace que sea un buen candidato para la detección de prolactina en pruebas reales.

Como alternativa a estos dispositivos se propone un sensor con la ventaja de la utilización de un sustrato fotónico SERS el cual permitirá la detección de hormona en baja cantidad esperando a aumentar el límite de detección. Asimismo, la química que se desarrollará para la inmovilización del anticuerpo es más sencilla respecto al inmunoensayo electroquímico ya que para llevarlo a cabo se requieren dos tipos de anticuerpo: primario y secundario.

3. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

3.1. Objetivos

En el presente trabajo, el **objetivo principal es el desarrollo de la parte química y la parte fotónica de un biosensor nanofotónico para la detección de la hormona prolactina en tiempo real basado en grafeno.**

Los objetivos específicos son los siguientes:

- O1: Verificar la funcionalización del grafeno exfoliado mecánicamente con 1-pyrenebutanoic acid succinimidyl ester (PBASE) para la posterior inmovilización del anticuerpo monoclonal de la prolactina.
 - O1.1. Exfoliación del grafeno mediante el método de Scotch tape y transferencia sobre la oblea de SiO₂
 - O1.2. Caracterización del grafeno depositado en la oblea
 - O1.3. Funcionalización del grafeno sobre la oblea con PBASE
 - O1.4. Caracterización de la muestra de grafeno sobre el PBASE

- O2: Transferencia del grafeno exfoliado mecánicamente al dispositivo nanofotónico (sustrato SERS basado en discos de silicio) mediante set-up micromecánico.
 - O2.1. Caracterización de los discos de silicio para verificar que se produce el efecto SERS
 - O2.2. Transferencia del grafeno exfoliado mecánicamente a los discos de silicio
 - O2.3. Caracterización del grafeno depositado mecánicamente sobre los discos para la verificación del efecto SERS en los discos en presencia del grafeno.

- O3: Funcionalización de la monocapa de grafeno transferida al dispositivo nanofotónico (discos en silicio) con los anticuerpos de la prolactina
 - O3.1. Transferencia de la monocapa de grafeno sobre la película de polímero en la oblea de SiO₂
 - O3.2. Caracterización del grafeno depositado en la oblea
 - O3.3. Funcionalización del grafeno sobre la oblea con PBASE
 - O3.4. Caracterización de la muestra de grafeno sobre el PBASE
 - O3.5. Inmovilización de anticuerpos en el complejo grafeno + PBASE
 - O3.6. Caracterización de la muestra tras la funcionalización con los anticuerpos monoclonales

3.2. Plan de trabajo

En la Tabla 3.1, se muestra el proceso que se llevará a cabo para el desarrollo del trabajo de manera cronológica. Los primeros meses, desde septiembre a diciembre se realizará un trabajo previo donde se hará una investigación sobre el grafeno, sus propiedades, así como de los sensores basados en grafeno para la detección de prolactina. Además, durante esta etapa recibiré formación para la utilización de el microscopio óptico, la espectroscopía Raman y el AFM (microscopio de

fuerzas atómicas). Asimismo, previo al trabajo a llevar a cabo, aprenderé a localizar y caracterizar copos de grafeno para posteriormente agilizar el proceso durante la etapa experimental.

Tabla 3.1. Plan de trabajo

OBJETIVOS	SEPT-DIC				ENERO				FEBRERO				MARZO				ABRIL				MAYO				JUNIO							
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV				
Trabajo previo																																
O1																																
O1.1																																
O1.2																																
O1.3																																
O1.4																																
O2																																
O2.1																																
O2.2																																
O2.3																																
O3																																
O3.1																																
O3.2																																
O3.3																																
O3.4																																
O3.5																																
O3.6																																
Memoria																																

Durante las primeras cinco semanas, se llevará a cabo el objetivo 1, donde se realizará la transferencia del grafeno exfoliado a una oblea de silicio, y se funcionalizará con PBASE. Las siguientes cinco semanas se dedicarán a la transferencia del grafeno exfoliado a los discos de silicio, correspondiente con el objetivo 2. La consecución del objetivo 3 se realizará durante dos meses y medio, ya que se realizará la transferencia de la monocapa, se funcionalizará y se inmovilizarán los anticuerpos. Finalmente, durante el último mes se empleará para la redacción de la memoria de manera paralela a la finalización de la etapa experimental.

El presente trabajo se ha desarrollado en el NTC, Instituto de Investigación de Nanofotónica de la UPV. En dicho centro, se han llevado a cabo trabajos previos acerca de la optimización de la obtención y funcionalización de grafeno (proyecto GRAFEBIOCOV (AP2020-33), perteneciente al Subprograma para el desarrollo de Proyectos de Innovación UPV/IIS LA FE, colaboración NTC/Hospital Universitari i Politècnic La Fe) y de los sustratos SERS (proyecto europeo THOR (TeraHertz detection enabled by mOlecularR optomechanics), H2020-FETOPEN-2018-2019-2020-01).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Fabricación de sustratos dieléctricos

El proceso a seguir para la obtención de los sustratos de silicio con discos litografiados consta de los siguientes pasos:

- i. **Limpieza de la oblea.** A partir de una oblea de silicio lo primero que se lleva a cabo es una limpieza profunda para evitar la contaminación y la humedad. Con la ayuda de isopropanol y acetona se limpia con el dispositivo *Coater EVG 101* y posteriormente se realiza un tratamiento de plasma de oxígeno con una potencia de 400 W durante un periodo de 5 a 10 minutos en la máquina *Tepla PVA*
- ii. **Deposición de la resina (spin coating).** Haciendo uso de la máquina *Coater EVG 101* tras la limpieza se deposita la resina sobre la oblea. El objetivo es obtener una superficie homogénea y sin defectos sobre el sustrato. Existen dos tipos de resina:
 - **Positivas**, las cuales cuando son expuestas a radiación se rompen sus enlaces químicos. Si se quiere acabar con el sustrato se expone la zona en cuestión, desapareciendo las zonas expuestas.
 - **Negativas**, donde las zonas expuestas fortalecen los enlaces químicos y tras las exposiciones son las que permanecen.

En este trabajo se hará uso de la resina positiva PMMA ya que permite la obtención de diseños de menor tamaño.

- iii. **Curado.** El objetivo del curado es separar el disolvente de la resina para mejorar su adhesión al sustrato. Para ello se utiliza el aparato *Brewer Model 100 CB*.
- iv. **Exposición.** Hay tres métodos para realizar la exposición: litografía óptica, impresión por contacto y la litografía por haz de electrones. En el presente trabajo se hará uso de la litografía por haz de electrones en la cual se utiliza un haz de electrones concentrados con una alta resolución espacial para irradiar la resina y en función de si es positiva o negativa se endurecerá o emblandecerá.
- v. **Revelado.** En este paso la resina menos resistente a la exposición se elimina haciendo uso del mismo dispositivo que en la fase de curado. Para el PMMA se utiliza isopropanol para que se haga aun más líquida
- vi. **Ataque.** Se elimina el silicio de la oblea libre de la máscara tras el revelado. Para ello se hace uso de la máquina RIEICP (Reactive Ion Etching with Inductived Coupling Plasma Source).
- vii. **Eliminación de la resina.** Se elimina la resina resultante tras el proceso de ataque para dejar al descubierto la estructura final fabricada

Para este trabajo el proceso de fabricación se llevará a cabo por el personal técnico especializado del NTC liderado por el Dr. Amadeo Griol, responsable de los procesos de nanofabricación de dispositivos fotónicos. Se parte de una oblea SOI (siglas en inglés: Silicon on Insulator) y lo primero que se lleva a cabo es una reducción de espesor de la misma a 140 nm. Posteriormente se siguió con el proceso de nanolitografía utilizando la litografía por haz de electrones sobre 100 nm de resina la cual será revelada con ayuda de TMAH. Una vez conseguido el ancho de separación de los discos deseado se realiza el ataque sobre el equipo RIE-ICP usando gases fluorados

4.2. Transferencia de grafeno a sustratos dieléctricos

A la hora de transferir el grafeno sobre las obleas de silicio se llevará a cabo mediante dos métodos, como se ha mencionado en el apartado de objetivos, la funcionalización del grafeno exfoliado mecánicamente se realiza para comprobar que la funcionalización del grafeno con la molécula PBASE es correcta y la transferencia de la monocapa para asegurar que el grafeno transferido a los discos está conformado por una capa de grafeno únicamente.

4.2.1. Transferencia de grafeno mediante scotch tape a la oblea de silicio

Los materiales que se utilizarán para este proceso son una oblea de silicio, un bloque de grafito pirolítico altamente orientado (HOPG) y cinta adhesiva. A partir del bloque de grafito HOPG, y haciendo uso de la exfoliación micromecánica, Geim y Novoselov fueron capaces de aislar una sola capa de grafeno usando únicamente cinta adhesiva y es el proceso que se ha llevado a cabo para la deposición de grafeno sobre las obleas de silicio [16]. Las ventajas de esta técnica es que los copos de grafeno obtenidos son de gran tamaño llegando incluso a varias centenas de micras, no obstante con esta técnica es muy complicado obtener un grafeno monocapa además de poseer una escala de producción pequeña.

La técnica utilizada en este caso se denomina exfoliación micromecánica o método de ‘Scotch tape’. La capa superficial del bloque de grafito es retirada con la cinta adhesiva (Figura 4.1. Exfoliación mecánica del grafeno [42]). El grafito depositado en la cinta se vuelve a transferir a otra zona de la cinta adhesiva, de manera que la capa de grafito se va haciendo más delgada hasta conseguir una sola capa de grafeno. Una vez conseguido una capa lo suficientemente delgada, se presiona la cinta contra el sustrato de SiO_2 .

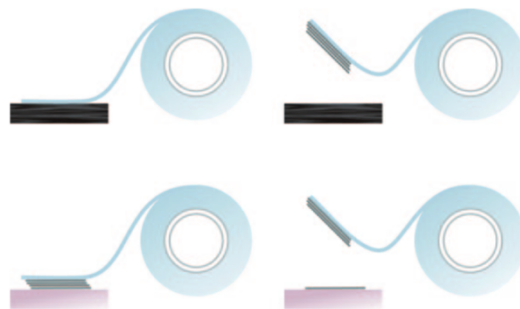


Figura 4.1. Exfoliación mecánica del grafeno [42]

4.2.2. Transferencia mediante scotch tape a los discos

Tras haber realizado la transferencia del grafeno a las obleas de silicio, el siguiente paso es realizar la transferencia del grafeno exfoliado a los discos de silicio. Para ello se utilizará un set-up micromecánico específico que permitirá visualizar grafeno a la vez que los discos para poder depositar el grafeno con precisión sobre los mismos (Figura 4.2).

El proceso a seguir es el siguiente: se exfolia el grafeno con la cinta adhesiva como se ha explicado en el punto 4.1.1. El siguiente paso, el grafeno exfoliado es transferirlo a un sello de PDMS (polidimetilsiloxano). La ventaja de este polímero es que es transparente, lo que permitirá visualizar los copos de grafeno a la vez que los discos de silicio. Además, el PDMS es un material duradero, resistente a muchos disolventes y con la capacidad de tener una superficie con una baja energía libre. Esto implica que cuando haya algún material depositado sobre él y se ponga en contacto el sello con algún sustrato, el material, en este caso grafeno, va a preferir depositarse sobre la superficie del sustrato.

Para ello simplemente colocamos la cinta adhesiva con el grafeno exfoliado sobre el sello, se ejerce presión sobre el mismo y se despega cuidadosamente la cinta adhesiva. Una vez se tenga el sello preparado, situamos la muestra bajo el microscopio óptico y localizamos los discos. Posteriormente situamos justo encima a una distancia de unos cinco centímetros el sello de PDMS con el grafeno sobre los discos. Se va bajando cuidadosamente el sello hasta que entre en contacto con la muestra, se verifica con el microscopio USB situado lateralmente, se ejerce presión y se deja reposar unos minutos. Finalmente se despega el sello y el grafeno quedará situado correctamente sobre los discos.

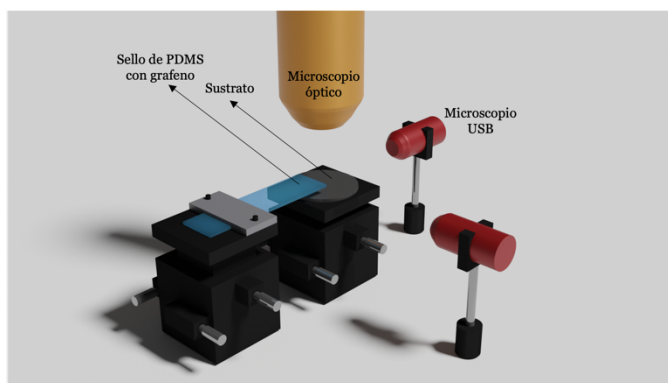


Figura 4.2. Set-up específico de para hacer la transferencia de grafeno a los discos

4.2.3. Transferencia de monocapa de grafeno en película de polímero

Para la transferencia del grafeno monocapa se utilizó el **“Graphenea-Monolayer graphene made via CVD”** de la empresa Graphenea (Figura 4.3. Monocapa de grafeno de Graphenea). Este grafeno está procesado en una sala limpia de clase 1000 y es considerado como la manera más sencilla de transferir grafeno a un sustrato. La monocapa de grafeno está dispuesta sobre una capa de polímero desconocido y sobre el grafeno hay una capa de sacrificio que será retirada una vez finalizada la transferencia al sustrato. La monocapa está sintetizada con el método CVD, tiene apariencia transparente, su grosor es de 0.345 nm y sus dimensiones son de 10 mm x 10 mm [43].



Figura 4.3. Monocapa de grafeno de Graphenea

Este proceso consta de tres fases (Figura 4.4. Esquema del proceso de transferencia de la monocapa de grafeno [44]). No obstante, antes de comenzar la transferencia se debe limpiar la muestra sumergiendo la misma en acetona y posteriormente en isopropanol. Seguidamente, se introduce el sustrato en la máquina de plasma de oxígeno, *PVA Tepla 200 Plasma system* para llevar a cabo la limpieza de macromoléculas de la superficie con oxígeno.

La primera consiste en la deposición de la muestra en agua desionizada de manera controlada. En el momento en el que la muestra entre en contacto con el agua, se interpondrá una capa de agua entre el grafeno y el polímero lo que permitirá que la monocapa se desprenda, se quede flotando en el agua y se pueda retirar la capa de polímero.

Una vez retirada la capa de polímero se procede a transferir al grafeno al sustrato y esto se hace sumergiendo el sustrato en el agua con una inclinación de aproximadamente 45°, se sitúa debajo de la capa de grafeno y se intenta ‘‘pescar’’ el grafeno con el sustrato. Una vez depositado el grafeno en el sustrato, se debe dejar la muestra secar 30 minutos al aire y posteriormente colocar la muestra en un plato caliente a 150° durante una hora.

La tercera y última parte del proceso es eliminar la capa de sacrificio. Para ello se pueden utilizar dos métodos: mediante solventes o mediante tratamiento térmico. En este caso se ha llevado a cabo con un solvente, la acetona. Se sumerge el sustrato en acetona caliente (50°) 1 hora, después se sumergen en isopropanol durante 1 hora y finalmente se seca la muestra con N₂.

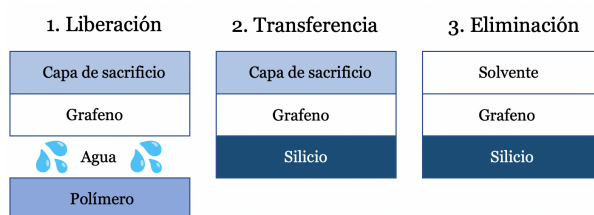


Figura 4.4. Esquema del proceso de transferencia de la monocapa de grafeno [44].

4.3. Funcionalización de grafeno con PBASE

Una vez depositado el grafeno en los sustratos, el siguiente paso es funcionalizar la superficie. La funcionalización es un proceso químico en el cual se deposita una molécula sobre una superficie, en este caso PBASE sobre grafeno, con el objetivo de facilitar la incorporación de otras moléculas.

El PBASE o ácido 1-pirenbutanílico éster N-hidroxisuccinimidílico (NHS) (Figura 4.5) está conformado por un grupo pireno, el cual es afín al grafeno y el grupo NHS, capaz de formar enlaces con grupos aminos, por lo que su uso es común en ensayos de anticuerpos o antígenos. Su peso molecular es de 385.41 g/mol y su fórmula molecular es $C_{24}H_{19}NO_4$. Esta molécula se utiliza como puente para inmovilizar las biomoléculas diana (en nuestro caso los anticuerpos de la PRL) al grafeno.

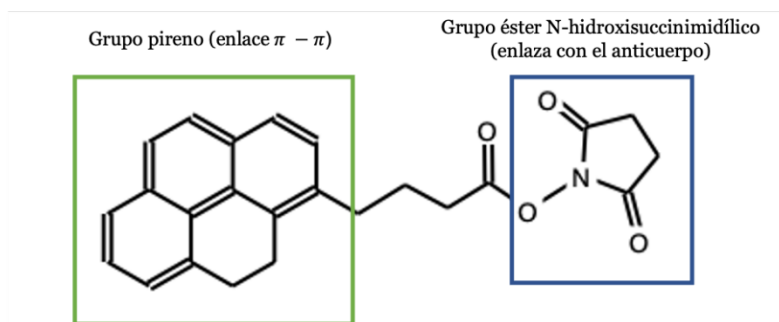


Figura 4.5. Estructura molecular del PBASE

Hay dos estrategias para la funcionalización del grafeno con PBASE: método covalente y método no covalente. Se va a llevar a cabo el método no covalente, para asegurar que las propiedades físicas y electrónicas del grafeno permanezcan intactas [45]. El grupo pireno presenta una fuerte afinidad con el grafeno, apilándose sobre él de manera paralela formando una interacción $\pi - \pi$ estable y el grupo NHS como se ha comentado antes, se enlazaré con el anticuerpo de la prolactina. En la Figura 4.6 se puede observar cómo se enlaza el PBASE con el grafeno depositado sobre una oblea de silicio.

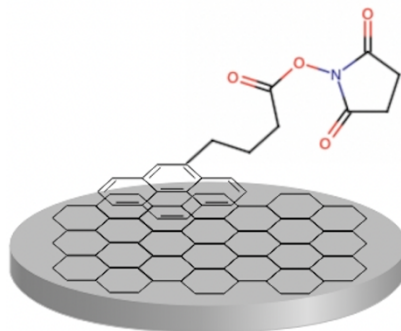


Figura 4.6. Enlace de la molécula PBASE con el grafeno depositado en una oblea de SiO_2

Antes de iniciar la funcionalización es muy importante limpiar adecuadamente los vasos de precipitado a utilizar. El proceso es el siguiente: se lavan dos vasos de precipitado con agua y jabón y se vierte etanol para que se terminen de secar. El siguiente paso es preparar una disolución en ambos vasos denominada piraña para eliminar cualquier resto de residuos orgánicos. La piraña se hace mezclando la misma proporción de H_2SO_4 (ácido sulfúrico) y H_2O_2 (agua oxigenada), en este caso fueron 40 mL de H_2SO_4 y H_2O_2 y se deja reposar la disolución 5 minutos. Una vez transcurrido el tiempo indicado, se deshecha la piraña, se vierte agua pura y se someten los vasos durante 5 minutos a un baño de ultrasonidos para terminar de limpiarlos. A continuación, se procede a hacer la disolución de PBASE para la funcionalización. En uno de los vasos se

disuelven 30,8 mg de PBASE en 40 mL de etanol obteniendo una concentración de 2 mM y se baña en ultrasonidos durante 2 minutos. Cuando se haya integrado el PBASE con el etanol, se introduce la muestra y se deja reposar durante 1 hora. Transcurrida la hora, se seca con N₂ y la muestra ya está preparada para la caracterización.

4.4. Inmovilización de anticuerpos en el dispositivo nanofotónico

Previamente a inmovilizar el anticuerpo de la prolactina, se inmovilizará el anticuerpo del SARS-CoV-2 ya que en un trabajo previo [46] realizado en el NTC se llevó a cabo este mismo proceso a diferencia de que sobre el sustrato el grafeno depositado no era monocapa, tratándose de grafito. En dicho trabajo se estudió y entendió el tipo de respuesta que se debía producir la inmovilización del anticuerpo sobre el grafeno, dando lugar a una disminución de intensidad del pico 2D del espectro Raman y un desplazamiento del mismo.

Para la funcionalización del sustrato con el anticuerpo se preparó una disolución de PBS y SARS-CoV-2 Spike Antibody con una concentración de 200ug/mL. Para ello se mezclaron 2 uL de anticuerpo en 8 uL de PBS (Phosphate buffered saline) previamente diluido (1X) en agua desionizada.. Una vez obtenida la disolución, se deposita una gota de 2uL con ayuda de una micropipeta y el microscopio óptico en la muestra sobre el grafeno depositado en los discos, y se deja reposar la disolución en el sustrato durante dos horas en condiciones ambiente. Finalmente, se limpia el exceso de disolución con PBS y se seca con N₂.

Una vez inmovilizado el anticuerpo del SARS-CoV-2 y estudiada la respuesta, se procederá a la inmovilización del anticuerpo de la prolactina. El anticuerpo utilizado es un monoclonal de ratón IgG producido a partir de los aminoácidos 96-200 de la prolactina de origen humano. El procedimiento a seguir es exactamente el mismo que el descrito anteriormente: se prepara una disolución de PBS y el anticuerpo monoclonal, se localizan las matrices de discos y se deposita una gota de 2 uL. Sin embargo, en este caso se utilizará una concentración menor 40 ug/mL, con el objetivo de probar la sensibilidad del dispositivo nanofotónico con concentraciones muy bajas de analitos.

4.5. Técnicas de caracterización

4.5.1. Microscopía óptica

La microscopía óptica nos permite visualizar y conocer la microestructura de la superficie de los sustratos gracias a la interacción de la luz con la muestra. El microscopio óptico se ha usado en primer lugar para localizar los copos de grafeno tras haber realizado la exfoliación micromecánica. Para facilitar la búsqueda de los copos en el sustrato se les practicó una cruz para así poder situar los copos alrededor de esta. En segundo lugar, se ha utilizado para localizar la lámina de grafeno tras haber realizado la transferencia de la monocapa.

Es importante saber que el grafeno obtenido por exfoliación y el grafeno crecido por CVD no se van a ver igual con la microscopía óptica. En el caso del grafeno exfoliado lo que se verá será principalmente la oblea de silicio y sobre ella depositados los copos de grafeno. En cambio, el

grafeno monocapa que se va a utilizar para el objetivo 3 es homogéneo por lo que lo único que se podrá distinguir son los bordes de la monocapa gracias al contraste que se produce con la muestra de silicio.

El microscopio utilizado es de la marca Zeiss, integrado en WITec alpha 300 RA y cuenta con los aumentos 10x, 20x, 50x y 100x.

4.5.2. Espectroscopía RAMAN

La espectroscopía Raman (junto con el AFM) va a ser el instrumento principal de trabajo para este proyecto. En el apartado de introducción se explican las bases de su funcionamiento y en este apartado se explicará la interpretación de los espectros obtenidos, en concreto del silicio y del grafeno. En el caso del grafeno, el espectro Raman característico presenta tres picos importantes (Figura 4.7. Espectros Raman del grafeno (arriba) y del grafito (abajo) [47]):

- 1300 cm^{-1} : denominado pico D, correspondiente a los defectos. Este pico se produce cuando la estructura del grafeno presenta algún tipo de desorden o debido a que tiene alguna sustancia encima. En el caso de un copo de grafeno este pico se ve intensificado en los bordes ya que al exfoliar la lámina de grafeno se produjo una rotura que fue lo que originó el copo que posteriormente se depositaron en el SiO_2
- 1580 cm^{-1} : llamado pico G, nos indica la cantidad de grafito que hay en la muestra.
- 2700 cm^{-1} : denominado pico 2D, nos aporta información de la estructura molecular del grafeno. Por otra parte indica si el grafeno está funcionalizado con alguna molécula si hay transferencia de carga. Esto se refleja en la morfología del pico (cambio en la anchura), cambio en intensidad y/o en la posición.

