



# REVISTA FIGEMPA

## Revisión acerca de biosensores basados en grafeno para la detección del SARS-COV-2.

### Review about graphene- based biosensors for detection of SARS-COV-2

Daniel Mena | [iD](#) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador

Eliana Acurio | [iD](#) Escuela Politécnica Nacional, Ecuador

Richard Pachacama Choca | [iD](#) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador

Gabriela Tubón | [iD](#) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador

#### HISTORIAL DEL ARTÍCULO

Recepción: 20/09/2021

Aceptación: 08/11/2021

#### PALABRAS CLAVE

Biosensores, covid-19, detección, grafeno, SARS-CoV-2.

#### ARTICLE HISTORY

Received: 20/09/2021

Accepted: 08/11/2021

#### KEY WORDS

Biosensors, covid-19, detection, graphene, SARS-CoV-2.

#### RESUMEN

Debido a la emergencia sanitaria producida por el SARS-CoV-2, que ha generado una pandemia, en este trabajo se propone una revisión sobre métodos desarrollados para la detección de covid-19 basados en biosensores de grafeno, considerando sus propiedades fisicoquímicas. Esta investigación abarca una recopilación y análisis de información sobre biosensores en revistas de alto impacto en los últimos dos años. Para el desarrollo del estudio, se escogieron parámetros como: tiempo de detección, límite de detección, tipo de sensor, proteínas que detectan el biosensor, tipo de grafeno y costo, a fin de comprobar su efectividad. Los resultados analizados demuestran que la mayoría de biosensores funcionalizan el anticuerpo de la proteína S, N, o una recombinación de ambas, y algunos biosensores permiten la detección de hasta 4 tipos de proteínas (proteína reactiva C, IgG, IgM y nucleopside). Varios de los estudios analizados muestran una detección de secuencia específica del virus y un bajo límite de detección (LOD) que va desde 0,1 fg/mL hasta a 1 fg/mL, lo que permite detectar SARS-CoV-2 a bajas concentraciones. El análisis indica una opción factible para la implementación de biosensores basados en grafeno como alternativa a las pruebas tradicionales

#### ABSTRACT

Due to the health emergency produced by SARS-CoV-2, which has generated a pandemic, this work proposes a review on developed methods for the detection of covid-19 based on graphene biosensors, considering their physicochemical properties. This research includes a compilation and analysis of information on this type of biosensors published in high-impact journals in recent years. For the development of the study, parameters such as detection time, detection limit, type of sensor, proteins that the biosensor detects, type of graphene, and cost were chosen to verify its effectiveness. The analyzed results demonstrate that most biosensors functionalizing the antibody of S, N protein or recombination of both, and some biosensors allow the detection of up to 4 types of proteins (C-reactive protein, IgG, IgM, and nucleopside). Several of the analyzed studies show a specific sequence detection of the virus and a low limit of detection (LOD) ranging from 0.1 fg/mL to 1 fg/mL, which allows detecting SARS-CoV-2 at low concentrations. In conclusion, the analysis indicates a feasible option for the implementation of graphene-based biosensors as an alternative to traditional test.

## INTRODUCCIÓN

Desde diciembre de 2019 en la ciudad de Wuhan, China, se reportaron los primeros casos del nuevo coronavirus, conocido como SARS-COV-2, mucho más contagioso que el MERS del 2012 y el SARS del 2002, que presentaba una tasa de transmisión muy elevada, el cual se propagó rápidamente por todo el planeta, provocando una pandemia de carácter mundial.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), una de las principales acciones para contener tanto el contagio como la propagación se centra en el aislamiento de las personas infectadas, quienes deben permanecer en cuarentena quince días. Los pacientes que han sido diagnosticados con el nuevo virus presentan sintomatologías como: tos, fiebre, opresión en el pecho, dolor de cabeza, entre otros síntomas agudos. Sin embargo, lo más grave

de la transmisión e infección son los casos reportados de individuos asintomáticos, lo que los convierte en focos de transmisión silenciosa (Bai *et al.*, 2020). Se estima que hasta agosto de 2021, la cantidad de infectados ascendió a 206.693.357 personas con 4.352.488 muertes confirmadas (World Health Organization, 2021), cifras no tan exactas debido a las personas asintomáticas que han fallecido sin reportar la causa de muerte o han llevado un tratamiento en casa. El índice de mortalidad es elevado debido a la falta de acceso a recursos, la indisciplina de la sociedad, o un limitado acceso a pruebas de diagnóstico en poblaciones aisladas o empobrecidas. Esta tasa de mortalidad se ha reducido significativamente gracias a los programas masivos de vacunación que se están llevando a cabo en todo el mundo (Pérez Abreu *et al.*, 2020; El Universo, 2021).

A pesar de esto, hay que tener en cuenta que el mecanismo de supervivencia del genoma viral es la mutación, desde su aparición se han reportados diversas variantes de preocupación por su mayor transmisibilidad (B.1.1.7; B.1.351; P.1-B.1.617.2) y de interés por diferir morfológicamente de la cepa original (B.1.427/B.1.429; P.2; B.1.525; P.3; B.1.526; B.1.617.1; C.37). Actualmente, la B.1.617.2 denominada como delta es dos veces más contagiosa que la cepa original (Davis *et al.*, 2021), lo que ha causado preocupación a nivel mundial por los estragos que se reportan en la población. Uno de los mecanismos efectivos para controlar la propagación del virus es la detección temprana, de ahí nace la necesidad de acceder a pruebas rápidas con un alto índice de certeza para la detección del SARS-COV-2 a fin de detener el contagio y mitigar el índice de mortalidad.

Las nanopartículas se encuentran en auge como nanomateriales prometedores que presentan una mayor sensibilidad a la detección de virus (Moitra, 2021; Lizarazo Salcedo *et al.*, 2018). Es por esto que han sido ampliamente usadas en el ámbito sanitario, gracias a que aumentan la actividad catalítica y desactivan hongos, bacterias y virus mediante la generación de especies reactivas de oxígeno o formas fototérmicas (Ahmad *et al.*, 2018).

Asimismo, las propiedades de resonancia del plasmón superficial (RPS) que poseen las nanopartículas metálicas permitieron desarrollar biosensores fototérmicos para detectar SARS-COV-2 (Qiu *et al.*, 2020), de igual manera, las propiedades conductoras de este tipo de partículas han sido aprovechadas por los investigadores.

Por otra parte, el grafeno, desde su descubrimiento en 2004 por los científicos Geim y Novoselov (2004), quienes ganaron el premio Nobel en 2010 por sus innovadores experimentos respecto a este nanomaterial bidimensional (2D), que se distingue por sus inigualables propiedades físico-químicas, haciéndolo un material muy interesante,

posee una configuración electrónica  $sp^2$ , donde las bandas de valencia y conducción se tocan en el denominado punto de Dirac; además, sus electrones ubicados en regiones de orbitales deslocalizados se desplazan con gran libertad por su estructura, como si se tratase de cuasipartículas con masa efectiva nula (Gallach Pérez, 2020), lo que conlleva a que el grafeno presente una gran conductividad, a diferencia de otros materiales, esta propiedad no varía con la temperatura (Smith *et al.*, 2019).

Cuando otras especies químicas forman algún tipo de interacción con los electrones  $\pi$  deslocalizados, la conductividad del grafeno se ve alterada (Herradón, 2020), esta alteración es cuantificada por los biosensores. Otras notables propiedades son: la permeabilidad al agua, es deformable, es ligero, soporta la radiación ionizante, no es corrosivo ni tóxico, y gracias a sus propiedades eléctricas y químicas es fácilmente funcionalizable, convirtiéndose en una alternativa atractiva para aplicaciones biomédicas (Priyadarsini *et al.*, 2018; Valencia Giraldo, 2011). En la actualidad, existen varios estudios que se basan en transistores de efecto de campo para detección de moléculas, virus, entre otros (Kuo *et al.*, 2018; Gong *et al.*, 2019). Éstos poseen ventajas muy notables, entre las que destacan ultrasensibilidad con poca cantidad de analito y mediciones instantáneas que pueden ser recogidas por sistemas de procesamiento de datos para su posterior visualización y diagnóstico (Liu *et al.*, 2019). Por otro lado, los sensores electroquímicos son un método muy prometedor en la detección de anticuerpos o patógenos, gracias a su transducción de señales (De Eguilaz *et al.*, 2020). Este tipo de biosensores, han avivado un alto interés en la comunidad científica mundial, como alternativa viable en el análisis de biomoléculas (Lu *et al.*, 2009).

Por todo lo expuesto, en este estudio se discute la posibilidad de presentar una alternativa al uso de las pruebas comunes, dando oportunidad al campo de la nanotecnología y la nanoingeniería para sustituir las pruebas actuales de anticuerpos, antígenos o las PCR, por biosensores, que emplean nanomateriales basados en grafeno.

Tomando en cuenta que este tipo de biosensores pueden ser funcionalizados con distintas moléculas para detecciones más selectivas y específicas, con un adecuado método de recolección de muestras podrían ser pruebas de detección confiables y rápidas. Además, podrían ser manipuladas por cualquier individuo desde la comodidad de su hogar, controlando de manera efectiva futuros brotes y trazas de otros virus, brindando una ventaja con respecto a otras pruebas reportadas.

