

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 848 798**

21 Número de solicitud: 202030111

51 Int. Cl.:

C01B 32/182 (2007.01)

C01B 32/194 (2007.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

11.02.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

11.08.2021

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

30.09.2021

Fecha de concesión:

21.12.2021

45 Fecha de publicación de la concesión:

29.12.2021

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD REY JUAN CARLOS (100.0%)
C/ Tulipán s/n
28933 Móstoles (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**ÁLVAREZ CASTILLO, Ángel Luis;
QUESADA SÁNCHEZ, Sergio Javier;
BORRÁS RODRIGO, Fernando y
COYA PÁRRAGA, Carmen**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

54 Título: **FUNCIONALIZACIÓN COVALENTE DE GRAFENO**

57 Resumen:

Funcionalización covalente de grafeno.

Se describe un procedimiento de obtención de grafeno modificado covalentemente. Asimismo, se describe el grafeno modificado covalentemente obtenible mediante dicho proceso de obtención, así como a su uso como superficie de anclaje de bio-receptores en dispositivos biosensores. Finalmente, se describe un dispositivo biosensor que comprende el grafeno modificado covalentemente obtenible de acuerdo con el procedimiento de la invención.

ES 2 848 798 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN**FUNCIONALIZACION COVALENTE DE GRAFENO****CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION**

La presente invención describe un procedimiento de obtención de grafeno modificado covalentemente. Asimismo, la presente invención se refiere al grafeno modificado covalentemente obtenible mediante dicho proceso de obtención, así como a su uso como superficie de anclaje de bio-receptores en dispositivos biosensores. Finalmente, la presente invención se refiere a un dispositivo biosensor que comprende el grafeno modificado covalentemente obtenible de acuerdo con el procedimiento de la invención.

ESTADO DE LA TÉCNICA

10 Actualmente, el grafeno se ha funcionalizado, tanto covalente, como no-covalentemente, (Plutnar et al, J. Mater. Chem. C., 2018, 6, 6082-6101) con una variedad de moléculas, hasta llegar incluso al anclaje de anticuerpos, pero en la mayor parte de las ocasiones se ha tratado de reacciones en fase líquida (en disolución), donde el grafeno usado es en forma de escamas en suspensión o formando parte de algún electrodo sumergido. Esto ha dado lugar, en los últimos 5 años, a un gran número de publicaciones (Georgakilas et al., Chem. Rev. 2016, 116, 5464-5519). También existen publicaciones en las que dicha funcionalización del grafeno se lleva a cabo fuera de una cubeta de disolución, en fase sólida sobre capas previamente depositadas de grafeno, u óxido de grafeno. Sin embargo, dichos métodos no permiten un control posicional de las modificaciones realizadas en la superficie del grafeno, o del óxido de grafeno, sin diferenciar regiones o zonas separadas dentro de dichas capas (Morales-Narvaez et al., Adv. Mater., 2018, 1805043; Sandoval et al., Chem. Commun., 2019, 55, 12196-12199). La técnica de litografía de oxidación, conocida como oxidación anódica local (LAO, por sus siglas en inglés, Local Anodic Oxidation), o litografía de oxidación mediante sonda de barrido (o-SPL), sí permite control posicional. No obstante, esta técnica hasta el momento se ha aplicado (1) sólo a escala nanométrica mediante la adaptación de microscopios que trabajan a esta escala, quedando limitada a áreas muy pequeñas y poco prácticas, del orden de nm (litografía de oxidación, R. García et al., Carbon 2018, 129, 281 – 285; Alvarez et al., 2017, Spanish Conference on Electron Devices (CDE), pág. 1-4, doi:10.1109/CDE.2017.7905231); y (2) sólo con propósito de oxidación, no ampliada a otro tipo de funcionalizaciones o reacciones químicas.

Muy recientemente, se ha publicado una manera de funcionalizar el grafeno en áreas diferenciadas, mediante un proceso con irradiación con luz (Valenta et al., Agew. Chem. Int.

Ed, 2019, 58, 1324-1328). En dicho método se favorece la reacción solamente en aquellas zonas en las que se usa una máscara, pudiéndose ubicar la región modificada en diversas posiciones de la superficie de la muestra. Sin embargo, este proceso está muy limitado a ciertas reacciones específicas susceptibles de llevarse a cabo mediante irradiación con luz en la región azul o UV, tales como las conocidas como reacciones de Mitsunobu.

Por otro lado, WO 2018098286 A1 describe sensores de biomoléculas, que hacen uso de superficies de grafeno (y grafeno defectuoso). Sin embargo, la unión de las moléculas sensoras (en este caso enzimas polimerasas) al grafeno, tal como se describe en dicho documento requiere para el control posicional, el uso, en el sensor, de máscaras, y solamente describe la modificación del grafeno, previa a su uso en el sensor, sin ningún control posicional (dispersión de nanopartículas, o grabado químico) o con la utilización de máscaras para poder efectuar dicho control.

WO 2018013586 A1 no describe la unión covalente de moléculas sensoras al grafeno, sino que utiliza una capa de funcionalización depositada sobre la capa de grafeno que es la que se une de manera covalente a las moléculas o grupos funcionales que se unen a las biomoléculas de interés objeto del sensor. Sin embargo, el grafeno descrito en dicho documento no se encuentra funcionalizado covalentemente.

US2019/0079068 A1 y WO2016054550 describen dispositivos sensores que pueden utilizar como elemento sensor un material conductor de carbono, tal como nanotubos de carbono, fullerenos o grafeno. Además, dichos documentos describen el uso de grafeno funcionalizado con proteínas o anticuerpos, en donde dicho grafeno se encuentra unido a las proteínas o anticuerpos directamente o mediante un enlazador, e indica que dicha unión puede ser covalente. Sin embargo, en ningún caso dicho documento divulga cómo se efectúa dicha funcionalización, ni si existe, o cómo llevar a cabo, un control posicional de ésta.

La funcionalización que reúna las características de control posicional y versatilidad en cuanto a la naturaleza del reactivo empleado en un material como el grafeno permitiría proporcionar un sustrato físico en el cual anclar diferentes moléculas o grupos funcionales que, por ejemplo pueden ser biomarcadores o bio-receptores (tales como anticuerpos), en una única plataforma miniaturizada, haciendo dichos ensayos mucho más compactos en tamaño, y proporcionando un sistema que permite la detección de analitos en un espacio reducido, compatible para desarrollar sistemas lab-on-chip, es decir, sistemas que integran y automatizan varias técnicas de laboratorio en un dispositivo del tamaño de un chip con un tamaño máximo de unos cuantos centímetros cuadrados.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de grafeno modificado covalentemente, que comprende:

- 5 i. aplicar un voltaje de al menos 10 voltios generando un campo eléctrico en una zona de la superficie de grafeno en presencia de un disolvente y una sustancia que, en dicho disolvente, o en dicho disolvente y en presencia del campo eléctrico generado por dicho voltaje, da lugar a uno o más iones y/o a uno o más radicales;
- 10 ii. lavar el grafeno y/u, opcionalmente, repetir el paso anterior sucesivamente en otra zona de la superficie de grafeno a modificar, diferente a la zona, o zonas en la(s) que ya se ha realizado el paso anterior, en presencia del mismo disolvente o de otro disolvente diferente y, con la misma sustancia, u otra sustancia diferente que, en el disolvente utilizado, o en el disolvente utilizado y en presencia del campo eléctrico generado por dicho voltaje, también da lugar a uno o más iones y/o a uno o más radicales.

15 La presente invención también se refiere a un procedimiento de obtención de grafeno modificado covalentemente, que comprende:

- 20 i. aplicar un voltaje eléctrico de al menos 10 voltios generando un campo eléctrico en una zona de la superficie de grafeno en presencia de agua y una sustancia que, en agua, o en agua y en presencia del campo eléctrico generado por dicho voltaje, da lugar a uno o más iones y/o a uno o más radicales;
- 25 ii. lavar el grafeno y/u, opcionalmente, repetir el paso anterior sucesivamente en otra zona de la superficie de grafeno a modificar, diferente a la zona, o zonas en la(s) que ya se ha realizado el paso anterior, con la misma u otra sustancia diferente que, en agua, o en agua y en presencia del campo eléctrico generado por dicho voltaje, da lugar a uno o más iones y/o a uno o más radicales.

