

**ÓXIDO DE GRAFENO FUNCIONALIZADO CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA
PARA EL ANÁLISIS DE VAPREOTIDE A TRAVÉS DE ESPECTROSCOPIA RAMAN
INTENSIFICADA POR EFECTO DE SUPERFICIE (SERS).**

IVETTE EUNICE CASTIBLANCO CASTIBLANCO

2090129

Trabajo de grado para optar el título de Químico

DIRECTOR

ENRIQUE MEJÍA OSPINO

Doctor en Química

CODIRECTOR

IVÁN DARÍO GÓMEZ ROBAYO

Químico

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUIMICA

BUCARAMANGA

2017

Dedicatoria

A mis padres Luis Castiblanco y Eunice Castiblanco por su apoyo, paciencia, por creer en mí y su amor incondicional. A mis hermanos

Angie y Luis Esteban por su cariño, por aguantarme y hacer mi vida un poco más sencilla.

A Sergio Lesmes, por su amor, apoyo, por ser fuente de felicidad y fuerza.

A mis directores Enrique Mejía y Rafael Cabanzo por su apoyo y paciencia.

Al grupo de investigación LEAM por la oportunidad brindada y la ayuda prestada en la realización de este trabajo.

A cada uno de mis amigos que han estado de una u otra manera y han aportado un granito de arena para ayudarme a culminar esta etapa.

Y sobre todo a Dios, sin Él no lo hubiese logrado.

Gracias

Ivette Castiblanco

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de forma especial al Dr. Enrique Mejía y M.Sc. Rafael Cabanzo por su disposición, acompañamiento y motivación durante el desarrollo de este trabajo.

A Iván Gómez por su colaboración, apoyo y coordinación. Al Laboratorio de Rayos X en cabeza del Dr. José Henao por su colaboración en la toma de los difractogramas. Al grupo de investigación GIFTEX en dirección del Dr. Cristian Blanco; y al profesional Manuel Fonseca por facilitar el uso del liofilizador. Al Laboratorio de Microscopía de la Universidad Industrial de Santander – Parque Tecnológico de Guatigará y su personal, por el servicio de microscopía suministrado para la adquisición de datos. A la profesional Lucia Novoa del laboratorio de instrumentación de la escuela de Química por su colaboración durante en el manejo del equipo UV-VIS. A los integrantes del grupo de investigación LEAM, especialmente a Ximena Calderón por su esmerada colaboración en la disposición de equipos, implementos necesarios y aportes al desarrollo de este trabajo.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	14
1. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES.....	16
1.1. ESPECTROSCOPIA RAMAN Y SERS	16
1.2. GRAFENO Y ÓXIDO DE GRAFENO.....	22
1.3. PÉPTIDOS.....	27
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
2.1. MATERIALES	31
2.2. MÉTODOS	31
2.1.1. SÍNTESIS DEL ÓXIDO DE GRAFENO.....	31
2.1.2. FUNCIONALIZACIÓN DEL GO CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA.....	33
2.1.2. CARACTERIZACIÓN.....	35
2.1.2.1. Espectroscopía UV-Vis.....	35
2.1.2.2. Espectroscopía Infrarrojo FTIR	36
2.1.2.3. Espectroscopía Raman y Raman Intensificada por Efecto de Superficie (SERS)	36
2.1.2.4. Análisis por Difracción de Rayos X (DRX)	37
2.1.2.5 Análisis por Microscopía Electrónica de Barrido	37
2.1.3. ANALISIS DEL VAPREOTIDE CON AgNPs@GO COMO SUSTRATO Y COMPARAR	38
3. RESULTADOS	38
3.1. FUNCIONALIZACIÓN IN SITU DE ÓXIDO DE GRAFENO CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA	38
3.2. CARACTERIZACIÓN.....	42
3.2.1. ESPECTROSCOPÍA UV-VIS.....	42
3.2.2. ESPECTROSCOPÍA INFRARROJO FTIR.....	43
3.2.3. ESPECTROSCOPÍA RAMAN Y RAMAN INTENSIFICADA POR EFECTO DE SUPERFICIE (SERS).....	45
3.2.4. ANÁLISIS POR DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX)	47
3.2.4 ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM).....	49
3.3. ANALISIS DEL VAPREOTIDE CON AGNPS@GO COMO SUSTRATO Y COMPARAR CON AgNPs COMO SUSTRATO.....	50
4. CONCLUSIONES.....	57
5. RECOMENDACIONES	58

BIBLIOGRAFIA	59
ANEXO A	64
PARÁMETROS DE EQUIPOS.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de distintos estados vibracionales en el que se muestran las transiciones energéticas para las diferentes interacciones luz-materia.....	17
Figura 2. Proceso de dispersión Raman convencional (A), dispersión Raman en presencia de nanopartículas metálicas (B).	19
Figura 3. Grafeno como unidad estructural básica de los materiales de carbono	24
Figura 4. Óxido de grafeno.....	27
Figura 5. Estructura de la Somatostatina.....	29
Figura 6 Estructura del Vapreotide.....	29
Figura 7. Montaje experimental de la síntesis de Óxido de Grafito.	32
Figura 8. Óxido de grafito crudo de la reacción de la síntesis de óxido de grafito.	32
Figura 9. Óxido de grafeno obtenido después del proceso de sonicación.....	33
Figura 10. Composito funcionalizado “AgNPs@GO.....	35
Figura 11. Composito sintetizado “AgNPs@GO” Lavado	41
Figura 12. Espectro UV-vis del GO (Linea Azul); AgNPs@GO (Linea negra), AgNPs (Linea Azul).	43
Figura 13. Espectro del FTIR del GO (línea roja); AgNPs@GO (línea negra).	44
Figura 14. Espectro Raman (A) GO; (B) AgNPs@GO.....	46
Figura 15. Difractograma del GO (Verde) y Difractograma del AgNPs@GO (Azul).....	48
Figura 16. Imágenes del SEM y EDS del GO.....	49
Figura 17. Imágenes del SEM y EDS del AgNPs@GO.....	50
Figura 18. Espectro Raman SERS Vapreotide 0,2 M.	51
.....	52
Figura 19. Espectro Raman SERS Vapreotide 1×10^{-4} M usando AgNPs como sustrato. ...	52
Figura 20. Espectro Raman SERS Vapreotide 1×10^{-5} M usando como sustrato AgNPs@GO.	52
.....	52
Figura 21. Espectro SERS de Vapreotide a concentraciones de 1×10^{-6} M y 1×10^{-7} M	56

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Toxicidad de Agentes reductores.	40
Tabla 2. Asignación señales de Óxido de Grafeno y Composito.	45
Tabla 3. Señales espectro Raman GO y AgNPs@GO	47
Tabla 4. Señales en Raman y SERS para el Vapreotide	53

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Resumen metodología.....	30
Esquema 2. Proceso de reducción del AgNPs@GO con el citrato.	41

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. PARÁMETROS DE EQUIPOS	64
--------------------------------------	----

RESUMEN

TÍTULO: Óxido De Grafeno Funcionalizado Con Nanopartículas De Plata Para El Análisis De Un Nuevo Peptido Antimicrobiano A Través De Espectroscopia Raman Intensificada Por Efecto De Superficie (Sers) *.

AUTOR: Ivette Eunice Castiblanco Castiblanco. **

PALABRAS CLAVES: óxido de grafeno, Nanopartículas de plata, péptidos, espectroscopia Raman, SERS.