Se plantea analizar principalmente al grafeno funcionalizado con propósitos de bioingeniería para la detección de SARS-COV-2, evaluando la fiabilidad de los dispositivos

en función de diferentes indicadores (tipo de grafeno, proteínas detectadas, tipo de sensor, costo, tiempo y límite de detección), a fin de establecer si este tipo de biosensores son una alternativa viable para su escalamiento a nivel industrial (Torrente Rodríguez *et al.*, 2020; Mojsoska *et al.*, 2021).

## Materiales y métodos

La presente revisión se desarrolló empleando una metodología mixta, a fin de establecer la viabilidad para el uso y la masificación de dispositivos basados en grafeno con propósitos de detección e identificación del SARS-COV-2. Con base en la información estudiada, se han seleccionado los siguientes indicadores cualitativos: tipo de grafeno y tipo de biosensor. Cuantitativamente se seleccionó indicadores como: número de proteínas que detecta el biosensor, costo, tiempo y límite de detección. Entre los artículos elegibles se escogió aquellos que permitían una comparación cuantitativa y cualitativa de los diferentes dispositivos, otra métrica considerada fue el impacto que han tenido en la comunidad investigativa. El proceso metodológico del estudio se resume a continuación en el diagrama de flujo que presenta la figura 1 (ver Figura 1).

## Resultados

### SARS-COV-2

El SARS-COV-2 (síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2) pertenece a la familia Orthocoronavirinae y al subgénero *Sarbecovirus*, que engloba a otras especies causantes de infecciones leves e incluso mortales a humanos (Zhu *et al.*, 2019). El SARS-COV-2 ha sido el séptimo coronavirus en contagiarse a personas, precedido de otras especies de coronavirus (229E, NL63, OC43, HKU1, MERS-COV y el anterior SARS-COV) (Yüce *et al.*, 2021).

La morfología estructural del SARS-COV-2 está conformado por las glicoproteínas spike (S), proteínas de envoltura (E), proteínas de membrana (M) y en el interior el RNA viral pegado a la proteína nucleocapside (N) (Díaz-Castrillón y Toro-Montoya, 2020). De todas las nombradas, aquella que juega un papel relevante en la infección, es la proteína S, que está formada por 3 subunidades iguales (S1, S2, S3), organizadas en forma de círculo que se unen para encajar como una llave con el receptor ACE-2, esta unión es mediada por el RBD (Receptor Binding Domain) (Tolosa, 2020). Hay que tomar en cuenta que el ACE-2 forma parte de una ruta bioquímica que interviene en procesos regulatorios como la presión sanguínea o inflamación, cuya actividad principal es modular a la angiotensina 2 para prever sus efectos dañinos.

En marzo de 2020, se encontró una variante del

SARS-COV-2 que contiene una sustitución D614G (de ácido aspártico a glicina en la posición 614) de la proteína S, esta mutación se expandió rápidamente por todo el mundo posicionándose como una mutación predominante en toda la población, distintas investigaciones en modelos animales y humanos mostraron que estas mutaciones D614G pueden ubicar su dominio de unión RBD a fin de interactuar más eficientemente con el receptor ACE-2 (Kantor *et al.*, 2021), esta variación en el virus está asociada con una carga viral ARN más alta en la zona nasofaríngea, lo que aumenta la transmisibilidad.

### Métodos de detección del virus SARS-COV-2

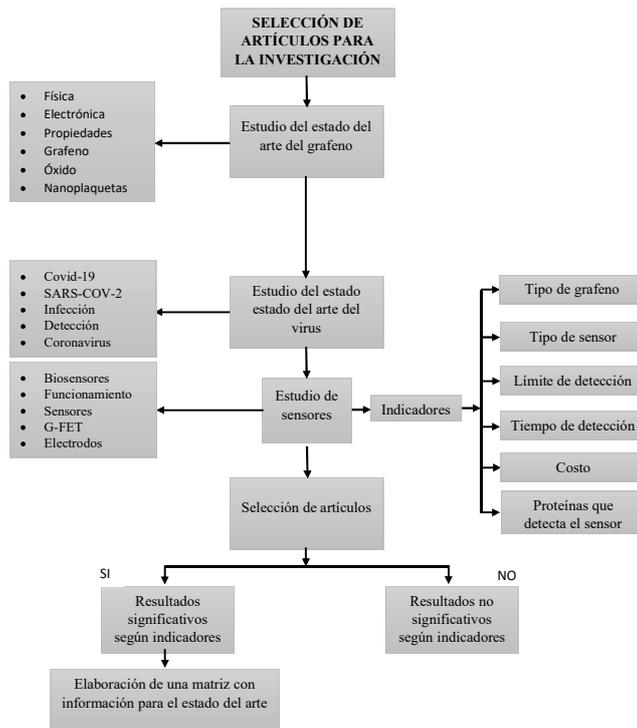
Actualmente, existen diferentes métodos de detección del virus como: RT-PCR (Real-time polymerase chain reaction), pruebas que detectan antígenos, y pruebas que detectan anticuerpos.

RT-PCR, es una versión de PCR en tiempo real desarrollado explícitamente para la detección de ARN del virus. Esta técnica es suficientemente específica y muestra una alta fiabilidad (Yüce *et al.*, 2021; Green, 2020). Está fundamentada en 2 reacciones consecutivas, la primera convierte el ARN en ADN complementario con el uso de la enzima de transcripción inversa, la segunda amplifica la muestra de ADN por reacción de cadena de proteínas, empleando cebadores específicos de sondas y genes de hidrólisis marcadas por fluorescencia (Yüce *et al.*, 2021). En la tabla 1, se resumen algunas de las pruebas PCR permitidas por la FDA con autorización de uso de emergencia (ver Tabla 1).

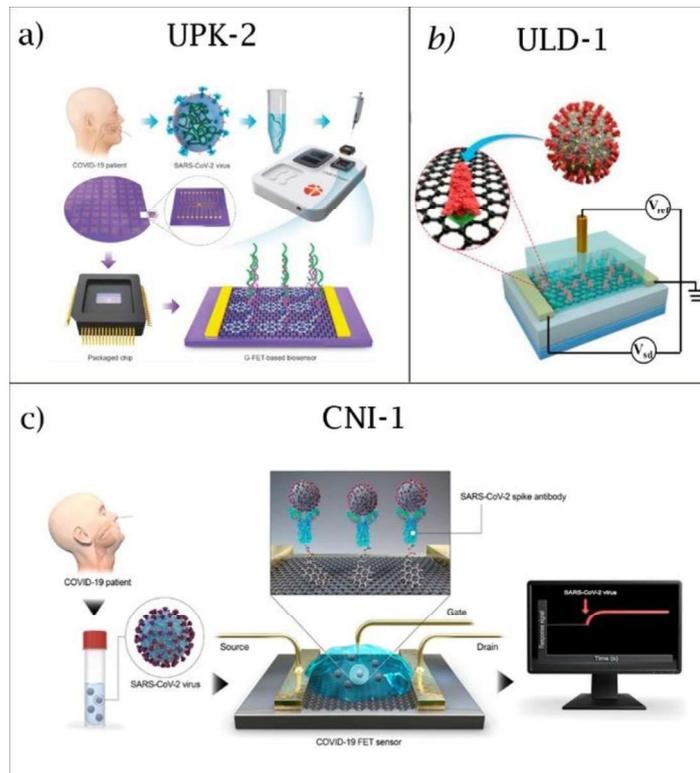
Por otra parte, las pruebas de antígenos se basan en la detección de un antígeno, sustancia, o cualquier molécula que produce la activación del sistema inmunológico, y posteriormente produce la generación de anticuerpos para neutralizar agentes patógenos externos, protegiendo así el cuerpo humano (Yüce *et al.*, 2021). Las pruebas de antígenos a diferencia de los métodos basados en PCR, permiten encontrar estructuras presentes en el virus como: liberación de glicoproteína S, proteína M, proteína N, o virus sin etapa de amplificación (Green *et al.*, 2020).

En la tabla 2, se presentan los principales resultados acerca de las pruebas que detectan antígenos, se hace referencia a diferentes tests aprobados con autorización especial emergente por la FDA, donde se muestra el tipo de proteína detectada, la sensibilidad, el límite de detección (LOD), el tiempo de procesamiento de resultados, entre otros parámetros estudiados (ver Tabla 2).

De la misma manera, los anticuerpos son proteínas generadas por el sistema inmunológico del cuerpo humano como reacción a la presencia de antígenos. Cada anticuerpo solo puede detectar a un único tipo de antígeno,



**Figura 1.** Proceso de verificación de información y selección de los artículos científicos a ser discutidos.



**Figura 2.** Biosensores basados en transistores de efecto de campo para detectar SARS-Cov-2. (a) UPK-2 fuente: Ke et al., 2020; (b) ULD-1 fuente: Zhang et al., 2020; (c) CNI-1 fuente: Seo et al., 2020

eliminándolo del cuerpo (Yüce *et al.*, 2021). Las inmunoglobulinas A (IgA), M (IgM) y G (IgG) son anticuerpos; IgA e IgM son detectables en la primera fase de la infección, se pueden detectar a partir del 5.º al 7.º día posterior al inicio de los síntomas. A continuación, se produce la fabricación de IgG como anticuerpos de memoria y protección; todas estas son secretadas en la sangre y mucosas (Jacofsky *et al.*, 2020). A diferencia de las pruebas RT-PCR y antígenos, las pruebas de anticuerpos son de carácter cualitativo, semicuantitativo y cuantitativo permitiendo establecer un nivel de presencia de anticuerpos (ver Tabla 4), el método más común empleado es el Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (ELISA) (Sethuraman *et al.*, 2020) y el ensayo dispositivo de flujo lateral, que son tiras reactivas inmunocromatográficas. En la tabla 3, se recogen las pruebas de anticuerpos de diferentes fabricantes, donde se establece la proteína que se detecta, su nivel de sensibilidad y el tiempo de detección (ver Tabla 3).