25 Asimismo, la presente invención se refiere al grafeno modificado covalentemente, obtenible de acuerdo con el procedimiento de la presente invención.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del grafeno modificado covalentemente, obtenible de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, en un dispositivo detector de analitos.

Finalmente, la presente invención se refiere a un dispositivo detector de analitos que comprende grafeno modificado covalentemente, obtenible de acuerdo con el procedimiento de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 5 **FIG. 1.** Comparativa de humedad relativa frente al radio normalizado de la zona de la superficie de grafeno modificada covalentemente con NaCl, NaHCO₃, NaI y 2-clorofenol (todos a 40 mM) frente a un control con agua destilada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

10 La presente invención describe un procedimiento de obtención de grafeno modificado covalentemente, que comprende: (i) aplicar un voltaje eléctrico de al menos 10 voltios para generar un campo eléctrico en una zona de la superficie de grafeno en presencia de un disolvente y una sustancia que, en dicho disolvente, o en dicho disolvente y en presencia del campo eléctrico generado por dicho voltaje, da lugar a uno o más iones y/o a uno o más radicales.

15 En una realización preferente de la invención, una vez realizado el paso (i), se repite dicho paso (i), sucesivamente, en otra zona de la superficie de grafeno a modificar, diferente a la zona, o zonas en la(s) que ya se ha realizado, en presencia del mismo disolvente o de otro disolvente diferente y, con la misma sustancia, u otra sustancia diferente que, en el disolvente utilizado, o en el disolvente utilizado y en presencia del campo eléctrico generado por dicho
20 voltaje, da lugar a uno o más iones y/o a uno o más radicales.

En una realización, el procedimiento de obtención comprende:

- i. aplicar un voltaje eléctrico de al menos 10 voltios para generar un campo eléctrico en una zona de la superficie de grafeno en presencia de un disolvente y una sustancia que, en dicho disolvente, o en dicho disolvente y en presencia del campo eléctrico generado por
25 dicho voltaje, da lugar a uno o más iones y/o uno o más radicales; y
- ii. lavar el grafeno.

En una realización de la invención, una vez realizado el paso (ii), se repite el pasos (i) y, opcionalmente, el paso (ii), sucesivamente, en otra zona de la superficie de grafeno a modificar, diferente a la zona, o zonas en la(s) que ya se ha realizado, en presencia del mismo
30 disolvente o de otro disolvente diferente y, con la misma sustancia u otra sustancia diferente

que, en el disolvente utilizado, o en el disolvente utilizado y en presencia del campo eléctrico generado por dicho voltaje, da lugar a uno o más iones y/o uno o más radicales.

Así, el procedimiento de la presente invención comprende:

- 5 i. aplicar un voltaje de al menos 10 voltios generando un campo eléctrico en una zona de la superficie de grafeno en presencia de un disolvente y una sustancia que, en dicho disolvente, o en dicho disolvente y en presencia del campo eléctrico generado por dicho voltaje, da lugar a uno o más iones y/o a uno o más radicales;
- 10 ii. lavar el grafeno y/u, opcionalmente, repetir el paso anterior sucesivamente en otra zona de la superficie de grafeno a modificar, diferente a la zona, o zonas en la(s) que ya se ha realizado el paso anterior, en presencia del mismo disolvente o de otro disolvente diferente y, con la misma sustancia, u otra sustancia diferente que, en el disolvente utilizado, o en el disolvente utilizado y en presencia del campo eléctrico generado por dicho voltaje, también da lugar a uno o más iones y/o a uno o más radicales.

Por tanto, el procedimiento de la invención comprende la modificación covalente en una zona del grafeno, de acuerdo con el paso (i), y en el que dicho paso (i) puede ser repetido, comprendiendo, entre cada paso (i), un paso (ii) en el cual se lava el grafeno, previamente a llevar a cabo el paso (i) otra vez, o no.

Es decir, el procedimiento de la invención comprende un paso (i), opcionalmente un paso (ii), en donde el paso (i), y opcionalmente el paso (ii), se repite sucesivamente en varias zonas de la superficie del grafeno, en presencia del mismo disolvente o de diferentes disolventes, y de la misma sustancia o de una sustancia diferente, cada vez que se lleva a cabo el paso (i).

A efectos de la presente invención, el término “comprende” indica que incluye un grupo de características, pero no excluye la presencia de otras características, siempre y cuando la presencia de las otras características no haga la invención impracticable. Además, los términos “consta de”, “contiene”, “incluye”, “tiene”, “abarca” y sinónimos de dichos términos, deben ser interpretados de la misma manera que el término “comprende”.

Adicionalmente, a efectos de la presente invención, el término “comprende” puede ser reemplazado por cualquiera de los términos “consiste de”, “consiste en”, “consisten sustancialmente de” o “consisten sustancialmente en”. Así, cuando el término “comprende” se refiere a un grupo de características técnicas A, B y C, debe interpretarse que puede incluir adicionalmente otras características técnicas además de las características técnicas A, B y C,

siempre y cuando la presencia de las otras características no haga la invención impracticable, pero también puede interpretarse como que solamente comprende dichas características A, B y C o, sustancialmente dichas características A, B y C y, por tanto, el término “comprende” referido a un grupo que comprende las características A, B y C debe interpretarse que incluye un grupo que consiste de las características A, B y C, o que consiste sustancialmente de las características A, B y C.

El término “disolvente” se refiere a un compuesto químico que, al ser mezclado con otro compuesto o sustancia, forma una mezcla homogénea, constituyendo una sola fase, es decir, forma una mezcla en la cual las propiedades físicas se mantienen homogéneas, entendiéndose por parte “homogénea” aquella a través de la cual todas las propiedades intensivas (las que no dependen de la cantidad de sustancia) son constantes. De manera general la cantidad de disolvente en la mezcla es mayor que la de la otra sustancia que, de manera general se denomina soluto.

El término “sustancia que, en un disolvente, o en un disolvente y en presencia de un campo eléctrico, da lugar a uno o más iones y/o a uno o más radicales” se refiere a una sustancia que, en contacto con dicho disolvente y, opcionalmente en presencia de un campo eléctrico (generado por la aplicación de un voltaje), genera al menos un ion y/o al menos un radical. Dicho término comprende así, tanto sustancias iónicas (es decir, sustancias que comprenden enlaces iónicos) que, al estar disueltas en dicho disolvente liberan los cationes y aniones que la conforman y, también comprende sustancias con enlaces covalentes que, al estar en contacto con dicho disolvente, o al estar en contacto con dicho disolvente y en presencia de un campo eléctrico, generan la formación de al menos un ion y/o la formación de al menos un radical. Es decir, en algunos casos, la sustancia utilizada da lugar a iones o radicales simplemente al estar disuelta en el disolvente utilizado, mientras que en otros casos será necesaria la presencia de un campo eléctrico para que dicha sustancia disuelta en dicho disolvente de lugar a iones o a radicales.

Así, el disolvente, opcionalmente con el efecto del campo eléctrico generado al aplicar un voltaje, produce la formación de iones (por ejemplo, la generación de un anión Cl^- y del catión Na^+ , cuando la sal NaCl se encuentra en presencia de agua como disolvente o, por ejemplo, la formación del catión amonio R-NH_3^+ de una amina R-NH_2 , mediante la unión de un protón H^+ a dicha amina en presencia de agua), o de radicales, cuando se produce una ruptura de un enlace que genera especies con electrones desapareados.

A efectos de la presente invención, el término “radical” se refiere a aquella especie química que posee uno o más electrones desapareados. Ejemplos de radicales, a efectos de la presente invención, incluyen, pero no se limitan a: radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), diradical oxígeno ($O_2^{\cdot\cdot}$), radical hidroxilo ($HO\cdot$), radical alcoxilo ($RO\cdot$), radical aroxilo ($ArO\cdot$), radical peroxilo ($ROO\cdot$), radical aminoxilo ($R-N-O\cdot$) de entre los cuales se puede citar el reactivo TEMPO (tetrametilpiridil-N-oxil) y sus derivados, radical monóxido de nitrógeno ($NO\cdot$), radical dióxido de nitrógeno ($NO_2\cdot$), catión nitrosonio ($NO_2^{\cdot+}$), radical nitreno ($R-N^{\cdot\cdot}$), radical halógeno ($X\cdot$), radical alquilo ($R\cdot$), radical arilo ($Ar\cdot$), radical carbeno ($R^{\cdot\cdot}$), etc.; en donde R es un grupo alquilo o H, X es un átomo de halógeno y Ar es un grupo arilo.