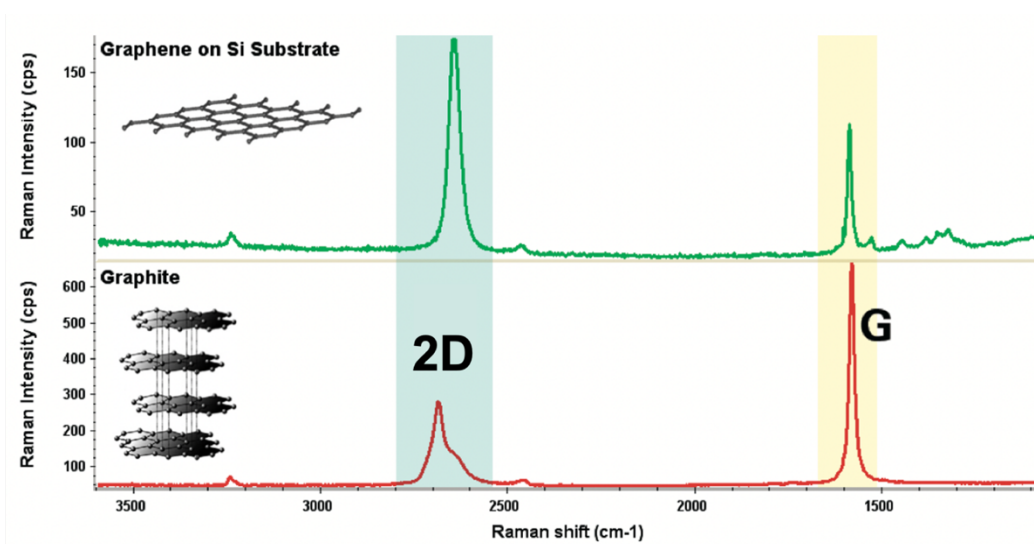


Figura 4.7. Espectros Raman del grafeno (arriba) y del grafito (abajo) [47]

Es importante conocer la relación de intensidad que hay entre el pico G y el pico 2D, ya que es determinante para ver si la muestra es de grafito o de grafeno. En la Figura 4.6 se puede observar

que cuando el pico 2D es más intenso que el pico G se trata de grafeno y cuando el pico G es más intenso que el pico 2D es grafito. Además, en el grafito el pico 2D está desplazado a la izquierda y es más ancho.

Por otra parte, hay otra característica del espectro del grafito y del grafeno que permite distinguir de que material se trata. Por lo general se dice que el pico 2D está situado en 2700 cm^{-1} . Exactamente esto no es así, ya que como se puede ver en la Figura 4.8. Banda 2D del grafito y del grafeno [47] el pico 2D del grafito está situado en 2700 mientras que el pico 2D del grafeno monocapa está situado en 2680 cm^{-1} . Además, la forma de estos picos es distinta: el pico 2D del grafito es el resultado de la interacción de las diferentes bandas del grafeno, por ello es más ancho y presenta un ligero desdoble [47].

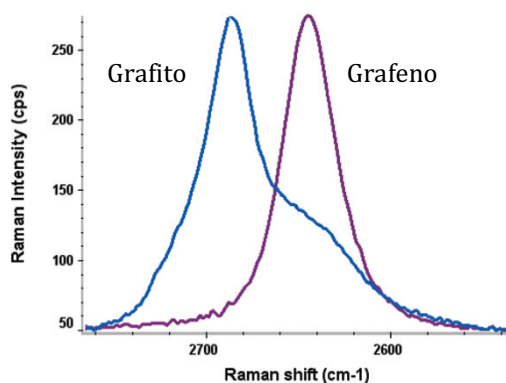


Figura 4.8. Banda 2D del grafito y del grafeno [47]

El espectrómetro de Raman con el que se han realizado todas las medidas es el modelo alpha 300 RA de la marca WITec y las medidas se han llevado a cabo con un láser de 532 nm (verde). La resolución lateral del escáner en x e y es de $200 \times 200\text{ }\mu\text{m} \pm 0.001$ y la resolución en z es de $3.5\text{ }\mu\text{m} \pm 0.001\text{ }\mu\text{m}$. Además, todas las imágenes y espectros puntuales se realizaron con una potencia del láser de 2 mW .

4.5.3. Microscopía de fuerzas atómicas (AFM)

El microscopio de fuerzas atómicas es un microscopio de sonda de barrido el cual está compuesto por un cantiléver con una punta, un láser y un fotodiodo. La punta, típicamente de Nitruro o Silicio, va haciendo un barrido XY de toda la superficie y los electrones de la punta son repelidos por los electrones de la muestra debido a las fuerzas de Van der Waals. La punta además cuenta con un sistema de control de altura (Z) de la punta que se encarga de mantener que la fuerza entre la punta y la muestra sea constante durante todo el barrido. Conociendo todas las variaciones de altura de la sonda, se puede obtener una imagen 3D de la superficie. El cálculo de la fuerza no se mide directamente, sino que se calcula midiendo la deflexión del cantiléver. Dicha deflexión se registra gracias al láser que se refleja por el cantiléver e incide en el fotodiodo, los cuales detectan más o menos potencia en función de la deflexión del cantiléver.

Por otra parte, el AFM tiene tres modos de trabajo: la punta está en contacto con la muestra todo el rato, no está en contacto en ningún momento o está en contacto de manera intermitente. Este último modo de funcionamiento es el que se ha utilizado para realizar la caracterización de las

muestras. El cantiléver en este caso vibra a su frecuencia de resonancia (dependiente de la longitud y la rigidez del cantiléver).

Gracias a esta técnica de microscopía podremos conocer la siguiente información acerca de los sustratos: si un copo se trata de grafeno o grafito en función de su altura y las dimensiones de los discos nanolitografiados en los sustratos de silicio.

El AFM utilizado en este trabajo está integrado en WITec alpha 300 RA. Cuenta con una resolución lateral de unos ± 20 nm y una resolución vertical de ± 1 nm. La punta utilizadas son de silicio de la marca NANOSENSORS (PPP-NCHR-50) con una constante de fuerza, $K = 40\text{N/m}$, y una frecuencia de resonancia de 300 kHz.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los siguientes apartados se van a ir exponiendo los resultados obtenidos de los objetivos propuestos en el apartado 3, Objetivos y Plan de trabajo.

5.1. OBJETIVO 1. Exfoliación de grafeno mediante el método Scotch Tape y funcionalización con PBASE

5.1.1. Deposición del grafeno mediante el método Scotch tape sobre la oblea

El primer paso es la preparación del sustrato. Dichas muestras se obtienen de una oblea con una dimensión de aproximadamente 4 pulgadas, la cual se corta en piezas más pequeñas, obteniendo una muestra de aproximadamente 1 cm². Esta muestra se utilizará como sustrato para hacer la transferencia de grafeno mediante el método Scotch Tape, ya que el silicio es un material que proporciona un contraste adecuado para la visualización de los copos de grafeno. Además, la oblea de silicio presenta una capa de óxido de silicio nativo de unos 1-2 nm que crece en condiciones ambiente. Esto se debe tener en cuenta ya que cuando se tomen espectros de Raman, aparecerán tanto los picos del grafeno como los picos del silicio y del óxido de silicio.

Por otra parte, las muestras de silicio son marcadas con una cruz, para que a la hora de la localización de los copos resulte más sencillo y se pueda localizar siempre el mismo copo en todos los pasos del experimento.

Una vez preparada la muestra, se limpia con etanol para eliminar cualquier tipo de resto orgánico. Para ello se limpia a chorro con etanol la superficie del sustrato y se seca con N₂. Tras haber realizado esto, se procede a depositar grafeno exfoliado sobre la muestra limpia. Este proceso está descrito en el apartado de Materiales y Métodos: Transferencia de grafeno mediante Scotch Tape a la oblea de silicio. En la Figura 5.1 se muestra, por una parte, el bloque de grafito HOPG utilizado para exfoliar el grafeno y por otra parte la cinta adhesiva con las láminas de grafito.

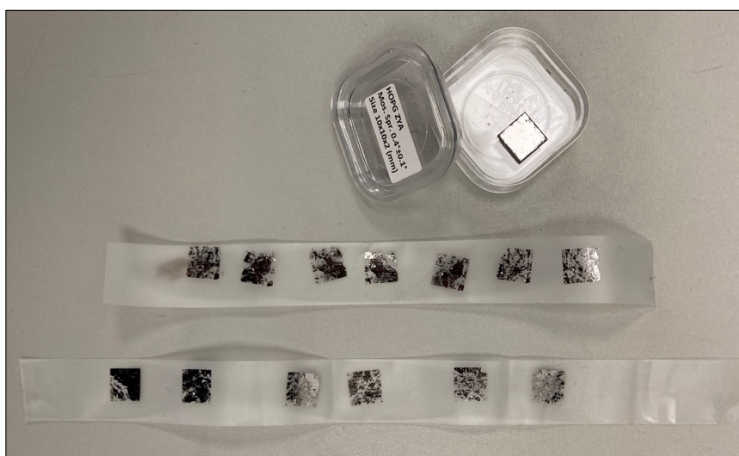


Figura 5.1. En la parte de arriba, bloque de grafito pirolítico HOPG usado para exfoliar grafeno. En la parte de abajo, grafeno exfoliado en la cinta adhesiva.

Microscopía óptica

El objetivo O1.1 se corresponde con la transferencia del grafeno sobre las obleas de silicio mediante exfoliación mecánica. Tras realizar un barrido por la superficie del sustrato y analizar los distintos copos, se selecciona un copo de interés. Gracias a que el sustrato está marcado, será posible localizar siempre el mismo copo para poder caracterizarlo en todos los pasos del proceso.

Para localizar siempre el mismo copo, se diseña un camino con las distintas imágenes del microscopio óptico a diferentes aumentos. En la Figura 5.2A, podemos ver la población de copos con un aumento del 10x, en la Figura 5.2B se observa la misma población con un aumento del 20x, en la Figura 5.2C con el 50x y finalmente en la Figura 5.2D se observa el copo de grafeno de interés con un aumento del 100x.

Para el análisis de los resultados nos vamos a centrar en el copo de grafeno señalado en la Figura 5.2D, ya que fue el único copo que tras la funcionalización seguía sobre el sustrato. La desventaja del grafeno exfoliado es que si la muestra se somete a procesos que impliquen estar en contacto con ciertas sustancias o sometido bajo procesos como un baño de ultrasonidos, es posible que se despeguen algunos copos. En este caso, todos los copos que se ven en la figura tal desaparecieron, por lo que como se ha dicho antes, el copo de estudio será el mostrado en la Figura 5.2D.

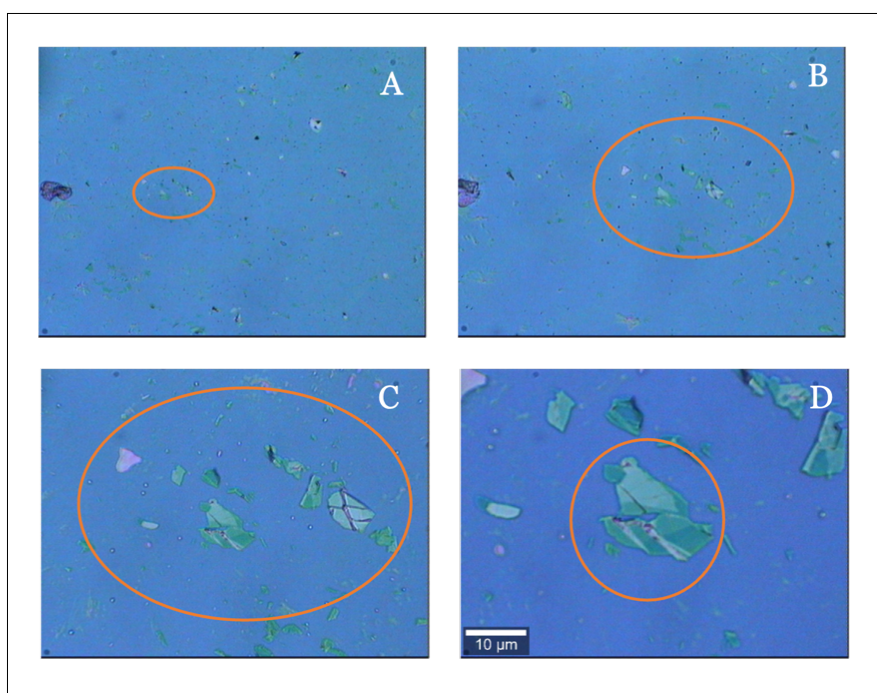


Figura 5.2. Imágenes tomadas con el microscopio óptico de varios copos de grafeno. A) Aumento x10 B) Aumento x20 C) Aumento x50 D) Aumento x100

Espectroscopía Raman

Una vez localizado el copo de interés, se procede a caracterizar dicho copo con el espectrómetro Raman, de manera que analizando los picos se verifique que se trata de grafeno monocapa o grafito. Primero se lleva a cabo un espectro puntual en la zona del copo indicada en la Figura 5.3 con una circunferencia naranja y obtenemos el espectro de la figura.

Por una parte, aparecen dos picos en 521 cm^{-1} y 950 cm^{-1} correspondientes con el silicio cristalino (c-Si) y con el óxido de silicio (O-Si-O) respectivamente. Por otra parte, se observan los picos característicos del grafeno: (G) 1580 cm^{-1} y (2D) 2700 cm^{-1} . Profundizando más en el espectro, observamos que el grafeno no es monocapa y que se trata de grafito por las siguientes razones:

- La intensidad del pico G es considerablemente mayor que la del pico 2D
- El pico 2D es más grueso de lo esperado

Además, el pico 1300 cm^{-1} correspondiente con el pico de defectos es inapreciable por lo que concluimos que se trata de un grafito sin apenas defectos. Estos defectos se verán intensificados cuando se realice la funcionalización pues el grafeno se habrá enlazado con la molécula PBASE.

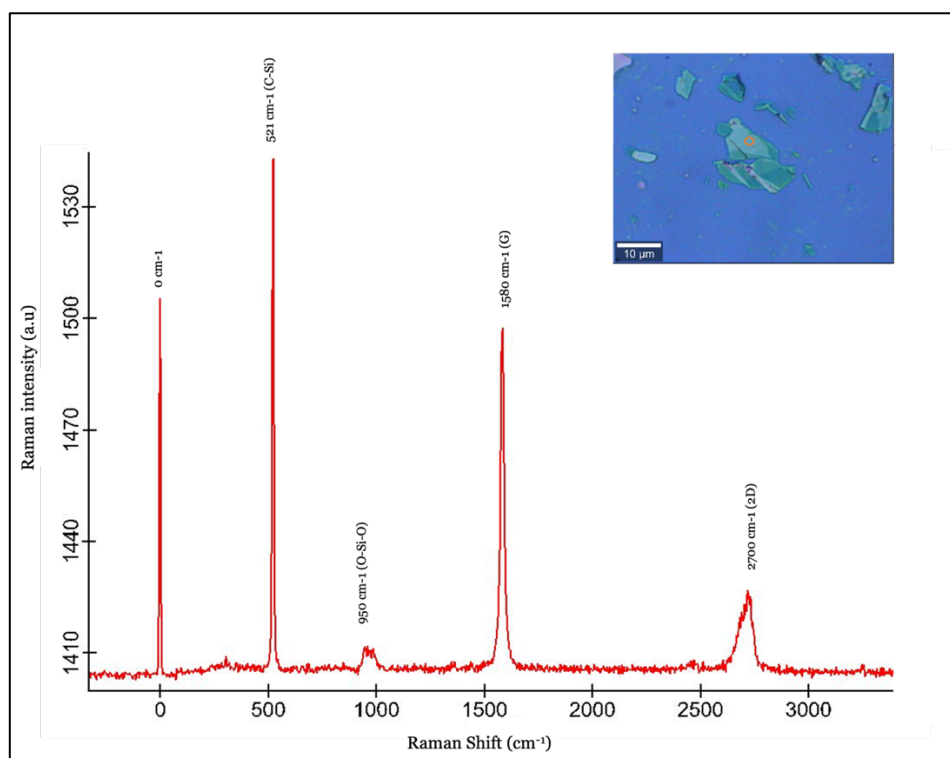


Figura 5.3. Espectro puntual Raman realizado en la zona del copo de grafeno señalado en la imagen

Tras haber obtenido un espectro puntual, se obtienen espectros Raman de toda la superficie del copo, obtenido de tal manera una matriz de espectros. Utilizando el software Proyect FIVE de Witec se generan imágenes a partir de las matrices adquiridas previamente. Con toda esta información se pueden reconstruir imágenes del copo en cuestión en las cuales queda representada la intensidad de un pico. Sabiendo esto, las imágenes que se van a procesar para su posterior análisis serán las correspondientes con los picos característicos del grafeno: 2700 cm^{-1} , 1580 cm^{-1} y en el caso de que presente defectos 1300 cm^{-1} . Por otra parte, la información que nos proporcionan las imágenes Raman es la intensidad de un pico en concreto, de manera que las zonas que sean más brillantes presentarán una intensidad mayor que las zonas que sean menos brillantes.

Se realizó un escáner del copo en cuestión (Figura 5.4). Para ello, se utilizó un láser verde con una longitud de onda de 532 nm con potencia 2 mW . De la misma manera, las dimensiones de la imagen son $20\text{ }\mu\text{m} \times 20\text{ }\mu\text{m}$ con una resolución de $100\text{ puntos} \times 100\text{ líneas}$, un tiempo de

integración de 0,05 y el grating utilizado fue el G1:600 g/mm BLZ = 500 nm. Estos datos de adquisición son los utilizados en todas las imágenes tomadas a lo largo del trabajo.

De dicha figura tal podemos sacar las siguientes conclusiones:

- Como se ha mencionado antes, el grafeno no presenta defectos significativos ya que la imagen A correspondiente al pico de defectos apenas se aprecia el copo, únicamente los bordes.
- Las imágenes B, C se corresponden con los picos 1580 cm^{-1} y 2700 cm^{-1} respectivamente y se observa claramente que hay una distribución de la señal Raman heterogénea. Esto es un indicativo de que el copo presenta distinto número de capas de grafeno por lo que nuevamente se puede afirmar que no se trata de grafeno sino de grafito.

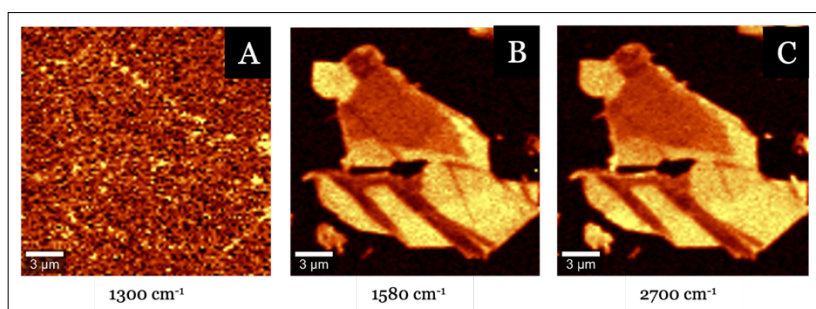


Figura 5.4. Imágenes Raman de los picos característicos del grafeno A) Pico D:1300 cm^{-1} B) Pico G:1580 cm^{-1} C) Pico 2D:2700 cm^{-1}

Tras haber obtenido las imágenes Raman, se tomaron tres espectros puntuales en distintas zonas del copo. En la Figura 5.5 se observan los tres espectros obtenidos correspondientes con las zonas del copo marcadas en la figura tal. Hay una clara diferencia en intensidad entre ambas zonas, indicativo nuevamente de que el copo presenta heterogeneidad en el número de capas, llegando nuevamente a la conclusión de que el grafeno exfoliado es demasiado grueso por lo que se trata de grafito. Ninguna de las zonas representa un espectro de grafeno, en el que el pico 2D es más intenso que el pico G.

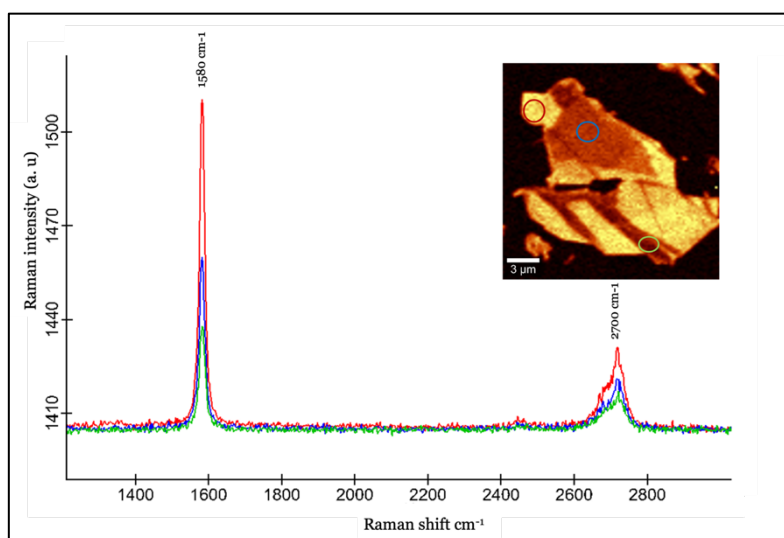


Figura 5.5. Espectros Raman del copo de grafeno indicado en la imagen superior

AFM

Tras haber realizado el análisis de la estructura del copo exfoliado, se procede a analizar la topografía del copo. La Figura 5.6 muestra una imagen del copo obtenida mediante AFM. Tiene un tamaño de 25 x 25 μm con una resolución de 256 líneas con 256 puntos. De nuevo, se puede observar que el copo presenta diferentes alturas, ya que hay zonas con mayor intensidad y zonas con menor intensidad. Las zonas más claras, indican que la altura es mayor y por lo tanto es grafito. Para un análisis más riguroso se obtiene un gráfico de la altura del copo (Figura 5.6B) correspondiente con el corte indicado en la figura tal.

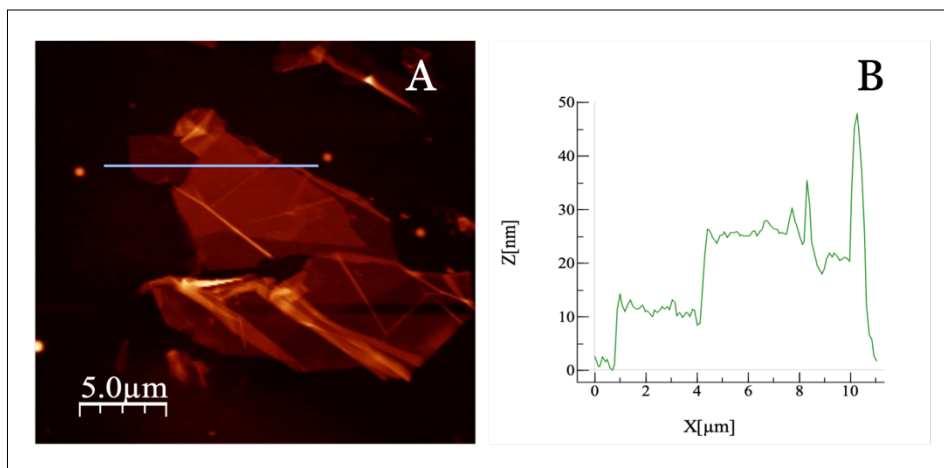


Figura 5.6. A) Imagen AFM del copo de grafeno. B) Topografía del corte indicado en la imagen A

Teóricamente la altura del grafeno es aproximadamente 0,3 nm. No obstante, teniendo en cuenta las condiciones ambientales, el método de medida utilizado (modo intermitente de AFM) y la resolución del mismo, se estima que la altura de la monocapa medida con AFM es de 1 nm. Por lo tanto, el corte señalado muestra una zona en la que hay aproximadamente 12 capas pues la altura es e 12 nm y otra zona de altura 25 nm por lo que habrá unas 25-30 capas de grafeno.