DESCRIPCIÓN:

Se sintetizó óxido de grafeno partiendo de grafito por exfoliación química usando el método de Hummers modificado, en el cual se hace uso de una mezcla de ácidos y permanganato de potasio como agente oxidante, con este se sintetizó un nanocompuesto funcionalizando óxido de grafeno con nanopartículas de plata, el proceso de funcionalización se realizó in situ del nitrato de plata con óxido de grafeno, utilizando como agente reductor citrato de sodio, para posteriormente utilizarlo como sustrato en Espectroscopía Raman Intensificada por Efecto de Superficie (SERS) de Vapreotide el cual es un péptido sintético análogo a la somatostatina, el nanocomposito fue caracterizado por espectroscopia UV-Vis, espectroscopía infrarroja (FTIR), espectroscopia Raman, difracción de Rayos X y microscopía electrónica de barrido (SEM).

La caracterización del composito confirmó la funcionalización del óxido de grafeno con las nanopartículas de plata, el análisis por Raman verificó la aplicación de este nanocomposito como sustrato en SERS realizando la comparación con Nanopartículas de Plata Vs el nuevo nanocomposito. El composito se utilizó para intensificar las señales del Vapreotide.

El método utilizado en la síntesis de nanocomposito es verde y el pH se llevó a pH biológico, de modo que el nuevo nanocomposito pueda ser utilizado en la industria médica en la detección y tratamiento de cancer.

*Trabajo de Grado.

**Facultad de Ciencias. Escuela de Química.

Director: Dr . Enrique Mejía Ospino. Codirector: Químico Iván Darío Gómez Robayo.

ABSTRACT

TITLE: Graphene Oxide Functionalized With Silver Nanoparticles For Analysis Of A New Antimicrobial Peptide Through Raman Spectroscopy Intensified By Surface Effect (Sers) *.

AUTHOR: Ivette Eunice Castiblanco Castiblanco. **

KEY WORDS: graphene oxide, silver nanoparticles, peptides, Raman spectroscopy, SERS.

DESCRIPTION:

Graphene oxide was synthesized starting from graphite by chemical exfoliation using the modified Hummers method, where a mixture of acids and potassium permanganate is used as oxidizing agent, with this a nanocomposite was synthesized by functionalizing graphene oxide with silver nanoparticles, the functionalization process was carried out in situ of silver nitrate with graphene oxide, using sodium citrate as a reducing agent, and then using it as a substrate in Intensified Raman Spectroscopy by Surface Effect (SERS) of Vapreotide, this is an analogous synthetic peptide to somatostatin, the nanocomposite to UV-Vis spectroscopy, infrared spectroscopy (FTIR), Raman spectroscopy, X-ray diffraction and scanning electron microscopy (SEM).

The characterization of the composite confirms the functionality of graphene oxide with the silver nanoparticles, the Raman analysis verified the application of this nanocomposite as a substrate in SERS making the comparison with Silver Nanoparticles against the new nanocomposite. The composition was used to intensify the Vapreotide signals. The method used in the synthesis of nanocomposition is green and the pH was brought to biological pH, so that the new nanocomposite can be used in the medical industry in the detection and treatment of cancer.

*Thesis Degree

**Science Department. Chemical School.

Advisor: Ph D. Enrique Mejia Ospino. Co-Advisor: Chemical. Ivan Dario Gómez Robayo

INTRODUCCIÓN

Las biomoléculas desempeñan un papel de gran importancia en los seres vivos ya que estas son las encargadas de las múltiples y diferentes tareas de las cuales depende el buen funcionamiento de los seres vivos, sin embargo muchas de estas se encuentran en proporciones muy pequeñas, aproximadamente en un rango inferior a 10^{-3} M, por tal motivo la caracterización de estas se torna muy compleja, ya que en muchas de las técnicas de caracterización se requiere mucha muestra o una preparación especial de la misma.

La espectroscopía Raman es una técnica de caracterización basada en la interacción entre el láser y las interacciones químicas, que analiza a partir de los estados vibracionales de las moléculas. Las ventajas que esta técnica aporta son su alta especificidad, su carácter no destructivo, no producen residuos, los espectros se pueden obtener a partir de casi cualquier superficie y/o disolvente; sin embargo la baja fuerza de las señales, la presencia de fluorescencia, las bajas concentraciones y la alta probabilidad de quemar la muestra han hecho perder su interés. (Halvorson & Vikesland, 2010)

Actualmente se han implementado nuevas estrategias para solucionar estos inconvenientes, una de las más útiles es la espectroscopía Raman Intensificada por Efecto de Superficie “SERS” en la cual la intensidad de las señales es mucho mayor, la presencia de fluorescencia disminuye, y la muestra no se quema debido a que el tiempo de interacción entre esta y el láser disminuye, esta técnica consiste en la amplificación del espectro de una muestra la cual se encuentra depositada sobre una superficie metálica nano-estructurada donde el láser excita los plasmones o electrones en la superficie metálica que oscilan colectivamente sobre la excitación y crea un campo electromagnético que se extiende hasta 20 nm desde el metal y mejora la señal aproximadamente en 14 magnitudes. (Halvorson & Vikesland, 2010)

También se ha podido evidenciar efecto SERS utilizando grafeno y óxido de grafeno, debido a que una de las condiciones más importantes para que se presente el efecto SERS es que ocurra una transferencia de carga entre la molécula y el sustrato y esto ocurre con el grafeno y el óxido de grafeno debido principalmente a la capacidad conductora que estos poseen, lo cual los convierte un buen sustrato en SERS sumándole que es biocompatible por su estructura basada en carbono. Al funcionalizar el óxido de grafeno con las nanopartículas se logran corregir los defectos en SERS que presenta el GO y se potencializan sus ventajas.(Ling et al., 2010)

En el estudio de biomoléculas esto es de gran importancia ya que las concentraciones en las que se encuentran en los seres vivos son muy bajas, y al analizarlas en mayor proporción no se obtiene un resultado verídico de estas, por tal motivo realizar la caracterización SERS se presenta como una alternativa altamente eficiente, permitiendo obtener un resultado acertado y preciso, esta técnica se busca aplicar en la industria biomédica.(He et al., 2012) (Ren, Fang, & Wang, 2011)

1. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

1.1. ESPECTROSCOPIA RAMAN Y SERS

En el efecto Raman, la luz incidente es dispersada inelásticamente y desplazado en frecuencia de la energía característica de las vibraciones moleculares, fue descubierta en 1927 por el físico Indio Chandrasekhara Venkata Raman. (Espectroscop, Descripci, Efecto, El, & Raman, 1930)

La espectroscopía Raman es el estudio de la interacción entre la materia y la radiación electromagnética la cual se incide como un haz de luz monocromática a una frecuencia ν_0 , las nubes electrónicas de las moléculas son perturbadas periódicamente a la misma frecuencia de la luz incidente, cuando los fotones de la luz incidente chocan contra la molécula la mayor parte la atraviesa, sin embargo hay una pequeña fracción es dispersada (del orden de 1 fotón dispersado por 10^{11} incidentes), (Childres, Jauregui, Park, Cao, & Chen, n.d.) donde el fotón dispersado llevará transitoriamente a la molécula a un estado vibracional o rotacional no permitido, el cual abandonará rápidamente para regresar a un estado permitido para la molécula, emitiendo un fotón, la frecuencia a la cual es liberado dependerá del salto energético que haya realizado la molécula. (Espectroscop et al., 1930)

Si el resultado fotón-molécula es un fotón emitido a la misma frecuencia que el fotón incidente, se dice que ocurrió un choque elástico, en este caso ni el fotón, ni la molécula sufrirán variaciones en sus estados energéticos, por tal motivo la molécula regresará a su estado energético original y el fotón tendrá una frecuencia ν_0 igual a la frecuencia incidente, esto producirá una dispersión Rayleigh (ver Figura 1); si por el contrario frecuencia del fotón dispersado es distinta, se dice que

se llevó a cabo un choque inelástico, por tal motivo hubo transferencia de energía entre el fotón y la molécula, y pueden ocurrir dos casos:

1. Si el fotón dispersado tiene una frecuencia menor a la del incidente, el fotón dispersado tendrá una frecuencia $(\nu_o - \nu_r)$, y producirá una dispersión Raman Stokes.
2. Si el fotón dispersado tiene una frecuencia mayor a la incidente, se produce una transferencia de energía de la molécula al fotón, este queda con una frecuencia $((\nu_o + \nu_r)$, y producirá una dispersión Raman Anti- Stokes.