10 Por otro lado, a efectos de la presente invención, el término “ion” se refiere a un átomo o grupo de átomos cargados eléctricamente.

El procedimiento de la invención se lleva a cabo en presencia de un campo eléctrico generado mediante la aplicación de un voltaje. En algunos casos, dicho campo eléctrico es, además, necesario para la formación de iones y/o radicales de la sustancia utilizada (por ejemplo, para la formación de carbocationes, u otro tipo de iones o radicales que requieren una mayor energía para su formación en presencia de dicho disolvente).

La modificación covalente del grafeno ocurre, como resultado del procedimiento de la invención, mediante la formación de enlaces nuevos entre uno o más átomos de carbono de grafeno y uno de los átomos del ion, o del radical, generado por dicha sustancia, formando grupos funcionales unidos covalentemente a átomos de carbono del grafeno, en donde el enlace covalente se produce entre uno de los átomos de carbono del grafeno y un átomo del ion, o del radical de la sustancia utilizada.

En una realización más preferente, el voltaje eléctrico del paso (ii) es aplicado por un electrodo en punta conectado a uno de los polos de un generador de voltaje eléctrico. A efectos de la presente invención el término “generador de voltaje eléctrico” es equivalente a una fuente de tensión. Es decir, el voltaje “se aplica” externamente mediante un generador de tensión (o fuente de tensión, o fuente de voltaje), entre dos polos o electrodos, generando un campo eléctrico cuyas líneas de fuerza van de un polo a otro. Cuando uno de los electrodos acaba en punta, se concentra en dicha punta el campo eléctrico generado.

A efectos de la presente invención, se denomina electrodo en “punta” a un electrodo cuyo extremo tiene un diámetro menor de 30 micras. Así, preferentemente, el campo eléctrico se genera en una zona de la superficie del grafeno a modificar de un diámetro menor a 30 micras.

5 En una realización aún más preferente, el campo eléctrico es aplicado mediante un dispositivo que comprende: un electrodo en punta conectado a un primer polo de un generador de tensión eléctrica, mientras que un segundo polo de dicho generador se encuentra conectado al grafeno; un cabezal configurado para sujetar el electrodo en punta; un separador dieléctrico que aloja dicho cabezal y que está configurado para aislar eléctricamente el electrodo del resto del dispositivo; un posicionador que está sujeto al separador eléctrico y que está
10 configurado para mover el cabezal en las tres dimensiones del espacio; y un sistema de amortiguación configurado para permitir movimiento vertical del cabezal con una presión predeterminada y para amortiguar los desplazamientos consecuencia de las irregularidades de la superficie por la cual se mueve el cabezal; en el que en el paso (ii) el campo eléctrico es generado con el electrodo en punta de dicho dispositivo; y un contenedor con disolvente
15 configurado para generar una dispersión de dicho disolvente. En particular dicho dispositivo se denomina dispositivo de litografía de funcionalización.

En una realización de la invención el campo eléctrico se genera mediante un electrodo, en particular un electrodo en punta, con potencial eléctrico negativo respecto al grafeno.

20 En otra realización de la invención, el campo eléctrico se genera mediante un electrodo, en particular un electrodo en punta, con potencial eléctrico positivo respecto al grafeno.

Por ejemplo, puede explicarse de manera teórica que, cuando el campo eléctrico es generado por un electrodo con potencial negativo respecto al grafeno (cátodo), el grafeno actúa como electrodo positivo (ánodo) y atrae las cargas negativas de las especies generadas por el campo eléctrico y se une a un átomo de dicha especie rica en carga negativa, mediante una
25 reacción de adición nucleófila. Por otro lado, también a modo de ejemplo, cuando el campo eléctrico es generado por un electrodo con potencial positivo respecto al grafeno, la nube de electrones π del grafeno atrae a las cargas positivas de las especies generadas y se une a un átomo de dicha especie rica en carga positiva mediante una reacción de adición electrófila.

30 El grafeno es una capa única y bidimensional, de átomos de carbono unidos formando hexágonos mediante enlaces carbono-carbono que presentan hibridación sp^2 y formando una nube π de electrones. Debido a su estructura el grafeno, se comporta como un semi-metal con una movilidad de carga muy elevada y presenta unas propiedades únicas, entre las cuales

destacan dureza, elasticidad, gran conductividad con una resistencia muy reducida pero una estructura química, en principio, muy estable (o poco reactiva) frente a gases. Esto hace que el grafeno sea un material muy interesante en muchas aplicaciones técnicas. A efectos de la presente invención, en el caso de que el grafeno a modificar covalentemente en el procedimiento de la invención conste de más de una monocapa de grafeno, el término “una superficie de grafeno” se refiere a cualquiera de las monocapas de grafeno. Aunque el grafeno, es un material bidimensional, en algunos casos, el material utilizado comprende más de una capa de grafeno. Así, a efectos de la presente invención, cuando el grafeno está formado por más de una capa, la modificación covalente puede ocurrir en cualquiera de las capas de grafeno. La formación de un enlace covalente entre un átomo de carbono y un grupo funcional supone el paso a una hibridación sp^3 del átomo de carbono reaccionante. Esto origina materiales con propiedades y reactividad diferente a la del grafeno inicial.

En una realización la modificación covalente es una modificación monotópica (es decir, que ocurre solamente en una de las dos caras de la superficie de grafeno. En otra realización, la modificación covalente es una modificación ditópica (es decir que ocurre en cualquiera de las dos caras de la superficie de grafeno).

A efectos de la presente invención, el disolvente que comprende la sustancia que, en dicho disolvente, o en dicho disolvente y en presencia de un campo eléctrico, da lugar a uno o más iones y/o a uno o más radicales, se encuentra en contacto con la superficie de grafeno en forma de “atomización” o “vaporización” o “dispersión”, sin que sea requerida la utilización de una fuente de calor, de tal manera que se genera una atmósfera con dicho disolvente y sustancia en contacto con la superficie de grafeno. De esta manera, los términos “atomización”, “vaporización” o “dispersión” se utilizan de manera intercambiable, a efectos de la presente invención, e indican la generación de una fase homogénea, en cuanto a sus propiedades físicas, que contiene dicho disolvente y dicha sustancia, sin que sea necesaria la utilización de una fuente de calor.

Así, el proceso de la invención permite un control posicional del anclaje covalente de grupos funcionales y, dado que es un procedimiento de carácter eléctrico, basado en la aplicación de un voltaje eléctrico localizado, permite trabajar con gran variedad de sustancias que generen iones o radicales al estar en contacto con dicho disolvente, o que generan dichos iones o radicales cuando, además, se las somete a un campo eléctrico.

A efectos de la presente invención el término “grupo funcional” se refiere a un átomo o conjunto de átomos que, unidos a la estructura molecular de un compuesto de mayor número

de átomos, y dispuestos según una secuencia de enlaces determinada, presentan unas propiedades químicas individualizadas y características. Por tanto, en la presente invención dicho grupo funcional se refiere a un átomo o conjunto de átomos de un ion o radical de una sustancia que, en un disolvente, o en un disolvente y en presencia de un campo eléctrico, da lugar a uno o más iones y/o a uno o más radicales, y que, durante el procedimiento de la presente invención, forma un enlace covalente con un átomo de carbono del grafeno.

En una realización preferente del procedimiento de acuerdo la presente invención, el campo eléctrico se aplica en una zona circular de la superficie del grafeno de diámetro menor a 15 micras.

10 En una realización preferente el voltaje eléctrico se aplica a una distancia de la superficie de grafeno menor a 10 nm, más preferentemente a una distancia menor 7 nm. En una realización aún más preferente el voltaje eléctrico se aplica entre un electrodo en punta y el grafeno, manteniendo dicho electrodo en contacto con la superficie del grafeno.

15 En una realización del procedimiento de acuerdo con la presente invención, el voltaje eléctrico aplicado en la zona de la superficie de grafeno a modificar es de entre 10 y 100 voltios; más preferentemente de entre 20 y 60 voltios.