### El grafeno y su funcionalización

El grafeno monocapa al ser de naturaleza hidrofóbica, precisa ser dotado con propiedades que conduzcan a la modificación covalente de los átomos de carbono, pasando de una configuración  $sp^2$  a  $sp^3$  (Aceituno Bueno, 2018), esto conlleva a cambiar la geometría hexagonal a tetraédrica, presentando enlaces más alargados, causando una distorsión geométrica que se extiende sobre múltiples posiciones de la red (Johns y Hersam, 2013); donde los electrones son compartidos por ambos átomos causando cambios significativos en sus propiedades electrónicas (Aceituno Bueno, 2018).

La funcionalización del grafeno es clave, puesto que se dota al nanomaterial de una afinidad covalente importante al momento de interactuar con las moléculas de sondas de detección, las cuales estarán en contacto con el analito, estas variaciones van a ser detectadas por el transductor de señales del biosensor. Por ejemplo, el grafeno funcionalizado con PBASE se emplea como enlazador heterobifuncional, ya que contiene un grupo pireno que se apila con el grafeno por superposición  $\pi - \pi$  y un éster de N-hidroxisuccinimida (NHS), que reacciona con aminas primarias presentes en las moléculas diana (antígenos, anticuerpos, material genético) (Kwong Hong Tsang *et al.*, 2019).

### Biosensores basados en grafeno para detección de SARS-COV-2

Los biosensores de grafeno (Bio-G) detectan moléculas dianas específicas (ARN, antígenos o anticuerpos), de acuerdo con el ensayo que se desea aplicar para la detección, se recogen respuestas a partir de señales sensibles y rápidas. El principio de funcionamiento de los

biosensores, se basa en el cambio de la distribución de cargas a lo largo de la superficie del grafeno y del potencial eléctrico al unirse con las moléculas diana. Posteriormente, se recoge la señal del transductor al medir las variaciones en conductancia, corriente, resistencia o voltaje (Yüce *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2019).

El proceso de caracterización de los sensores es un paso fundamental en los artículos estudiados, mediante técnicas instrumentales como: voltamperometría de pulsos (DVP), espectroscopía de impedancia electroquímica, amperometría, voltamperometría cíclica, espectroscopía Raman, XPS, SEM, entre otras, se comprueba si las funcionalizaciones del grafeno con los enlazadores de detección están correctamente ensambladas. De manera que se mida, y verifique la fiabilidad y rendimiento de los biosensores.

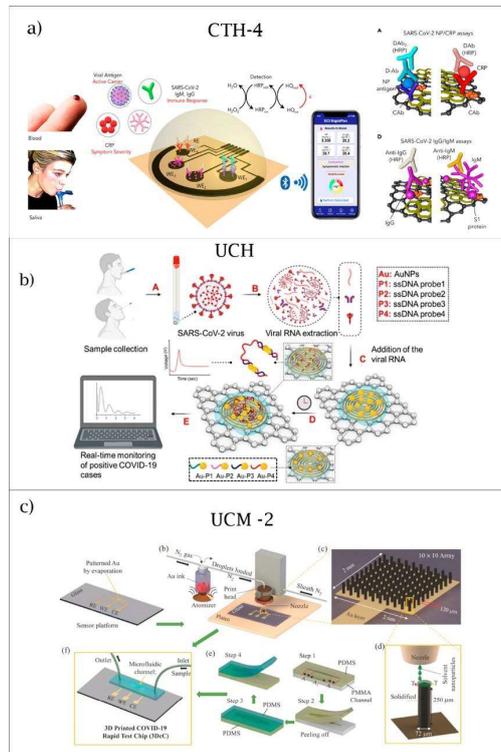
En todos los casos las caracterizaciones se dieron en 3 etapas, las superficies de grafeno sin funcionalización, superficies funcionalizadas con biorreceptores, y finalmente la respuesta a la unión con los analitos, de esta manera se fue corroborando y comprobando los cambios en el voltaje y la conductancia que se fueron produciendo al añadir al grafeno, las sondas y las moléculas diana.

### Principio de funcionamiento físico-químico

Debido a la naturaleza hidrofóbica del grafeno monocapa, muchas de las reacciones biológicas no podrían llevarse a cabo, de ahí que es necesario añadir enlazadores como, por ejemplo, el ácido pirenobutírico (PBA) o éster succinimidílico del ácido 1-pirenobutanoico (PBASE) que constan de un grupo pireno y carboxílico, donde una vez funcionalizados con la capa de grafeno se unen mediante interacciones hidrófobas y de apilamiento  $\pi$  (Hinnemo *et al.*, 2017).

Las capas de grafeno interactúan fuertemente con las unidades de pireno del PBA y PBASE, gracias a la afinidad de la unión covalente entre los grupos carboxilos de los enlazadores y los grupos amino receptores de captura (Hinnemo *et al.*, 2017), de esta forma sus propiedades se mantienen excelentemente conservadas. La detección de la señal eléctrica se basa en principios electroquímicos, donde se miden los cambios en la conductancia debido a las reacciones redox que ocurren en cada uno de los electrodos de trabajo al detectar los anticuerpos, proteínas o antígenos del SARS-COV-2 en los biosensores basados en sensores electroquímicos.

Una vez funcionalizado el grafeno-enlazador, otro punto importante son los receptores, la unión de los biorreceptores (anticuerpos, antígenos, enzimas u oligonucleótidos antisentido) identifican la molécula diana



**Figura 3.** Biosensores basados en sistemas de electrodos electroquímicos. (a) y (b) CTH-4 (Torrente Rodríguez, et al., 2020), (c) UCH (Alafeef et al., 2020), (d) UCM-2 (Ali et al., 2020)

KIT	FABRICANTE	REGIÓN ESPECIFICA	LOD (límite de detección)	SENSIBILIDAD	TIEMPO después extracción y purificación (min)	METODO DE RECOLECCION DE MUESTRA	TECNOLOGÍA	REFERENCIA
VitaPCR <sup>TM</sup> SARS-CoV-2	Meranini Pharmaceutical Group	Gen de la nucleocápside (N)	2730 copias/ml	≥95%	20 después extracción y purificación	Hisopos nasofaríngeos (NP) u orofaríngeos (OP)	(RT-PCR) en tiempo real	(Meranini Diagnostics, 2020)
QIAstat-Dx	Qiagen	Genes poli Orf1b y E	500 copias/mL	≥95%	60	Hisopos nasofaríngeos (NP)	PCR multiplexada de ácido nucleico en tiempo real	(Qiagen, 2020)
NxTAG COV	Luminex	Genes ORF1ab, E y N	5.4 x 10 <sup>3</sup> NDU/mL	≥97.8%	60	Hisopos nasofaríngeos (NP)	(RT-PCR)	(Luminex Corporation, 2020)
Veri-Q PCR 316	MiCo BioMed Co., Ltd.	Genes ORF3a y N	137.850 - 151.028 copias/mL	≥95%	55	Nasofaríngeo o hisopo orofaríngeo	Real-time PCR	(Mico BioMed, 2021)

**Tabla 1.** Resumen sobre pruebas PCR del mercado tradicional según cada fabricante

PRUEBA	FABRICANTE	PROTEINA DE DETECCIÓN	SENSIBILIDAD	LOD (límite de detección)	METODO DE RECOLECCION DE MUESTRA	TIEMPO (minutos)	TECNOLOGIA	REFERENCIA
Sofia	Quidel	Proteína N	96,67%	1,13 × 10 <sup>2</sup> DICT 50 / ml	Hisopos nasofaríngeos y nasales	15	Flujo lateral basada en inmunofluorescencia	(Quidel, 2021)
Dispositivo de prueba rápida Panbio™ COVID-19 Ag	Abbott	Proteína N	93,33%	2,5 × 10 <sup>1,8</sup> TCID 50 / ml	Hisopos nasofaríngeos	15-20	LFA- Ensayo de Flujo Lateral de Antígeno	(Abbott, 2021)
Prueba rápida de antígeno SARS-CoV-2	SD Biosensor, Inc	Proteína N	96,52%	3,12 x 10 <sup>2,2</sup> TCID 50 / ml	Hisopos nasofaríngeos	15-30	Inmunoensayo cromatográfico	(SD Biosensor, 2021)
ErbaLisa COVID-19 IgG ELISA	Calbiotech, Inc.	IgG (contra la proteína S)	98,30 %	-	Suero	~ 60	ELISA	(Erba Mannheim, 2020)
ELISA Anti-SARS-CoV-2 (IgG)	EUROIMMUN AG	IgG (contra S1 RBD)	94,40 %	-	Suero Plasma Sangre entera	120	ELISA	(Public Health England, 2020)(Euroimmun, 2020)
Elecsys Anti SARS CoV-2	Roche	IgG (contra la proteína N)	88,1 %	-	Suero Plasma	18	ECLIA - Inmunoensayo de electroquimioluminiscencia	(Roche, 2020)
Platelia SARS-CoV-2 Total Ab	Laboratorios Bio-Rad, Inc.	IgG, IgA, IgM (contra la proteína N)	97,50 %	-	Suero Plasma	~120	EIA - Inmunoensayo enzimático	(Bio-Rad, 2020)
Prueba rápida de casete qSARS-CoV-2 IgGIgM (oro coloidal)	Cellex, Inc.	IgM / IgG (contra la proteína N & S)	93,80 %	-	Suero Plasma	15-20	LFIA - Inmunoensayo de flujo lateral	(Rafer, 2020)