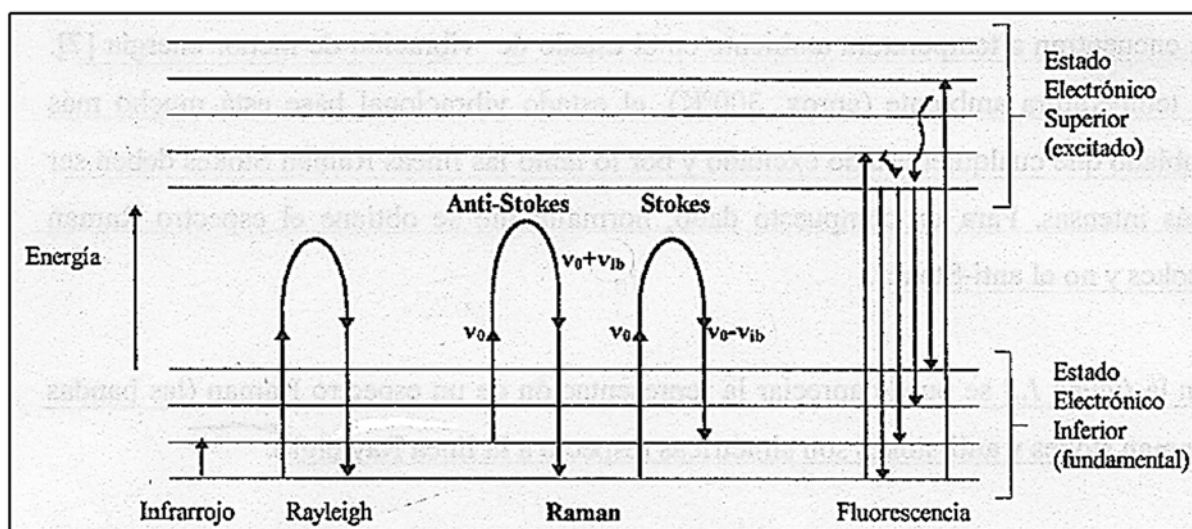


Figura 1. Diagrama de distintos estados vibracionales en el que se muestran las transiciones energéticas para las diferentes interacciones luz-materia. (Consuelo, 2011).

Las variaciones de la frecuencia son equivalentes a las variaciones de energía, los iones y átomos enlazados químicamente, están sometidos constantemente a movimientos vibracionales y

rotacionales, a cada rotación y vibración le corresponde una frecuencia relacionada en función de la masa y el movimiento de las partículas que intervienen en el movimiento, a estos movimientos les corresponde un valor determinado de energía molecular. (Consuelo, 2011).

A pesar de que la diferencia de energía entre el fotón y la molécula corresponde a los estados rotacionales y vibracionales, no todos tienen una dispersión en Raman y solo quienes tengan un cambio en la polarización en la molécula estarán activos, el espectro Raman muestra una huella única que permitirá la determinación de las especies medidas y cómo, el entorno afecta en ellas.

A diferencia del IR en la técnica Raman la muestra es irradiada con un láser cuya longitud puede ser cualquiera presente entre el ultravioleta y el infrarrojo cercano, se estudia la luz dispersada (Figura 2) que presenta la frecuencia que cambia con respecto a la línea excitante, de modo que en la espectroscopia Raman se miden frecuencias vibracionales como un desplazamiento entre la energía del haz incidente y el dispersado, esta diferencia con respecto a la línea excitante no depende de la longitud de onda de dicha línea. De manera que si el desplazamiento Raman se normaliza respecto a la frecuencia del haz incidente, se obtiene el mismo valor de frecuencias en las bandas de Raman observadas, independientemente de que luz sea usada para irradiar la muestra.(Consuelo, 2011)

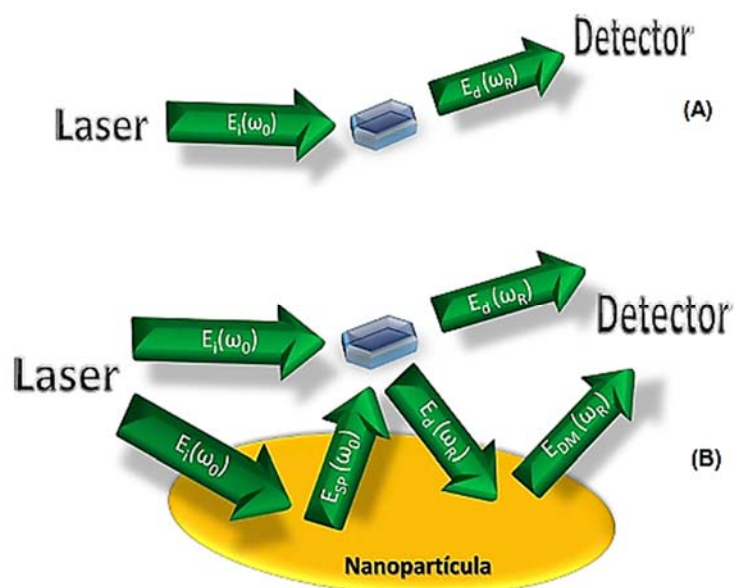


Figura 2. Proceso de dispersión Raman convencional (A), dispersión Raman en presencia de nanopartículas metálicas (B).

A pesar de ser una técnica muy práctica y novedosa, posee ciertas desventajas, referente a las posibles fuentes de ruido presentes en la técnica:

Se presentan en los ruidos generados por efecto de la luz (shot), Ruido en la muestra: Principalmente se da por fluorescencia en la muestra, esto ocurre cuando entre la muestra a analizar, algunas de las moléculas absorben la luz y pasan a un excitado por ciertos nanosegundos y luego emiten un fotón con menor longitud de onda a la incidente, lo cual produce error en la línea base, otra razón por la que se presenta el ruido es por la temperatura y la heterogeneidad de la muestra esto se observa como una curvatura en la señal; otros tipos de ruido que se presentan son el ruido por instrumentación (cambios en los parámetros del instrumentos), ruidos computacionales (variaciones al momento de graficar las señales), estas desventajas pueden superarse cuando las moléculas se ponen cerca o sobre una superficie metálica especialmente

preparada ya que esta apaga parcialmente la emisión fluorescente e intensifica las señales RAMAN a este método se lo conoce como Raman Intensificado por Efecto Superficial, SERS. (Jeanmaire & Duyne, 1977) (Espectroscop et al., 1930).