Por tanto, una realización preferente de la invención comprende (i) aplicar un voltaje eléctrico a una distancia menor de 10 nm, más preferentemente a menos de 7 nm, y aún más preferentemente entre un electrodo en punta y el grafeno, manteniendo dicho electrodo en contacto con una zona de la superficie de grafeno, en el que dicho voltaje es de entre 10 y 100 voltios, más preferentemente entre 20 y 60 voltios, para generar un campo eléctrico en dicha zona de la superficie de grafeno en presencia de un disolvente y una sustancia que, en dicho disolvente, o en dicho disolvente y en presencia del campo eléctrico generado por dicho voltaje, da lugar a uno o más iones y/o uno o más radicales;

25 En una realización preferente el voltaje eléctrico se aplica durante un período de al menos 1 milisegundo (1 ms). En una realización más preferente el voltaje eléctrico se aplica, en general, durante un período de entre 1 ms y 30 segundos.

En una realización preferente de la invención, el disolvente es agua y la invención se refiere a un procedimiento de obtención de grafeno modificado covalentemente, que comprende:

30 i. aplicar un voltaje eléctrico de al menos 10 voltios para generar un campo eléctrico en una zona de la superficie de grafeno, en presencia de agua que comprende una sustancia

que, en agua, o en agua y en presencia del campo eléctrico generado por dicho voltaje, da lugar a uno o más iones y/o a uno o más radicales;

ii opcionalmente, lavar el grafeno.

5 En una realización de la invención el paso (i), y opcionalmente el paso (ii), se repiten, sucesivamente, en otra(s) zona(s) de la superficie de grafeno a modificar, diferente a la zona, o zonas en la(s) que ya se ha realizado, con la misma sustancia u otra sustancia diferente que, en agua, o en agua y en presencia del campo eléctrico generado por dicho voltaje, da lugar también a uno o más iones y/o a uno o más radicales.

10 Así, en una realización preferente de la invención, la modificación covalente se puede llevar a cabo, preferentemente, en presencia de vapor de agua, o de una fina atomización de agua líquida que comprende una sustancia que, en agua, o en agua y en presencia de un campo eléctrico, da lugar al menos a un ion y/o a al menos un radical. Así la superficie de grafeno se encuentra en contacto con una atmósfera, denominada atmósfera de trabajo, rica en agua, que contiene dicha sustancia.

15 En una realización preferente de la invención el disolvente es agua y el paso (i) del procedimiento comprende:

20 i aplicar un voltaje eléctrico de entre 10 y 100 voltios, más preferentemente entre 20 y 60 voltios, entre un electrodo en punta y el grafeno (que actúa como el otro electrodo), a una distancia menor a 10 nm, más preferentemente menor a 7 nm y aún más preferentemente en contacto con, una zona de la superficie de grafeno, para generar un campo eléctrico en dicha zona de la superficie de grafeno, en donde dicho voltaje es aplicado en presencia de agua que comprende una sustancia que, en agua, o en agua y en presencia del campo eléctrico generado por dicho voltaje, da lugar a uno o más iones y/o a uno o más radicales, y en el que la humedad relativa en contacto con la superficie de grafeno a modificar es
25 de al menos 40%, más preferentemente de al menos 50% y aún más preferentemente de entre 60% y 95%.

A efectos de la presente invención, el término “atmósfera” o atmósfera de trabajo” se refiere a la fase de disolvente en contacto directo con la superficie a modificar de acuerdo con el procedimiento de la presente invención. Los valores de humedad relativa cuando el agua es
30 el disolvente utilizado, de acuerdo con el presente documento, se expresan en %.

Así, la aplicación de dicho voltaje eléctrico genera un campo eléctrico en una zona de la superficie de grafeno, en presencia de un disolvente que comprende una sustancia que, en dicho disolvente, o en dicho disolvente y en presencia de un campo eléctrico, da lugar a uno o más iones y/o a uno o más radicales, genera la modificación covalente del grafeno al formarse uno o más enlaces covalentes entre átomos de carbono del grafeno y uno o más átomos de dicha sustancia o dicho disolvente, en una zona que tiene, preferentemente, un diámetro alrededor de 1 a 12 veces el tamaño de la zona en la cual se ha generado el voltaje eléctrico. Así si, por ejemplo, se ha generado un campo eléctrico en una zona circular de 10 micras de diámetro, la modificación covalente se producirá en una zona con un diámetro de 10 a 120 micras.

De manera aún más preferente, el disolvente es agua y el paso (ii) comprende aplicar un voltaje eléctrico de entre 20 y 60 voltios, en contacto con una zona de la superficie de grafeno, en presencia de agua que comprende una sustancia que, en agua, o en agua y en presencia de un campo eléctrico da lugar a al menos un ion y/o a al menos un radical, y en el que la humedad relativa en contacto con la superficie de grafeno a modificar es de al menos 50% y más preferentemente de entre 60% y 99%.

En otra realización de la invención el disolvente es un disolvente polar. Preferentemente un disolvente polar prótico. Más preferentemente el disolvente es agua, un ácido carboxílico, un alcohol, una amina o un haluro de hidrógeno. Aún más preferentemente, el disolvente es agua.

De esta manera, con el procedimiento de la invención se puede funcionalizar, o modificar covalentemente, grafeno en regiones extensas, de mm^2 o mayores, con especies químicas diferentes, pudiéndose unir covalentemente diferentes grupos, o los mismos, en diferentes zonas separadas entre sí de la superficie del grafeno mediante generación de un campo eléctrico localizado en dichas zonas en presencia de dicho disolvente, o de otro disolvente diferente que contiene la misma sustancia, o con o diferentes sustancias que en el disolvente utilizado, o en el disolvente utilizado y en presencia de un campo eléctrico, generan iones y/o radicales, y que forman enlaces con uno o más átomos de carbono del grafeno.

Por ejemplo, cuando el disolvente es agua, las sales inorgánicas se ionizan en agua, se genera una fase de fina atomización líquida en la que dichas sales se transportan y responden a los campos eléctricos generados. Así, al aplicar un campo eléctrico localizado en presencia de dicha fase de fina atomización líquida de agua, enriquecida con una sal, el campo eléctrico media en la unión de la especie iónica o radicalaria correspondiente al grafeno. Para anclar dos sustancias, una en cada zona, se procede a llevar a cabo el procedimiento de manera

secuencial: primero se utiliza una primera sustancia en una primera zona y se aplica el campo eléctrico, produciéndose la modificación del grafeno con dicha primera sustancia en dicha primera zona. A continuación, se lava el grafeno y, se procede a repetir el procedimiento trabajando sobre otra zona diferente con una sustancia y disolvente, iguales o diferentes a los primeros.

En una realización de la invención, el grafeno se lava con DMF (dimetilformamida), DMSO (dimetilsulfóxido), metanol, tolueno o etanol, preferentemente realizando más de un lavado con uno o más disolventes.

El procedimiento de la invención no solamente es posible con sales, en concreto con sales inorgánicas, sino que se puede llevar a cabo con cualquier molécula, complejo o sustancia que, en agua, u otro disolvente apropiado, genera iones o radicales, requiriendo, o no, la presencia del campo eléctrico generado durante el procedimiento, y sin que sea necesariamente una molécula con enlaces de naturaleza iónica.

Así, en una realización preferente del procedimiento de acuerdo con la presente invención la sustancia que, en un disolvente, o en un disolvente y en presencia de un campo eléctrico, da lugar a uno o más iones y/o a uno o más radicales, se selecciona independientemente del grupo que consiste en:

- un compuesto que, en dicho disolvente, o en dicho disolvente y en presencia de un campo eléctrico da lugar a un radical seleccionado del grupo que consiste en: radical superóxido, diradical oxígeno, radical hidroxilo, radical alcoxilo, radical aroxilo, radical peroxilo, radical aminoxilo, radical monóxido de nitrógeno, radical dióxido de nitrógeno, catión nitrosonio, radical nitreno, radical halógeno, radical alquilo, radical arilo, radical carbeno y radical cetilo; o un compuesto que comprende uno o más grupos funcionales que en dicho disolvente, o en dicho disolvente y en presencia de un campo eléctrico, dan lugar a dicho radical;
- un compuesto que en dicho disolvente, o en dicho disolvente y en presencia de un campo eléctrico da lugar a un catión seleccionado independientemente del grupo que consiste en: un catión metálico, un catión amonio, un catión nitronio, un catión iminio, un catión iodonio, un carbocatión, un catión diazonio y un catión guanidino; o un compuesto que comprende uno o más grupos funcionales que en dicho disolvente, o en dicho disolvente y en presencia de un campo eléctrico, dan lugar a dicho catión; y

- un compuesto que en dicho disolvente, o en dicho disolvente y en presencia de un campo eléctrico, da lugar a un anión seleccionado independientemente del grupo que consiste en: peróxido, hidróxido, alcóxido, fenolato, carboxilato, carbanión, azida, carbonato, bicarbonato, borato, bromato, yodato, cianato, isocianato, cianuro, nitrato, nitrito, haluro, sulfato, bisulfato, tiosulfato, sulfito, bisulfito, sulfuro, bisulfuro, disulfuro, fosfato, fosfito, fosfato ácido, fosfato diácido y silicato; o un compuesto que comprende uno o más grupos funcionales que en dicho disolvente, o en dicho disolvente y en presencia de un campo eléctrico, dan lugar a dicho anión.