5.1.2. Funcionalización del grafeno sobre la oblea con PBASE

En el apartado 4.2 se explica la funcionalización, y se dice la que la muestra debía estar en la disolución de PBASE y etanol durante una hora. No obstante, una vez realizada la funcionalización y tras haber caracterizado la muestra, se observó que apenas había PBASE en la superficie del grafeno. Por esto se volvió a realizar otra vez la funcionalización durante otra hora, en total dos horas, explicada en el apartado Materiales y Métodos, Funcionalización del grafeno con PBASE.

Para saber si el grafeno se ha funcionalizado correctamente, en el espectro RAMAN deben apreciarse dos cambios respecto al grafeno sin PBASE. Primero se van a analizar los picos nuevos que aparecen en el espectro como consecuencia del enlace grafeno-PBASE y segundo se analizarán los cambios que han sufrido los picos del grafeno.

- En primer lugar, es que el pico de defectos (D: 1300 cm^{-1}) aumenta, ya que la superficie del grafeno se ha funcionalizado con la molécula PBASE y la estructura

presenta cambios. El pico D representa la cantidad de defectos presentes en la estructura laminar de grafeno o indica la cantidad de enlaces sp^3 entre carbonos (cuanto más intenso, más defectos y/o más hibridación de orbital $\pi-\pi$). La señal de defectos se ha intensificado en toda la superficie del copo indicando la presencia de PBASE que introduce defectos en toda la capa de grafeno que surge de la hibridación orbital de la molécula con el plano del grafeno.

- En segundo lugar debe aparecer un pequeño pico en 1620 cm^{-1} . Este pico se corresponde con el pico de pireno. Este pico representa enlace entre la parte del pireno de la molécula del PBASE y la capa de grafeno.
- Por último, el pico 2D: 2700 cm^{-1} del grafeno aumenta su anchura (FWHM, full-width at half-maximum), lo que indica que se ha producido dopado electrónico del mismo debido a la funcionalización con la molécula de PBASE.

Asimismo, en la Tabla 5.1 se explican los picos que aparecen en el espectro del grafeno tras funcionalizarlo característicos del enlace PBASE – grafeno.

Tabla 5.1. Picos característicos del grafeno funcionalizado con PBASE [48], [49].

965 cm^{-1}	Óxido de silicio
1231 cm^{-1}	Doble enlace C=C como consecuencia de la funcionalización del PBASE
1363 cm^{-1}	Hibridación de la molécula PBASE con el plano del grafeno
1384 cm^{-1}	Hibridación de orbital $\pi-\pi$ del PBASE con el plano del grafeno
1507 cm^{-1}	Vibraciones de $-\text{NO}_2$ de α,β -nitroalquenos no saturados
1621 cm^{-1}	Resonancia del grupo pireno del PBASE

En la Figura 5.7, el espectro azul (grafeno tras la primera funcionalización) presenta un pico de defectos el cual apenas se aprecia y el pico en 1620 cm^{-1} no aparece. El azul, representa el espectro del grafeno tras la primera funcionalización (1 hora), donde se observa que el aumento del pico D es débil y el pico 1620 cm^{-1} no aparece, por lo que se decidió realizar otra funcionalización. El espectro verde (grafeno tras la segunda funcionalización), el pico de defectos D: 1300 cm^{-1} aumenta considerablemente respecto al pico de la segunda funcionalización y sí que se observa el pico característico de 1620 cm^{-1} (rodeado en naranja).

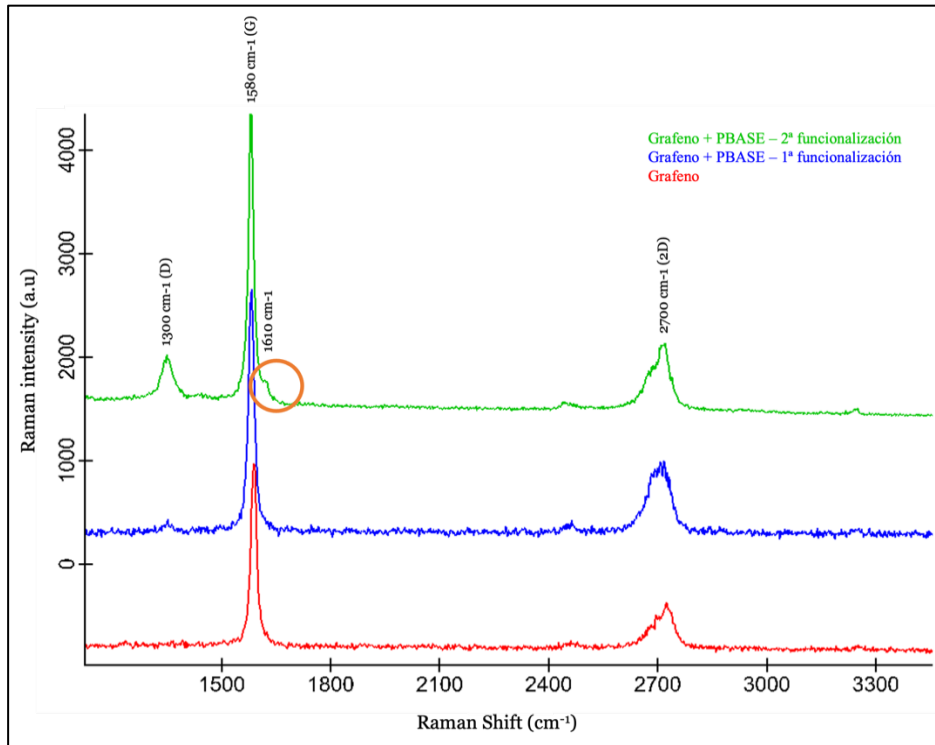


Figura 5.7. Espectros Raman comparativos del grafeno sin funcionalizar (Rojo), grafeno tras la primera funcionalización (azul) y grafeno tras la segunda funcionalización (verde)

Para observar con más detalle el espectro, la Figura 5.8 muestra la zona de interés de un espectro puntual ampliado en el que ilustran los picos que aparecen como consecuencia del enlace del grafeno con el PBASE.

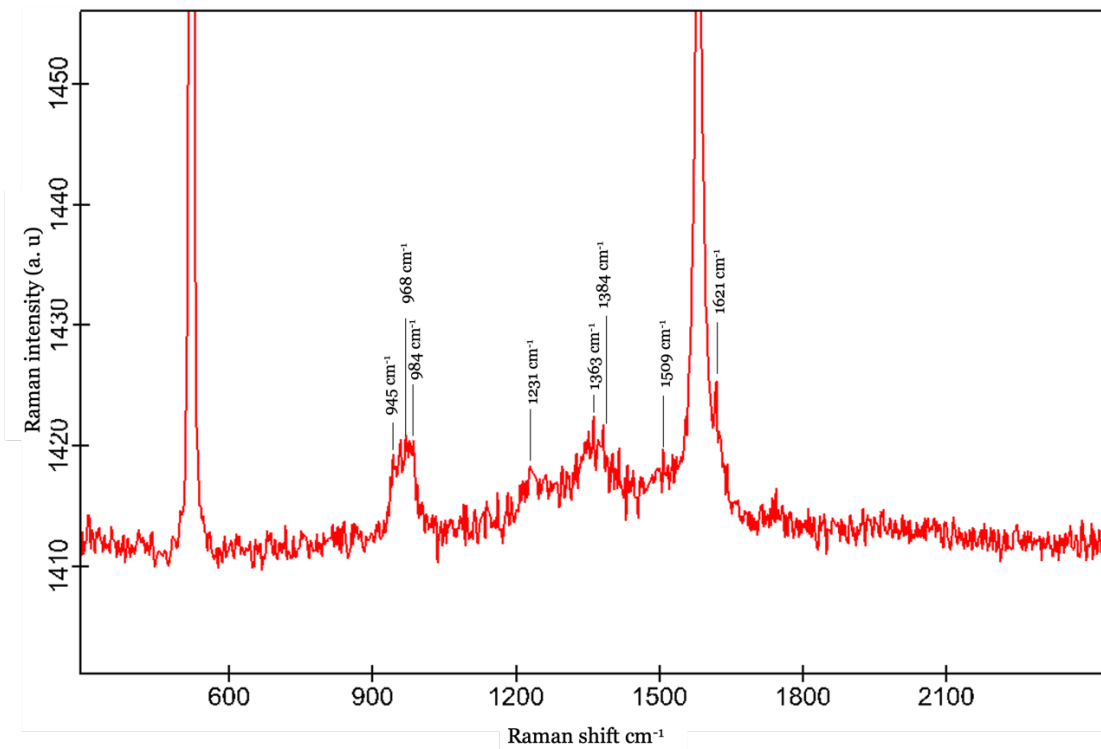


Figura 5.8. Espectro puntual Raman del grafeno funcionalizado con PBASE

Una vez se analizó el espectro y se confirmó la presencia del PBASE, se tomaron imágenes Raman del copo en cuestión de dimensiones 20 x 20 micras, y con una resolución de 256 puntos y 256 líneas. La Figura 5.9 muestra las imágenes de los picos característicos del grafeno y de la funcionalización con el PBASE del copo sin funcionalizar, tras funcionalizar 1 hora y tras funcionalizar 2 horas.

Observando detenidamente las imágenes, se pueden apreciar los patrones de alteraciones típicas en la espectroscopía Raman del grafeno tras su funcionalización:

- La Figura 5.9 presentan un aspecto más granuloso correspondiente al ruido. Esto se debe a que al haber una molécula sobre el copo (PBASE), la señal Raman típica del grafeno se ve distorsionada. Los picos G, 2D y el del PBASE son menos intensos tras la funcionalización por la misma razón.

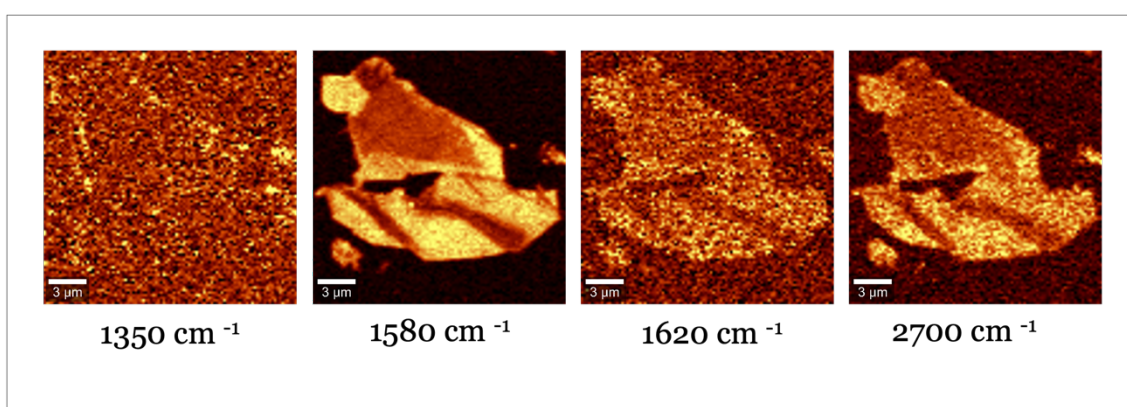


Figura 5.9. Imágenes comparativas Raman del copo A) sin funcionalizar B) tras la primera funcionalización C) tras la segunda funcionalización

AFM

La funcionalización del grafeno con el PBASE se comprobó también a través de la caracterización mediante el microscopio de fuerzas atómicas, realizando un estudio de la superficie. Se tomó una imagen del copo tras la funcionalización de 25x25 μm con una resolución de 256 puntos y 256 líneas. De esta forma Figura 5.10A y Figura 5.10B son imágenes de AFM del copo funcionalizado y del copo sin funcionalizar, respectivamente.

De la misma manera la imagen de la derecha muestra la diferencia en la altura de la misma zona del copo tras la funcionalización. Esta diferencia de altura es de unos 2 nm, lo que se espera tras haber realizado la funcionalización, por lo que se puede concluir que el copo ha sido funcionalizado correctamente con la molécula de PBASE.

Por último, podemos observar que parece que la funcionalización es dependiente del número de capas del grafeno, cuanto más grueso es el copo, parece que la funcionalización es menos efectiva. Esto se puede observar en la Figura 5.10C, en la parte que el copo es más fino, es decir, hay menos capas de grafeno la funcionalización es más efectiva, ya que la diferencia de perfiles es un mayor que en la zona del copo más gruesa. Esto parece confirmarse también en las medidas de Raman (Figura 5.9) donde se observa que el pico del pireno (1620 cm^{-1}) es más intenso para las zonas del copo menos gruesas.

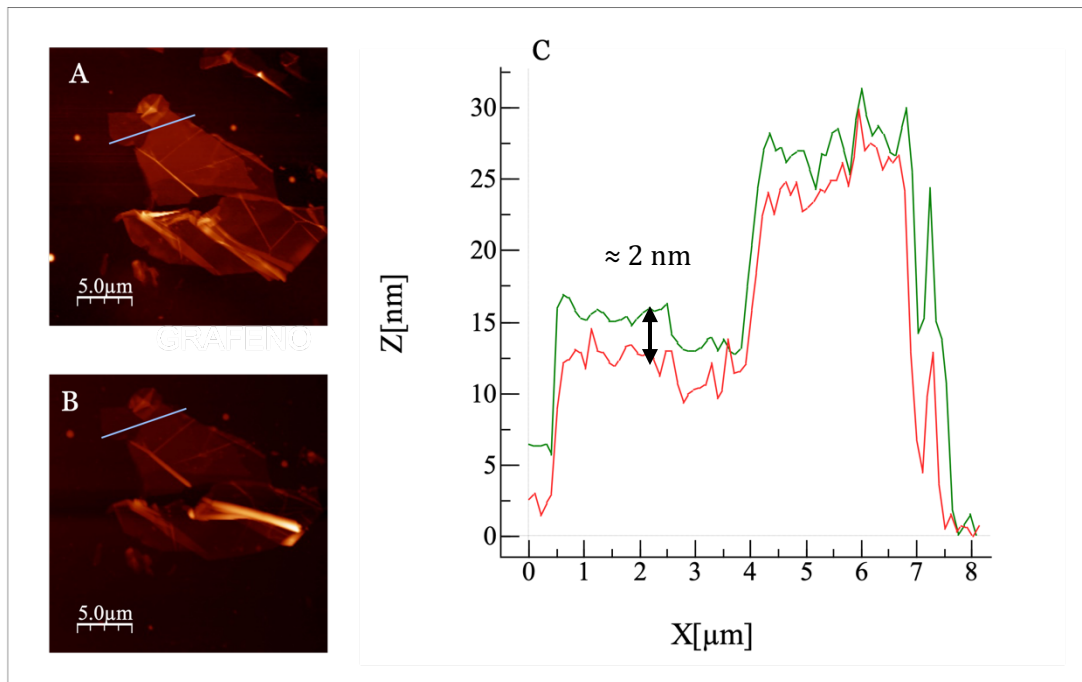


Figura 5.10. Imágenes del copo tomadas con AFM A) Sin funcionalizar B) Funcionalizado 2 horas C) Perfil de los copos en rojo sin funcionalizar y en verde funcionalizado

5.2.OBJETIVO 2. Transferencia del grafeno exfoliado mecánicamente al dispositivo nanofotónico (discos de silicio).

. Una vez se ha demostrado la correcta funcionalización de la molécula de PBASE en grafeno, se va a proceder a su transferencia a los sustratos SERS (en nuestro caso sustratos dieléctricos de nanodiscos de silicio). Este paso es crucial pues se utilizará el efecto SERS para intensificar la señal de los anticuerpos inmovilizados en el grafeno funcionalizado para poder detectar concentraciones muy bajas de los anticuerpos de la PRL. El primer paso para llevar a cabo este segundo objetivo es comprobar y demostrar que las estructuras de discos de silicio litografiados sobre la oblea de silicio producen efecto SERS.

5.2.1.Caracterización de los discos de silicio para verificar que se produce el efecto SERS

Es de vital importancia antes de realizar la transferencia de grafeno al dispositivo nanofotónico, verificar la funcionalidad de los discos de silicio como sustratos SERS, es decir, comprobar que se produce una intensificación del espectro Raman en los discos, mostrados en la Figura 5.11. Para ello se hará un análisis espectral Raman dentro y fuera de los discos. Las medidas se realizarán con el láser de 532 nm a una potencia de 2 mW. Este valor de potencia se ha determinado así ya que a más potencia aumenta el efecto térmico del láser y puede producirse un desplazamiento de picos del espectro además de que se pueden dañar los discos.

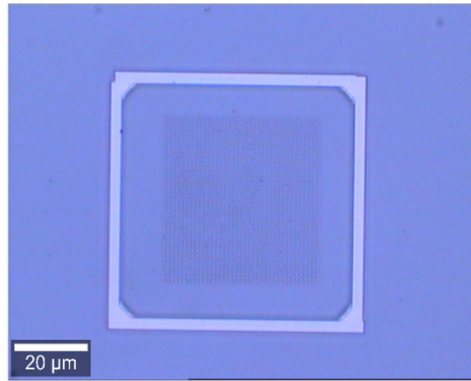


Figura 5.11. Imagen tomada con el microscopio óptico de la matriz de discos compuesta por 38 filas y 38 columnas con un aumento de 50x.

En la Figura 5.12 se ilustran dos imágenes de una de las matrices de discos. La imagen A representa una parte de la matriz de discos y la imagen B muestra un disco con sus dimensiones, siendo el diámetro de los discos aproximadamente 125 nm y la separación entre dos discos contiguos de 1 μm aproximadamente.

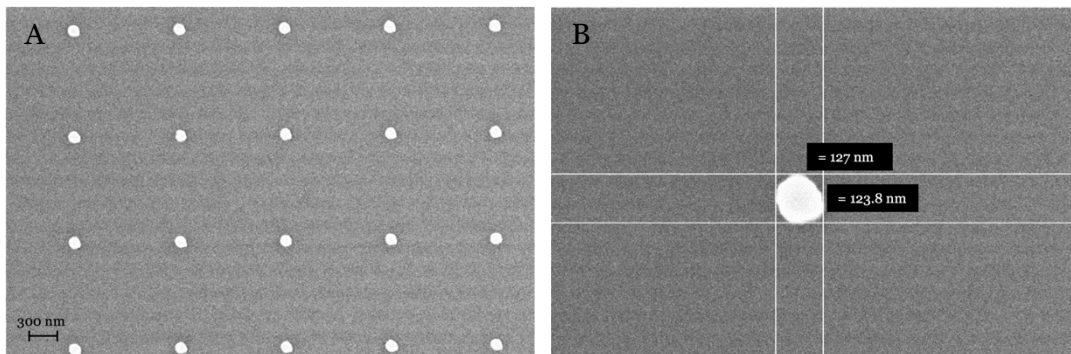


Figura 5.12. Imágenes tomadas con el microscopio electrónico de barrido (SEM). A) Matriz de discos B) Dimensiones de un disco (diámetro medio de 125 nm).

Espectroscopía Raman

En la Figura 5.13 se muestran las imágenes Raman de los picos característicos del silicio, de dimensiones 50 x 50 μm. En el pico de 950 cm⁻¹ se observa que los discos presentan más intensidad de señal Raman por lo que se puede pensar que sí que se está produciendo efecto SERS, no obstante, esto se confirmará y cuantificará analizando los espectros. Por otra parte, en el pico de 521 cm⁻¹ se pueden apreciar unos puntos negros. Esto es causado por el calentamiento de los discos por la potencia del láser, ya que produce que el pico del espectro se desplace a la derecha y por ello se ve en negro en la imagen. Las diferencias en contraste Raman de los discos viene dada por ligeras diferencias en el proceso de litografía que hacen que los tamaños difieran ligeramente. No obstante, se considera que el comportamiento de los discos de una misma matriz es suficientemente homogéneo.

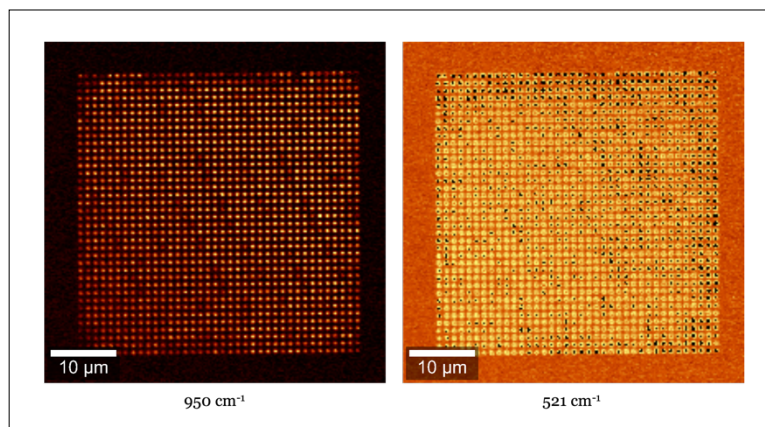


Figura 5.13. Imágenes Raman de los picos característicos del silicio 100x100 μm

La Figura 5.14 muestra dos espectros puntuales de la matriz de discos: uno dentro del disco (rojo) y otro fuera del disco (azul). En ambos espectros se pueden observar los picos característicos del silicio: el pico en 300 cm^{-1} es debido al modo transversal del silicio, el pico en 521 cm^{-1} representa el silicio cristalino y finalmente el pico 950 cm^{-1} es el óxido de silicio. Tomando como referencia el pico del silicio cristalino la señal Raman se ve intensificada en un 10 %, por lo que se puede afirmar que en los discos se produce SERS.

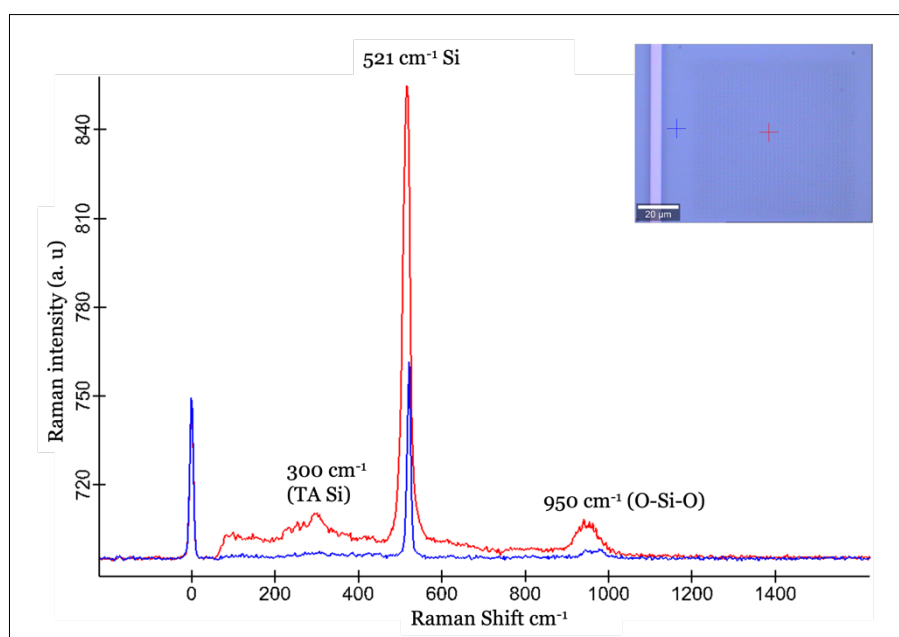


Figura 5.14. Espectros Raman de la matriz de discos. En rojo espectro tomado dentro de un disco y en azul el espectro tomado fuera de los discos que se ve intensificado gracias al efecto SERS.

AFM

La caracterización de los discos con AFM se ha llevado a cabo para caracterizar su altura (el diámetro de los discos se midió con SEM, Figura 5.12). Se tomó una imagen de 5 x 5 μm con una resolución de 512 puntos y 512 líneas. En la Figura 5.15 se muestra la topografía de una zona de la matriz de los discos (A) y el perfil de los discos (B). La información que nos proporcionan es que los discos están separados aproximadamente 1 μm y tienen una altura de 180 nm aproximadamente.