El efecto SERS fue observado por primera vez en 1974 por el científico Fleischman y sus colaboradores, al caracterizar una molécula de piridina en Raman la cual había sido depositada sobre un electrodo de plata; esto les permitió observar un espectro mucho más nítido, con señales más intensas, ellos pensaron que el incremento en la señales se debía a una mayor área de superficial producto del tratamiento de óxido-reducción al cual había sido expuesto el electrodo previamente y por tal motivo la cantidad de moléculas que estarían interactuando con la radiación incidente sería mayor, en 1977 Jeanmaire y Van Duyne por un lado y Albrecht y Creighton (Jeanmaire & Duyne, 1977) (Albrecht, 1978) determinaron que el aumento en el área superficial no era el único motivo por el cual se intensificaban las señales, de esta manera se dio origen a un nuevo efecto en la espectroscopia Raman conocido como SERS por sus siglas en inglés, Surface Enhanced Raman Spectroscopy (Halvorson & Vikesland, 2010) (Félix-Rivera et al., 2011).

Algunas de las características más importantes son su dependendencia de la característica del metal (morfología, propiedades ópticas); la naturaleza de la molécula y las variables externas tales como longitud de onda, ángulo de incidencia, concentración tanto de la muestra como del sustrato, cabe señalar que el efecto SERS no se ve reflejado uniformemente en todo el espectro, si no que habrán moléculas que se vean mayormente afectadas que otras y estas se intensificarán en mayor proporción. (Wang, Irudayaraj, & Irudayaraj, 2012)

Existen dos mecanismos para explicar el efecto SERS, el mecanismo electromagnético (EM) y el mecanismo de transferencia de carga (TC), en el mecanismo electromagnético el efecto SERS se

debe a la intensificación de campo eléctrico local debido al acoplamiento del fotón incidente con los plasmones superficiales del metal, en el mecanismo de transferencia de carga el efecto se origina por el proceso de resonancia que involucra la luz incidente y la banda TC del complejo metal-molécula el cual es similar al proceso de resonancia en Raman.(Creighton, Jennings, & Aroca, 1986)

A medida que se ha estudiado y conocido el funcionamiento del efecto SERS, se ha comprendido que el SERS es una intensificación de la radiación Raman llevada a cabo por la presencia de nanoestructuras, más que una intensificación superficial. Este conocimiento se ha puesto de manifiesto gracias al desarrollo de nuevas tecnologías en el campo de la Ciencia de Materiales. Por tal motivo, las superficies metálicas empleadas en espectroscopía SERS deben cumplir ciertos requisitos con respecto a su morfología. Un substrato SERS se caracteriza por presentar una superficie metálica nano-estructurada con plasmones activos que dan lugar a una intensificación del campo electromagnético cercano por LSPR. La elección de un substrato SERS adecuado se realiza bajo los criterios de máxima amplificación de la relación señal/ruido y una óptima reproducibilidad(Creighton et al., 1986). El interés por las nanopartículas metálicas con propiedades plasmónicas se ha incrementado durante los últimos años debido a sus versátiles aplicaciones. Hay una amplia lista en las que las nanopartículas metálicas plasmónicas pueden ser de gran utilidad en el medio ambiente, la medicina, la química y la óptica, gracias a las potencialidades que presentan en la detección química, diagnóstico clínico, catálisis heterogénea entre otras (Wang et al., 2012). Estos sistemas son muy sensibles debido a la resonancia del plasmón de superficie localizado que presentan. Al mismo tiempo estas nanopartículas pueden ser utilizadas como substratos SERS ya que son capaces de intensificar en gran medida el campo electromagnético en sus inmediaciones. Además, si las Nanopartículas metálicas que se utilizan

como sustrato SERS presentan una morfología adecuada, serían capaces de (Albretch, 1978) incrementar aún más la señal Raman. En este caso, se han reportado en la literatura diversas formas de nanopartículas, que propician una mayor intensificación del espectro Raman.

Los sustratos SERS más utilizados hasta la fecha han sido los coloides metálicos. Creighton y Albrecht fueron los pioneros en emplear los coloides metálicos como sustratos SERS en el estudio de la piridina en el año 1979 (Albretch, 1978) (Creighton et al., 1986). La fabricación de este tipo de soporte SERS es relativamente sencilla y poco costosa, ya que no requiere de una instrumentación sofisticada y los beneficios respecto al factor de intensificación que proporcionan son muy elevados (hasta 10^{11}). De hecho, son los sustratos empleados en los experimentos de detección de moléculas aisladas los coloides metálicos son de fácil preparación y se pueden preparar por reducción química o fotoquímica de una sal del correspondiente catión, generalmente en disolución acuosa. En un principio los coloides metálicos obtenidos fueron suspensiones acuosas de nano-esferas de oro, plata o cobre. Sin embargo, en los últimos tiempos se han fabricado otros sistemas con morfologías diferentes, cuyo uso está también justificado por cálculos teóricos del campo generado sobre estas nano-estructuras, que predicen una mayor intensificación en zonas con mayor curvatura como vértices y valles, que en la superficie de nanopartículas esféricas (Halvorson & Vikesland, 2010) (Leopold & Lendl, 2003).

1.2. GRAFENO Y ÓXIDO DE GRAFENO

El término grafeno se empleó a principios de los años cuarenta, a raíz de los primeros estudios en profundidad sobre el grafito para la realización de cálculos teóricos de propiedades eléctricas. En

los años sesenta se llevaron a cabo los primeros intentos de preparar láminas delgadas de grafito. El término grafeno se propuso ya en 1986 para definir a “cada una de las capas del grafito”, pero hasta 2004 se pensaba que era imposible aislarlo por ser termodinámicamente inestable. Ese año, Konstantin Novoselov y Andrew Geim aislaron el grafeno en la Universidad de Mánchester. Por ese motivo fueron galardonados con el Premio Nobel de Física en 2010. Actualmente, la comisión de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) ha establecido que “anteriormente, se han utilizado para el término grafeno descripciones como capas de grafito, capas de carbono u hojas de carbono... no es correcto utilizar, para una sola capa, un término que incluya el término grafito, que implica una estructura tridimensional. El término grafeno debe ser usado solo cuando se trata de las reacciones, las relaciones estructurales u otras propiedades de capas individuales”. En este sentido, el grafeno se ha definido como un “hidrocarburo aromático policíclico infinitamente alternante de anillos de solo seis átomos de carbono”. Sin embargo, el término grafeno actualmente se suele aplicar para hacer referencia a agrupaciones de varias láminas de grafeno, generalmente usando los términos grafeno mono, bi y multi-capas (< 10), ya que sus propiedades son diferentes. (“Menéndez, Rosa, and Blanco, Clara. El grafeno. España: Editorial CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 2014.,” 2014)

Desde que el material fue aislado en el 2004, ha tenido gran acogida por la comunidad científica, lo cual se puede observar en el incremento de las publicaciones científicas referentes al tema. (“Menéndez, Rosa, and Blanco, Clara. El grafeno. España: Editorial CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 2014.,” 2014)

El grafeno se define como una lámina de carbono de un solo átomo de espesor, el carbono se presenta en cuatro formas alotrópicas (misma composición, diferente estructura cristalina, ver Figura 3): grafito, diamante, nanotubos de carbono, fullereno; o como carbono amorfo (sin

estructura cristalina), debido a la configuración electrónica $1s^2, 2s^2, 2p^2$, el átomo de carbono es muy versátil. Tiene la capacidad de unirse con otros elementos o consigo mismo a través de diferentes tipos de enlace, los cuales forman gran variedad de compuestos y estructuras, cada una de ellas con características diferentes. En general, la mayoría de los materiales de carbono con hibridación sp^2 se pueden considerar que están formados por unidades gráficas, con mayor o menor orden estructural, conectadas por regiones menos ordenadas (Figura 3). El grafeno puede hacerse una pelota para formar fullerenos, enrollarse formando nanotubos o apilarse para formar grafito. (“Menéndez, Rosa, and Blanco, Clara. El grafeno. España: Editorial CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 2014.,” 2014)