De esta manera, al generarse un campo eléctrico, a una distancia del orden de nm de la zona de la superficie del grafeno, en presencia de un disolvente que comprende dicha sustancia, se produce uno o más enlaces covalentes entre uno o más átomos de carbono de grafeno y uno de los átomos de dicha sustancia, formando grupos funcionales unidos covalentemente a átomos de carbono del grafeno, en donde el enlace covalente se produce entre uno de los átomos de carbono del grafeno y un átomo de la sustancia. Así, en un ejemplo no limitante, si la sustancia es una sal de arildiazonio (arilo- $N_2^+ X^-$), se podría generar, en disolución acuosa y en presencia de un campo eléctrico, N_2 y un carbocatión arilo, o un radical arilo, que reaccionaría con un carbono del grafeno formándose un enlace de dicho átomo de carbono y un átomo de carbono del grupo arilo, formándose, entonces, un grupo funcional arilo en el grafeno.

En una realización preferente de la invención, la sustancia que da lugar en el disolvente, o en el disolvente y en presencia de un campo eléctrico, a uno o más iones se selecciona independientemente del grupo que consiste en:

- un compuesto que, en dicho disolvente, o en dicho disolvente y en presencia de un campo eléctrico da lugar a un radical seleccionado del grupo que consiste en: radical hidroxilo, radical alcoxilo, radical aroxilo, catión nitrosonio, radical nitreno, radical halógeno, radical arilo y radical carbeno; o un compuesto que comprende uno o más grupos funcionales que en dicho disolvente, o en dicho disolvente y en presencia de un campo eléctrico, dan lugar a dicho radical;
- un compuesto que, en dicho disolvente, o en dicho disolvente y en presencia de un campo eléctrico, da lugar a uno o más cationes seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en: Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} amonio, diazonio y carbocatión; o un compuesto que comprende uno o más grupos funcionales que en dicho disolvente, o en dicho disolvente y en presencia de un campo eléctrico, dan lugar a dicho catión; y

- un compuesto que, en dicho disolvente, o en dicho disolvente y en presencia de un campo eléctrico, da lugar a uno o más aniones seleccionados independientemente del grupo que consiste en: cloruro, ioduro, bicarbonato, hidróxido, alcóxido, fenolato y carboxilato; un compuesto que comprende uno o más grupos funcionales que en dicho disolvente, o en dicho disolvente y en presencia de un campo eléctrico, dan lugar a dicho anión.

Así, el grafeno podría reaccionar con un catión (por ejemplo, el carbocatión de las sales de diazonio) o con un anión (por ejemplo, I^- o HCO_3^-) que podrían ser generados por la sustancia utilizada, dependiendo de si el grafeno es más o menos nucleófilo que el anión generado.

Más preferentemente dicho disolvente es agua.

- 10 En otra realización preferente adicional de la invención, la sustancia que da lugar en agua a uno o más iones en presencia de un campo eléctrico se selecciona independientemente del grupo que consiste en NaCl, NaI, $NaHCO_3$, NaOH, $CuCl_2$, NH_3 , 2-clorofenol, azul de variamina y la sal de sodio de fluoresceína.

- 15 En una realización de la invención el campo eléctrico se genera mediante un electrodo, en particular un electrodo en punta, con potencial eléctrico negativo respecto al grafeno.

En otra realización de la invención, el campo eléctrico se genera mediante un electrodo, en particular un electrodo en punta, con potencial eléctrico positivo respecto al grafeno.

Preferentemente, en el procedimiento de acuerdo con la presente invención, la superficie de grafeno a modificar covalentemente es una monocapa.

- 20 Más preferentemente, en el procedimiento de acuerdo con la presente invención, el grafeno es obtenido mediante depósito químico en fase vapor (CVD).

El grafeno de mayor calidad se obtiene en forma de monocapas mediante depósito químico en fase vapor (CVD), que pueden transferirse, con procedimientos conocidos en el estado de la técnica, sobre cualquier sustrato.

- 25 Aunque el grafeno, es un material bidimensional, en algunos casos, el material utilizado comprende más de una capa de grafeno. Así, a efectos de la presente invención, cuando el grafeno está formado por más de una capa, la modificación covalente puede ocurrir en cualquiera de las capas de grafeno.

En una realización particular de la invención, el procedimiento se lleva a cabo con sustancias solubles en el disolvente utilizado y comprende, previamente al paso (i), los pasos de:

- a. disolver una sustancia en un disolvente; y
- b. extender la disolución obtenida sobre la superficie de grafeno;
- 5 c. secar la superficie de grafeno formando una película de dicha sustancia sobre la superficie de grafeno,

de manera que, al poner en contacto la superficie del grafeno con un disolvente igual o diferente al disolvente del paso (a), se disuelve la sustancia depositada sobre la superficie de grafeno y, al aplicar un voltaje eléctrico de al menos 10 voltios en dicha zona de la superficie
10 de grafeno de acuerdo con el paso (i) en presencia de dicho disolvente.

En una realización de la invención, el disolvente utilizado en el paso (a) y en el paso (i) son iguales. En otra realización de la invención, el disolvente utilizado en el paso (a) y en el paso (i) son diferentes.

En una realización el paso (c) de secado se lleva a cabo mediante la utilización de una fuente
15 de calor.

En una realización preferente de la invención, ambos el primer disolvente y el segundo disolvente son agua y el procedimiento comprende previamente al paso (i), los pasos de:

- a. disolver una sustancia que, en agua, o en agua y en presencia de un campo eléctrico, da lugar a uno o más iones; y
- 20 b. extender la disolución obtenida sobre la superficie de grafeno;
- c. secar la superficie de grafeno de manera que se forma una película de dicha sustancia sobre la superficie de grafeno,

de manera que al poner en contacto la superficie de grafeno con el agua, se disuelve la sustancia depositada sobre la superficie de grafeno en el agua, y al aplicar un voltaje eléctrico
25 de al menos 10 voltios en dicha zona de la superficie de grafeno, de acuerdo con el paso (i), se genera un campo eléctrico en dicha zona de la superficie de grafeno en presencia de agua.

A efectos de la presente invención, el procedimiento de modificación covalente de grafeno de acuerdo con la presente invención se denomina también “procedimiento de litografía de funcionalización” covalente de grafeno. Así, a efectos de la presente invención, el dispositivo
30 que genera el voltaje eléctrico en el procedimiento de modificación covalente de grafeno de la

presente invención se puede denominar dispositivo de litografía de funcionalización de grafeno.

Preferentemente, previamente al paso (i) el electrodo en punta se acerca a una distancia de igual o menor a 10 nm de la zona de la superficie de grafeno a modificar. Más
5 preferentemente, el electrodo en punta está en contacto con la zona de la superficie de grafeno a modificar.

En una realización de la invención se genera el campo eléctrico antes de acercar la punta del electrodo a una distancia igual o menor a 10 nm, y se mantiene cuando ésta entra en contacto con la zona de la superficie de grafeno a modificar.

10 Una vez, se completa el paso (i) dicho procedimiento se repite, opcionalmente en otra u otras zonas de la superficie del grafeno. En una realización preferente, el paso (i) se repite en una zona contigua a la primera zona a modificar y con la misma sustancia, de manera que las modificaciones covalentes obtenidas se solapan.

En otra realización preferente, el paso (i) se repite en una zona alejada de la primera zona a
15 modificar y con una sustancia diferente, de manera que se obtienen modificaciones covalentes de diferente naturaleza química en zonas separadas de la superficie de grafeno.

En una realización aún más preferente el electrodo en punta está en contacto con la superficie de grafeno durante la generación del campo eléctrico del paso (i). En una realización más preferente de esta realización más preferente, el electrodo en punta está en contacto con la
20 superficie de grafeno durante la generación del campo eléctrico del paso (i) realizando una presión adicional sobre la superficie de grafeno a modificar covalentemente.