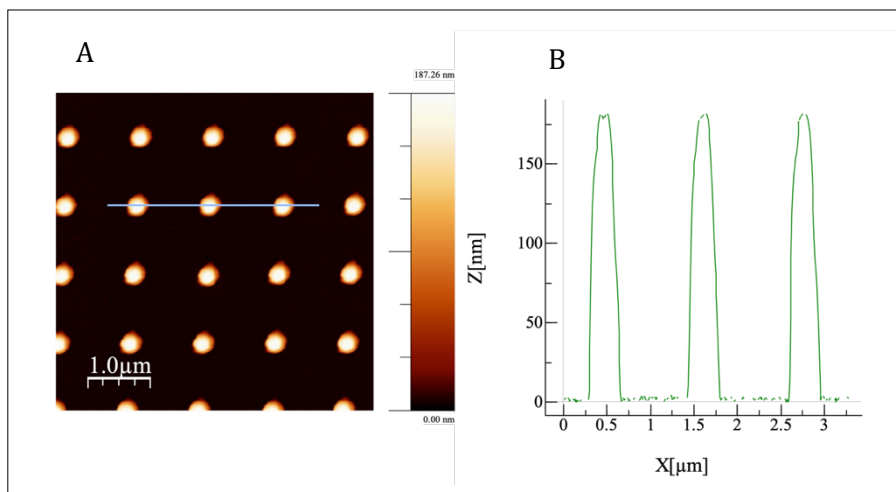


Figura 5.15. Imagen de topografía de AFM de la matriz de discos. A) Topografía B) Perfil de los discos.

5.2.2. Transferencia del grafeno exfoliado mecánicamente a los discos de silicio

Para llevar a cabo la transferencia de grafeno exfoliado por el método de Scotch tape a los discos, se ha utilizado el dispositivo de microposicionamiento de materiales 2D disponible en el NTC, descrito en el apartado de materiales y métodos (apartado 4.1).

En la Figura 5.16 se puede apreciar el copo de grafeno depositado situado sobre los discos en diferentes aumentos. A simple vista ya se puede ver que el copo es demasiado grueso, ya que el grafeno es un material prácticamente translúcido y al visualizarlo con el microscopio óptico no debería verse con tanto contraste con el silicio. Esto se confirmará con las medidas de Raman y AFM.

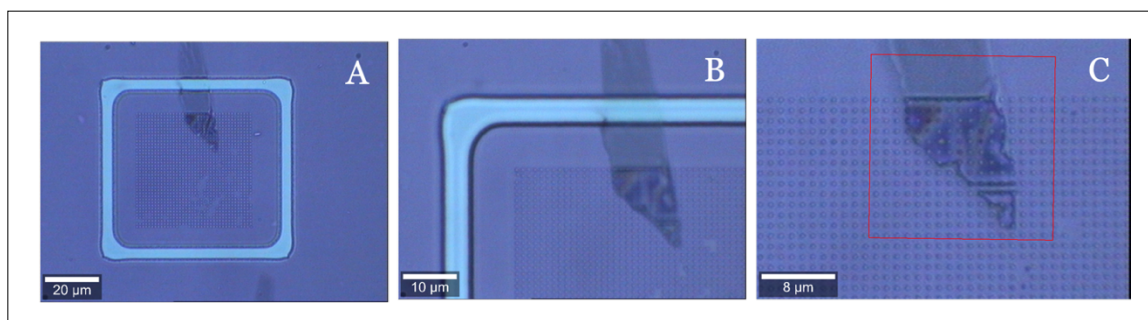


Figura 5.16. Imágenes de microscopio óptico del copo de grafeno transferido sobre una matriz de discos. A) aumento 20x B) aumento 50x C) Aumento 100x.

Espectroscopía RAMAN

En la Figura 5.17 se ilustran las imágenes Raman tomadas de los picos característicos del silicio y del grafeno, con dimensiones de $15 \times 15 \mu\text{m}$ y una resolución de 256 puntos y 256 líneas. En la Figura 5.17A se observa como se produce efecto SERS tanto en los discos que no tienen grafeno como en los que sí tienen grafeno, aunque en estos últimos el efecto es mejor. Además, en la Figura 5.17B y Figura 5.17C se puede ver claramente como en la zona del copo que está sobre los discos es mucho más intensa que las zonas del copo que está sobre silicio. Con esto se puede

concluir que incluso con el grafeno sobre los discos se produce SERS en ellos y se percibe mayor señal de Raman.

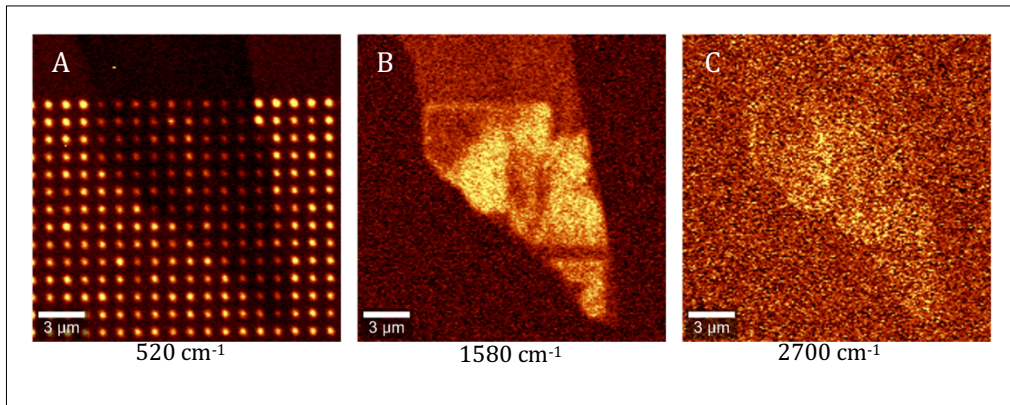


Figura 5.17. Imágenes Raman de los picos A) 520 cm^{-1} B) 1580 cm^{-1} C) 2700 cm^{-1}

Una vez se ha confirmado que se produce SERS sobre los discos y la señal Raman del grafeno se ve intensificada, se han obtenido dos espectros correspondientes con el grafeno sobre los discos y con el grafeno sobre el silicio, mostrados ambos en la Figura 5.18. Se puede apreciar que los picos G y 2D han aumentado considerablemente. Tomando como referencia el pico de 1580 cm^{-1} , la intensidad de ese pico del grafeno sobre el silicio es de 694 a. u., mientras que la intensidad del pico del grafeno en los discos es de 1790 a. u. Esto se traduce en que la señal Raman ha aumentado un 38%.

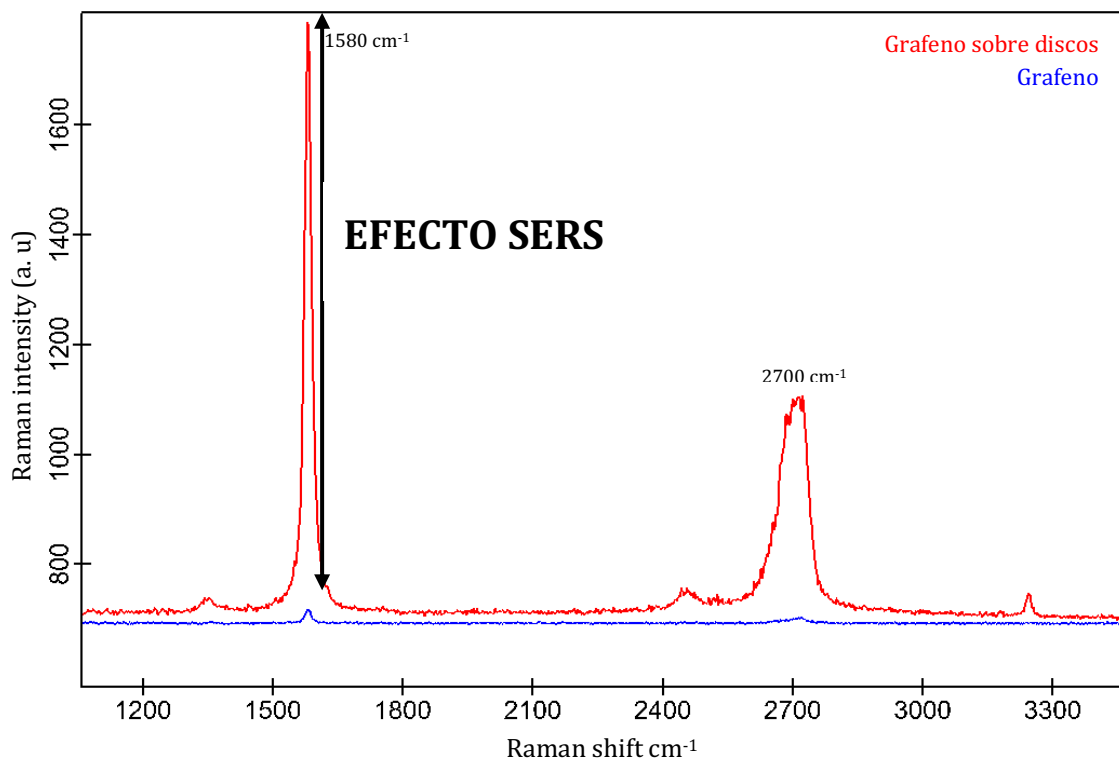


Figura 5.18. Espectro Raman en rojo del grafeno sobre los discos y en azul del grafeno sobre la muestra

AFM

Lo último que se llevó a cabo en este segundo objetivo fue un análisis con AFM de la topografía del copo sobre los discos. En la Figura 5.19A se muestra una imagen de dimensiones $25 \times 25 \mu\text{m}$ con una resolución de 256 puntos y 256 líneas. En la Figura 5.19B se puede observar el perfil del copo. Se ve que el copo presenta diferentes alturas, una zona en la que mide 200 nm aproximadamente y otra zona en la que llega a medir 300 nm. Esto indica que el copo presenta entre 200 y 300 capas de grafeno, en otras palabras, es un copo de grafito extremadamente grueso.

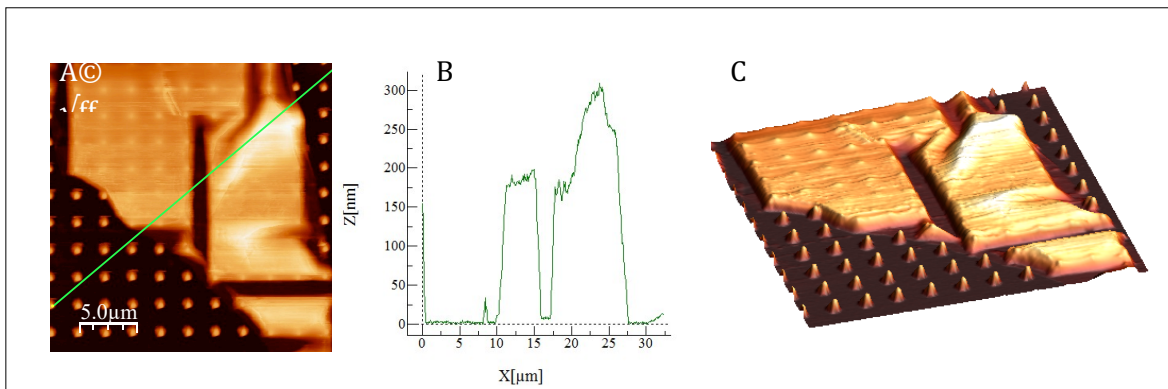


Figura 5.19. Imágenes AFM del copo de grafeno sobre los discos A) Topografía 2D B) Perfil del copo indicado en el corte de la figura A C) Topografía 3D

Se puede confirmar que si se deposita grafeno sobre discos de silicios que producen SERS, el efecto SERS se sigue produciendo y se puede ver la señal de Raman del grafeno intensificada. Con esta caracterización se finalizó el Objetivo 2, ya que como se ha explicado anteriormente, al ser grafito y además un grafito tan grueso, se estarían perdiendo las propiedades intrínsecas del grafeno. Otra desventaja del grosor es que, a mayor grosor del grafeno, más costosa es la funcionalización. Con todo ello, el siguiente objetivo es depositar grafeno sobre discos, pero esta vez se trata de una monocapa de grafeno comercial descrita en el apartado de materiales y métodos (4.1.3.). La razón de elegir este tipo de grafeno es que tras varios ensayos de exfoliación y transferencia de grafito sobre los discos con el dispositivo micromecánico, no llegamos a conseguir la transferencia de una sola capa de grafeno. Como solución se decidió usar grafeno comercial mientras se optimiza el método de transferencia con el dispositivo disponible en el NTC.

5.3. OBJETIVO 3. Funcionalización de la monocapa de grafeno transferida al dispositivo nanofotónico (discos en silicio) con PBASE y posteriormente con los anticuerpos de la prolactina

5.3.1. Caracterización de los discos de silicio

Al igual que en el objetivo 2, el primer paso es la caracterización de los discos de silicio para garantizar que en los discos se produce efecto SERS. Al haber utilizado una muestra nueva con otra disposición de discos litografiados, es importante localizarlos y posteriormente estudiarlos. La **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** ilustra la disposición de las matrices de discos: hay un total de 28 matrices siendo la disposición de los discos la indicada en la esquina

superior izquierda de la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Por otra parte, en la Figura 5.20 se muestran las dimensiones de los discos: están separados entre sí 1 nm y presentan una altura aproximada de 140 nm. Además, la oblea (oblea SOI: Silicon on Insulator) está conformada por una capa de óxido de silicio (2 μm) y bajo ella otra capa gruesa de silicio que conforma la propia oblea (220 μm).

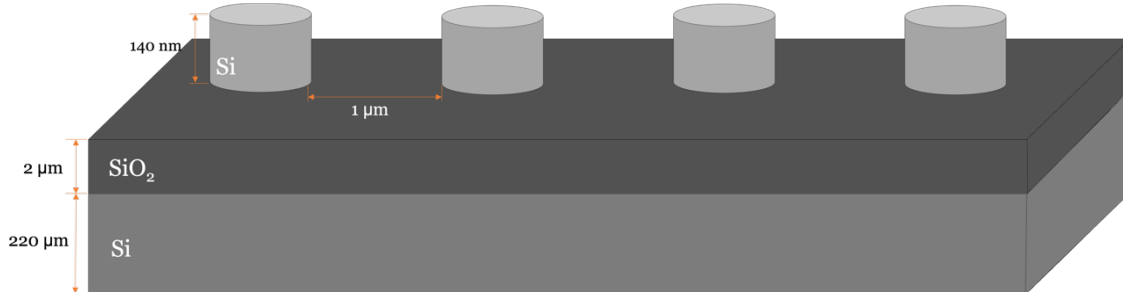


Figura 5.20. Representación de una fila de discos de toda la matriz con las dimensiones teóricas

El objetivo de tener matrices de discos distribuidas de manera homogénea sobre toda la muestra con dimensiones 3x2 cm es para asegurarse de que a la hora de hacer la transferencia de la monocapa de grafeno con unas dimensiones de 1 x 1 cm, se deposite sobre alguna de las matrices de discos. **De esta manera, además, tenemos 28 matrices funcionales disponibles para la inmovilización de distintos tipos de anticuerpos en un mismo chip.**



Figura 5.21. Disposición de las matrices de los discos sobre la muestra

AFM

Las dimensiones indicadas en el apartado anterior son teóricas, por lo que se procederá a caracterizar los discos mediante microscopía de barrido para comprobar dichas dimensiones pues después del proceso de fabricación puede haber ligeras diferencias. En la Figura 5.22A se puede observar una imagen de AFM de los discos en la que se muestra además el perfil a partir del cual se obtuvo la altura de los discos. En la Figura 5.32B se muestra el perfil mencionado, concluyendo que la altura de los discos es aproximadamente 140nm. El diámetro de los discos de 130 nm, se confirmó durante el proceso de litografiado.

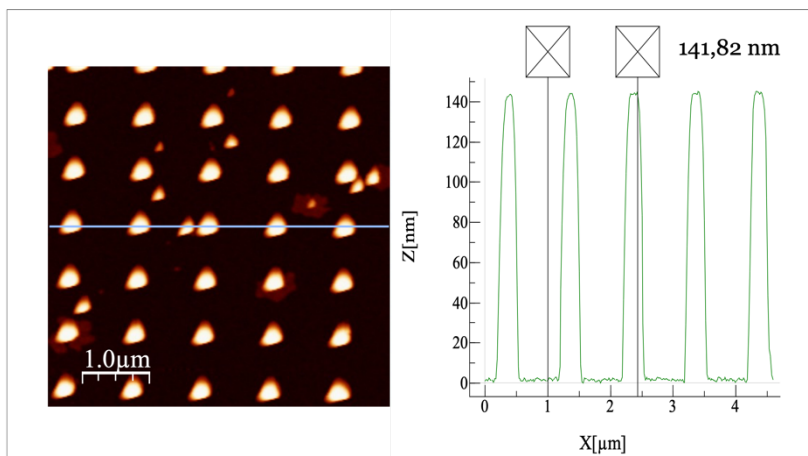


Figura 5.22. Imágenes AFM de los discos de silicio A) Topografía B) Perfil de los discos señalados en la figura A indicando la altura de los discos.

Espectroscopía Raman

Una vez conocidas la disposición y dimensiones de los discos se procede a verificar la funcionalidad de los mismos. En primer lugar, se realizó una imagen Raman de las matrices de los discos 6B. En la Figura 5.23A y Figura 5.23B se muestran los picos característicos del silicio y del óxido de silicio respectivamente. En ambas imágenes se pueden distinguir los discos, ya que en ellos la señal Raman es mucho más intensa que en el silicio de la muestra (fondo oscuro), por lo que analizando dichas imágenes podemos concluir que sí que se produce efecto SERS. No obstante, esto se cuantificará con los espectros puntuales obtenidos.

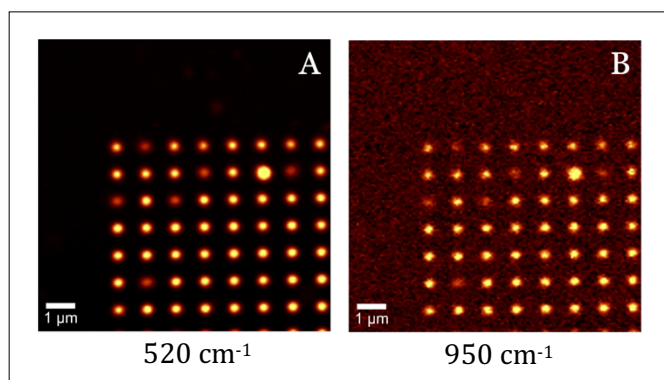


Figura 5.23. Imágenes Raman correspondientes con los picos característicos del silicio. A) 520 cm^{-1} B) 950 cm^{-1}

En la Figura 5.24 se ilustran los espectros obtenidos dentro del disco en azul y fuera del disco en rojo. Se observa que la señal Raman dentro del disco se ve intensificada en gran medida. Cuantificando este fenómeno, sabiendo que el pico del silicio cristalino de 521 cm^{-1} presenta una intensidad Raman de 1431 a. u y ese mismo pico posee una intensidad Raman de 2387 a. u, se puede afirmar que la señal Raman dentro de un disco se ve intensificada en un 40 % aproximadamente. Esto indica que la disposición de los discos es la correcta y que se produce de una manera efectiva SERS. Una vez concluido esto, se procede a hacer la transferencia de la monocapa de grafeno explicada en detalle en el siguiente apartado.

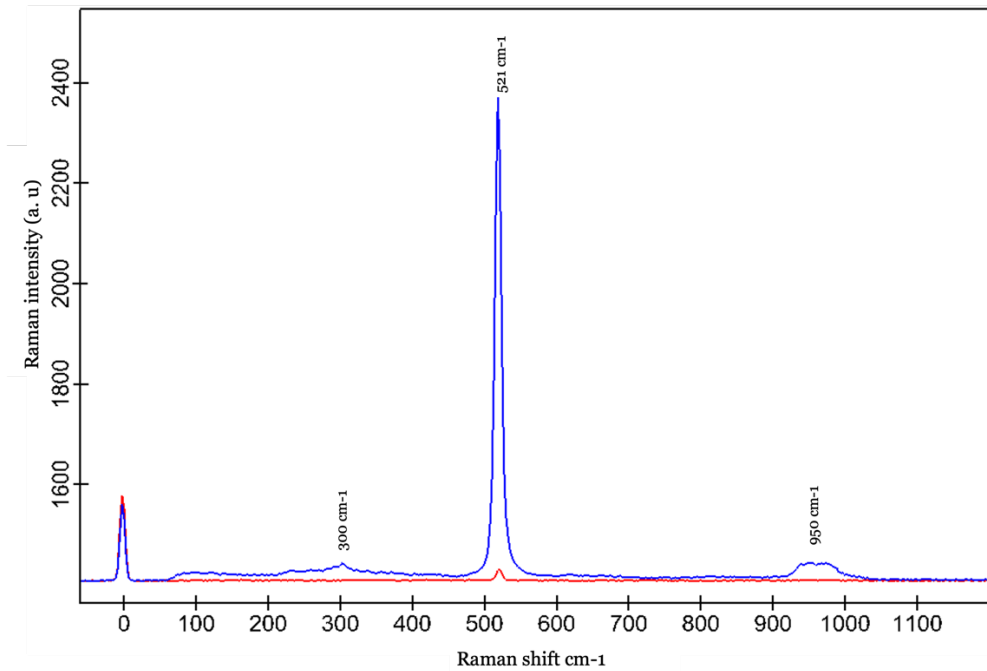


Figura 5.24. Espectros Raman en azul dentro de un disco y en rojo fuera del disco

5.3.2. Transferencia de la monocapa de grafeno sobre la película de polímero en la oblea de SiO₂

La transferencia de la monocapa de grafeno explicada en el apartado 4.1.3, se llevó a cabo una vez caracterizado los discos. En la Figura 5.25A se puede observar la monocapa de grafeno antes de liberarla en el agua ultrapura. Tras introducirla en el agua desionizada, la monocapa de grafeno se desprende del polímero de soporte de manera que queda libre en la disolución siendo posible depositarla en el sustrato en cuestión. Asimismo, en la Figura 5.25B se puede apreciar la monocapa de grafeno depositada sobre la muestra de silicio litografiada con las matrices de discos. Posterior a la deposición se llevaron a cabo los procesos correspondientes de secados para asegurar correcta adhesión al sustrato.

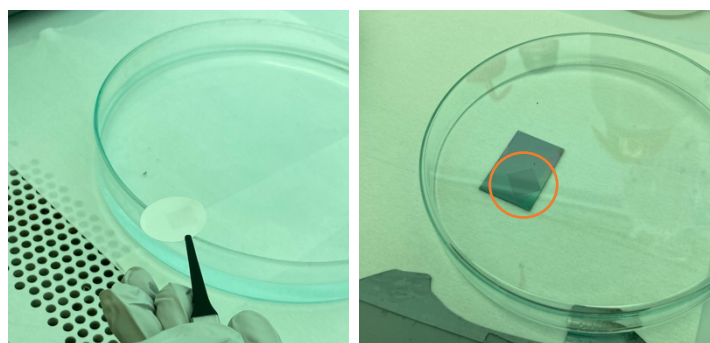


Figura 5.25. Fotografías tomadas en la sala limpia de A) Monocapa de grafeno previa a la inmersión en el agua ultrapura B) Muestra de los discos con la monocapa de grafeno

Por otra parte, con el microscopio óptico se pudo estimar aproximadamente la localización de la monocapa sobre los discos, ilustrada en la Figura 5.26. Es aproximado ya que las matrices de discos a simple vista no se pueden ver por lo que es necesario utilizar un microscopio óptico.

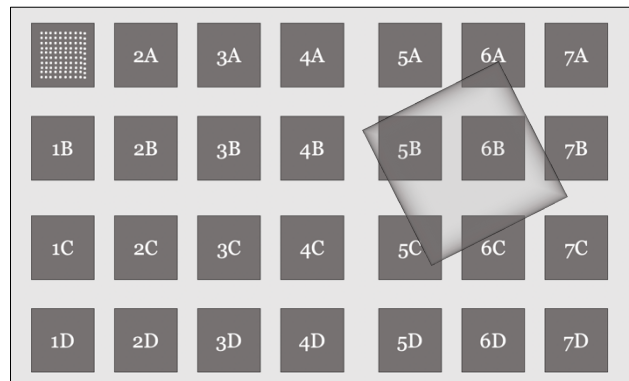


Figura 5.26. Esquema de las matrices de los discos de silicio con la monocapa transferida

Tras haber realizado la transferencia de manera exitosa del grafeno a la muestra, se procedió a caracterizar el borde de la monocapa, es decir, tomar la imagen en un borde donde a un lado hay silicio y al otro lado grafeno con AFM para poder determinar la altura de la capa. En la Figura 5.27A se muestra una imagen de AFM de $25 \times 25 \mu\text{m}$ con una resolución de 256 puntos y 256 líneas en la que se puede observar el borde de la monocapa: a la derecha de la línea naranja es la del silicio de la muestra y la parte izquierda se corresponde con el grafeno. Cabe destacar también que la línea naranja que se ve en la Figura 5.27A corresponde con el borde y presenta una altura mayor debido a que la monocapa en los bordes presenta defectos debido a los pliegues producidos durante la transferencia.