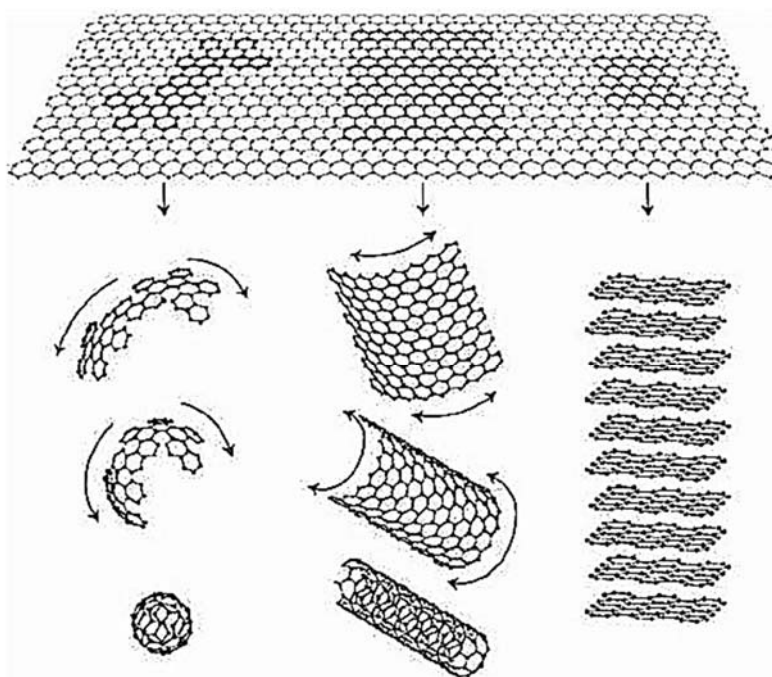


Figura 3. Grafeno como unidad estructural básica de los materiales de carbono (“Menéndez, Rosa, and Blanco, Clara. El grafeno. España: Editorial CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 2014.,” 2014)

Se trata del cristal bidimensional más delgado de la naturaleza (su espesor es el correspondiente a un solo átomo de carbono), lo que le confiere algunas de sus extraordinarias propiedades, las cuales se resumen a continuación: Es casi completamente transparente y tan denso que ni siquiera el helio puede atravesarlo, es 200 veces más resistente que el acero y más duro que el diamante, es igual de ligero y más flexible que las fibras de carbono, así mismo es un excelente conductor térmico, es capaz de soportar la radiación ionizante, prácticamente no tiene efecto Joule (pérdida de energía cinética de los electrones en forma de calor), por lo que se calienta menos al conducir los electrones, tiene una alta movilidad de portadores (movilidad electrónica), así como un bajo nivel de ruido, lo que permite que sea utilizado como canal en transistores de efecto de campo (Field-Effect Transistor o FET), también puede reaccionar químicamente con otras sustancias para formar compuestos con diferentes propiedades, y una de las propiedades más significativas del grafeno está relacionada con su conductividad eléctrica. Ya que se comporta simultáneamente como un metal y como un semiconductor, en el que los electrones se mueven a gran velocidad. Además, presenta el llamado “efecto Hall cuántico”, que implica que la conductividad del grafeno nunca puede ser cero. Los electrones del grafeno pueden moverse libremente por toda la lámina y no se quedan aislados en zonas de las que no pueden salir. (“Menéndez, Rosa, and Blanco, Clara. El grafeno. España: Editorial CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 2014.,” 2014) (“Andrada, Ana María. Nanotecnología: descubriendo lo invisible. Argentina: Editorial Maipue, 2012.,” 2012)

Uno de los principales derivados del grafeno es el óxido de grafeno, fue mencionado por primera vez en 1855 por Brodie en una nota corta en el “*Annales de Chimie*” en la que se mostraba la preparación del óxido de grafeno a partir del grafito y clorato de potasio en ácido nítrico fumante, este método también se le llamó “*el método de Brodie*” en 1859 se publicó un artículo con las

propiedades del método en el *“Philosophical transaction of the Royal Society of London”* el cual un año después se tradujo al francés y al alemán , en la primera publicación se utilizó el nombre de *“óxido de grafito”* y en las siguientes publicaciones *“ácido de grafito”* .(Lerf, 2017)

Actualmente los científicos de Brodie han diseñado diferentes métodos para la síntesis del óxido de grafeno entre los cuales uno de los más utilizados es el tratamiento del grafito con una mezcla de ácido sulfúrico y ácido nítrico; uno de los eventos de mayor trascendencia ocurrió en 1919 con la publicación de Kohlshütter y Haenni la cual marca el fin de la búsqueda clásica de GO, basándose en el análisis químico clásico y en una descripción cuidadosa de la reacción llevada a cabo, así mismo, reprodujeron los métodos expuestos por Brodie y Weinschenk basados en las condiciones cristalográficas considerando que existía una relación cercana entre la estructura del grafito y el GO, así mismo sobre la reducción y descomposición química, negando lo que muchos autores decían acerca de que el GO no era nada más que CO y CO₂ en superficies de grafito .(Lerf, 2017)

La nueva era del GO fue introducida por Hofmann y Frenzel los cuales aplicaron difracción de rayos X para el análisis estructural del GO pudiendo generar un nuevo modelo del GO (ver Figura 4) en 1969, el cual ha estado en constante cambio; con el método de obtención de grafeno dado por Geim y Novoselov el GO fue ganando interés, ya que mostraba un método económico y sencillo de obtención de láminas de grafeno.(Lerf, 2017)

El óxido de grafeno es una etapa para la preparación de grafeno por el método de exfoliación química, consiste en partir de grafito y a este agregar agentes oxidantes, de modo que estos separarán las láminas de grafito y a su vez se anclarán grupos oxigenados tales como grupos carboxilo, epoxi e hidroxilo (Figura 4), los cuales proporcionarán propiedades distintas al grafeno,

como una mayor capacidad de enlazarse o funcionalizarse con otros materiales, así como estable frente a ácidos pero en menor proporción frente a ácidos oxidantes, las soluciones de NaOH favorecen la redispersión del GO aumentando su capacidad osmótica, las soluciones de acetatos alcalinos o alcalinotérreos desprotonan el GO dando lugar a sales alcalinas, estas reacciones de neutralización son reversibles, los iones -OH pueden iniciar alteraciones más o menos reversibles del GO, del mismo modo es hidrofílico, y dependiendo el pH la distancia entre sus capas variará de modo que esto podría utilizarse en la fabricación de membranas, así mismo este ha sido utilizado como sustrato Raman de modo que se produzca el efecto SERS ya sea funcionalizado con metales nobles o solo y de esta forma producir un incremento en las señales de células cancerígenas, colorantes y demás moléculas orgánicas. (Lerf, 2017) (Dutta et al., 2013) (Guo, 2013) (Liu, Hu, Li, Zhang, & Guo, 2012)