Tabla 2. Resumen pruebas que detectan antígenos

PRUEBA	FABRICANTE	PROTEINA DE DETECCIÓN	SENSIBILIDAD	LOD (límite de detección)	METODO DE RECOLECCION DE MUESTRA	TIEMPO (minutos)	TECNOLOGIA	REFERENCIA
Prueba rápida de antígeno SARS-CoV-2	Roche	Proteína N	95,5%	3.12 x 10 <sup>2,2</sup> TCID50/mL f	Hisopos nasofaríngeos	15-30	Inmunoensayo cromatográfico	(Roche, 2020)

Tabla 3. Resumen sobre pruebas que detectan anticuerpos..

inmovilizada en el canal de grafeno o los electrodos de trabajo mediante reacciones químicas.

Sensores basados en arreglos de transistores efecto de campo con grafeno (G-FET)

De manera similar trabajan los biosensores G-FET, donde se aplica un voltaje entre los electrodos fuente (S) y drenaje (D), y se mide el flujo de corriente a través de la capa de grafeno como una función del voltaje del electrodo compuerta (G), que se mantiene en constante contacto con la solución buffer. Cuando se enlaza el complejo sonda de detección-molécula diana, la distribución de cargas del nivel de Fermi cambia en las inmediaciones de la capa de grafeno, modificando así su conductividad eléctrica. El cambio de conductancia en el electrodo G, altera la cantidad de corriente que puede fluir entre los electrodos S y D (Zhang *et al.*, 2020; Mao, 2018).

Cabe mencionar que la mayoría de transistores analizados usaron grafeno monocapa producido mediante la técnica CVD, inmovilizado sobre el canal del transistor (Ghany *et al.*, 2017). En la tabla 5, se presenta los resultados más significativos en cuanto a biosensores de grafeno.

En la figura 2 (a) se puede apreciar el transistor desarrollado en la universidad de Pekín (UPK-2), que fabricó un chip conformado por 10 transistores efecto-campo empaquetados en PQFP (paquete plano cuádruple de plástico), donde mediante un apilamiento  $\pi$ - $\pi$  se inmovilizaron sondas de ss-DNA en la superficie del grafeno monocapa y el antígeno. Para la detección de anticuerpos se usó una proteína recombinante a partir de la longitud completa de la proteína N y se conjugó con el dominio RBD de la proteína S (Ke *et al.*, 2020), este sensor detecta ARN viral y la inmunoglobulina IgG, con un tiempo de detección de 10 minutos y un límite de detección de ARN viral que oscila desde 0,1 fg/ mL<sup>-1</sup> a 1 fg/ mL<sup>-1</sup>.

Asimismo, en la figura 2 (b), se muestra un prototipo basado en un transistor FET (ULD-1) desarrollado en la universidad de Leiden, en la cual se efectuaron dos ensayos, donde se funcionalizó el grafeno con dos enlazadores CSAb y ACE2, para determinar la afinidad de unión a la proteína de la subunidad S1 de covid-19, donde CSAb demostró mejor afinidad de enlace con la subunidad S1 de la proteína S, lo que concluyó en una detección eficaz (Torrente Rodríguez *et al.*, 2020). Con respecto al tiempo de detección, solo tardó 2 minutos para mostrar los resultados una vez depositado el analito, y se necesitó un LOD de 2 pM aproximadamente (Tabla 5).

Por otra parte, en Corea del Sur, figura 2 (c) se desarrolló un FET (CNI-1), donde el grafeno monocapa fue previamente depositado sobre el canal, para luego

sumergirlo en PBASE, y así exponerlo a un anticuerpo spike a fin de detectar el antígeno de la proteína S del virus, el tiempo de detección que reportan los investigadores es de 1 a 8 minutos una vez depositado el analito, con un LOD de  $2,42 \times 10^2$  copias/mL. Cabe recalcar, que por lo general se usa albumina de suero bobino (BSA) para enjuagar la superficie de detección y evitar que se formen residuos que alteren la respuesta del biosensor (ver Figura 2).

Sensores basados en sistemas de electrodos

Generalmente un sensor electroquímico consta de 3 electrodos, el electrodo de trabajo (WE) de donde se deposita el analito y se generan las reacciones de oxidación-reducción, una vez generada la reacción, electrodo auxiliar o contra electrodo (CE), recoge las señales que produce el WE, y según el tipo de reacción produce un flujo de electrones que van hacia o desde el electrodo CE, este electrodo admite únicamente el transporte de la corriente. Posteriormente el electrodo de referencia (RE), que establece los valores de WE y posee una entrada alta de impedancia para no originar transporte de corriente a través del mismo (Arrieta-Almario y Tarazona-Cáceres, 2014). Finalmente, aplicando un potencial controlado (V) registra la respuesta del sensor, midiendo la corriente que circula por el sensor en función del tiempo (Bertrand, 1998).

En la figura 3 (a), se presenta el diagrama de un estudio llevado a cabo en el Instituto Tecnológico de California (CTH-4), donde se grabó un sistema en poliimida que consta de un RE de plata (Ag/AgCl), un CE y 4 electrodos WE con grafeno monocapa multiplexados y funcionalizados con PBA, donde las unidades de pireno interactúan fuertemente con el grafeno y la sonda de detección está basada en ensayos de sándwich sencillo y doble (Torrente Rodríguez *et al.*, 2020; Ochoa Azze, 2012). Las muestras de sangre y saliva deben someterse a un pretratamiento y enjuagarlas con distintas soluciones (PBS y BSA) para formar suero purificado antes de agregarse sobre la superficie de detección.

Este sistema multiplexado es interesante, puesto que se agregaron 4 proteínas de captura específicas en cada WE para detectar distintas proteínas del virus. En la tabla 5, se reportan los límites de detección para la proteína C reactiva (CRP) en el rango de 10-20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en muestras tipo suero, y 0,1-0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en muestras de saliva. Mientras que, para la proteína nucleocápside (NP) el LOD se estableció en un rango de 0,1 a 0,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en muestras de suero y desde 0,5 a 2,0 ng mL<sup>-1</sup> en muestras de saliva. Asimismo, la inmunoglobulina específica S1-IgG se detectó con un LOD establecido desde 20 a 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en muestras de suero y 0,2 a 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en muestras de saliva. Finalmente, la inmunoglobulina S1-IgM se detectó con un LOD de 20 a 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en muestras de suero y 0,6 a 5,0  $\mu\text{g}$

mL<sup>-1</sup> saliva) (Torrente Rodríguez *et al.*, 2020). La detección simultánea de estas proteínas proporciona información sobre tres aspectos claves de la enfermedad: estado crítico, infección viral y generación de anticuerpos. Este dispositivo es capaz de generar una respuesta confiable en un tiempo de 10 min, este sistema resulta interesante porque consta de un sistema electrónico que se encarga de enviar la señales mediante bluetooth al usuario y se visualizan los resultados en una aplicación (Torrente Rodríguez *et al.*, 2020).

Siguiendo con el análisis en la figura 3 (b), se muestra otro experimento que se llevó a cabo en la Universidad de Illinois (UCH-1), un genosensor electroquímico que detecta de manera sensible y selectiva el ARN viral del SARS-COV-2, este sensor se diseñó sobre papel filtro usando una suspensión de nanoplaquetas de grafeno (Gnp) formando una película conductora vía *spincoating*, posteriormente se grabó sobre el papel/Gnp micro-Au electrodos, diseño que se presenta en la figura 3 (c). Para la fase de detección, se funcionalizaron sondas de oligonucleótidos antisentido ssDNA con nanopartículas de oro (AuNPs+ssDNA) para un mayor rendimiento al reconocer y detectar el virus (Moitra *et al.*, 2020; Vikesland, 2018), esto debido a su gran área de superficie y propiedades conductoras (Ling Ling *et al.*, 2011; Young *et al.*, 2016). Este arreglo se unirá a dos zonas específicas del gen N, para obtener una aceleración en la transferencia de electrones, las Au+ssDNA fueron depositadas sobre los micro-Au electrodos (Ala-feef, 2020).

Uno de los derivados de grafeno es el (rGO) es una capa de átomos de carbono similar a la del prístino, pero con grupos residuales oxigenados los mismo que se tratan de eliminar mediante técnicas de reducción química (Dreyer, 2009).