El electrodo se aproxima a la muestra hasta una distancia suficientemente cercana, de menos de 10 nanómetros, o haciendo contacto con la superficie, de manera que el campo eléctrico reduce la barrera energética (energía de activación) de formación del enlace covalente entre
25 el grafeno y el ion o radical generado por la sustancia.

La presente invención también se refiere a grafeno modificado covalentemente, obtenible de acuerdo con el procedimiento descrito en la presente invención.

En una realización preferente el grafeno a modificar, y el grafeno modificado covalentemente, obtenible de acuerdo con el procedimiento de descrito en la presente invención, se encuentran
30 depositados sobre una capa de cobre, o una capa de carburo de silicio, óxido de silicio, cuarzo,

silicio, teflón, tereftalato de polietileno o en una capa de níquel, o en una aleación cobre/níquel, o en una aleación platino/cobre, o en una aleación cobre/níquel/zinc, o en una superficie mineral o en una superficie polimérica.

5 Preferentemente, el grafeno modificado covalentemente, obtenible de acuerdo con la presente invención, se presenta en forma de una monocapa de grafeno. Más preferentemente en forma de una monocapa de grafeno obtenida por depósito químico en fase vapor que se encuentra modificada covalentemente, obtenible de acuerdo con el procedimiento de la invención.

10 Mediante el procedimiento de la invención se logra, por tanto, la modificación del grafeno de manera covalente con diferentes tipos de grupos funcionales, controlando la posición de dichos grupos. En este sentido, el grafeno modificado covalentemente, obtenible de acuerdo con el procedimiento descrito en la presente invención permite proporcionar sitios activos selectivos para la unión a diferentes moléculas. Esto hace que dicho grafeno sea útil como superficie de anclaje de bio-receptores en dispositivos detectores de uno o varios analitos, tales como dispositivos de inmunoensayo ELISA, en los cuales, el grafeno modificado
15 covalentemente, obtenible de acuerdo con el procedimiento de la invención, sirve como superficie de anclaje para sustancias receptoras (p.ej. antígenos) que son capaces de unirse a analitos a determinar. Además, el control de la posición y tipo de modificaciones covalentes (diferentes grupos funcionales) permite el anclaje o inmovilización de diferentes sustancias receptoras, pudiéndose llevar a cabo la detección de varios analitos en una superficie muy
20 reducida. Así, es posible la miniaturización de las plataformas de detección de múltiples analitos, o detección multianalito, de manera más económica y en fase sólida.

Así, la presente invención también se refiere al uso del grafeno modificado covalentemente, obtenible de acuerdo con el procedimiento descrito en el presente documento, en un dispositivo detector de analitos o biosensor.

25 Además, la presente invención se refiere a un método in vitro para detectar analitos en una muestra de un humano o animal, en el que dicho método comprende el anclaje de dichos analitos a bio-receptores anclados al grafeno modificado covalentemente, obtenible de acuerdo con el procedimiento descrito en el presente documento.

30 A efectos de la presente invención, dicho dispositivo o biosensor es un dispositivo de análisis que puede detectar una señal correspondiente a una molécula presente en una muestra in vitro de un humano o animal, generando una señal medible a partir de dicha muestra con el uso de un transductor. Dicho dispositivo o biosensor comprende una plataforma, en particular,

una superficie en la que se encuentra anclado una molécula bio-receptora, o bio-receptor, que es capaz de unirse o reconocer el analito cuya presencia se desea medir, y en el que, de manera preferente, o bien el bio-receptor, o bien el analito se encuentran unidos o comprenden una molécula detectable física, química, eléctrica, magnética, óptica (fluorescencia o colorimetría por ejemplo) o térmicamente. Así, el bio-receptor tiene que ser capaz de reconocer el analito a medir, tal como una enzima, un anticuerpo, ADN, ARN o células completas.

Las propiedades conductoras del grafeno permiten su utilización en sensores basados en la transferencia de fluorescencia, electroquímica, transferencia de electrones, voltametría cíclica, voltametría de pulso diferencial, resonancia de plasmones de superficie, transistores de efecto de campo (FET), de dispersión Raman aumentada en superficie (SERS) y de espectrometría de impedancia. Así, una realización se refiere al uso del grafeno modificado covalentemente, obtenible de acuerdo con el procedimiento descrito en el presente documento en un dispositivo detector de analitos basado en la transferencia de fluorescencia o en transistores de efecto de campo.

En una realización el dispositivo es un biosensor basado en la transferencia de fluorescencia, electroquímica, transferencia de electrones, voltametría cíclica, voltametría de pulso diferencial, resonancia de plasmones de superficie, transistores de efecto de campo (FET) y de espectrometría de impedancia electroquímica.

En otra realización el dispositivo es un biosensor de transistor de efecto de campo (FET biosensor) de grafeno, o un biosensor de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET biosensor) de grafeno, o un dispositivo de espectrometría de impedancia electroquímica un dispositivo de LDI-MS, o un dispositivo de voltametría cíclica, o un dispositivo de voltametría de pulso diferencial, o un dispositivo de resonancia de plasmones de superficie, o un dispositivo tipo ELISA.

Preferentemente, el grafeno modificado covalentemente, forma parte de la superficie de anclado de bio-receptores de analitos a detectar en los dispositivos descritos anteriormente. Más preferentemente, el grafeno modificado covalentemente, comprende grupos funcionales para unión a moléculas bio-receptoras en un dispositivo detector de analitos.

En una realización preferente la superficie de anclado de bio-receptores es una superficie de grafeno modificado covalentemente, obtenible de acuerdo con el procedimiento descrito en la presente invención, depositada sobre una capa de cobre, o una capa de carburo de silicio, o

en una capa de níquel, o en una aleación cobre/níquel, o en una aleación platino/cobre, o en una aleación cobre/níquel/zinc, o en una superficie mineral o en una superficie polimérica. Preferentemente dicha superficie polimérica es polimetilmetacrilato. Más preferentemente dicha superficie mineral es cuarzo.

- 5 Dichos bio-receptores, o moléculas bio-receptoras, pueden ser, sin limitación, cualquier proteína, péptido, ácido nucleico, polisacárido, nucleótido, nucleósido, azúcar, antígeno, aptámero, hormona o anticuerpo que pueda ser utilizado para métodos de diagnóstico de cualquier tipo de analito presente en humanos o animales.

En una realización, el bio-receptor o molécula bio-receptora es un péptido, una proteína, un
10 ácido nucleico, un nucleótido, un nucleósido, un oligonucleótido, un azúcar o un polisacárido. En otra realización, el bio-receptor o molécula bio-receptora es una glicoproteína, más en particular una inmunoglobulina. En otra realización adicional el bio-receptor o molécula bio-receptora es un ácido nucleico, un oligonucleótido, un polinucleótido, un ADN de cadena sencilla, un ADN de cadena doble, un aptámero o un ARN.

- 15 Más preferentemente, el grafeno modificado covalentemente, obtenible de acuerdo con el procedimiento descrito en la presente invención, comprende grupos funcionales mediante los que se pueden unir moléculas con función bio-receptora para un dispositivo detector de analitos.

Además, otro aspecto de la invención se refiere, por tanto, a un dispositivo detector de analitos
20 que comprende el grafeno modificado covalentemente, obtenible de acuerdo con el procedimiento descrito en la presente invención.

Preferentemente, el grafeno modificado covalentemente, forma parte de una superficie de anclaje de bio-receptores de los analitos a detectar.

- Más preferentemente, el grafeno modificado covalentemente comprende uno o más grupos
25 funcionales para su anclaje a bio-receptores de los analitos a detectar.

Otra realización de la invención se refiere al uso del grafeno obtenible de acuerdo con el procedimiento de la invención en un transistor de efecto campo, en un biosensor de transistor de efecto de campo (FET biosensor) de grafeno, o en un biosensor de dispersión Raman aumentada de superficie (SERS), o en un biosensor de transferencia de energía de
30 resonancia de Förster (FRET biosensor) de grafeno, o en un biosensor de detección electroquímica.