Observando detenidamente el gráfico del perfil mostrado en la Figura 5.27B, se puede apreciar el pliegue de la monocapa en el borde, así como un ligero aumento de la altura en la parte correspondiente con la monocapa de grafeno correspondiente a $\approx 1 \text{ nm}$, por lo que podemos afirmar que se ha transferido de manera correcta

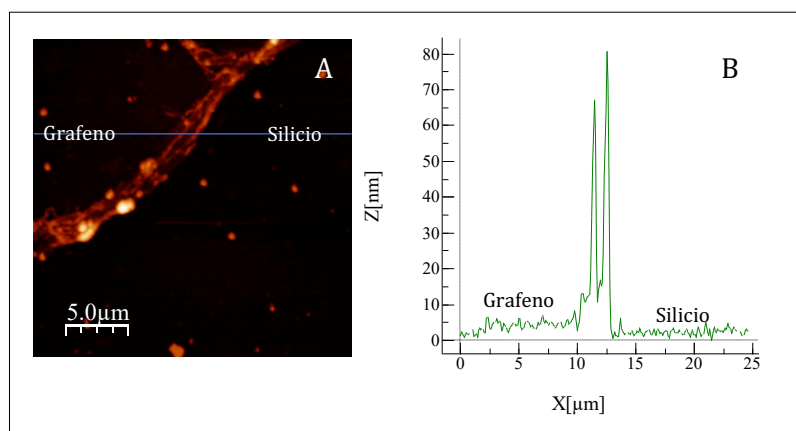


Figura 5.27. Imágenes AFM del borde de la lámina de grafeno A) Topografía de la lámina, en la esquina superior izquierda es grafeno B) Perfil de la muestra, indicado con una línea azul en la imagen A.

Espectroscopía Raman

Para confirmar la presencia del grafeno, se tomó un espectro puntual de la monocapa. La Figura 5.28 muestra dicho espectro y se confirma la presencia de grafeno ya que la intensidad del pico 2D es mayor a la del pico G. Además, se puede afirmar que es un grafeno sin apenas defectos ya que la intensidad del pico de defectos es relativamente baja.

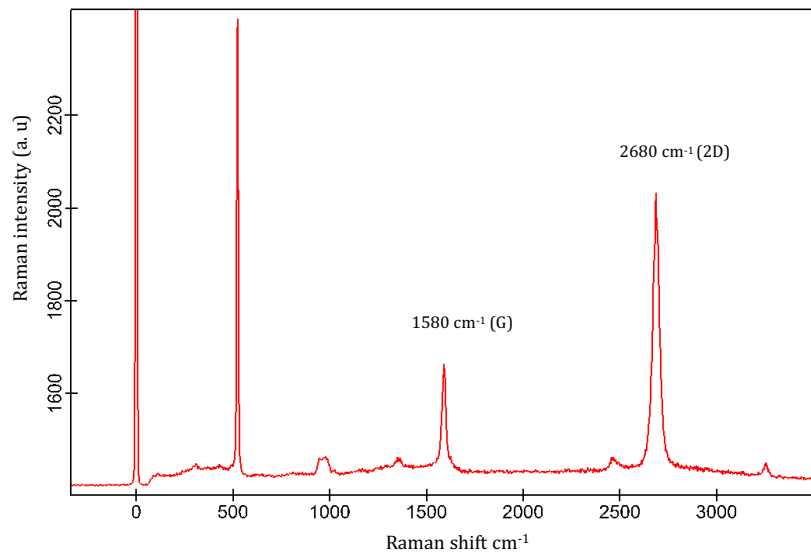


Figura 5.28. Espectro puntual de Raman tomado en la monocapa de grafeno.

Una vez confirmada la presencia del grafeno, nos situamos sobre la matriz 6B para la caracterización del grafeno sobre los discos y se tomó una imagen de $10 \times 10 \mu\text{m}$ con una resolución de 100 puntos y 100 líneas. En la Figura 5.29A está representado el pico característico del silicio y se pueden apreciar con una buena resolución todos los discos. Las imágenes B y C muestran los picos correspondientes al grafeno. En ellas se pueden distinguir también los discos, aunque se observan una especie de manchas las cuales posiblemente sean debido a que la monocapa de grafeno no está dispuesta de manera homogénea sobre el sustrato y presenta pliegues.

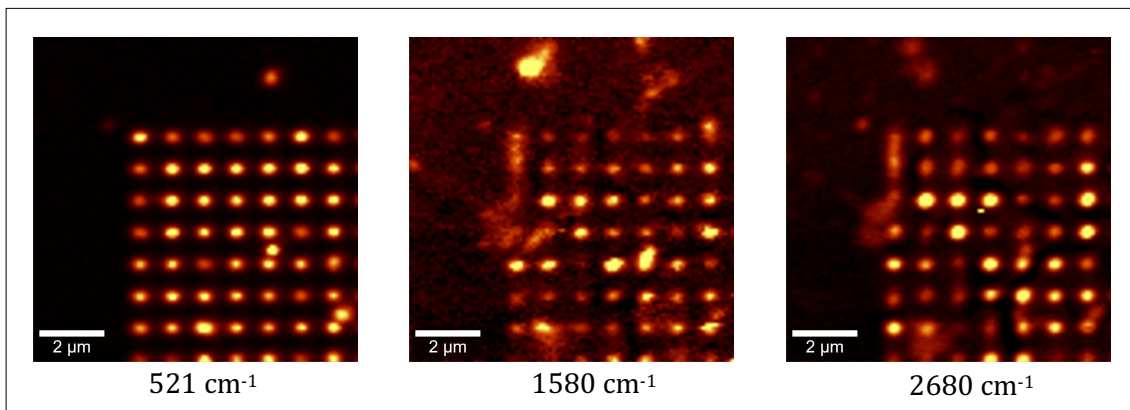


Figura 5.29. Imágenes Raman de los discos con la lámina de grafeno encima A) Pico 521 cm^{-1} correspondiente al silicio B) Pico 1580 cm^{-1} correspondiente al pico G del grafeno C) Pico 2680 cm^{-1} correspondiente al pico 2D del grafeno.

No obstante, para comprobar que la señal de grafeno se ve intensificada y que en efecto se produce efecto SERS del sustrato, se han tomado dos espectros puntuales, uno dentro de un disco y el otro fuera del disco. De esta manera, la Figura 5.30 ilustra los dos espectros y se pueden observar como el espectro rojo (tomado dentro de los discos) se ve intensificado respecto al espectro azul (fuera de los discos). Cuantificando este resultado, el espectro del grafeno se ve intensificado en un 5% cuando está sobre los discos en comparación que el grafeno sobre el sustrato del silicio.

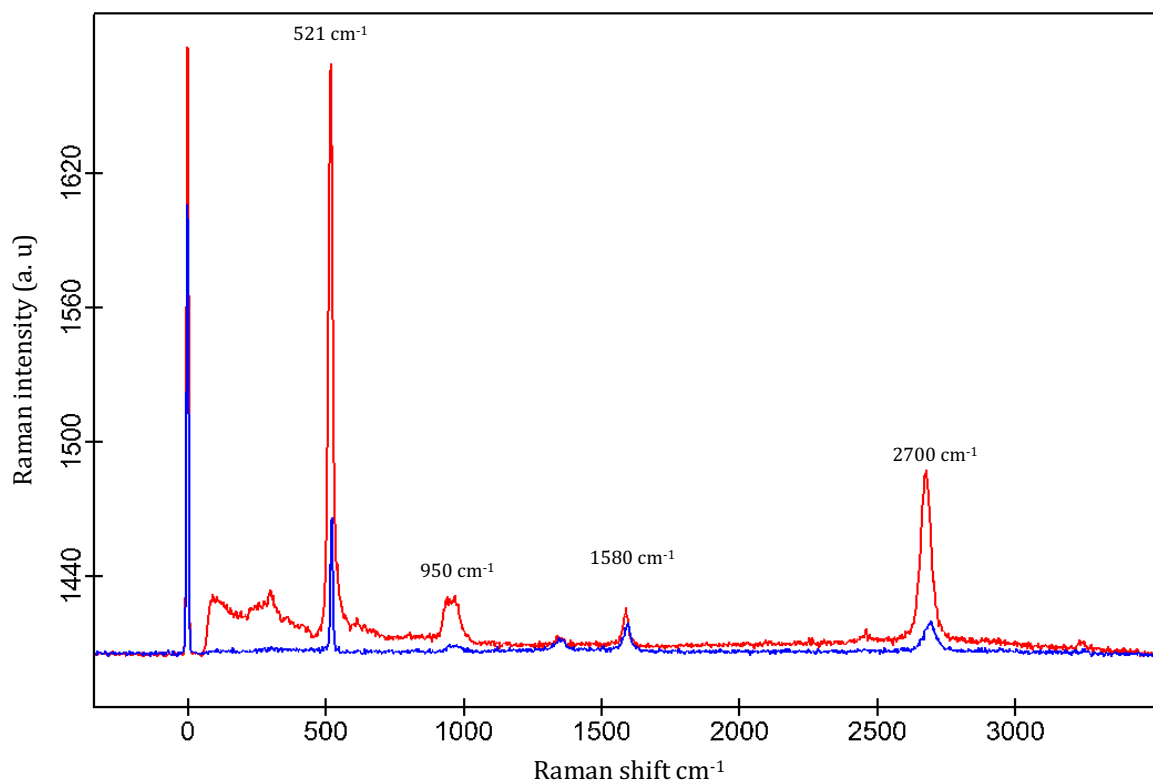


Figura 5.30. Espectros puntuales Raman: en rojo dentro de un disco y en azul fuera del disco

AFM

Siguiendo el mismo procedimiento que durante la caracterización de los discos sin grafeno, se tomaron imágenes de AFM de los discos de $5 \times 5 \mu\text{m}$ con una resolución de 256 puntos y 256 líneas, y se realizó un perfil. A priori, la Figura 5.31 que muestra los resultados después de realizar la transferencia del grafeno se ve prácticamente igual.

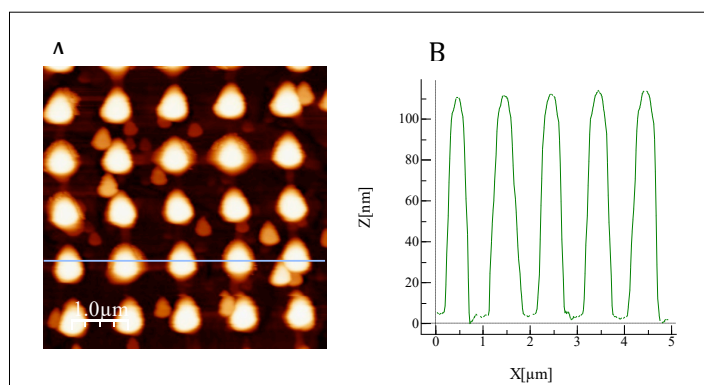


Figura 5.31. Imágenes AFM de la monocapa de grafeno sobre los discos A) Topografía B) Perfil

La Figura 5.31B muestra el perfil de los discos (Figura 5.31A), donde indica que la altura de los discos es de 110 nm aproximadamente. Recordando la caracterización de los discos antes de la transferencia, su altura era de 140 nm. La hipótesis de esta reducción de la altura es que el grafeno está suspendido sobre los discos y como consecuencia al tomar medidas de AFM aparece como que la altura de los discos ha disminuido.

5.3.3. Funcionalización del grafeno sobre la oblea con PBASE

Para la realización de la funcionalización de la muestra, se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el apartado 5.1.2, con un tiempo de inmersión de la muestra en la disolución de PBASE de 2 horas. La Figura 5.32 muestra las imágenes Raman tomadas antes de la funcionalización y después de la funcionalización. Atendiendo al pico de 1580 cm^{-1} y 2680 cm^{-1} tras la funcionalización se ven menos discos, la señal en general es más débil y ha aumentado el ruido. La causa de esto es que al estar el PBASE funcionalizado en el grafeno, hace que se atenúe la señal del grafeno. Lo que ocurrió también tras la funcionalización es que hay distintas zonas en las que el grafeno se rompió. En la Figura 5.32B aparece señalada (recuadro azul) la zona donde la lámina de grafeno se ha roto como consecuencia del peso de la molécula del PBASE sobre la monocapa de grafeno suspendida en los discos, por lo que aparentemente el PBASE se ha depositado sobre el grafeno. No obstante, esto se confirmará con los espectros Raman puntuales.

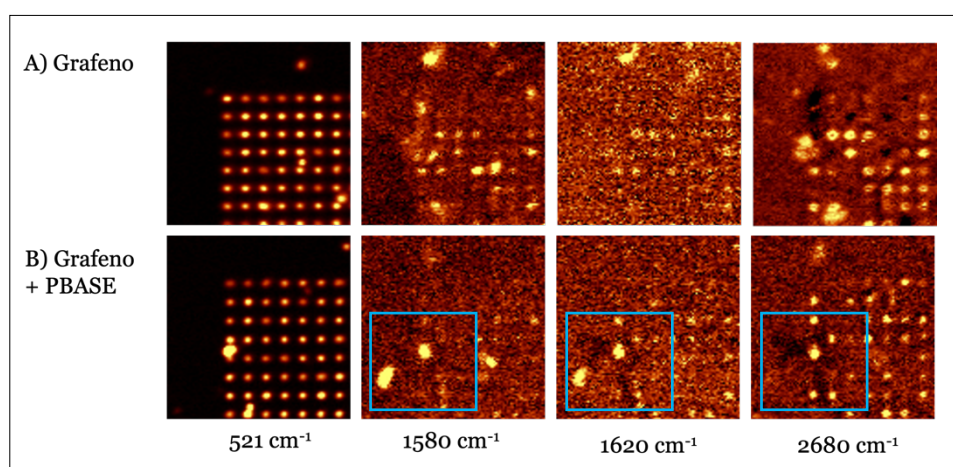


Figura 5.32. Imágenes Raman de los picos característicos del grafeno y el silicio. A) grafeno B) grafeno funcionalizado con PBASE

Por otra parte, como se describió en el apartado del objetivo 1 'Funcionalización del grafeno sobre la oblea con PBASE' el espectro del grafeno debe sufrir una serie de cambios que indiquen que se ha enlazado correctamente el PBASE. La Figura 5.33 muestra dos espectros tomados en la matriz de discos 6B en rojo dentro de un disco y en azul fuera de un disco. Por una parte, en dicho espectro se debe de confirmar la presencia del PBASE (presencia del pico del piero en 1620 cm^{-1} y ensanchamiento del pico 2D de grafeno) y la funcionalidad del sustrato SERS, pues el espectro dentro del disco (rojo) es más intenso que fuera del disco (azul).

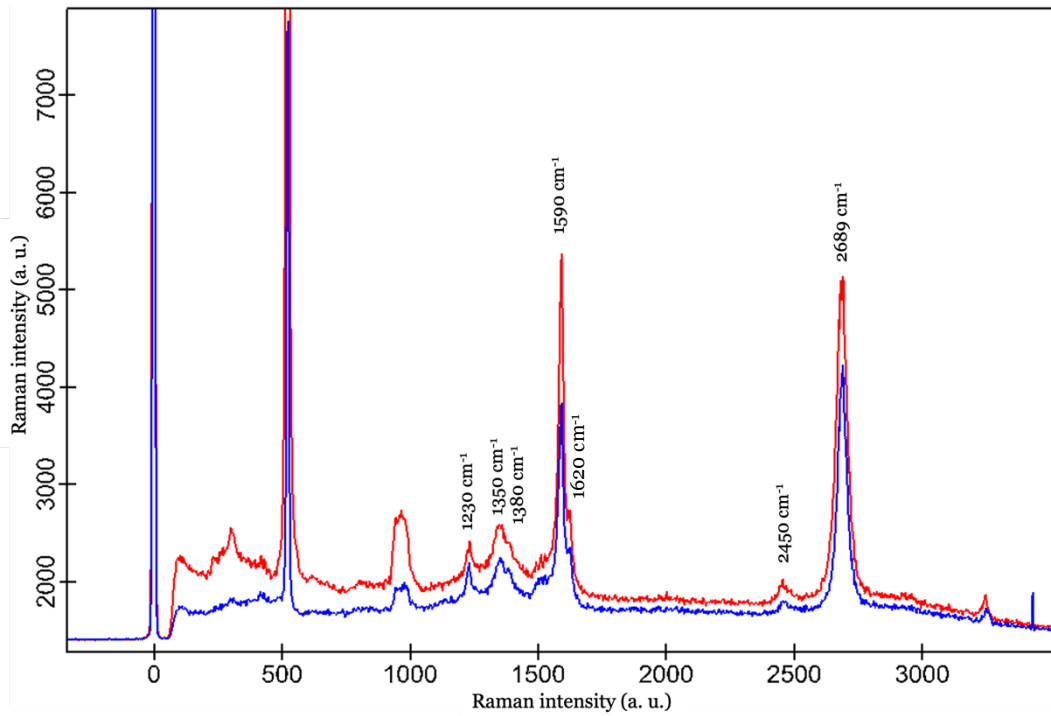


Figura 5.33. Espectros RAMAN tras la funcionalización. En rojo dentro de un disco (más intensos gracias al efecto SERS) y en azul fuera de un disco.

Una vez caracterizada la muestra con Raman, se continuó con AFM, tomándose medidas en el borde de la monocapa, justo en la frontera donde a un lado hay grafeno y al otro hay silicio y por otra parte se tomaron medidas en la matriz de discos 6B.

En Figura 5.34 se pueden apreciar los perfiles de la monocapa de grafeno antes (Figura 5.34A) y después de la funcionalización (Figura 5.34B). A simple vista se puede ver como la parte correspondiente del grafeno ha aumentado tras la funcionalización y de manera cuantitativa, antes de la funcionalización había una diferencia entre el grafeno y el silicio de 1,5 nm y tras la funcionalización esta diferencia aumentó a 2,8 nm. Hay una diferencia aproximadamente de 2 nm por lo que se puede afirmar que el PBASE está sobre el grafeno y la muestra se ha funcionalizado correctamente.

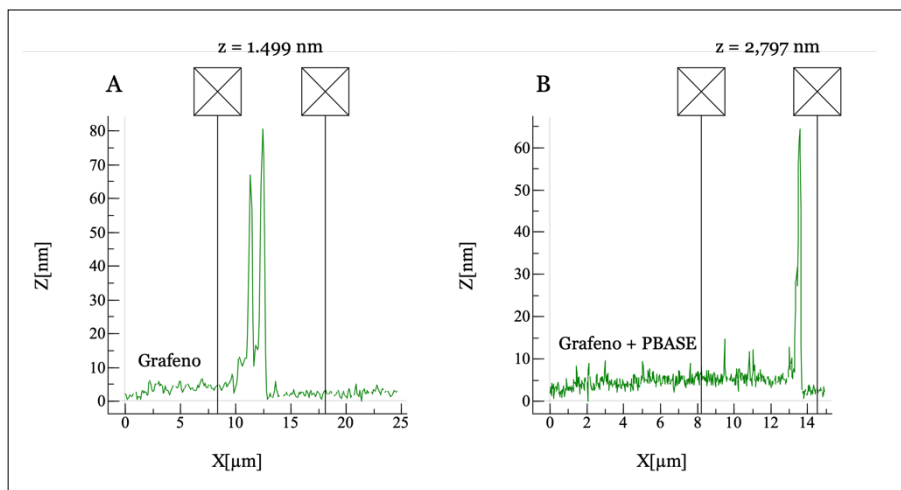


Figura 5.34. Perfil del borde de la monocapa de grafeno A) grafeno sin funcionalizar B) grafeno funcionalizado con PBASE. En ambos perfiles se indica la altura de la capa.

Por otro lado, se han analizado los perfiles de los discos sin grafeno, con grafeno y funcionalizados, mostrados en la Figura 5.35. Como se puede observar en el perfil de los discos funcionalizados, han vuelto a disminuir el diámetro respecto a los discos sin funcionalizar. Además, analizando la altura de estos discos, ha vuelto a aumentar hasta los 143.96 nm aproximadamente. Este resultado es una señal de que al enlazarse el PBASE con el grafeno ha hecho que aumente el peso sobre el grafeno y ha pasado de estar suspendido como muestra el perfil del grafeno sobre los discos a moldearse y ajustarse perfectamente a los discos. Además, el enlace del PBASE al grafeno se puede confirmar debido al aumento de altura en el perfil del disco de aproximadamente 2 nm.

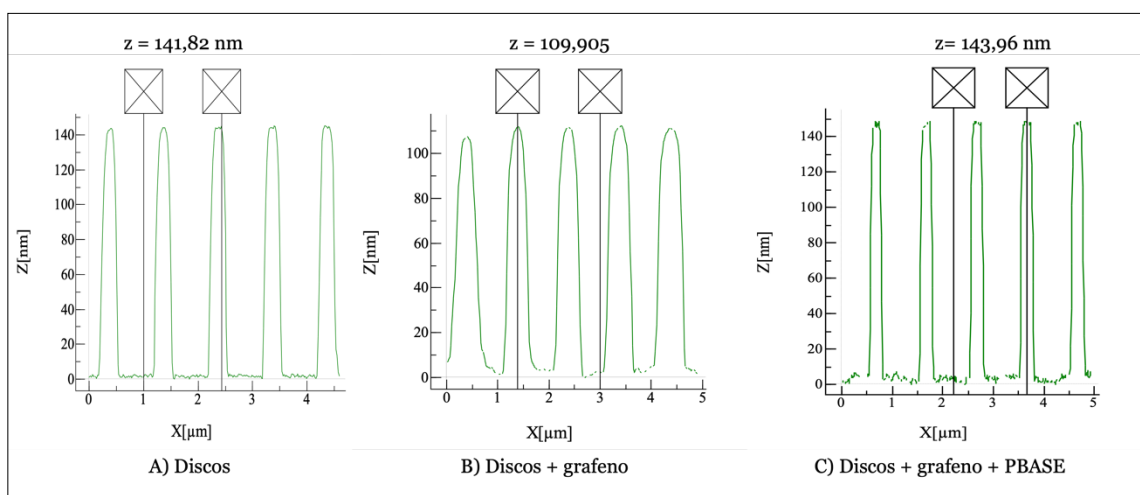


Figura 5.35. Perfiles obtenidos de imágenes de AFM A) Discos B) Discos después de la transferencia de grafeno y C) Discos después de la transferencia de grafeno funcionalizado con PBASE. En todos los perfiles se indica la altura de los discos.

Resumiendo, los resultados obtenidos, el grafeno sobre los discos queda suspendido y no se ajusta a la estructura de los discos lo que hace que al tomar medidas con el AFM aparentemente los discos disminuyen su altura. Tras la funcionalización con PBASE, al tener una molécula encima que ejerce peso sobre él, se adapta a la forma de los discos y la altura ahora son 2 nm más que la inicial como consecuencia de la funcionalización con la molécula PBASE. Con todo esto se

concluye que el grafeno se ha depositado correctamente sobre los discos y la funcionalización ha sido exitosa.