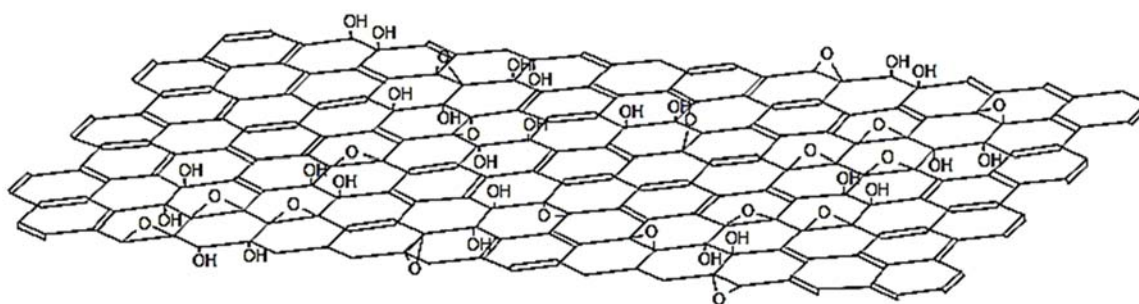


Figura 4. Óxido de grafeno(Lerf, 2017)

1.3. PÉPTIDOS

Los péptidos son cadenas lineales de aminoácidos unidos por enlaces químicos de tipo amídico a los que se denomina Enlace Peptídico. Así pues, para formar péptidos los aminoácidos se van

enlazando entre sí formando cadenas de longitud y secuencia variable. Cada péptido o polipéptido se suele escribir, convencionalmente, de izquierda a derecha, empezando por el extremo N-terminal que posee un grupo amino libre y finalizando por el extremo C-terminal en el que se encuentra un grupo carboxilo libre, de tal manera que el eje o esqueleto del péptido, formado por una unidad de seis átomos (-NH-CH-CO-) es idéntico a todos ellos. Lo que varía de unos péptidos a otros, y por extensión, de unas proteínas a otras, es el número, la naturaleza y el orden o secuencia de sus aminoácidos. El enlace peptídico es un enlace covalente y se establece entre el grupo carboxilo (-COOH) de un aminoácido y el grupo amino (-NH₂) del aminoácido contiguo inmediato, con el consiguiente desprendimiento de una molécula de agua. (“Hernández, Alfonso. Aminoácidos y proteínas. Argentina: El Cid Editor | apuntes, 2009.” 2009)

Muchos de los péptidos son sintetizados naturalmente por los seres vivos y son los encargados del buen funcionamiento del cuerpo, así mismo estos péptidos se han podido aislar del cuerpo humano de modo que se puedan sintetizar en un laboratorio y además crear análogos, de modo que se puedan utilizar como medicamentos para el tratamiento de diversas enfermedades. (Du & Stenzel, 2014)

La somatostatina (Figura 5) posee una extensa gama de aplicaciones las cuales van desde la inhibición de secciones exocrinas y endocrinas hasta la inhibición del crecimiento tumoral o neoplásico, algunas de las principales aplicaciones se observan como droga antisecretora gástrica en el tratamiento de las várices esofágicas, en la hemorragia aguda en pacientes con cirrosis, en el tratamiento de de los trastornos de la secreción de la hormona del crecimiento y en el tratamiento de inhibición de diversos tumores, ya que induce la apoptosis, detiene el ciclo celular e induce la angiogénesis. (Du & Stenzel, 2014)

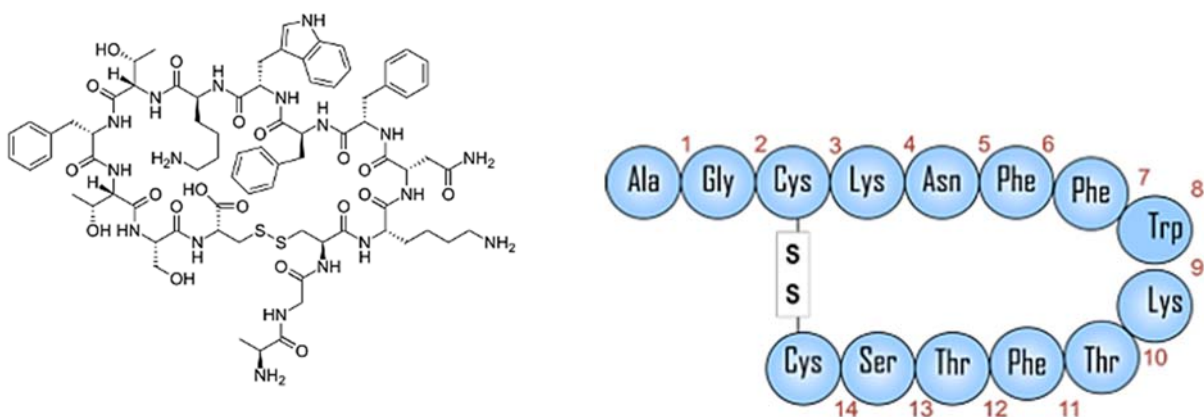


Figura 5. Estructura de la Somatostatina.

El vapreotide es un octapéptido análogo cíclico de la somatostatina (Du & Stenzel, 2014), que presenta un puente disulfuro entre las dos cisteínas presentes en las posiciones 2 y 7 (D-Phe¹-Cys²- Tyr³- D-Trp⁴- Lys⁵-Val⁶-Cys⁷-Trp⁸-NH₂) su formula química según a IUPAC es 2-Amino-*N*-[10-(4-aminobutil)-4-{[1-carbamoil-2-(1*H*-indol-2-yl)etil]carbamoil}-16-[(4-hydroxifenil)metil]-13-(1*H*-indol-3-ylmethyl)-6,9,12,15,18-pentaoxo-7-(propan-2-yl)-1,2-dithia-5,8,11,14,17-entaazacycloicosan-19-yl]-3-phenilpropanamida,(Figura 5).(Peters, Shirtliff, & Jabra-Rizk, 2010)

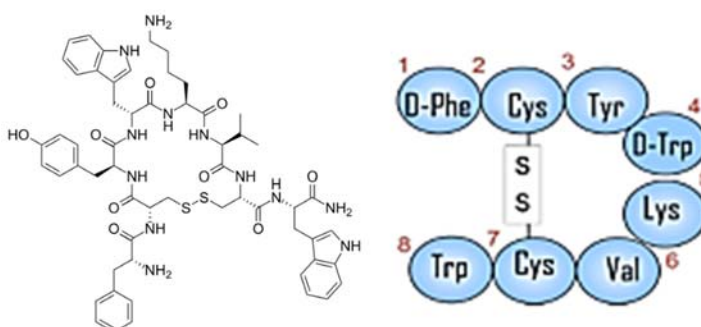
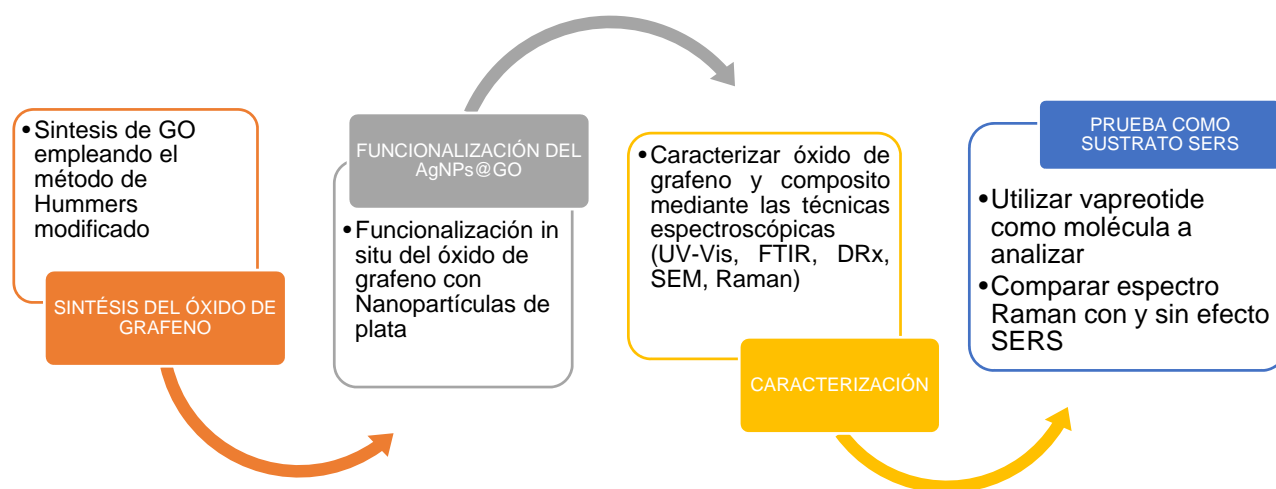


Figura 6 Estructura del Vapreotide,(Johana Gomez, 2016).