Por otra parte, gracias a una colaboración entre la Universidad Carnegie Mellon y la Universidad de Pittsburgh (Figura 3c), se desarrolló un sensor UCM-2 (Tabla 5) basado en una celda electroquímica, donde en un portaobjetos de vidrio recubierto con cromo estampado (5 nm de espesor) y oro (100 nm de espesor) forma la capa base de los tres electrodos (WE, CE y RE) (Ali *et al.*, 2020), para fabricar el canal donde se deposita la muestra se usó dimeticona (PDMS). Este sensor tiene un diseño singular con nano-impresión 3D AJ (aerosol jet), y se depositaron micropilares de AuNPs sobre el WE, a los cuales se agregaron nanoescamas de Rgo, unidas a dos antígenos virales, como se indica en la figura 3 (c); la proteína S y el dominio RBD del virus, que son enlaces para detectar la presencia de anticuerpos, esto se logró al activar los grupos -COOH de rGO usando una química de acoplamiento EDC: NHS (1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil) carbodiimida, N-hidroxi-succinimida) (Liu *et al.*, 2018). Así se facilita la formación de enlaces covalentes C-N entre

rGO y antígenos a través de una reacción de amidación. Este sensor se puede reutilizar hasta 10 veces sin perder su sensibilidad, según los resultados obtenidos por los investigadores. Además, presenta límites de detección considerables;  $2,8 \times 10^{-15}$  M anticuerpos antiproteína S1 contra el antígeno spike S1 y  $16,9 \times 10^{-15}$  M anticuerpo anti-RBD contra (RBD) (ver Figura 3).

Otro estudio reportado, comprende un inmunoensayo electroquímico URK-1 (Ver Tabla 5) a nivel de laboratorio que se realizó únicamente para detectar la proteína S como antígeno, adhiriendo a la superficie de grafeno (electrodo de trabajo) anticuerpos antiproteína S como sondas de detección, este enfoque de antígeno anticuerpo es similar al canal de detección de dispositivo CNI-1, ambos utilizan el mismo mecanismo de anclaje entre el biorreceptor y el analito, la diferencia radica en que este dispositivo está basado en un inmunoensayo electroquímico sin etiqueta, que detecta la subunidad S1 de la proteína S. Se logró detectar una señal de respuesta por encima de 260 nM (20 µg/ml). La función de este sistema es detectar la perturbación de la señal obtenida de las mediciones de ferri/ferrocianuro después de la unión con el antígeno, este dispositivo reporta que se necesita únicamente 45 min desde la toma de la muestra, incubación hasta la detección (Mojsoska *et al.*, 2021).

Para verificar la efectividad de todos los dispositivos reportados en esta revisión, los investigadores reportan que las muestras fueron estudiadas por el método tradicional de detección (RT-PCR), mostrando una efectividad de casi el 100% en todos los casos.

## Discusión

Al analizar la viabilidad del uso de los transistores basados en grafeno para detección del covid-19, es importante establecer una comparación cualitativa entre las pruebas PCR pruebas de antígenos y pruebas de anticuerpos, que actualmente se emplean para detectar estructuras de origen viral, por ejemplo, a diferencia de las RT-PCR, las pruebas de antígenos solo muestran la infección activa, mas no el desarrollo de inmunidad, de manera que los anticuerpos son precedidos por los antígenos, es decir, se forma un complejo de atracción entre ellos y son específicos de la molécula diana (Yüce *et al.*, 2021), convirtiéndose así en pruebas más fiables que la de anticuerpos para identificar la fase activa de la enfermedad. Por otra parte, las pruebas de anticuerpos pueden ayudar a estimar cualitativa y cuantitativamente inmunoglobulinas G y M, con el propósito de conocer si el individuo estaba infectado con el virus, si ha desarrollado anticuerpos, cuánto tiempo estarán presentes en el cuerpo y si brindan inmunidad (Sharpless *et al.*, 2021).

PCR	IgA/IgM	IgG	Interpretación
+	-	-	Fase presintomática
+	+/-	+/-	Fase inicial
+/-	+	+/-	2da Fase
+/-	++	++	3era Fase
-	+/-	++	Infección pasada

**Tabla 4:** Interpretación cualitativa de las pruebas ELISA (Sethuraman et al., 2020).

INVESTIGACIÓN	ABREVIATURA	TIPO DE GRAFENO	MÉTODO DE RECOLECCIÓN DE MUESTRA	MUESTRAS TOMADAS	PROTEÍNAS DETECTADAS	TIEMPO DE DETECCIÓN	LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD)	TIPO DE SENSOR	COSTO	REFERENCIA
SARS-CoV-2 RapidPlex: A Graphene-based Multiplexed Telemedicine Platform for Rapid and Low-Cost COVID-19 Diagnosis and Monitoring	CTH-4	Grafeno monocapa	Sangre y saliva	17 muestras de sangre (10 (+), 7 (-)) 8 muestras de saliva (5 (+), 3 (-)) (se requiere posterior tratamiento de la muestra)	Proteína reactiva C, nucleopside, IgG, IgM	10 min	NP=0,1-0,8 µg mL <sup>-1</sup> suero y 0,5-2,0 ng mL <sup>-1</sup> saliva - S1-IgG= 20 a 40 µg mL <sup>-1</sup> en suero y 0,2 a 0,5 µg mL <sup>-1</sup> -; S1-IgM= 20 a 50 µg mL <sup>-1</sup> suero y 0,6 a 5,0 µg mL <sup>-1</sup> saliva-; PCR en el rango de 10-20 µg mL <sup>-1</sup> suero y 0,1-0,5 µg mL <sup>-1</sup> saliva	Biosensor basado en celda electroquímica	5 ctvos	((Torrente Rodríguez et al., 2020)
Electrical probing of COVID-19 spike protein receptor binding domain via a graphene field-effect transistor	ULD-1	Grafeno monocapa	Muestra aislada en laboratorio	-	Subunidad S1 de la proteína S	2 min	aproximadamente 2 pM	Biosensor basado en G-FET	-	(Zhang et al., 2020)
Rapid Detection of COVID-19 Causative Virus (SARS-CoV-2) in Human Nasopharyngeal Swab Specimens Using Field-Effect Transistor-Based Biosensor	CNI-1	Grafeno monocapa	Hisopos nasofaríngeos	3 PCR (+) muestras clínicas sin ningún procesamiento previo	Virus completo-Antígeno de la proteína S	1-8 min	2,42 × 10 <sup>2</sup> copias / mL - 100 fg / mL	Biosensor basado en G-FET	-	(Seo et al., 2020)
Rapid, Ultrasensitive, and Quantitative Detection of SARS-CoV-2 Using Antisense Oligonucleotides Directed Electrochemical Biosensor Chip	UCH-1	Nanoplaquetas de grafeno	Hisopo nasal - saliva	48 muestras clínicas 22 pacientes (+) y 26 (-), confirmados por RT-PCR	ARN viral	5 min	6,9 copias / µL	Biosensor basado en celda electroquímica	\$ 10	(Alafeef et al., 2020)
An accurate, high-speed, portable bifunctional electrical detector for COVID-19	UPK-2	Grafeno monocapa	hisopos orofaríngeos	Muestras clínicas de 10 (+) y 8 (-)	ARN viral, IgG	10 min	ARN e ~ 0,1 fg .mL <sup>-1</sup> ; 1 fg mL <sup>-1</sup>	Biosensor basado en G-FET	-	(ke et al., 2020)
Sensing of COVID-19 Antibodies in Seconds via Aerosol Jet Nanoprinted Reduced-Graphene-Oxide-Coated 3D Electrodes	UCM-2	Óxido de grafeno reducido	Muestra aislada en laboratorio (suero fetal bobino y suero de conejo)	-	Detección de anticuerpos S1 y RBD	10 - 12 segundos	2,8 × 10 <sup>-15</sup> M anticuerpo anti-proteína S1 16,9 × 10 <sup>-15</sup> M anticuerpo anti-RBD	Biosensor basado en celda electroquímica	-	(Ali et al., 2020)
Rapid SARS-CoV-2 Detection Using Electrochemical Immunosensor	URK-1	Grafeno monocapa	Muestra aislada en laboratorio	-	Proteína S1 de Spike	45 min todo el proceso	Proteína S a 260 nM (20 µg / ml)	Biosensor basado en celda electroquímica	-	(Mojsoska et al, 2021)

**Tabla 5.** Resultados obtenidos en esta revisión

Los dispositivos reportados en este artículo se basan especialmente en 2 tipos de tecnologías; transistores de efecto de campo y sensores electroquímicos, ambos dispositivos tienen la ventaja de necesitar una mínima cantidad de grafeno a ser depositada en el canal y en el electrodo de trabajo, respectivamente. Por otra parte, cabe resaltar que el grafeno monocapa actualmente es más costoso de obtener y sintetizar, puesto que para que se deposite o crezca la monocapa de grafeno sobre determinado sustrato hacen falta equipos de alto vacío, y para la fabricación de semiconductores es necesario cuartos limpios que requieren protocolos de limpieza estrictos y rigurosos (IEEE/IEC, 2011; Phelan, 2021), es ahí donde incrementa el valor de la hoja de grafeno monocapa y dificulta su proceso de escalamiento a nivel industrial, aunque cabe destacar que las cantidades que se requieren para los electrodos y superficies de detección en estos biosensores son mínimas (Zhang *et al.*, 2020; Seo *et al.*, 2020; Ke *et al.*, 2020).