5.3.4. Funcionalización del complejo grafeno + PBASE con el anticuerpo monoclonal

Como se ha comentado en el apartado de ‘Inmovilización de anticuerpos en el dispositivo nanofotónico’, el primer paso que se ha llevado a cabo ha sido la inmovilización del anticuerpo del SARS-CoV-2 para conocer la respuesta del complejo grafeno – PBASE y posteriormente la inmovilización del anticuerpo de la prolactina. Este paso se realiza pues existe experiencia previa en el grupo de inmovilización del **anticuerpo del SARS-COV-2** sobre grafeno exfoliado mecánicamente y es una manera de validar la inmovilización sobre grafeno monocapa de un anticuerpo conocido. Una vez comprobada la validez del procedimiento se procederá a inmovilizar el **anticuerpo de la prolactina**.

1. Inmovilización del del **anticuerpo del SARS-COV-2**:

Para la inmovilización del anticuerpo del SARS-Cov-2 sobre el grafeno funcionalizado con PBASE en el sustrato SERS, se utilizó el microscopio óptico con un aumento de 10x para la localización de la lámina de grafeno sobre la matriz de discos, en este caso la 5B. Una vez localizada, y haciendo uso de la fuente de luz del microscopio, se depositó la disolución del anticuerpo (concentración de 200 ug/mL) con ayuda de una micropipeta (Figura 5.36).

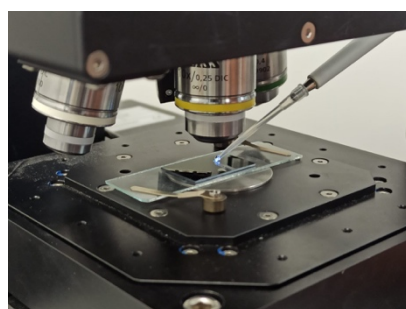


Figura 5.36. Deposición de la disolución del anticuerpo sobre el sustrato

Tras funcionalizar la muestra con el anticuerpo del SARS-Cov-2, lo primero que se hizo fue observar por el microscopio óptico observar si se había producido cambios macroscópicos en la muestra. La Figura 5.37 muestra las imágenes de la matriz 6B del grafeno. La Figura 5.37C se corresponde con la matriz de discos tras la deposición del anticuerpo. En ella, aparecen unas “manchas” o aglomerados que en un primer momento se hizo la hipótesis de que podrían ser aglomerados de anticuerpos. No obstante, se realizó un análisis Raman para confirmar la naturaleza de estos aglomerados.

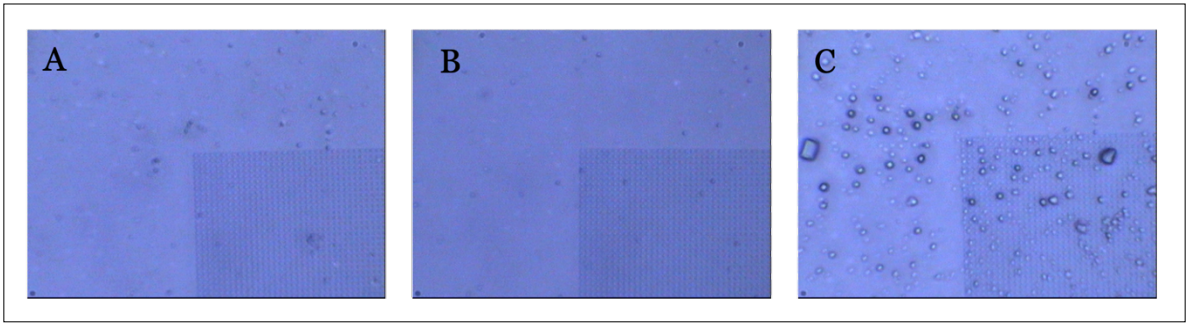


Figura 5.37. Imágenes tomadas con el microscopio óptico con un aumento de 100x A) grafeno B) grafeno + PBASE C) grafeno + PBASE + Ab.

Espectroscopía Raman

La Figura 5.38 muestra dos figuras comparativas del grafeno funcionalizado con el PBASE (A) y el grafeno funcionalizado con el PBASE y el anticuerpo (B). La diferencia más llamativa es que los pico en 1580 cm^{-1} , en 1620 cm^{-1} y en 2680 cm^{-1} aparecen con ruido, por lo que hay una mayor dificultad para distinguir los discos. Esto es debido a la funcionalización de moléculas sobre la superficie que hace que la señal Raman del grafeno se vea atenuada, por lo que se puede pensar que el anticuerpo se ha depositado correctamente sobre los discos. No obstante, se debe de comprobar con los espectros que el anticuerpo se ha enlazado con el PBASE así como la funcionalidad del sustrato como sustrato SERS.

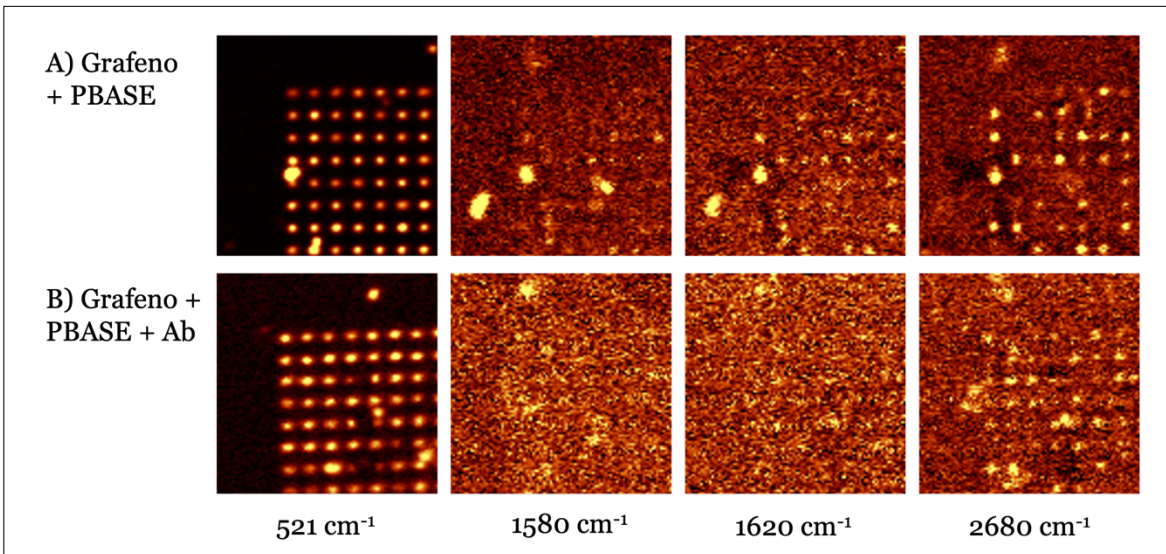


Figura 5.38. Imágenes Raman de los picos característicos del grafeno

Además de la confirmación del enlace anticuerpo-PBASE, se debe de comprobar que el sustrato sigue siendo funcional, es decir, se produce efecto SERS. La Figura 5.39 muestra dos espectros tomados dentro de un disco (azul) y fuera del disco (rojo) donde se puede observar que el espectro del grafeno tomado fuera del disco es inapreciable. Sin embargo, el espectro tomado dentro del disco se pueden distinguir los picos del grafeno de manera clara e intensa, por lo que se puede afirmar que el sustrato es funcional como sustrato SERS.

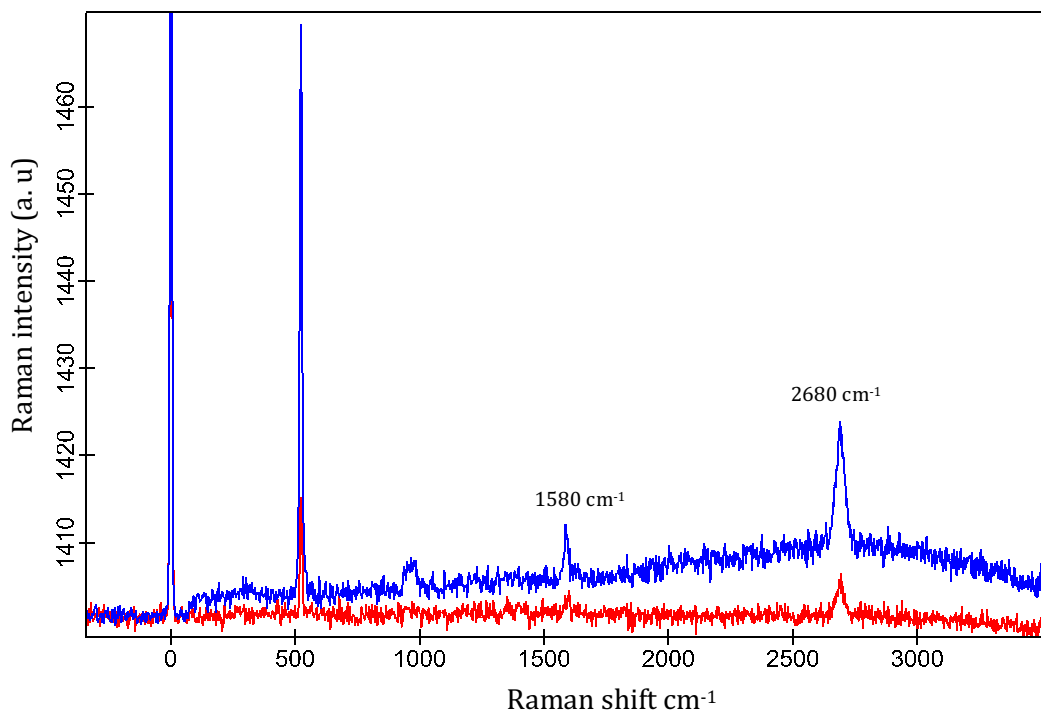


Figura 5.39. Espectros puntuales de los discos tras la funcionalización con el anticuerpo. En rojo fuera de un disco y en azul dentro de un disco. El espectro dentro del disco muestra la señal típica de la capa de Grafeno gracias al efecto SERS.

Se ha demostrado en trabajos previos [46], [50] que los cambios que debe sufrir el espectro del grafeno como consecuencia del enlace anticuerpo-PBASE son, por una parte, la disminución en intensidad del pico 2D (2680 cm^{-1}) debido a la funcionalización que produce una reducción de la intensidad de la señal con respecto a la señal de G-PBASE. Y por otra parte debe producirse un desplazamiento del pico 2D correspondiente con el dopado de la capa del grafeno debido a la funcionalización con PBASE-anticuerpo. Para comprobar estos dos efectos y por lo tanto confirmar la inmovilización del anticuerpo en el sustrato, se han tomado medidas en distintos discos de la matriz y posteriormente se han procesado y analizado los espectros en esos puntos comparando los tres estados del sustrato: con grafeno, con grafeno y PBASE y con grafeno, PBASE y anticuerpo.

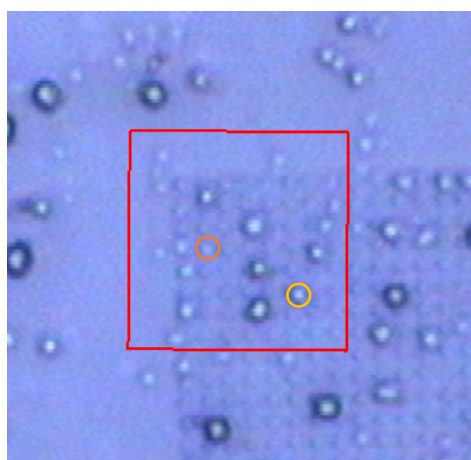


Figura 5.40. Imagen tomada con el microscopio óptico de la matriz de los discos tras la funcionalización. En naranja está rodeado el disco sin aglomerado donde se tomó un espectro puntual y en amarillo un disco con aglomerado.

Para realizar un análisis exhaustivo del sustrato, se tomaron medidas Raman en aproximadamente 15 discos donde la mitad de ellos estaban cubiertos por aglomerado y la otra mitad no. Posteriormente se procesaron dichos espectros para cuantificar los cambios que sufrían y se realizó una tabla con los cambios que sufrían los espectros en función de si se tomaron sobre un aglomerado o no. Por cuestiones de espacio, se analizan únicamente dos gráficas representativas de cada situación: disco con aglomerado y sin aglomerado.

Caracterización de Raman de un aglomerado: La Figura 5.41 muestra los espectros comparativos en un disco con aglomerado (indicado en la figura Figura 5.40 en amarillo), mostrado en la en todos los pasos de la funcionalización (verde G, rojo G+PBASE, azul G+PBASE+anticuepro Sars-Cov-2). Como se puede observar el espectro del grafeno con PBASE y el espectro con PBASE y anticuerpo son prácticamente iguales. En ambos espectros se aprecia una reducción significativa de la intensidad de los picos G y 2D, debido a la funcionalización con la molécula de PBASE como se ha discutido anteriormente, la aparición (aunque tenue) del pico del pireno en 1620 cm^{-1} y desplazamiento del pico 2D por la transferencia de carga típica de la funcionalización de PBASE. Sin embargo, no se observan ninguno de los efectos esperados para la inmovilización del anticuerpo. Concluimos entonces que estos aglomerados son del disolvente PBS utilizado en la dilución del anticuerpo.

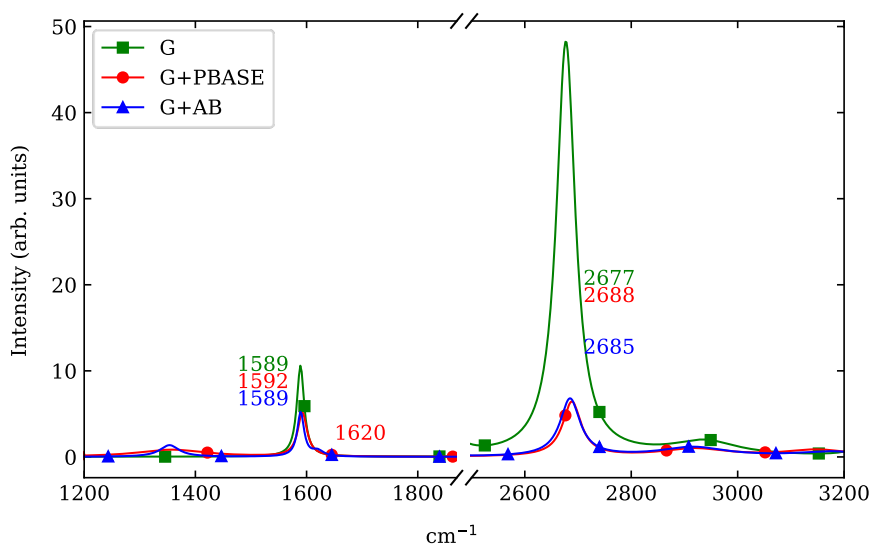


Figura 5.41. Espectro Raman sobre un cristal de PBS. En verde del grafeno, en rojo del grafeno con PBASE y el azul grafeno con PBASE y anticuerpo.

Sabiendo que los aglomerados no son anticuerpos, se tomaron medidas en otros discos (indicado en la figura Figura 5.40 en naranja) y se obtuvieron los espectros puntuales de Raman mostrados en la Figura 5.41 donde se muestran las tres etapas de funcionalización del grafeno:

1. Espectro Raman de un disco con grafeno **G sin funcionalizar**: línea verde del espectro donde se observan los picos característicos del grafeno: El pico G en 1589 cm^{-1} , y pico 2D en 2672 cm^{-1} , más alto que el G.
2. Espectro Raman del mismo disco con grafeno **funcionalizado con PBASE**: línea roja del espectro donde se aprecia la presencia de moléculas encima del grafeno. Aparece el pico D de defectos en 1390 cm^{-1} , el pico 1620 cm^{-1} , característico de la

molécula PBASE; y por último el pico 2D aparece en 2685 cm^{-1} , más estrecho que el anterior y desplazado a la derecha 7 cm^{-1} .

3. Espectro Raman del mismo disco con grafeno **funcionalizado con PBASE y con anticuerpo del SARS-CoV-2 (Ab)**: línea azul del espectro, donde se observa una disminución de la señal y un desplazamiento del pico 2D. No se esperan picos nuevos de Raman para la presencia de la proteína pues sabemos por la literatura que dicha especie orgánica no presenta picos característicos en esta espectroscopia. Sin embargo, su presencia se puede analizar gracias al pico 2D que presenta distintos desplazamientos dependiendo de la transferencia electrónica del grafeno con las moléculas funcionalizadas. En este caso el pico 2D aparece en 2687 cm^{-1} , desplazado a la derecha 9 cm^{-1} con respecto al G sin funcionalizar.

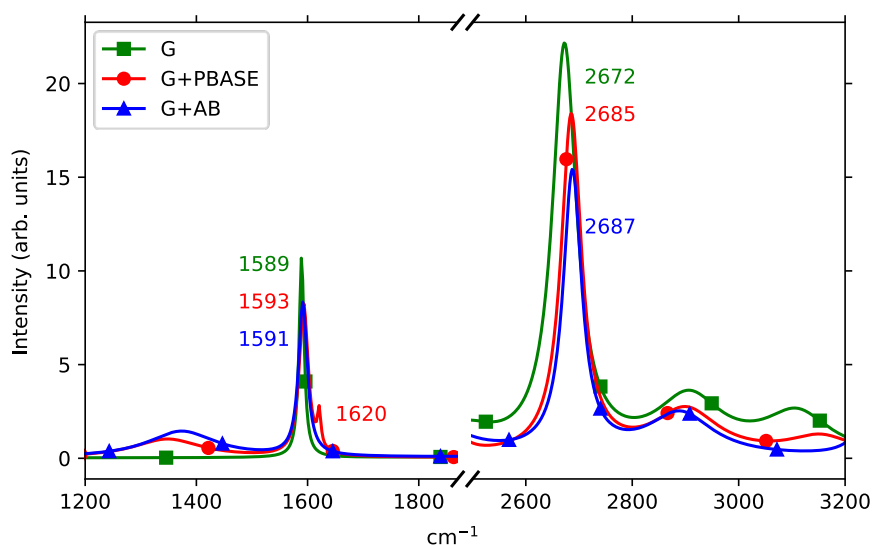


Figura 5.42. Espectros Raman sobre un disco con anticuerpo. En verde del grafeno, en rojo del grafeno con PBASE y en azul del grafeno con PBASE y anticuerpo SARS-CoV-2.

Finalmente, se tomó una medida de AFM mostrada en la Figura 5.43. En la imagen A se pueden apreciar los discos y sobre ellos los aglomerados (quizás cristales de la sal) de PBS mencionados anteriormente. Además, se realizó un perfil mostrado en la imagen B en el que se ilustran los discos y el cristal de PBS con una altura aproximada de 300 nm . Por otra parte, la altura de los discos es de 132 nm , habiendo una diferencia de altura con los discos funcionalizados únicamente con el PBASE de 10 nm . Esto se debe a la distribución heterogénea del anticuerpo, habiéndose acumulado más en algunas zonas que en otras.

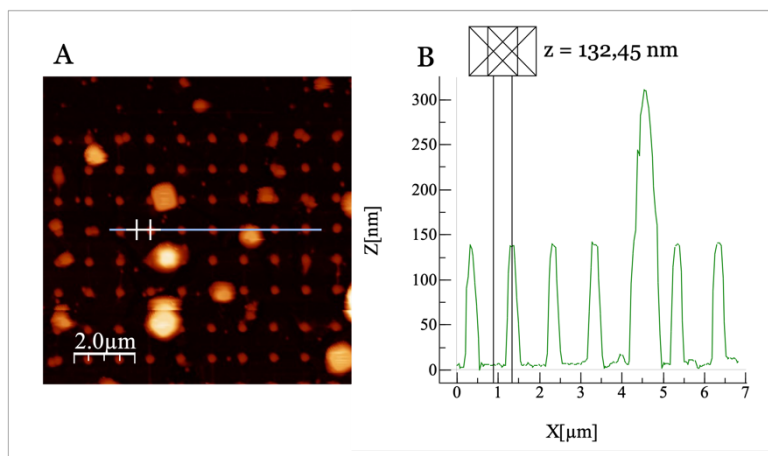


Figura 5.43. Imágenes AFM de la matriz de discos tras la funcionalización con el anticuerpo. A) Topografía B) Perfil

2. Inmovilización del del **anticuerpo de la prolactina:**

Una vez verificada la correcta inmovilización del anticuerpo sobre el dispositivo fotónico, se procedió a tomar espectros puntuales al sustrato tras la deposición del anticuerpo de la **prolactina**.

Gracias al diseño de los sustratos SERS donde se litografiaron 28 matrices de discos funcionales disponibles para la inmovilización de distintos tipos de anticuerpos en un mismo chip, pudimos inmovilizar los anticuerpos de la PRL en este caso en la matriz 6B, matriz la cual se ha caracterizado durante todo el proceso en todas las etapas del trabajo. El proceso de deposición de la prolactina se llevó a cabo de manera análoga a la deposición de los anticuerpos del SARS-CoV-2: sobre el grafeno funcionalizado con PBASE en el sustrato SERS, en este caso en otra matriz de discos, se utilizó el microscopio óptico con un aumento de 10x para la localización de la zona de interés. Una vez localizada, y haciendo uso de la fuente de luz del microscopio, se depositó la disolución del anticuerpo con ayuda de una micropipeta. En este caso la concentración será de 40 ug/mg, 5 veces menos que la inmovilización del anticuerpo SARS-CoV-2.

Para el análisis de la inmovilización del anticuerpo anti-PRL se ha seguido el mismo procedimiento que para el anticuerpo SARS-CoV-2: se tomaron espectros en 15 discos, esta vez donde no había aglomeraciones pues no aportan información relevante para los resultados buscados. Tras procesar todos los espectros, la Figura 5.44 muestra dos gráficas en las que se analizan en cada una de ellas un mismo disco de la matriz en las tres etapas del proceso: en verde sobre grafeno, en rojo sobre grafeno funcionalización con PBASE y en azul tras la inmovilización del anticuerpo de la prolactina. A la izquierda de cada gráfica está representado el pico de 521 cm^{-1} (Silicio) donde se indica con un círculo verde el disco que se ha analizado.

La Figura 5.44A representa un disco donde la señal del silicio es más intensa respecto al disco de la Figura 5.44B. La gráfica correspondiente al disco de la imagen A muestra que no hay diferencia entre en el espectro del grafeno funcionalizado y del grafeno funcionalizado y con el anticuerpo anti-PRL inmovilizado, por lo que se puede afirmar que no hay anticuerpo anti-PRL sobre ese disco. Es decir, cuando el anticuerpo está depositado sobre el silicio, la señal Raman del pico de 521 cm^{-1} es más débil ya que al tener encima una molécula, en este caso el anticuerpo anti-PRL impide que se recoja toda la señal del Silicio.