Este péptido posee una alta eficiencia como inhibidor de la hormona del crecimiento, ha sido usado experimentalmente para el tratamiento de tumores en mama, riñón, páncreas, colon, cerebro y estómago; así mismo ha servido como método para el diagnóstico y tratamiento del sangrado esofágico. (Johana Gomez, 2016)

2. MATERIALES Y MÉTODOS



Esquema 1. Resumen metodología

2.1.MATERIALES

Grafito; ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 98% Merck; ácido fosfórico (H_3PO_4) al 85% J.T Baker; peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30%; Permanganato de potasio ($KMnO_4$); Nitrato de plata ($AgNO_3$) Merck; Citrato de Sodio, Vapreotide

2.2. MÉTODOS

2.1.1. SÍNTESIS DEL ÓXIDO DE GRAFENO

Para la obtención de óxido de grafeno existen varios métodos los más conocidos en general son el método de ablación y el método de exfoliación química del grafito, ambos provenientes del grafito.

En este caso se sintetizó el óxido de grafeno por medio de la exfoliación química del grafito utilizando el método propuesto por Hummers y Offeman modificado Inicialmente se pesaron 2 g de grafito con un tamaño inferior a 40 μm los cuales se le adicionaron a una mezcla de 96 mL de ácido sulfúrico al 98% v/v y 10,7 mL de ácido fosfórico al 85% v/v, ajustando la temperatura a 50 $^{\circ}C$.

Posteriormente se pesaron 9,6 g de permanganato de potasio para oxidar la muestra; los cuales se adicionaron a la solución a razón de 0,5 g cada dos minutos. Una vez terminada la adición del permanganato, se aumentó la temperatura de la solución a 70 $^{\circ}C$ con una agitación de 500 rpm y la reacción se mantuvo bajo estas condiciones por seis horas (Figura 7).



Figura 7. Montaje experimental de la síntesis de Óxido de Grafito.

Terminado este proceso, se dejó enfriar la solución para luego agregarle 12mL de peróxido de hidrógeno al 30% v/v hasta detección de efervescencia para reducción del agente oxidante residual. La mezcla tomó una coloración “parda” y se llevó a un volumen de 600 ml aproximadamente, para posteriormente dejar reposar por 24 horas (Figura 8).



Figura 8. Óxido de grafito crudo de la reacción de la síntesis de óxido de grafito.

Se decantó la solución anterior, el óxido de grafito crudo se transfirió a 6 tubos de centrifuga, se adicionó agua destilada hasta completar un volumen de 45 ml se centrifugaron a 6000 rpm, por 15 minutos a 4 °C. (Kamat, 2010), se realizó este proceso 4 veces con agua destilada y 4 veces con agua tipo I. Finalizado este paso, se colocó la muestra en una sonda de ultrasonido por 1 hora y 30 minutos, en fracciones de 15 minutos a una frecuencia de 20 KHz, una amplitud de 40 %, pulso (On/Off) 1:1 y sonda con diámetro de 19 mm para obtener óxido de grafeno (Figura 9).



Figura 9. Óxido de grafeno obtenido después del proceso de sonicación.

2.1.2. FUNCIONALIZACIÓN DEL GO CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Para la funcionalización se realizaron pruebas con diferentes agentes reductores, verificando si la funcionalización se llevó a cabo y que tan amigable es con el ambiente.

2.1.1.1.Preparación de Nanopartículas de plata con Hidroxilamina como agente reductor

Inicialmente se prepararon por separado el GO por el método de Hummers modificado (Lerf, 2017) (Chen, Yao, Li, & Shi, 2013) y las nanopartículas de plata por el método de Lendl (Félix-Rivera et al., 2011), se utilizó el método de Lendl donde a 90 ml de una solución de clorhidrato de Hidroxilamina a una concentración de $1,66 \times 10^{-3}$ M se adicionaron 300 μ L de Hidroxido de sodio 1M bajo agitación vigorosa, a esta disolución se agregaron 10 mL de una solución 1×10^{-2} M de nitrato de plata gota a gota bajo agitación magnética, lo cual produjo un cambio de coloración de transparente a naranja (tornasol), la cuales se utilizaron como medio de comparación entre las nanopartículas y el composito como sustratos en SERS.

2.1.1.2.Funcionalización de GO con nanopartículas de plata con citrato de sodio como agente reductor

Se preparó una solución de 50 mL con concentración de 2 mg/mL de GO, seguidamente se procedió a agregar 0,23 g de AgNO_3 y 1 g de Citrato de Sodio bajo agitación magnética por 30 minutos, posteriormente esta mezcla se transfirió a un baño de aceite a 95°C y se deja reaccionar por 6 horas bajo agitación magnética constante; finalmente el composito se lavó con una solución agua-etanol y una parte se redispersó en agua y otra se secó mediante liofilización por 36 h (Figura 10). Finalmente mediante liofilización se obtiene el producto final AgNps@GO . (Yuan, Gu, & Li, 2012)



Figura 10. Composito funcionalizado “AgNPs@GO”

2.1.2. CARACTERIZACIÓN

2.1.2.1. Espectroscopía UV-Vis

Se caracterizó el óxido de grafeno y el composito; inicialmente se analizó el GO con el fin de observar las señales características de óxido y compararlos posteriormente con el GO funcionalizado con las nanopartículas de plata en el caso del GO se preparó una solución 1:1000 de óxido de grafeno contra agua desionizada, del mismo modo para el composito se preparó una solución 1:10000 de óxido de grafeno contra agua tipo I, se pusieron en cubetas de cuarzo, y se analizaron utilizando como agua desionizada como blanco. Los parámetros del equipo y condiciones del análisis se observan en el ANEXO A.

2.1.2.2.Espectroscopía Infrarrojo FTIR

Para el espectro infrarrojo se tomaron las muestras sólidas en celda ATR, el GO se puso a secar en placa de calentamiento y el composito se secó por liofilización la cual duró 36 h.

Las condiciones del equipo y los parámetros para la toma de la muestra se mostrarán en el ANEXO A.

2.1.2.3.Espectroscopía Raman y Raman Intensificada por Efecto de Superficie (SERS)

Esta técnica, es la más utilizada en este trabajo ya que el objetivo de la tesis es sintetizar un composito que sirva como sustrato en Raman y provoque el efecto SERS de modo que se pueda utilizar para la caracterización de vapreotide.

Para la caracterización del GO y del composito, se secaron en plancha de calentamiento a una temperatura de 70 °C y se depositó sobre láminas de cuarzo.

Las condiciones del equipo y los parámetros para la toma de la muestra se mostrarán en el ANEXO A.