Por otra parte, los sensores electroquímicos por lo general usan nanomateriales derivados de grafeno, como óxido de grafeno reducido (rGO) y nanoplaquetas de grafeno, es interesante analizar, por ejemplo, el óxido de grafeno (Smith *et al.*, 2019; Maio *et al.*, 2020; Tene *et al.*, 2020), puesto que al contener grupos funcionales es más fácil que se produzca la afinidad entre los enlazadores como el PBA y el PBASE (Kwong Hong Tsang *et al.*, 2019; Hinnemo *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2015). Esto aporta una gran ventaja con respecto a los biosensores basados en transistores de efecto de campo, puesto que la etapa de funcionalización sobre la monocapa de grafeno ya no debería ser llevada a cabo.

Entre los dispositivos estudiados se observó que algunos son diseñados con nanopartículas de oro, dotando a la monocapa de grafeno con una funcionalidad extra y elevando de alguna forma la respuesta eléctrica en el dispositivo, visto desde este punto de vista, es interesante cómo el empleo de dos nanomateriales puede ayudar al diseño y mejorar la respuesta de los sensores basados en grafeno (Alafeef *et al.*, 2020). Cabe recalcar, que mientras más nanomateriales se empleen dentro de un dispositivo se corre el riesgo de elevar su costo final, lo cual no es conveniente para la industrialización de pruebas tipo POC (pruebas auxiliares ejecutadas por personal no clínico y externo a las instalaciones de un laboratorio).

En cuanto al costo, son pocos los dispositivos que reportan un costo real final, de una prueba para detección de covid-19 utilizando nanomateriales basados en grafeno. De hecho, en nuestra investigación solo dos dispositivos mencionan el costo de la prueba como tal, el primero el dispositivo CTH-4 (Torrente Rodríguez *et al.*, 2020) con un costo de cinco centavos por sensor, sin embargo, no se menciona el costo total de todo el dispositivo junto con la

aplicación (Tabla 5). Mientras que el segundo, es un sistema basado en un sensor electroquímico con un costo final de USD 10 (Alafeef, 2020), los otros estudios solo reportan prototipos que son probados a nivel de laboratorio. Es interesante hacer mención al dispositivo CTH-4, puesto que los investigadores crean un diseño completo de detección, con una aplicación en la que se visualizan los resultados vía una aplicación en el celular, esto brinda al usuario la posibilidad de obtener un sistema de detección automatizado.

En cuanto a las proteínas detectadas, el dispositivo más eficiente es CTH-4, permite evidenciar tres estados críticos de la enfermedad: respuesta inmune (IgG e IgM) (Li *et al.*, 2020), infección viral (NP) (Diao *et al.*, 2020), y gravedad de la enfermedad (PCR) (Gong *et al.*, 2020), desde el punto de vista de las pruebas tradicionales, podríamos establecer una comparación con una prueba cuantitativa de anticuerpos, puesto que nos da trazas de dos proteínas importantes en la generación de anticuerpos y desarrollo de la enfermedad (Jacofsky *et al.*, 2020; Ji *et al.*, 2020). Por otra parte, la mayoría de los sensores desarrollados y reportados, presentaron la detección de proteínas N, S, ARN viral o IgG (Tabla 5).

El siguiente parámetro para considerar depende del tiempo de detección, éste es fundamental para optimizar e incrementar el volumen de análisis clínicos, se analizó que todos los sensores necesitan purificación e incubación de muestras lo que representa un inconveniente si no se manipula de manera adecuada; aunque en comparación con las RT-PCR actuales son una alternativa altamente eficiente, ya que las pruebas moleculares requieren de mínimo 1 a 4 horas para ser procesadas y analizadas en laboratorios especializados. El tiempo de detección de los biosensores, varió en un intervalo desde 10 segundos a 12 minutos para detectar una señal medible en presencia del analito. Sin embargo, el reporte del artículo URK-1 muestra en sus resultados un tiempo de 45 min que incluye la incubación y detección de la proteína

Se debe recalcar, que aquel biosensor que presentó una respuesta en un tiempo más corto fue UCM-2, que detectó en un intervalo de 10 a 12 segundos anticuerpos de la antiproteína S1 con un LOD de  $2,8 \times 10^{-15}$  M y anti-RBD  $16,9 \times 10^{-15}$  M, en suero fetal bobino y suero de conejo respectivamente (Ali *et al.*, 2020).

Además, todos los dispositivos desarrollados presentan límites de detección ultrabajos capaces de competir con las pruebas convencionales PCR-RT, en esta investigación se reporta que el dispositivo capaz de detectar cantidades mínimas de analito y producir una señal detectable es el biosensor CNI-1, cuyo nivel de detección se ubica en  $2,42 \times 10^2$  copias/mL para virus completo y 100 fg/mL

para la proteína S1. Tomando en cuenta que las pruebas PCR que se reportan en este estudio detectan la presencia del virus en intervalos que van desde 137.850 copias/mL a 2730 copias/mL, este biosensor CNI-1 ofrece límites de detección bajos y solo tarda entre uno y ocho minutos en dar resultados. Mientras tanto, para los demás sensores estudiados no es posible establecer un límite de detección comparable con las pruebas tradicionales (antígenos y anticuerpos), ya que, reportan el límite de detección (LOD) en unidades de masa/volumen, sin poder diferenciar qué cantidad de muestra constituye ARN viral y ARN humano.

Los sensores basados en grafeno se presentan como una alternativa altamente viable, la funcionalización de este nanomaterial en sensores FET y sensores electroquímicos permite detectar con facilidad los antígenos especialmente con bajos límites de detección, en el orden de las 242 copias/mL (Seo *et al.*, 2020), pudiendo ser comparados con los límites de detección de las pruebas PCR, pero con tiempos de respuesta mucho más cortos. Los estudios se enmarcan en la detección de la proteína S y del RBD del SARS-COV-2, también se llevan a cabo ensayos para detectar anticuerpos y secuencias específicas de ARN, estos biosensores son altamente adaptables, y en caso de mutación únicamente se cambiaría la molécula a ser emparejada en la superficie detectora.

## Conclusiones

Los sensores investigados y reportados en este trabajo presentan tiempos de detección relativamente cortos en el orden de los minutos, con una sensibilidad comparada con las pruebas convencionales PCR. Además, los análisis realizados sugieren que existe la viabilidad para su implementación, pero por el momento en el ámbito del laboratorio; si la síntesis de estos nanomateriales y los sistemas que se usan para la construcción de este tipo de biosensores se abarataran en cuestión de costos, podría existir la posibilidad del escalamiento a nivel industrial, y podrían convertirse en una gran alternativa ante las pruebas tradicionales.

En conclusión, los procesos de detección que usan grafeno podrían ser aprovechados para detectar trazas de otros virus, teniendo en cuenta que se puede cambiar el biorreceptor para detectar proteínas de nuevos virus, manteniendo el diseño base y el rendimiento del sistema de detección. Estos prototipos pueden diseñarse para reconocer otros agentes virales, lo cual puede convertirse en gran ayuda si se producen situaciones similares o futuras pandemias.

El desafío actual es la reproducibilidad en gran escala del grafeno y su estabilización, además crear pruebas automatizadas que no requieran los tediosos procesos de tratamiento de muestras.

También se pretende reducir los requisitos técnicos, tiempo de respuesta, la viabilidad, menor riesgo de muestreo y preparación, para de esta manera lograr contener futuros brotes virales que produzcan emergencias sanitarias como las causadas por el SARS-COV-2, con una detección rápida y ensayos más económicos.

Con la funcionalización de este nanomaterial se esperan aplicaciones en varios campos, en especial, este estudio muestra que el grafeno puede ser utilizado para desarrollar dispositivos ultrasensibles de detección, aprovechando sus propiedades físico-químicas y electrónicas.

## Referencias

- Abbott. (2020). *Covid-19 Ag rapid test device*. <https://dam.abbott.com/en-gb/panbio/120007883-v1-Panbio-COVID-19-Ag-Nasal-AsymptomaticSe.pdf>
- Aceituno Bueno, R. (2018). *Funcionalización covalente y selectiva de grafeno en ultra alto vacío*. Universidad Autónoma de Madrid. [http://digital.csic.es/bitstream/10261/162931/1/tesis\\_RebecaAceitunoBueno.pdf](http://digital.csic.es/bitstream/10261/162931/1/tesis_RebecaAceitunoBueno.pdf)
- Ahmad, R., Wolfbeis, O. S., Hahn, Y. B., Alshareef, H. N., Torsi, L., Salama, K. N. (2018). Deposition of nanomaterials: a crucial step in biosensor fabrication. *Matter Today Commun*, (17), 289-321.
- Alafeef, M., Dighe, K., Moitra, P. y Pan, D. Rapid. (2020). Ultrasensitive and quantitative detection of SARS-cov-2 using antisense oligonucleotides directed electrochemical biosensor chip. *ACS Nano*, 14, 17028-45. <https://dx.doi.org/10.1021/acsnano.0c06392>
- Ali, M.A., Hu, C., Jahan, S., Yuan, B., Saleh, M.S., Ju, E. *et al.* (2020). Sensing of covid-19 antibodies in seconds via aerosol jet nanoprinted reduced graphene oxide Coated 3D Electrodes. *Adv Mater*, 33(7), 2006647. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adma.202006647>