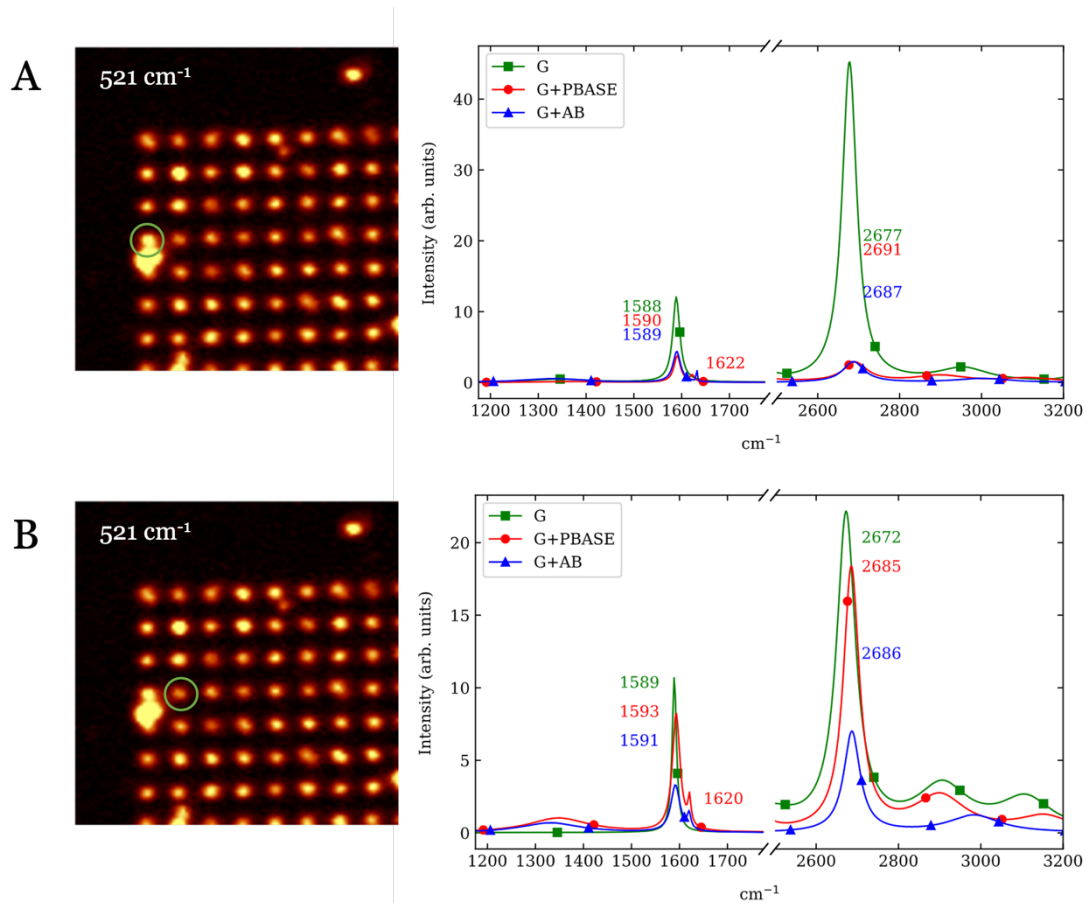


Figura 5.44. Espectros puntuales tomados en un disco tras la inmovilización del anticuerpo anti-PRL

Por otra parte, como en el anterior experimento con los anticuerpos del SarS-Cov_2, los espectros puntuales de Raman de la Figura 5.44B muestran las tres etapas de funcionalización del grafeno sobre los discos SERS:

1. Espectro Raman de un disco con grafeno **G sin funcionalizar**: línea verde del espectro donde se observan los picos característicos del grafeno: El pico G en 1589 cm^{-1} , y pico 2D en 2672 cm^{-1} , más alto que el G.
2. Espectro Raman del mismo disco con grafeno **funcionalizado con PBASE**: línea roja del espectro donde se aprecia la presencia de moléculas encima del grafeno. Aparece el pico D de defectos, el pico 1620 cm^{-1} , característico de la molécula PBASE; y por último el pico 2D aparece en 2685 cm^{-1} , más estrecho que el anterior y desplazado a la derecha 7 cm^{-1} .
3. Espectro Raman del mismo disco con grafeno **funcionalizado con PBASE y con anticuerpo de la prolactina (Ab)**: línea azul del espectro, donde se observa una disminución de la señal significativa y un desplazamiento del pico 2D que depende de la transferencia electrónica del grafeno con las moléculas funcionalizadas. En este caso el pico 2D aparece en 2686 cm^{-1} , desplazado a la derecha 8 cm^{-1} con respecto al G sin funcionalizar.

Estas señales se pueden verificar en un área mayor de la muestra haciendo un análisis con imágenes Raman de los picos característicos del grafeno. En la Figura 5.45 se muestran las

imágenes de una misma matriz previa a la inmovilización del anticuerpo y tras la inmovilizar el anticuerpo. Se puede observar claramente como en los picos 1580 cm^{-1} , 1620 cm^{-1} , y 2680 cm^{-1} de la Figura 5.45B se aprecia una clara disminución de intensidad Raman. Esto es un indicador de que el anticuerpo está sobre el dispositivo fotónico lo que impide que la señal del grafeno sea tan intensa como los de la Figura 5.45A

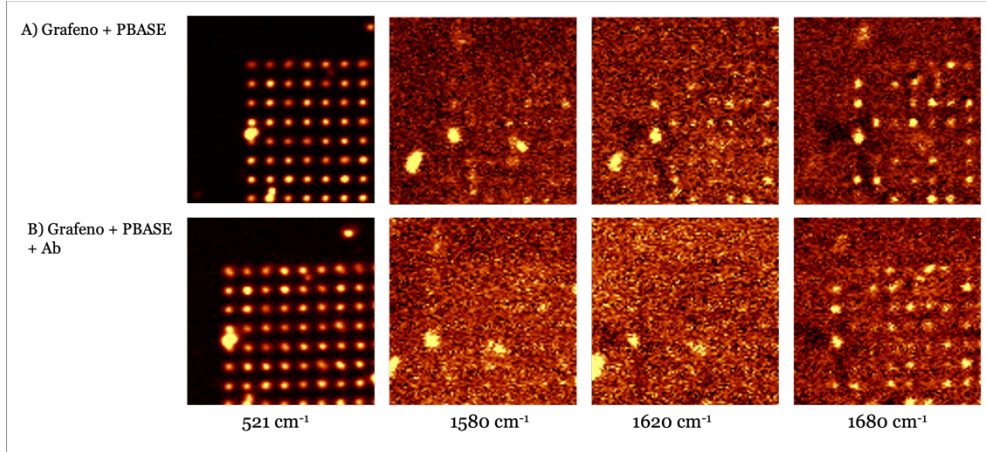


Figura 5.45. Imágenes Raman de la matriz de discos de los picos característicos del grafeno. A) Grafeno funcionalizado con PBASE B) Sustrato tras la inmovilización del anticuerpo

Finalmente, se tomaron dos espectros puntuales mostrados en la Figura 5.46, en rojo dentro del disco y en azul fuera de un disco. Se puede ver un claro aumento de la intensidad Raman del espectro dentro del disco respecto a fuera del disco por lo que se puede afirmar que el dispositivo fotónico con efecto SERS tras la inmovilización de los anticuerpos es fundamental para poder detectar la presencia de anticuerpos con tan baja concentración.

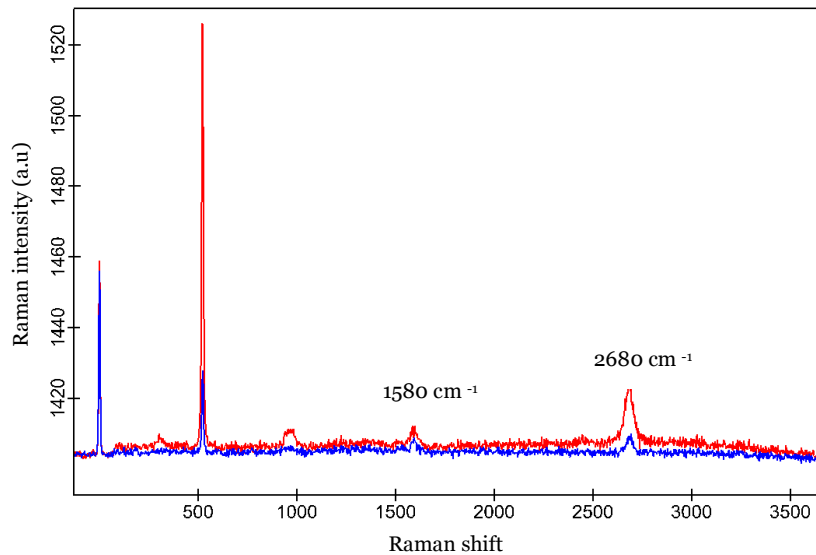


Figura 5.46. Espectros puntuales tomados fuera y dentro del disco. En azul fuera de los discos y en rojo dentro del disco

6. CONCLUSIONES

La detección de biomoléculas en bajas concentraciones y a tiempo real es un problema que hoy en día sigue presente para el cual los sensores ópticos proporcionan una posible solución. Por este motivo, se ha llevado a cabo este trabajo con el objetivo de la inmovilización de un anticuerpo, en concreto el de la prolactina, para su detección en bajas concentraciones desarrollando un dispositivo nanofotónico basado en el efecto SERS.

En primer lugar, se ha llevado a cabo la transferencia de grafeno exfoliado mediante el método Scotch Tape a un sustrato de silicio y posteriormente se ha funcionalizado con la molécula PBASE que es fundamental para poder inmovilizar los anticuerpos de la prolactina en el dispositivo fotónico diseñado. La funcionalización fue exitosa y el siguiente paso fue realizar el mismo procedimiento sobre un sustrato con discos de silicio, sustrato que proporciona el efecto SERS, fundamental para la mejora del efecto Raman que permite detectar muy baja concentración de los anticuerpos. Sin embargo, los copos de grafeno obtenidos por este método no son lo suficientemente finos, lo que hace se pierdan las propiedades del grafeno. Por esta razón, se optó por otro método de transferencia. Se puede afirmar que el método Scotch Tape es un procedimiento de transferencia de grafeno a un sustrato rápido y de bajo coste con la ventaja que se puede realizar la optimización de la funcionalización de biomoléculas sobre su superficie.

El siguiente procedimiento fue la transferencia de una monocapa de grafeno comercial sintetizada sobre un polímero de soporte sobre los discos de silicio. El grafeno obtenido presentó una calidad excelente por lo que se procedió a la funcionalización de este con PBASE (optimizada con los copos exfoliados de grafeno). Dicha funcionalización se pudo reproducir correctamente en este tipo de grafeno, ya que se dieron los cambios esperados sobre los espectros Raman del sustrato de grafeno funcionalizado. Una vez llegados a este punto, el paso final para la realización del sensor fotónico de los anticuerpos de la prolactina fue la inmovilización de los anticuerpos. En primer lugar, se inmovilizó adecuadamente el anticuerpo del Sars-Cov-2 por lo que se puede afirmar que la configuración grafeno – PBASE es funcional para la inmovilización de dicho anticuerpo. La detección y confirmación fue llevada a cabo con medidas de Raman gracias al efecto SERS proporcionado por el sustrato de discos de silicio diseñado para tal fin.

Finalmente, se realizó el mismo procedimiento con el anticuerpo de la prolactina, sobre el mismo chip fotónico, pero en otra matriz funcional de discos de silicio. El resultado también fue exitoso, ya que se obtuvieron los cambios esperados en los espectros Raman para la inmovilización del anticuerpo de la prolactina sobre el sustrato de grafeno funcionalizado. Por otro lado, en el caso de la prolactina se utilizó una concentración un 80% menor que en el SARS-Cov_2 y aun así la inmovilización del anticuerpo fue clara de detectar gracias al efecto SERS del sustrato sin el cual no sería posible llegar a ese grado de detección.

Cabe destacar que para un mismo chip fotónico se han podido inmovilizar dos tipos anticuerpos distintos con distintas concentraciones, sobre el mismo sustrato, lo que demuestra la versatilidad del dispositivo fotónico y su alto grado de sensibilidad.

En resumen, se ha llevado a cabo de manera exitosa el desarrollo de un sensor versátil basado en grafeno para la detección de anticuerpos de la prolactina en muy baja concentración. Todos los pasos para su desarrollo: la exfoliación de grafeno y su transferencia, la funcionalización con la molécula PBASE, los métodos de transferencia del grafeno al sustrato SERS y su posterior

funcionalización e inmovilización de dos tipos de anticuerpos, se han descrito, caracterizado y analizado en profundidad.

7. LINEAS FUTURAS

Como perspectiva futura, este trabajo tendrá el objetivo de la demostración experimental de la detección a tiempo real de la hormona prolactina en muestras pequeñas de sangre para comprobar en enlace anticuerpo – antígeno (prolactina). Para ello será necesario en primer lugar un bloqueo del sustrato tras la inmovilización del anticuerpo con BSA para permitir que se produzca la reacción en cuestión de manera correcta y comprobar la adhesión de la prolactina al sustrato.

Por otra parte, dado que se ha demostrado la versatilidad del dispositivo en cuanto al tipo de anticuerpo inmovilizado, se llevaría a cabo un estudio de optimización de un único chip para la detección de distintas moléculas, de manera que se reducirían costes pues se ha demostrado que en un mismo sustrato se pueden inmovilizar dos anticuerpos distintos. Una vez realizada la demostración experimental de manera exitosa, la fabricación a gran escala del biosensor fotónico sería el siguiente paso.

8. REFERENCIAS

- [1] “MedlinePlus.” <https://medlineplus.gov/spanish/pruebas-de-laboratorio/niveles-de-prolactina/> (accessed Apr. 20, 2022).
- [2] “Análisis de sangre: prolactina (para Padres) - Nemours KidsHealth.” <https://kidshealth.org/es/parents/test-prolactin.html> (accessed Apr. 21, 2022).
- [3] “Prolactinoma | NIDDK.” <https://www.niddk.nih.gov/health-information/informacion-de-la-salud/enfermedades-endocrinas/prolactinoma> (accessed Apr. 21, 2022).
- [4] I. Halperin Rabinovich, R. Cámara Gómez, M. García Mouriz, and D. Ollero García-Agulló, “Clinical guidelines for diagnosis and treatment of prolactinoma and hyperprolactinemia,” *Endocrinología y Nutrición (English Edition)*, vol. 60, no. 6, pp. 308–319, 2013, doi: 10.1016/j.endoen.2012.11.009.
- [5] G. A. S. Soto, “Estudio de las alteraciones endocrinas durante el uso de psicofármacos en la infancia y adolescencia a partir de una base de datos prospectiva en atención especializada del área VI,” 2018.
- [6] D. Zhan, J. Yan, L. Lay, Z. Ni, L. Liu, and Z. Shen, “Engineering the Electronic Structure of Graphene,” *Advanced materials.*, vol. 24, no. 30, 2012, doi: 10.1002/adma.201200011.
- [7] A. K. Geim, “Graphene: Status and Prospects,” *Science (1979)*, vol. 324, no. 5934, pp. 1530–1534, 2009, doi: 10.1126/science.1158877.
- [8] “Potencial de la adición de nanofibras de grafeno en la mejora de las propiedades de resinas acrílicas para base de dentaduras - Gaceta Dental.” <https://gacetadental.com/2015/11/potencial-de-la-adicion-de-nanofibras-de-grafeno-en-la-mejora-de-las-propiedades-de-resinas-acrilicas-para-base-de-dentaduras-56614/> (accessed May 25, 2022).
- [9] T. Ohta, A. Bostwick, T. Seyller, K. Horn, and E. Rotenberg, “Controlling the Electronic Structure of Bilayer Graphene,” *Science (1979)*, vol. 313, no. 5789, pp. 951–954, 2006, doi: 10.1126/science.1130681.
- [10] “So What’s The Deal With Graphene? — Steemit.” <https://steemit.com/science/@phaedrus/so-what-s-the-deal-with-graphene> (accessed May 25, 2022).
- [11] “El Gluón - Las grandes preguntas de la Física.” <http://w2.fisica.unam.mx/gluon/articles/13> (accessed May 25, 2022).
- [12] P. Avouris and C. Dimitrakopoulos, “Graphene: synthesis and applications,” *Materials Today*, vol. 15, no. 3, pp. 86–97, 2012, doi: [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(12\)70044-5](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(12)70044-5).

- [13] H. Shen, L. Zhang, M. Liu, and Z. Zhang, “Biomedical applications of graphene,” *Theranostics*, vol. 2, no. 3, pp. 283–294, 2012, doi: 10.7150/thno.3642.
- [14] Md. S. A. Bhuyan, Md. N. Uddin, Md. M. Islam, F. A. Bipasha, and S. S. Hossain, “Synthesis of graphene,” *International Nano Letters*, vol. 6, no. 2, pp. 65–83, 2016, doi: 10.1007/s40089-015-0176-1.
- [15] J. Kang, D. Shin, S. Bae, and B. H. Hong, “Graphene transfer: key for applications,” *Nanoscale*, vol. 4, no. 18, pp. 5527–5537, 2012, doi: 10.1039/C2NR31317K.
- [16] K. Novoselov *et al.*, “Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films,” *Nat. Mater.*, vol. 6, Jun. 2004.
- [17] Y. Zhang, J. P. Small, W. v Pontius, and P. Kim, “Fabrication and electric-field-dependent transport measurements of mesoscopic graphite devices,” *Applied Physics Letters*, vol. 86, no. 7, p. 73104, 2005, doi: 10.1063/1.1862334.
- [18] S. Unarunotai *et al.*, “Transfer of graphene layers grown on SiC wafers to other substrates and their integration into field effect transistors,” *Applied Physics Letters*, vol. 95, no. 20, p. 202101, Nov. 2009, doi: 10.1063/1.3263942.
- [19] J. D. Caldwell *et al.*, “Technique for the Dry Transfer of Epitaxial Graphene onto Arbitrary Substrates,” *ACS Nano*, vol. 4, no. 2, pp. 1108–1114, Feb. 2010, doi: 10.1021/nn901585p.
- [20] K. S. Kim *et al.*, “Large-scale pattern growth of graphene films for stretchable transparent electrodes,” *Nature*, vol. 457, no. 7230, pp. 706–710, 2009, doi: 10.1038/nature07719.
- [21] Y. Wang *et al.*, “Electrochemical Delamination of CVD-Grown Graphene Film: Toward the Recyclable Use of Copper Catalyst,” *ACS Nano*, vol. 5, no. 12, pp. 9927–9933, Dec. 2011, doi: 10.1021/nn203700w.
- [22] Z.-Y. Juang *et al.*, “Graphene synthesis by chemical vapor deposition and transfer by a roll-to-roll process,” *Carbon N Y*, vol. 48, no. 11, pp. 3169–3174, 2010, doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2010.05.001>.
- [23] L. E. Raman, “Capítulo 1: FUNDAMENTOS DE ESPECTROSCOPIA RAMAN”.
- [24] D. L. Jeanmaire and R. P. van Duyne, “Surface raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode,” *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, vol. 84, no. 1, pp. 1–20, 1977, doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(77\)80224-6](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(77)80224-6).
- [25] M. A. and V. D. R. P. Schatz George C. and Young, “Electromagnetic Mechanism of SERS,” in *Surface-Enhanced Raman Scattering: Physics and Applications*, M. and K. H. Kneipp Katrin and Moskovits, Ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006, pp. 19–45. doi: 10.1007/3-540-33567-6_2.
- [26] X.-M. Lin, Y. Cui, Y.-H. Xu, B. Ren, and Z.-Q. Tian, “Surface-enhanced Raman spectroscopy: substrate-related issues,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 394, no. 7, pp. 1729–1745, 2009, doi: 10.1007/s00216-009-2761-5.

- [27] S. S. Panikar, D. Cialla-May, E. de la Rosa, P. Salas, and J. Popp, “Towards translation of surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) to clinical practice: Progress and trends,” *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 134, p. 116122, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116122>.
- [28] I. Alessandri and J. R. Lombardi, “Enhanced Raman Scattering with Dielectrics,” *Chemical Reviews*, vol. 116, no. 24, pp. 14921–14981, Dec. 2016, doi: [10.1021/acs.chemrev.6b00365](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00365).
- [29] G. Mie, “Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen,” *Ann Phys*, vol. 330, no. 3, pp. 377–445, Jan. 1908, doi: [10.1002/andp.19083300302](https://doi.org/10.1002/andp.19083300302).
- [30] A. E. Miroshnichenko *et al.*, “Nonradiating anapole modes in dielectric nanoparticles,” *Nature Communications*, vol. 6, no. 1, p. 8069, 2015, doi: [10.1038/ncomms9069](https://doi.org/10.1038/ncomms9069).
- [31] I. González Llácer, “Diseño y caracterización de sustratos SERS con nanoestructuras de Silicio,” Oct. 2020, Accessed: Jun. 28, 2022. [Online]. Available: <https://riunet.upv.es:443/handle/10251/151270>
- [32] L. Bonilla Hernández, “Estudio experimental de sustratos SERS basados en nanoantenas de silicio para la interacción Raman mejorada de materiales 2D y monocapas de moléculas autoensambladas,” Jul. 2021, Accessed: Jun. 28, 2022. [Online]. Available: <https://riunet.upv.es:443/handle/10251/170206>
- [33] M. E. Freeman, B. Kanyicska, A. Lerant, and G. Nagy, “Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion,” *Physiological Reviews*, vol. 80, no. 4, pp. 1523–1631, 2000, doi: [10.1152/physrev.2000.80.4.1523](https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.4.1523).
- [34] “Inmunidad humoral específica (1/2): Ig tipos y estructura - Artículos - 3tres3, la página del Cerdo.” https://www.3tres3.com/articulos/inmunidad-humoral-especifica-1-2-ig-tipos-y-estructura_38562/ (accessed Jun. 28, 2022).
- [35] “Table: Estructura básica en Y de los anticuerpos - Manual MSD versión para público general.” <https://www.msmanuals.com/es-ve/hogar/multimedia/table/estructura-b%C3%A1sica-en-y-de-los-anticuerpos> (accessed Jun. 28, 2022).
- [36] “Biosensores: aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimenticios.” http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042009000100017 (accessed Apr. 28, 2022).
- [37] F. Regan, “Sensors | overview,” *Encyclopedia of Analytical Science*, pp. 172–178, Jan. 2019, doi: [10.1016/B978-0-12-409547-2.14540-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14540-8).
- [38] Pirzada Muqsit and Altintas Zeynep, “Recent Progress in Optical Sensors for Biomedical Diagnostivs,” *micromachines*.
- [39] Pirzada Muqsit and Z. Altintas, “Recent Progress in Optical Sensors for Biomedical Diagnostics,” *micromachines*, vol. 11, 356, 2020.

- [40] X.-J. Sun, Z. Jiang, H. Wang, and H. Zhao, “Highly Sensitive Detection of Peptide Hormone Prolactin Using Gold Nanoparticles-Graphene Nanocomposite Modified Electrode,” 2015.
- [41] V. Serafín, L. Agüí, P. Yáñez-Sedeño, and J. M. Pingarrón, “Determination of prolactin hormone in serum and urine using an electrochemical immunosensor based on poly(pyrrolepropionic acid)/carbon nanotubes hybrid modified electrodes,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 195, pp. 494–499, 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.01.055>.
- [42] “Potencial de la adición de nanofibras de grafeno en la mejora de las propiedades de resinas acrílicas para base de dentaduras - Gaceta Dental.” <https://gacetadental.com/2015/11/potencial-de-la-adicion-de-nanofibras-de-grafeno-en-la-mejora-de-las-propiedades-de-resinas-acrilicas-para-base-de-dentaduras-56614/> (accessed Apr. 24, 2022).
- [43] “Grafeno monocapa en Cu 1 pulgada x 1 pulgada – Graphenea.” <https://www.graphenea.com/collections/buy-graphene-films/products/easy-transfer-monolayer-graphene-on-polymer-film-1-cm-x-1-cm> (accessed May 01, 2022).
- [44] “User Instructuios. Graphenea Monolayer Graphene film “Easy transfer.”” Accessed: May 01, 2022. [Online]. Available: https://cdn.shopify.com/s/files/1/0191/2296/files/Graphenea_Easy_Transfer_Instructions_20210126.pdf?v=1611681633
- [45] G. Wu, X. Tang, M. Meyyappan, and K. W. C. Lai, “Chemical functionalization of graphene with aromatic molecule,” in *2015 IEEE 15th International Conference on Nanotechnology (IEEE-NANO)*, 2015, pp. 1324–1327. doi: 10.1109/NANO.2015.7388878.
- [46] S. Zorina, “Estudio de la funcionalización de grafeno con anticuerpos del SARS-CoV-2 para biosensores fotónicos ultra rápidos de Covid-19,” Sep. 2021, Accessed: Jun. 17, 2022. [Online]. Available: <https://riunet.upv.es:443/handle/10251/173189>
- [47] J. Hodkiewicz, “Characterizing Carbon Materials with Raman Spectroscopy.”
- [48] G. Socrates, *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*, 3rd edition. Wiley, 2004.
- [49] Y. Liu *et al.*, “Giant enhancement in vertical conductivity of stacked CVD graphene sheets by self-assembled molecular layers,” *Nature Communications*, vol. 5, no. 1, p. 5461, 2014, doi: 10.1038/ncomms6461.
- [50] N. H. L. Nguyen, S. Kim, G. Lindemann, and V. Berry, “COVID-19 Spike Protein Induced Phononic Modification in Antibody-Coupled Graphene for Viral Detection Application,” *ACS Nano*, vol. 15, no. 7, pp. 11743–11752, Jul. 2021, doi: 10.1021/acsnano.1c02549.