EJEMPLOS**Ejemplo 1: Funcionalización de grafeno con varias sustancias**

El dispositivo empleado para la modificación covalente de grafeno está equipado con tres posicionadores electromecánicos que permiten el control posicional en las tres direcciones del espacio, y un electrodo en punta con una constante de muelle de 300 N/m. Para cada valor determinado de humedad relativa y voltaje, la modificación covalente del grafeno se realiza en modo contacto (electrodo en contacto con la superficie de grafeno), empleando un osciloscopio para detectar el momento de contacto eléctrico. La punta se comprime < 3 μm tras dicho contacto, para evitar daño del grafeno, y posteriormente se separa. Entonces se desplaza a una zona adyacente, y se repite el proceso, de forma que se consigue controlar la posición y el tamaño de la modificación por solapamiento de zonas individuales oxidadas. El voltaje se mantiene constante durante todo el proceso, en -25 V. Las muestras empleadas son de grafeno CVD depositado sobre una superficie de cuarzo. Los reactivos químicos empleados en las fabricaciones se recogen en la **Tabla 1**:

NaCl 0,5 mM		NaCl 20 mM		NaCl 40 mM		NaCl 60 mM	
RH	r norm, μm	RH	r norm, μm	RH	r norm, μm	RH	reff
27,6	1,000	27,6	1,000	29,3	1,000	29,3	1,000
		39,5	1,018	40,8	1,075		
49,7	1,097	50,5	1,106	51,4	1,156	50,2	1,261
60,1	1,172	59,5	1,134	59,8	1,163	61,5	1,420
69,7	1,195	70,2	1,305	70,1	1,297	69,8	1,619
74,9	1,215	75,5	1,431	74,9	1,359	75,5	1,685
79,8	1,276	81,0	1,404	80,0	1,429	80,1	1,816
85,0	1,324	84,5	1,397	85,0	1,649	85,7	1,941
90,4	1,312	89,8	1,564	90,1	1,844	90,0	2,462
95,0	1,820	95,0	1,744	95,2	2,438	95,4	2,694
98,4	1,938	98,1	2,202	98,0	3,034	98,1	3,406

NaHCO₃ 0,5 mM		NaHCO₃ 20 mM		NaHCO₃ 40 mM		NaHCO₃ 60 mM	
RH	r norm, μm	RH	r norm, μm	RH	r norm, μm	RH	r norm, μm
45,6	1,000	45,6	1,000	40,5	1,000	40,5	1,000
50,0	1,239	50,5	1,130	51,6	1,167	51,8	1,174
60,0	1,274	61,4	1,307	59,8	1,241	60,3	1,526
		69,7	1,425	70,5	1,342	70,0	1,648
76,8	1,306	76,1	1,436	75,0	1,377	75,8	1,724
80,2	1,393	80,0	1,491	80,7	1,587	82,0	1,838
85,3	1,427	85,9	1,611	85,8	1,637	87,7	2,036
90,1	1,554	90,3	1,824	90,1	1,733	90,8	2,134
95,3	1,656	96,0	2,178	95,5	2,072	95,7	2,685
98,3	1,903	98,1	2,562	98,3	2,480	98,4	3,075

(Tabla 1 cont.)

NaI 0,5 mM		NaI 20mM		NaI 40mM		NaI 60 mM	
RH	r norm, μm	RH	r norm, μm	RH	r norm, μm	RH	r norm, μm
26,0	1,000	26,0	1,000	26,0	1,000	26,0	1,000
50,2	1,308					49,7	1,272
61,3	1,401					59,0	1,421
70,0	1,531	69,5	1,067	70,5	1,104	70,7	1,482
75,1	1,552	75,9	1,289	75,8	1,317	75,3	1,578
80,4	1,577	79,8	1,509	80,4	1,765	79,5	1,687
86,0	1,631	85,0	1,869	84,2	2,045	85,0	1,928
90,0	1,775	89,4	2,213	90,1	2,500	91,0	2,404
95,1	1,999	95,5	2,441	95,3	3,022	95,5	3,187
98,1	2,078	98,3	2,555	98,0	3,561	98,0	3,611

Tabla 1: Valores de radio de grafeno modificado covalentemente (normalizado con el radio del electrodo en punta medido a la menor humedad relativa para cada serie) usando diferentes sales inorgánicas de sodio.

Se preparó una disolución acuosa de cada reactivo a la concentración correspondiente (expresadas como concentraciones mM en el caso de las sales y excepto para el NH_3 que se expresa como % v/v). La disolución o mezcla resultante se agitó durante 10 min. a temperatura ambiente y se introdujo en el dispositivo de atomización o dispersión. El dispositivo de atomización conteniendo la disolución se introdujo entonces en el dispositivo que comprende el electrodo, el cual se cierra en una cámara aislante. Se conectó el equipo de atomización, hasta alcanzar el valor de humedad relativa correspondiente. El valor de la humedad relativa se monitorizó con un higrómetro-termómetro. Cuando se alcanzó la humedad relativa (RH) deseada, se inició el procedimiento de la invención, manteniendo la RH constante. Una vez terminado el proceso, se abrió la cámara aislante y la muestra se lavó mediante inmersión consecutiva en etanol, metanol y agua durante un minuto, y se dejó secar mediante calentamiento en placa calefactora durante 3h a una temperatura entre 40 – 70 °C.

La velocidad de expansión de la modificación covalente del grafeno se midió como el radio de los spots o zonas generadas usando dicho reactivo a la concentración y humedad correspondiente. El radio se normalizó con el radio del electrodo en punta utilizado (en **Tabla 1**, columna “r norm”), el cual se estimó como el spot generado a RH ambiente, donde no se produce expansión de la modificación covalente (primera fila de cada grupo en la **Tabla 1**). Cada medida se repitió con 10 spots y se promediaron los resultados. Los radios se midieron usando un microscopio de contraste diferencial (DIC).

La **Figura 1** muestra la comparación de los radios normalizados empleando las sales de sodio recogidas en la **Tabla 1**. Se aprecian tres efectos:

- (1) Para un mismo reactivo y concentración, el radio del spot aumenta con la RH. Existe una primera fase de crecimiento lento ($40 < RH < 80 \%$), y una segunda fase de crecimiento exponencial ($RH > 85\%$). Esto se debe a que el menisco de agua generado entre la punta y el grafeno es más grande a mayor RH.
- (2) Para una mismo reactivo y RH, la modificación covalente del grafeno se expande a mayor concentración de compuesto (**Tabla 1**), siendo en cualquier caso mayores a los radios con agua destilada (**Tabla 2**).
- (3) Para un mismo valor de RH y concentración del reactivo, el radio del spot es mayor cuanto mayor es la nucleofilia del reactivo químico empleado. En el caso de los compuestos de la **Tabla 1**, la nucleofilia (polarizabilidad) crece en el orden $HCO_3 < Cl < I$.

Esta nucleofilia se asocia con la reactividad del aditivo del anión de cara a su unión covalente, en caso de que se siguiera un mecanismo equivalente al de la oxidación con agua destilada.

- Los resultados (2) y (3) nos llevan a concluir que existe un fenómeno de unión covalente al grafeno de los aniones.

Para confirmar estos resultados, se realizaron experimentos con nuevos reactivos químicos, como amoniaco o 2-clorofenol, reactivos nucleófilos que de nuevo debían expandir la modificación covalente respecto al agua destilada, y otros como etanol, menos nucleófilos que el agua y que debían por tanto retardar el crecimiento. Los resultados confirman nuestra conclusión. A modo de ejemplo, se recogen algunos datos seleccionados en la **Tabla 2**.