- Arrieta-Almarío, Á. A., Tarazona-Cáceres, R. L. (2014). Sistema multipotenciostato basado en instrumentación virtual. *Ingeniería, Investigación y tecnología*, 15(3), 331-7. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-77432014000300001](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-77432014000300001)
- Bai, Y., Yao, L., Wei, T., Tian, F., Jin, D. Y., Chen, L. *et al.* (2020). Presumed asymptomatic carrier transmission of covid-19. *JAMA - J Am Med Assoc*, 323(14), 1406-7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32083643/>
- Bertrand, M.J., 1998. Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. Frank A. Settle (ed.). ISBN 0-13-177338-0. *J Am Chem Soc.*, 120(26), 6633-6633. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja975671k>
- Bio-Rad (2020). *Platelia SARS-COV-2 Total Ab*. [https://commerce.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/en/16008267\\_2020\\_04\\_EN.pdf](https://commerce.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/en/16008267_2020_04_EN.pdf)
- Chen, X., Liu, Y., Fang, X., Li, Z., Pu, H., Chang, J. *et al.* (2019). Ultratrace antibiotic sensing using aptamer/graphene-based field-effect transistors. *Biosens Bioelectron* (126), 664-71.
- Davis, C., Logan, N., Tyson, G., Orton, R., Harvey, W., Haughney, J. *et al.* (2021). Reduced neutralisation of the Delta (B.1.617.2) SARS-COV-2 variant of concern following vaccination. *medRxiv*; <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.06.23.21259327v1>
- De Eguilaz, M. R., Cumba, L. R. y Forster, R. J. (2020). Electrochemical detection of viruses and antibodies: A mini review. *Electrochem Commun*, (116), 106762. [/pmc/articles/PMC7247998/](https://pubs.rsc.org/en/article/c6em00017a)
- Diao, B., Wen, K., Chen, J., Liu, Y., Yuan, Z., Han, C. *et al.* (2020). Diagnosis of acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection by detection of nucleocapsid protein. *MedRxiv*. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.07.20032524v2>
- Díaz-Castrillón, F. y Toro-Montoya, A. (2020). SARS-cov-2/covid-19: el virus, la enfermedad y la pandemia. *Med Lab*, 24(3). <https://medicinaylaboratorio.com/index.php/myl/article/view/268/256>
- Dreyer, D. R., Park, S., Bielawski, W. y Ruoff, R. S. (2009). The chemistry of graphene oxide. *Chem Soc Rev*, 39(1), 228-40.
- El Universo. (2021). Varios países vuelven a la normalidad y tratan de dejar las mascarillas, pero siguen alertas para reinstaurar restricciones si es necesario. <https://www.eluniverso.com/noticias/internacional/variopaises-vuelven-a-la-normalidad-y-tratan-de-dejar-las-mascarillas-pero-siguen-alertas-para-reinstaurar-restricciones-si-es-necesario-nota/>
- Erba Mannheim. (2020). ERBALisa covid-19 IgG. The Netherlands. [https://erbalisacovid19.erbamannheim.com/getattachment/Home/text-content/uvod/ErbaLisa-COVID19\\_IgG\\_Intencion-de-Uso.pdf.aspx?lang=es-ES](https://erbalisacovid19.erbamannheim.com/getattachment/Home/text-content/uvod/ErbaLisa-COVID19_IgG_Intencion-de-Uso.pdf.aspx?lang=es-ES)
- Euroimmun. (2020). Anti-SARS-COV-2 Elisa (IgG). Lübeck. [https://www.coronavirus-diagnostics.com/documents/Indications/Infections/Coronavirus/EI\\_2606\\_D\\_UK\\_A.pdf](https://www.coronavirus-diagnostics.com/documents/Indications/Infections/Coronavirus/EI_2606_D_UK_A.pdf)
- Gallach Pérez, D. (2020). *Grafeno: concepto y aplicaciones*. UE Steam Essentials. Madrid: Universidad Europea. [https://projectbasedschool.universidadeuropea.es/escuela/escuela/steam\\_essentials](https://projectbasedschool.universidadeuropea.es/escuela/escuela/steam_essentials)
- Ghany, N. A. A., Elsherif, S. A., Handal, H. T. (2017). Revolution of graphene for different applications. *State-of-the-art*, 9(June), 93-106.
- Gong, H., Chen, F., Huang, Z., Gu, Y., Zhang, Q., Chen, Y. *et al.* (2019). Biomembrane-modified field effect transistors for sensitive and quantitative detection of biological toxins and pathogens. *ACS Nano*, 13(3), 3714-22. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b00911>
- Gong, J., Dong, H., Xia, Q., Huang, Z., Wang, D., Zhao, Y. *et al.* (2020). Correlation analysis between disease severity and inflammation-related parameters in patients with covid-19 pneumonia. *MedRxiv*. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.02.25.20025643v1>
- Green, K., Winter, A., Dickinson, R., Graziadio, S., Wolff, R., Mallett, S. *et al.* (2020). ¿Qué pruebas podrían usarse potencialmente para la detección, el diagnóstico y el seguimiento de covid-19 y cuáles son sus ventajas y desventajas? El centro de medicina basada en la evidencia. <https://www.cebm.net/covid-19/what-tests-could-potentially-be-used-for-the-screening-diagnosis-and-monitoring-of-covid-19-and-what-are-their-advantages-and-disadvantages/>
- Herradón, B. (2020). Graphene and covid-19: scientific and social aspects. *Boletín del Grupo Español del Carbono*, (57), 4-15. [http://www.gecarbon.org/boletines/articulos/BoletinGEC\\_057-art1.pdf](http://www.gecarbon.org/boletines/articulos/BoletinGEC_057-art1.pdf)
- Hinnemo, M., Zhao, J., Ahlberg, P., Hägglund, C., Djurberg, V., Scheicher, R. H. *et al.* (2017). On monolayer formation of pyrenebutyric acid on graphene. *Langmuir*, 33(15), 3588-93. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.langmuir.6b04237>
- IEEE/IEC. (2011). *Draft standard for large scale manufacturing of nanoelectronics*. IEC 62659 Ed1, pp. 1-13.
- Jacofsky, D., Jacofsky, E.M. y Jacofsky, M. (2020). Understanding antibody testing for covid-19. *J Arthroplasty*, 35(7), S74-81. <https://doi.org/10.1016/j.arth.2020.04.055>
- Ji, T., Liu, Z., Wang, G. Q., Guo, X., Akbar khan, S., Lai, C., *et al.* (2020). Detection of covid-19: a review of the current literature and future perspectives. *Biosens Bioelectron*, (166), 112455. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112455.
- Johns, J. E. y Hersam, M. C. (2013). Atomic covalent functionalization of graphene. *Acc Chem Res*, 46(1), 86. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3546170/>
- Kantor, I. N., Lüthy, I. A. y Ritacco, V. (2021). Las