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIERÍA
INDUSTRIAL VALENCIA

PRESUPUESTO DEL PROYECTO

Desarrollo de un biosensor nanofotónico para la detección
de prolactina basado en grafeno

ÍNDICE DEL PRESUPUESTO

1. INTRODUCCIÓN.....	75
2. CUADRO DE PRECIOS DE MANO DE OBRA	77
3. CUADRO DE PRECIOS MAQUINARIA	77
4. CUADRO DE PRECIOS MATERIALES	78
5. CUADRO DE PRECIOS UNITARIOS.....	79
6. CUADRO DE PRECIOS DESCOMPUESTOS	80
7. PRESUPUESTOS PARCIALES.....	84
8. EJECUCIÓN POR CONTRATA	86

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. TABLA DE PRECIOS DE MANO DE OBRA	77
TABLA 2. TABLA DE PRECIOS DE MAQUINARIA	77
TABLA 3. TABLA DE PRECIOS DE MATERIALES	78
TABLA 4. TABLA DE PRECIOS UNITARIOS	79
TABLA 5. TABLA DE PRECIOS DESCOMPUESTOS	80
TABLA 8.6. PRESUPUESTO PARCIAL CAPÍTULO 1	84
TABLA 7. PRESUPUESTO PARCIAL CAPÍTULO 2	84
TABLA 8. PRESUPUESTO PARCIAL CAPÍTULO 3	84
TABLA 9. PRESUPUESTO PARCIAL CAPÍTULO 4	85

1. INTRODUCCIÓN

En esta segunda parte del trabajo, se realiza un coste aproximado del proyecto que se ha llevado a cabo. Para ello, se tienen en cuenta todos los recursos empleados: mano de obra, materiales y maquinaria.

En cuanto a la mano de obra requerida para este trabajo consta de una estudiante de ingeniería biomédica y una tutora encargada de dirigir y supervisar a la estudiante durante el transcurso del trabajo. Para simplificar los cálculos del presupuesto se tendrá en cuenta la contribución de un solo tutor. Asimismo, para hallar el cálculo del salario del tutor y de la estudiante se llevará a cabo mediante la ecuación (1)

$$\text{Coste trabajador} = \text{salario bruto} + \text{coste de la seguridad social} \quad (1)$$

Por otra parte, el coste de la seguridad social que debe pagar la empresa cada mes por cada trabajador se determina en base al salario bruto de cada empleado. Teniendo en cuenta el 23,6 % de las contingencias comunes, el 5,5% tipo general de desempleo para contrato indefinido, el 0,6% de formación profesional, el 1% de accidentes de trabajos y enfermedades profesionales y el 0,2% de FOGASA (Fondo de Garantía Profesional), los costes del tutor y del estudiante anuales son los siguientes:

$$\text{Coste SS} = \text{salario bruto} \times (0,236 + 0,055 + 0,006 + 0,002 + 0,010) \quad (2)$$

El salario bruto mensual del estudiante es de 1100 € al año mientras que el del tutor es de 3500 €, por lo que los costes anuales del tutor y del estudiante de seguridad social serían los siguientes:

$$\text{Coste SS estudiante} = 4.078,8 \frac{\text{€}}{\text{año}} \quad (3)$$

$$\text{Coste SS tutor} = 12,978 \frac{\text{€}}{\text{año}} \quad (4)$$

Y el coste anual del estudiante y del tutor respectivamente en un año son los siguientes

$$\text{Coste anual estudiante} = 1100 \frac{\text{€}}{\text{mes}} \times 12 \text{ meses} + 4.078,8 \frac{\text{€}}{\text{año}} = 17.278,8 \frac{\text{€}}{\text{año}} \quad (5)$$

$$\text{Coste anual tutor} = 3500 \frac{\text{€}}{\text{mes}} \times 12 \text{ meses} + 12,978 \frac{\text{€}}{\text{año}} = 54.978 \frac{\text{€}}{\text{año}} \quad (6)$$

Teniendo en cuenta que los días trabajados son 224 durante un año, lo equivalente a 1792 horas, los costes por hora son:

$$\text{Coste horario estudiante} = \frac{17.278,8 \frac{\text{€}}{\text{año}}}{1792 \frac{\text{horas}}{\text{año}}} = 9,82 \text{ €/hora} \quad (7)$$

$$\text{Coste horario tutor} = \frac{54.978 \frac{\text{€}}{\text{año}}}{1792 \frac{\text{horas}}{\text{año}}} = 9,82 \text{ €/hora} \quad (8)$$

En cuanto a la maquinaria utilizada en el centro, se atribuye un coste de 45 €/hora a los equipos de medida y de 90€/hora a los equipos que se ubican en la sala limpia.

Por último, para el cálculo del Presupuesto total de Ejecución de material se le añade un 15% de gastos general y un 6% de beneficio industrial. Asimismo, para el cálculo del presupuesto total, se añade un 21%.

2. CUADRO DE PRECIOS DE MANO DE OBRA

Tabla 1. Tabla de precios de mano de obra

Núm.	Código	Denominación de la mano de obra	Precio	Horas	Total
1	MO.TUT	Tutor del TFG	30,25	111,00 h	3.468,75
2	MO.IBE	Ingeniero Biomédico Estudiante	9,820	319,00	
Total mano de obra:					6.713,53

3. CUADRO DE PRECIOS MAQUINARIA

Tabla 2. Tabla de precios de maquinaria

Núm.	Código	Denominación de la maquinaria	Precio	Cantidad		Total
1	MAQ.Lito	Litografía: Raith 150	500,000	1,00	h	500,00
2	MAQ.Res	Resina PMMA + Deposición de la resina (sping coating) con Coater EVG 101 y Tepla PVA + Curado y Revelado con Brewer Model	150,000	1,00	h	150,00
3	MAQ.Ataque	Ataque: RIEICP	90,000	2,00	h	180,00
4	MAT.Vac	Máquina de vacío	90,000	24,00	h	2.160,00
5	MAQ.Camp	Camapa extractora	45,000	10,00	u	450,00
6	MAQ.Proyect5	Software Proyect 5 de Witec	45,000	88,00	h	3.960,00
7	MAQ.BUS	Baño de ultrasonidos	45,000	2,00	u	90,00
8	MAQ.AFM-Raman	Medidas con Raman y AFM	45,000	100,00	h	4.500,00

9	MAQ.Sim	CST STUDIO SUITE	45,000	3,00	h	135,00
10	MAQ.WsxM	Software WsxM	45,000	19,00	h	855,00
11	MAT.HP	Hot plate	45,000	3,00	h	135,00
12	MAQ.SetUp	Set Up transferencia de grafeno	45,000	1	u	45
Total maquinaria:						13.116,00

4. CUADRO DE PRECIOS MATERIALES

Tabla 3. Tabla de precios de materiales

Núm.	Código	Denominación del material	Precio	Cantidad	Total	Núm.
1	MAT.MP	Micropipeta 2-20 uL	316,510	2,00	u	633,02
2	MAT.PRL	Anticuerpo monoclonal prolactina	305,000	1,00	u	305,00
3	MAT.PBASE	Molécula PBASE	266,980	1,00	u	266,98
4	MAT.OSi	Oblea de silicio	250,000	4,00	u	1.000,00
5	MO.Spike	SARS-CoV.2 Spike Antibody	216,000	1,00	u	216,00
6	MAT.PBS	Disolución de PBS	90,000	1,00	u	90,00
7	MAT.EtOH	Etanol 98%	59,080	2,00	L	118,16
8	MAQ.VL	Váscula de laboratorio	45,000	1,00	u	45,00
9	MAT.LO	Licencia Microsoft Office 265	20,000	51,00	u	1.020,00
10	MAT.CALZSB	Calzas de Sala Blanca	20,000	1,00	u	20,00
11	MAT.MSB	Mono sala blanca	15,690	1,00	u	15,69
12	MAT.PUNT	Puntas micropipetas	11,500	4,00	u	46,00
13	MAT.IPA	Isopropanol	9,000	1,00	L	9,00
14	MAT.AS	Ácido sulfúrico	6,600	1,00	L	6,60

15	MAT.VASO	Vasos de precipitado	4,190	4,00	u	16,76
16	MAT.Acetona	Acetona	3,390	1,00	L	3,39
17	MAT.AO	Agua oxigenada	2,500	1,00	L	2,50
18	MAT.CA	Cinta Adhesiva	2,000	2,00	u	4,00
19	MAT.N2	Gas N2	1,400	11,00	m3	15,40
20	MAT.PDMS	Sello de PDMS	1,000	1,00	u	1,00
21	MAT.GuN	Guantes de nitrilo sala blanca	1,000	6,00	u	6,00
22	MAT.GRAF	Bloque de grafito pirolítico altamente orientado	1,000	2,00	u	2,00
23	MAT.CUZSB	Calzas sala blanca	0,050	1,00	u	0,05
Total materiales:						3.842,55

5. CUADRO DE PRECIOS UNITARIOS

Tabla 4. Tabla de precios unitarios

Número	Designación	Importe	
		En cifra (euros)	En letra (euros)
1 DEFINICIÓN DE PROYECTO			
1.1	Reunión inicial con el tutor del TFG	82,14	OCHENTA Y DOS EUROS CON CATORCE CÉNTIMOS
1.2	Reunión planificación actividades a desarrollar	82,14	OCHENTA Y DOS EUROS CON CATORCE CÉNTIMOS
2 INVESTIGACIÓN DEL ESTADO DEL ARTE			
2.1	h Investigación del estado del arte	360,70	TRESCIENTOS SESENTA EUROS CON SETENTA CÉNTIMOS
2.2	h Aprendizaje de manejo de programas	1.336,05	MIL TRESCIENTOS TREINTA Y SEIS EUROS CON CINCO CÉNTIMOS
3 RECOPIACIÓN DE DATOS Y ANÁLISIS			
3.1	h Fabricación de sustratos	180,00	CIENTO OCHENTA EUROS

3.2	h Limpieza de vasos	91,96	NOVENTA Y UN EUROS CON NOVENTA Y SEIS CÉNTIMOS
3.3	Obtención de grafeno		
3.3.1	h Exfoliación micromecánica de grafeno	663,70	SEISCIENTOS SESENTA Y TRES EUROS CON SETENTA CÉNTIMOS
3.3.2	h Transferencia de grafeno a los discos	871,05	OCHOCIENTOS SETENTA Y UN EUROS CON CINCO CÉNTIMOS
3.3.3	h Transferencia monocapa grafeno 'Easy Transfer'	3.025,48	TRES MIL VEINTICINCO EUROS CON CUARENTA Y OCHO CÉNTIMOS
3.4	h Funcionalización del sustrato con PBASE	815,72	OCHOCIENTOS QUINCE EUROS CON SETENTA Y DOS CÉNTIMOS
3.5	h Inmovilización del anticuerpo	1.583,44	MIL QUINIENTOS OCHENTA Y TRES EUROS CON CUARENTA Y CUATRO CÉNTIMOS
3.6	h Caracterización del sustrato en las distintas fases del proyecto	10.218,50	DIEZ MIL DOSCIENTOS DIECIOCHO EUROS CON CINCUENTA CÉNTIMOS
3.7	h Análisis de los resultados	410,70	CUATROCIENTOS DIEZ EUROS CON SETENTA CÉNTIMOS
4 REDACCIÓN Y DEFENSA DEL TFG			
4.1	h Redacción y corrección TFG	988,35	NOVECIENTOS OCHENTA Y OCHO EUROS CON TREINTA Y CINCO CÉNTIMOS
4.2	h Preparación de la exposición	118,20	CIENTO DIECIOCHO EUROS CON VEINTE CÉNTIMOS

6. CUADRO DE PRECIOS DESCOMPUESTOS

Tabla 5. Tabla de precios descompuestos

Núm. Código	Ud	Descripción		Total
1 Definición de proyecto				
1.1	h	Reunión inicial con el tutor del TFG		
	MO.TUT	2,00 h Tutor TFG	31,250	62,50

	MO.IBJ	2,00 h	Ingeniera Biomédica estudiante	9,820	19,64
			Precio total por h .		82,14
1.2	h	Reunión planificación actividades a desarrollar			
	MO.TUT	2,00 h	Tutor TFG	31,250	62,50
	MO.IBJ	2,00 h	Ingeniera Biomédica estudiante	9,820	19,64
			Precio total por h .		82,14
<i>2 Investigación del estado del arte</i>					
2.1	h	Investigación del estado del arte			
	MO.TUT	2,00 h	Tutor TFG	31,250	62,50
	MO.IBJ	10,00 h	Ingeniera Biomédica estudiante	9,820	98,20
	MAT.LO	10,00 u	Licencia Microsoft Office 265	20,000	200,00
			Precio total por h .		360,70
2.2	h	Aprendizaje de manejo de programas			
	MO.TUT	15,00 h	Tutor TFG	31,250	468,75
	MO.IBJ	15,00 h	Ingeniera Biomédica estudiante	9,820	147,30
	MAQ.AFM-Raman	10,00 h	Medidas con Raman y AFM	45,000	450,00
	MAQ.Proyect5	4,00 h	Software Proyect 5 de Witec	45,000	180,00
	MAQ.WsxM	2,00 h	Software WsxM	45,000	90,00
			Precio total por h .		1.336,05
<i>3 Recopilación de datos y análisis</i>					
3.1	h	Fabricación de sustratos			
	MAQ.Ataque	2,00 h	Ataque: RIEICP	90,000	180,00
	MAQ.Res	1,00 h	Resina PMMA + Deposición de la resina (sping coating) con Coater EVG 101 y Tepla PVA + Curado y Revelado con Brewer Model	150,000	150,00
	MAQ.Lito	1,00 h	Litografía: Raith 150	500,000	500,00
	MAQ.Sim	3,00 h	CST STUDIO SUITE	45,000	135,00
	MAT.OSi	1,00 u	Oblea de silicio	250,000	250,00
			Precio total por h		1.215,00
3.2	h	Limpieza de vasos			
	MAT.VASO	2,00 u	Vasos de precipitado	4,190	8,38

MAT.AS	1,00 L	Ácido sulfúrico	6,600	6,60
MAT.AO	1,00 L	Agua oxigenada	2,500	2,50
MAT.EtOH	1,00 L	Etanol 98%	59,080	59,08
MAT.N2	11,00 m3	Gas N2	1,400	15,40
Precio total por h .				91,96

3.3 Obtención de grafeno

3.3.1	h	Exfoliación micromecánica de grafeno		
MO.TUT	10,00 h	Tutor TFG	31,250	312,50
MO.IBJ	10,00 h	Ingeniera Biomédica estudiante	9,820	98,20
MAT.OSi	1,00 u	Oblea de silicio	250,000	250,00
MAT.GRAF	1,00 u	Bloque de grafito pirolítico altamente orientado	1,000	1,00
MAT.CA	1,00 u	Cinta Adhesiva	2,000	2,00
Precio total por h .				663,70
3.3.2	h	Transferencia de grafeno a los discos		
MO.TUT	15,00 h	Tutor TFG	31,250	468,75
MO.IBJ	15,00 h	Ingeniera Biomédica estudiante	9,820	147,30
MAT.GRAF	1,00 u	Bloque de grafito pirolítico altamente orientado	1,000	1,00
MAT.CA	1,00 u	Cinta Adhesiva	2,000	2,00
MAT.PDMS	1,00 u	Sello de PDMS	1,000	1,00
MAT.OSi	1,00 u	Oblea de silicio	250,000	250,00
MAQ.SetUp	1,00 u	Set Up transferencia de grafeno	1,000	1,00
Precio total por h .				871,05
3.3.3	h	Transferencia monocapa grafeno 'Easy Transfer'		
MO.TUT	5,00 h	Tutor TFG	31,250	156,25
MO.IBJ	5,00 h	Ingeniera Biomédica estudiante	9,820	49,10
MAT.OSi	1,00 u	Oblea de silicio	250,000	250,00
MAQ.Camp	5,00 u	Camapa extractora	45,000	225,00
MAT.Vac	24,00 h	Máquina de vacío	90,000	2.160,00
MAT.HP	3,00 h	Hot plate	45,000	135,00
MAT.Acetona	1,00 L	Acetona	3,390	3,39
MAT.IPA	1,00 L	Isopropanol	9,000	9,00
MAT.GuN	2,00 u	Guantes de nitrilo sala blanca	1,000	2,00
MAT.CALZSB	1,00 u	Calzas de Sala Blanca	20,000	20,00
MAT.CUZSB	1,00 u	Cubre zapatos Sala Blanca	0,050	0,05
MAT.MSB	1,00 u	Mono sala blanca	15,690	15,69

				Precio total por h .	3.025,48
3.4	h	Funcionalización del sustrato con PBASE			
	MO.TUT	4,00 h	Tutor TFG	31,250	125,00
	MO.IBJ	4,00 h	Ingeniera Biomédica estudiante	9,820	39,28
	MAT.VASO	2,00 u	Vasos de precipitado	4,190	8,38
	MAT.EtOH	1,00 L	Etanol 98%	59,080	59,08
	MAT.PBASE	1,00 u	Molécula PBASE	266,980	266,98
	MAQ.VL	1,00 u	Váscula de laboratorio	45,000	45,00
	MAT.GuN	2,00 u	Guantes de nitrilo sala blanca	1,000	2,00
	MAQ.Camp	4,00 u	Camapa extractora	45,000	180,00
	MAQ.BUS	2,00 u	Baño de ultrasonidos	45,000	90,00
				Precio total por h .	815,72
3.5	h	Inmovilización del anticuerpo			
	MO.TUT	6,00 h	Tutor TFG	31,250	187,50
	MO.IBJ	6,00 h	Ingeniera Biomédica estudiante	9,820	58,92
	MO.Spike	1,00 u	SARS-CoV.2 Spike Antibody	216,000	216,00
	MAT.PBS	1,00 u	Disolución de PBS	90,000	90,00
	MAT.MP	2,00 u	Micropipeta 2-20 uL	316,510	633,02
	MAT.PUNT	4,00 u	Puntas micropipetas	11,500	46,00
	MAQ.Camp	1,00 u	Camapa extractora	45,000	45,00
	MAT.GuN	2,00 u	Guantes de nitrilo sala blanca	1,000	2,00
	MAT.PRL	1,00 u	Anticuerpo monoclonal prolactina	305,000	305,00
				Precio total por h .	1.583,44
3.6	h	Caracterización del sustrato en las distintas fases del proyecto			
	MAQ.AFM-Raman	80,00 h	Medidas con Raman y AFM	45,000	3.600,00
	MAQ.Proyect5	80,00 h	Software Proyect 5 de Witec	45,000	3.600,00
	MAQ.WsxM	15,00 h	Software WsxM	45,000	675,00
	MO.TUT	20,00 h	Tutor TFG	31,250	625,00
	MO.IBJ	175,00 h	Ingeniera Biomédica estudiante	9,820	1.718,50
				Precio total por h .	10.218,5
3.7	h	Análisis de los resultados			
	MO.TUT	10,00 h	Tutor TFG	31,250	312,50
	MO.IBJ	10,00 h	Ingeniera Biomédica estudiante	9,820	98,20
				Precio total por h .	410,70

4 Redacción y defensa del TFG

4.1	h	Redacción y corrección TFG				
	MO.TUT	3,00 h	Tutor TFG	31,250	93,75	
	MO.IBJ	30,00 h	Ingeniera Biomédica estudiante	9,820	294,60	
	MAT.LO	30,00 u	Licencia Microsoft Office 265	20,000	600,00	
			Precio total por h .		988,35	
4.2	h	Preparación de la exposición				
	MAT.LO	1,00 u	Licencia Microsoft Office 265	20,000	20,00	
	MO.IBJ	10,00 h	Ingeniera Biomédica estudiante	9,820	98,20	
			Precio total por h .		118,20	

7. PRESUPUESTOS PARCIALES

Tabla 8.6. Presupuesto parcial capítulo 1

Nº	Ud	Descripción	Medición	Precio	Importe
01.01		Reunión inicial con el tutor del TFG			
		Total :	1,00	82,14	82,14
01.02		Reunión planificación actividades a desarrollar			
		Total :	1,00	82,14	82,14
Total Presupuesto parcial nº 01 Definición de proyecto :					164,28

Tabla 7. Presupuesto parcial capítulo 2

02.01	H	Investigación del estado del arte			
		Total h :	2,00	360,70	721,40
02.02	H	Aprendizaje de manejo de programas			
		Total h :	2,00	1.336,05	2.672,10
Total Presupuesto parcial nº 02 Investigación del estado del arte :					3.393,50

Tabla 8. Presupuesto parcial capítulo 3

03.01	H	Fabricación de sustratos			
		Total h :	1,00	1.215,00	1.215,00
03.02	H	Limpieza de vasos			
		Total h :	1,00	91,96	91,96
03.03 Obtención de grafeno					

03.02.1	H	Exfoliación micromecánica de grafeno			
		Total h :	1,00	663,70	663,70
03.02.2	H	Transferencia de grafeno a los discos			
		Total h :	1,00	871,05	871,05
03.02.3	H	Transferencia monocapa grafeno 'Easy Transfer'			
		Total h :	1,00	3.025,48	3.025,48
Total 03.03 Obtención de grafeno					4.560,23
03.04	H	Funcionalización del sustrato con PBASE			
		Total h :	1,00	815,72	815,72
03.05	H	Inmovilización del anticuerpo			
		Total h :	1,00	1.583,44	1.583,44
03.06	H	Caracterización del sustrato en las distintas fases del proyecto			
		Total h :	1,00	10.218,50	10.218,50
03.07	H	Análisis de los resultados			
		Total h :	1,00	410,70	410,70
Total Presupuesto parcial nº 03 Recopilación de datos y análisis :					18.895,55

Tabla 9. Presupuesto parcial capítulo 4

04.01	H	Redacción y corrección TFG			
		Total h :	1,00	988,35	988,35
04.02	H	Preparación de la exposición			
		Total h :	1,00	118,20	118,20
Total Presupuesto parcial nº 04 Redacción y defensa del TFG :					1.106,55

8. EJECUCIÓN POR CONTRATA

CAPÍTULO	Importe
1 Definición de proyecto.	164,28
2 Investigación del estado del arte.	3.393,50
3 Recopilación de datos y análisis	
3.3 Obtención de grafeno.	4.560,23
Total 3 Recopilación de datos y análisis	18.895,55
4 Redacción y defensa del TFG.	1.106,55
<hr/>	
Presupuesto de ejecución material	23.559,88
15% de gastos generales	3.533,98
6% de beneficio industrial	1.413,59
Suma	28.507,45
21% IVA	5.986,56
Presupuesto de ejecución por contrata	34.494,01

Asciende el presupuesto de ejecución por contrata a la expresada cantidad de TREINTA Y CUATRO MIL CUATROCIENTOS NOVENTA Y CUATRO EUROS CON UN CÉNTIMO.

Valencia, Julio 2022
Ingeniera
Eva Zafra Blázquez

9. COSTE DE UN BIOSENSOR EN CHIP

Por último, en este apartado se realiza una estimación del coste de un chip basado en nanoestructuras de silicio para la detección de prolactina en bajas concentraciones. Para el cálculo del coste aproximado del proceso tecnológico fabricación se deben tener en cuenta los siguientes costes:

- El coste de una oblea de silicio de 150 mm es de **250€**
- La deposición de PMMA como resina con Coater EVG 101 y Tepla PVA + Curado y Revelado con Brewer Model 100CB es de **150€ para cada oblea**
- La exposición con haz de electrones tiene un coste de 500€ la hora. No obstante, para grabar una oblea se requieren varias horas por lo que el coste ascendería a **3300€**
- Ataque con ICP-RIE **90 € la oblea**

Es decir, el coste de litografiar una oblea de 150 mm de diámetro es de 2790 €. Un chip posee unas dimensiones de 150 mm de diámetro o lo que es lo mismo un área 707 cm². Por otra parte, de cada oblea se obtienen chips de 2x3 cm², es decir 9 cm², por lo que a partir de una oblea 78 chips con un coste de 35 € el chip. No obstante, los costes calculados en el NTC de fabricación de chips de silicio en obleas producidos en masa se reducirían a 1 €. Teniendo en cuenta que la parte de funcionalización tiene un coste de 2€, la producción en masa de un chip para la detección de prolactina sería de 3€ aproximadamente.