H ₂ O destilada		2-clorofenol, 40 mM		NH ₃ , 10% (V/V)	
RH	r norm, μm	RH	r norm, μm	RH	r norm, μm
32,5	1,0000	34,9	0,999	38	1,08152286
41,0	1,0221	50,0	1,032	50,9	1,22154485
50,0	1,0142			56	1,38641642
61,0	1,0058	70,5	1,115	70	1,52463555
71,0	1,1018			70,5	1,5436862
75,8	1,1451	82,8	1,385	75,3	1,65442348
79,8	1,1525	90,0	1,772	80,1	1,7727001
85,6	1,2219	95,2	2,281	84,5	1,77437272
89,9	1,3365	98,4	2,474	90,2	1,94661939
95,2	1,7413			94,4	2,07939856
98,0	2,0646			98,3	2,14594237

Tabla 2. Valores de radios normalizados con el radio de la punta para diferentes valores de humedad usando agua destilada (blanco para estimar el incremento de velocidad), así como otros aditivos para confirmación de los resultados obtenidos en la **Tabla 1**. En el caso del amoniaco, los radios parecen ser algo más bajos de los esperado a la vista de la alta concentración que se usó. Esto tal vez se deba a su volatilidad, que hace que se pierda parte del volumen en el proceso de atomización.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de grafeno modificado covalentemente, que comprende:
- i. aplicar un voltaje de al menos 10 voltios generando un campo eléctrico en una zona de la superficie de grafeno en presencia de un disolvente y una sustancia que, en dicho disolvente, o en dicho disolvente y en presencia del campo eléctrico generado por dicho voltaje, da lugar a uno o más iones y/o a uno o más radicales;
 - ii. opcionalmente lavar el grafeno y, repetir el paso (i) e (ii) sucesivamente en otra zona de la superficie de grafeno a modificar, diferente a la zona, o zonas en la(s) que ya se ha realizado dichos pasos (i) e (ii), con la misma u otra sustancia diferente que, en agua, o en agua y en presencia del campo eléctrico generado por dicho voltaje, da lugar a uno o más iones y/o a uno o más radicales; y en el que la sustancia que, en agua, o en agua y en presencia de un campo eléctrico, da lugar a uno o más iones y/o a uno o más radicales, se selecciona independientemente del grupo que consiste en:
 - un compuesto que, en agua, o en agua y en presencia de un campo eléctrico da lugar a un radical seleccionado del grupo que consiste en: radical superóxido, radical alcoxilo, radical aroxilo, radical peroxilo, radical aminoxilo, radical monóxido de nitrógeno, radical dióxido de nitrógeno, catión nitrosonio, radical nitreno, radical halógeno, radical alquilo, radical arilo, radical carbeno y radical cetilo; o un compuesto que comprende uno o más grupos funcionales que en agua, o en agua y en presencia de un campo eléctrico, dan lugar a dicho radical;
 - un compuesto que, en agua, o en agua y en presencia de un campo eléctrico, da lugar a un catión, donde dicho catión se selecciona independientemente del grupo que consiste en: un catión metálico, un catión amonio, un catión nitronio, un carbocatión, un catión diazonio y un catión guanidino; o un compuesto que comprende uno o más grupos funcionales que, en agua, o en agua y en presencia de un campo eléctrico, dan lugar a dicho catión; y
 - un compuesto que, en agua, o en agua y en presencia de un campo eléctrico, da lugar a un anión, donde dicho anión se selecciona independientemente del grupo que consiste en: peróxido, alcóxido, fenolato, carboxilato, azida, carbonato, bicarbonato, borato, bromato, yodato, cianato, isocianato, cianuro, nitrato, nitrito, haluro, sulfato, bisulfato, tiosulfato, sulfito, bisulfito, sulfuro, bisulfuro, disulfuro, fosfato, fosfito, fosfato ácido, fosfato diácido y silicato; o un compuesto que comprende uno o más grupos funcionales que, en agua, o en agua y en presencia de un campo eléctrico, dan lugar a dicho anión.

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el voltaje eléctrico aplicado en la zona de la superficie del grafeno a modificar covalentemente es de entre 20 y 60 voltios.
- 5 3. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el paso (i) comprende aplicar un voltaje eléctrico de entre 20 y 60 voltios, entre un electrodo en punta y el grafeno, a una distancia menor a 7 nm de una zona de la superficie de grafeno, para generar un campo eléctrico en dicha zona de la superficie de grafeno, en donde dicho voltaje es aplicado en presencia de agua que comprende una sustancia que, en
10 agua, o en agua y en presencia del campo eléctrico generado por dicho voltaje, da lugar a uno o más iones y/o a uno o más radicales, y en el que la humedad relativa en contacto con la superficie de grafeno a modificar es de al menos 50%.
4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el campo eléctrico se genera
15 mediante un electrodo en punta con potencial eléctrico negativo respecto al grafeno o con potencial eléctrico positivo respecto al grafeno.
5. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la superficie de grafeno a modificar covalentemente es de una monocapa de grafeno.
20
6. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la superficie de grafeno a modificar es obtenida mediante depósito químico en fase vapor.
7. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el campo
25 eléctrico se genera en una zona de la superficie del grafeno a modificar de un diámetro menor a 30 micras.
8. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el voltaje eléctrico se aplica previamente al contacto con la zona de la superficie de grafeno a
30 modificar, y se mantiene durante dicho contacto.
9. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el voltaje eléctrico se aplica durante un período de al menos 1 milisegundo.

10. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende previamente al paso (i), los pasos de:

a. disolver una sustancia que, en agua, o en agua y en presencia de un campo eléctrico, da lugar a uno o más iones; y

5 b. extender la disolución obtenida sobre la superficie de grafeno;

c. secar la superficie de grafeno de manera que se forma una película de dicha sustancia sobre la superficie de grafeno,

de manera que al poner en contacto la superficie de grafeno con el agua, se disuelve la sustancia depositada sobre la superficie de grafeno en el agua, y al aplicar un voltaje eléctrico de al menos 10 voltios en dicha zona de la superficie de grafeno, de acuerdo con el paso (i), se genera un campo eléctrico en dicha zona de la superficie de grafeno en presencia de agua.

11. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la sustancia que, en agua, o en agua y en presencia de un campo eléctrico, da lugar a uno o más iones y/o a uno o más radicales, se selecciona independientemente del grupo que consiste en:

- un compuesto que, en agua, o en agua y en presencia de un campo eléctrico da lugar a un radical seleccionado del grupo que consiste en: radical alcoxilo, radical aroxilo, catión nitrosonio, radical nitreno, radical halógeno, radical arilo y radical carbeno; o un compuesto que comprende uno o más grupos funcionales que en agua, o en agua y en presencia de un campo eléctrico, dan lugar a dicho radical;

- un compuesto que, en agua, o en agua y en presencia de un campo eléctrico, da lugar a un catión, donde dicho catión se selecciona independientemente del grupo que consiste en: Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , un catión amonio, un catión diazonio y un carbocatión; o un compuesto que comprende uno o más grupos funcionales que, en agua, o en agua y en presencia de un campo eléctrico, dan lugar a dicho catión; y

- un compuesto que, en agua, o en agua y en presencia de un campo eléctrico, da lugar a un anión, donde dicho anión se selecciona independientemente del grupo que consiste en: cloruro, ioduro, bicarbonato, alcóxido, fenolato y carboxilato; o un compuesto que comprende uno o más grupos funcionales que, en agua, o en agua y en presencia de un campo eléctrico, dan lugar a dicho anión.

12. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la humedad relativa de la dispersión en contacto con la zona de la superficie de grafeno a modificar es de entre 60 y 99%.
- 5 13. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el campo eléctrico es aplicado mediante un dispositivo que comprende: un electrodo en punta conectado a un primer polo de un generador de tensión eléctrica, un segundo polo de dicho generador conectado al grafeno; un cabezal configurado para sujetar el electrodo en punta; un separador dieléctrico, que aloja dicho cabezal, y que está configurado para aislar eléctricamente el electrodo del resto del dispositivo; un posicionador que está sujeto al separador eléctrico y que está configurado para mover el cabezal en las tres dimensiones del espacio; y un sistema de amortiguación configurado para permitir movimiento vertical del cabezal con una presión predeterminada y para amortiguar los desplazamientos consecuencia de las irregularidades de la superficie por la cual se mueve el cabezal; en el que en el paso (ii) el campo eléctrico es generado con el electrodo en punta de dicho dispositivo; y un contenedor con disolvente configurado para generar una dispersión de dicho disolvente.
- 10
- 15
14. Grafeno modificado covalentemente obtenible de acuerdo con el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
- 20
15. Uso del grafeno modificado covalentemente de la reivindicación 14, en un dispositivo detector de analitos.
- 25
16. Uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el que el grafeno modificado covalentemente forma parte de la superficie de anclaje de moléculas bio-receptoras de analitos a detectar.
17. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 o 16, en el que el grafeno modificado covalentemente, comprende grupos funcionales para unión a moléculas bio-receptoras en dicho dispositivo detector de analitos.
- 30
18. Dispositivo detector de analitos que comprende el grafeno modificado covalentemente, de acuerdo con la reivindicación 14.

19. Dispositivo detector de analitos de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el grafeno modificado covalentemente forma parte de una superficie de anclaje de moléculas bio-receptoras de los analitos a detectar.
- 5 20. Dispositivo detector de analitos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 o 19, en el que el grafeno modificado covalentemente comprende uno o más grupos funcionales para anclaje a moléculas bio-receptoras de los analitos a detectar.

FIGURA 1