- variantes de SARS-CoV-2 y la llamada resistencia a las vacunas. *Medicina*, 81(3). (B. Aires) <https://www.reactgroup.org/toolbox/>
- Ke, G., Su, D., Li, Y., Zhao, Y., Wang, H., Liu, W. *et al.* (2020). An accurate, high-speed, portable bifunctional electrical detector for covid-19. *Sci China Mater*, 64(3), 739-47. <https://doi.org/10.1007/s40843-020-1577-y>
- Kuo, C.J, Chiang, H. C, Tseng, C. A., Chang, C. F., Ulaganathan, R. K., Ling, T. T. *et al.* (2018). Lipid-modified graphene-transistor biosensor for monitoring amyloid- $\beta$  aggregation. *ACS Appl Mater Interfaces*, 10(15), 12311-6. <https://doi.org/10.1021/acsaami.8b01917>
- Kwong Hong Tsang, D., Lieberthal, T. J., Watts, C., Dunlop, I. E., Ramadan, S., del Rio Hernández, A. E. *et al.* (2019). Chemically functionalised graphene FET biosensor for the label-free sensing of exosomes. *Sci Rep*, 9(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50412-9>
- Li, Z., Yi, Y., Luo, X., Xiong, N., Liu, Y., Li, S. *et al.* (2020). Development and clinical application of a rapid IgM IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *J Med Virol*, 92(9), 1518-24. DOI: 10.1002/jmv.25727
- Ling Ling, T., Ahmad, M., Yook Heng, L., Chee Seng, T. (2011). The effect of multilayer gold nanoparticles on the electrochemical response of ammonium ion biosensor based on alanine dehydrogenase enzyme. *J Sensors*. <https://www.hindawi.com/journals/js/2011/754171/>
- Liu, E. Y., Jung, S., Weitz, D. A., Yi, H., Choi, C. H. (2018). High-throughput double emulsion-based microfluidic production of hydrogel microspheres with tunable chemical functionalities toward biomolecular conjugation. *Lab Chip*, 18(2), 323-34. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29242870/>
- Liu, J., Chen, X., Wang, Q., Xiao, M., Zhong, D., Sun, W. *et al.* (2019). Ultrasensitive monolayer MoS<sub>2</sub> field-effect transistor based DNA sensors for screening of down syndrome. *Nano Lett*, 19(3), 1437-44. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.nanolett.8b03818>
- Lizarazo Salcedo, C., González Jiménez, E., Arias Portela, C., Guarguati Ariza, J. (2018). Nanomateriales: un acercamiento a lo básico. *Med Segur Trab (Madr)*, 64(251), 109-18. [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0465-546X2018000200109](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0465-546X2018000200109)
- Lu, C. H., Yang, H. H., Zhu, C. L., Chen, X. y Chen, G. N. (2009). A graphene platform for sensing biomolecules. *Angew Chemie-Int Ed*, 48(26), 4785-7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19475600/>
- Luminex Corporation (2020). NxTAG<sup>®</sup> CoV Extended Panel. <https://www.luminexcorp.com/nxtag-cov-extended-panel/>
- Maio, F. De, Palmieri, V., Babini, G., Augello, A., Palucci, I., Perini, G. *et al.* (2020). Graphene nanoplatelet and graphene oxide functionalization of face mask materials inhibits infectivity of trapped SARS-CoV-2. *Medrxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.09.16.20194316>
- Mao, S. (2018). Graphene field-effect transistor sensors. *Graphene Bioelectronics*. Elsevier Inc., 113-132. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128133491000056>
- Menarini Diagnostics. (2020). VITAPCR<sup>™</sup> plataforma, características. <https://www.menarinidiagnostics.com/en-us/Home/Laboratory-products/COVID-19/Viral-RNA-Detection/VitaPCRTM-platform/Features>
- Mico BioMed. (2021). Veri-Q PCR 316 coronavirus disease 2019 (covid-19) Detection kit nCoV-QS. Instructions for use. [https://extranet.who.int/pqweb/sites/default/files/documents/eul\\_0495\\_188\\_00\\_nCoV-QS\\_EN\\_IFU\\_v4.pdf](https://extranet.who.int/pqweb/sites/default/files/documents/eul_0495_188_00_nCoV-QS_EN_IFU_v4.pdf)
- Moitra, P., Alafeef, M., Dighe, K., Frieman, M. B. y Pan, D. (2020). Selective naked-eye detection of SARS-CoV-2 mediated by n gene targeted antisense oligonucleotide capped plasmonic nanoparticles. *ACS Nano*, 14(6), 7617-27. <https://dx.doi.org/10.1021/acsnano.0c03822>
- Mojsoska, B., Larsen, S., Olsen, D. A., Madsen, J.S., Brandslund, I. y Alatraktchi, F. A., (2021). Rapid SARS-CoV-2 detection using electrochemical immunosensor. *Sensors*, 21(2), 390. <https://www.mdpi.com/1424-8220/21/2/390>
- Novoselov, K. S., Geim, A. K., Morozov, S. V., Jiang, D., Zhang, Y., Dubonos, S. V. *et al.* (2004). Electric field effect in atomically thin carbon films. *Sci*, 306(5696), 666-9. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15499015/>
- Ochoa Azze, R. (2012). *Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos* (1.<sup>a</sup> ed.) V. Betancourt (ed.). Finlay. [https://www.paho.org/cub/index.php?option=com\\_docman&view=download&alias=742-pubfinlay-librotecinmunoparaclinvacunas2012&Itemid=226](https://www.paho.org/cub/index.php?option=com_docman&view=download&alias=742-pubfinlay-librotecinmunoparaclinvacunas2012&Itemid=226)
- Pérez Abreu, M., Gómez Tejada, J. y Dieguez Guach, R. (2020). Características clínico-epidemiológicas de la covid-19. *Rev Habanera Ciencias Médicas*, 19(2). <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/3254/2562>
- Phelan, B. (2021). Semiconductor cleanroom-design requirements. *Advancete*. <https://www.advancetecllc.com/post/semiconductor-cleanroom-design-requirements>
- Priyadarsini, S., Mohanty, S., Mukherjee, S., Basu, S. y Mishra, M. (2018). Graphene and graphene oxide as nanomaterials for medicine and biology application. *J Nanostructure Chem*, 8, 123-137.
- Public Health England. (2020). *Evaluation of the*

- euroimmun anti-SARS-CoV-2 Elisa (IgG) serology assay for the detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies*. [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/893433/Evaluation\\_of\\_Euroimmun\\_SARS\\_CoV\\_2\\_ELISA\\_IgG\\_1\\_.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/893433/Evaluation_of_Euroimmun_SARS_CoV_2_ELISA_IgG_1_.pdf)
- Qiagen. (2020). QIAstat-Dx Respiratory SARS-CoV-2 Panel. <https://www.qiagen.com/us/products/diagnostics-and-clinical-research/infectious-disease/qiastat-dx-syndromic-testing/qiastat-dx-eua-us/>
- Qiu, G., Gai, Z., Tao, Y., Schmitt, J., Kullak-Ublick, G. A. y Wang, J. (2020). Dual-functional plasmonic photothermal biosensors for highly accurate severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 detection. *ACS Nano*, 14(5), 5268-77. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsnano.0c02439>
- Quidel. (2021). *Sofia Antígeno del SARS FIA*. <https://www.quidel.com/immunoassays/rapid-sars-tests/sofia-sars-antigen-fia>
- Rafer. (2020). *Cellex qSARS-CoV-2 IgG/IgM cassette rapid test*. [https://www.rafer.es/sites/default/files/cellex\\_qsars-cov-2\\_iggigm.pdf](https://www.rafer.es/sites/default/files/cellex_qsars-cov-2_iggigm.pdf)
- Roche. (2020). *Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 Inmunoensayo para la detección cualitativa de anticuerpos (incl. IgG) contra el SARS-CoV-2*. <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/params/elecsys-anti-sars-cov-2.html>
- Roche. (2020). *SARS-CoV-2 Rapid antigen test roche diagnostic*.
- SD Biosensor (2021). *Standar Q covid-19 Ag*. [http://www.sdbiosensor.com/product/product\\_view?product\\_no=241](http://www.sdbiosensor.com/product/product_view?product_no=241)
- Seo, G., Lee, G., Kim, M. J., Baek, S-H., Choi, M., Ku, B. *et al.* (2020). Rapid detection of covid-19 causative virus (SARS-CoV-2) in human nasopharyngeal swab specimens using field-effect transistor-based biosensor. *ACS Nano*, 14, 5142. <https://dx.doi.org/10.1021/acsnano.0c02823>
- Sethuraman, N., Jeremiah, S. S. y Ryo, A. (2020). Interpreting diagnostic tests for SARS-CoV-2. *JAMA. J Am Med Assoc*, 323(22), 2249-51. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32374370/>
- Sharpless, N. (2021). *Los anticuerpos contra el coronavirus evitan la reinfección*. Instituto Nacional del Cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol/noticias/temas-y-relatos-blog/2021/anticuerpos-coronavirus-protegen-contra-futuras-infecciones>
- Smith, A.T., LaChance, A., Zeng, S., Liu, B. y Sun, L. (2019). Synthesis, properties, and applications of graphene oxide / reduced graphene oxide and their nanocomposites. *Nano Mater Sci*, 1(1), 31-47. <https://doi.org/10.1016/j.nanoms.2019.02.004>
- Tene, T., Tubon Usca, G., Guevara, M., Molina, R., Veltri, F., Arias, M., ...y Vacacela Gómez, C. (2020). Toward large-scale production of oxidized graphene. *Nanomaterials*, 10(2), 279. <https://www.mdpi.com/634944>
- Tolosa, A. (2020). Coronavirus SARS-CoV-2: estructura, mecanismo de infección y células afectadas. *Genética Médica News*. [https://genotipia.com/genetica\\_medica\\_news/coronavirus-estructura-infeccion-celulas/](https://genotipia.com/genetica_medica_news/coronavirus-estructura-infeccion-celulas/)
- Torrente Rodríguez, R., Heather, L., Tu, J., Min, J., Yang, Y., Xu, C. *et al.* (2020). SARS-CoV-2 RapidPlex: a graphene-based multiplexed telemedicine platform for rapid and low-cost covid-19, diagnosis and monitoring. *Matter*, 3, 1981-98. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590238520305531>
- Valencia Giraldo, A. (2011). El grafeno. *Rev Colomb Mater* (1), pp. 24. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/materiales/article/view/9172>
- Vikesland, P. J. (2018). Nanosensors for water quality monitoring. *Nat Nanotechnol*, 13(8), 651-60. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30082808/>
- World Health Organization. (2021). *Weekly operational update on covid-19*. World Health Organization. <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-operational-update-on-covid-19---16-august-2021>
- Wu, G., Tang, X., Meyyappan, M. y Lai, K. W. C. (2015). *Chemical functionalization of graphene with aromatic molecule*. *IEEE-NANO - 15th International Conference on Nanotechnology*. Roma: Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc, 2015. p. 1324-7.
- Young, S.L., Kellon, J. E. y Hutchison, J. E. (2016). Small gold nanoparticles interfaced to electrodes through molecular linkers: a platform to enhance electron transfer and increase electrochemically active surface area. *J Am Chem Soc*. 138(42), 13975-84. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jacs.6b07674>
- Yüce, M., Filiztekin, E. y Özkaya, K.G. (2021). Covid-19 diagnosis: a review of current methods. *Biosens Bioelectron*, p. 172. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33126180/>
- Zhang, X., Qi, Q., Jing, Q., Ao, S., Zhang, Z., Ding, M. *et al.* (2020). Electrical probing of covid-19 spike protein receptor binding domain via a graphene field-effect transistor. <https://arxiv.org/abs/2003.12529>
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J. *et al.* (2019). A novel coronavirus from patients with pneumonia in China. *N Engl J Med.*, 382(8), 727-33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>