2.1.2.4. Análisis por Difracción de Rayos X (DRX)

Para la caracterización por difracción de rayos X se tomaron el GO y el composito y se liofilizaron por 36 h, estas se maceraron con un mortero ágata con y posteriormente fue montado en un porta-muestras de polimetilmetacrilato (PMMA) con centro de silicio, mediante la técnica de llenado frontal.

Las condiciones del equipo y los parámetros para la toma de la muestra se mostrarán en el ANEXO A.

2.1.2.5 Análisis por Microscopía Electrónica de Barrido

Para la caracterización por Microscopía Electrónica de Barrido se tomaron el GO y el composito y se liofilizaron por 36 h, sobre un pequeño pedazo de cinta conductora doble faz.

Las condiciones del equipo y los parámetros para la toma de la muestra se mostrarán en el ANEXO A.

2.1.3. ANALISIS DEL VAPREOTIDE CON AgNPs@GO COMO SUSTRATO Y COMPARAR

Para la caracterización del péptido se preparó una solución 20 mM sobre un slide cubierto con papel aluminio donde se depositaron 5 μ L, los cuales fueron analizados por Raman convencional con un láser de 532 nm, 10 s, 10 acumulaciones, 100 mW de potencia y un objetivo de 10X, para la caracterización en SERS se utilizó inicialmente como sustrato Nanopartículas de plata y posteriormente se utilizó el composito AgNPs@GO; para las nanopartículas de plata se preparó una solución en proporción 1:100 de analito contra sustrato la cual se depositó 5 μ L de solución en un slide de acero inoxidable con orificios de 1mm de diámetro por 1 mm de profundidad.

3. RESULTADOS

3.1. FUNCIONALIZACIÓN IN SITU DE ÓXIDO DE GRAFENO CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Al analizar las propiedades de las nanopartículas de plata y las del óxido de grafeno se pueden observar que ambos materiales poseen un sin número de características muy útiles, como la conductividad eléctrica y de calor presente tanto en el grafeno como en las nanopartículas, así como las propiedades antibacterianas presentes en las nanopartículas de plata; se puede inferir que

al funcionalizar estos dos materiales muchas de sus propiedades se van a optimizar, como es el caso de la conductividad presente en ambos, la cual al estar unidos mejora considerablemente.

Sin embargo, los procesos de funcionalización en ocasiones pueden ser tóxicos dependiendo del agente reductor o de difícil síntesis si no se tiene experiencia; de modo que para optimizar y disminuir el impacto ambiental, se funcionalizaron por diferentes métodos para su posterior uso como sustrato en SERS.

De acuerdo a la toxicidad de los agentes reductores (Tabla 1) los agentes reductores más amigables con el ambiente son el ácido ascórbico y el citrato de sodio, además de ser los que mejor respondieron al proceso de funcionalización, sin embargo, se puede observar un mejor efecto SERS con el citrato de sodio como agente reductor y a su vez permite obtener un composito más estable.

Tabla 1. Toxicidad de Agentes reductores.

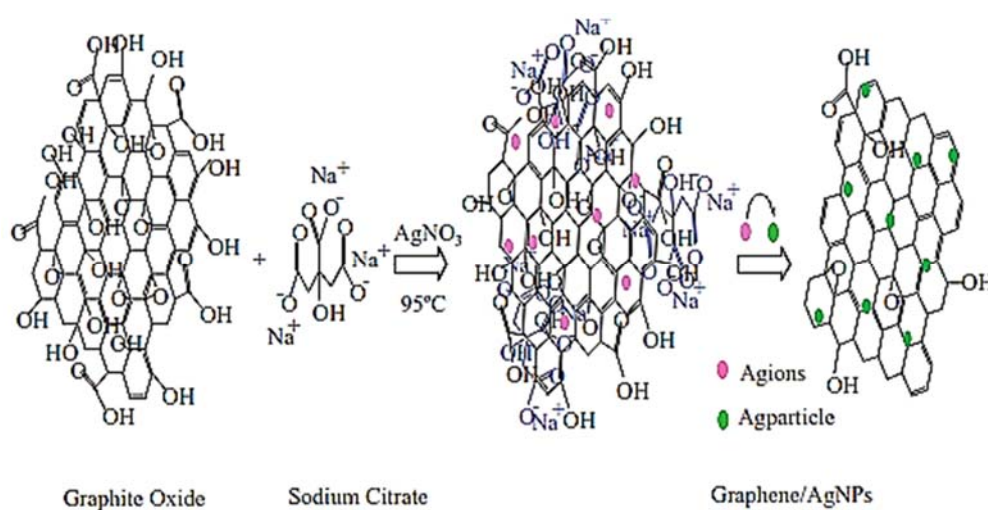
Tipo de toxicidad	Hidroxilamina	DMF	Ácido Ascórbico	Citrato de Sodio
Oral	1000 mg/kg	3010 mg/kg	11900 mg/kg	>8000 mg/kg
Inhalación	Irritación aguda	Irritación	No	No
Cutánea	> 2000 mg/kg	1500 mg/kg	No	No
Ocular	Lesiones Graves	Irritación aguda	Ligera Irritación	Ligera Irritación
Carcinogenicidad	Cancerígeno	No	No	No
Mutagenocidad	No	No	No	No
Teratogenicidad	No	Si	No	No

La funcionalización se realizó in situ de modo que las nanopartículas de plata se redujeran a partir de nitrato de plata utilizando como agente reductor citrato de sodio, el cual es un buen agente reductor y no es tóxico, el compuesto toma una coloración negra producto de la reducción tanto de la plata como del óxido de grafeno (Figura 11).



Figura 11. Composito sintetizado “AgNPs@GO” Lavado

La sonicación del óxido de grafeno hasta la formación un coloide estable favoreció la separación en mayor proporción de las láminas de grafeno y la reducción de las mismas, al agregar el citrato de sodio este reduce principalmente el nitrato de plata a nanopartículas de plata y ayuda a retirar el exceso de grupos oxigenado presentes en el óxido (Esquema 2).



Esquema 2. Proceso de reducción del AgNPs@GO con el citrato.

3.2. CARACTERIZACIÓN

3.2.1. ESPECTROSCOPÍA UV-VIS

Según los equipos de investigadores liderados por Pandurangan y Yuan (Pandurangan, 2016), (Yuan et al., 2012) para el GO aparece un pico en 227 nm con un hombro en 302 nm los cuales representan las transiciones electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$ en los enlaces conjugados C=C y $n \rightarrow \pi^*$ de los grupos carbonilos de los ácidos carboxílicos y cetonas con α,β -insaturaciones para el GO, y señales en 263 nm que corresponde a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de los enlaces conjugados C=C y en 440 nm la banda de absorción de resonancia del plasmon de superficie lo que indica la formación Nanopartículas de plata. La línea azul corresponde al espectro UV-Vis del Óxido de grafeno (GO) en el pico en 227 nm corresponde a las transiciones electrónicas de los electrones $\pi \rightarrow \pi^*$ de los enlaces conjugados C=C y el hombro en 303 nm corresponde a las transiciones electrónicas de los enlaces carbonílicos C=O $n \rightarrow \pi^*$, el espectro en negro corresponde al compuesto de óxido de grafeno funcionalizado con nanopartículas de plata donde el pico que aparece en 253 nm corresponde a las transiciones electrónicas de los grupos aromáticos $\pi \rightarrow \pi^*$, el hombro característico de GO desaparece y se observa un nuevo pico alrededor de los 412 nm el cual corresponde a la banda de absorción de resonancia del plasmon de superficie lo que indica la formación Nanopartículas de plata (Figura 12).

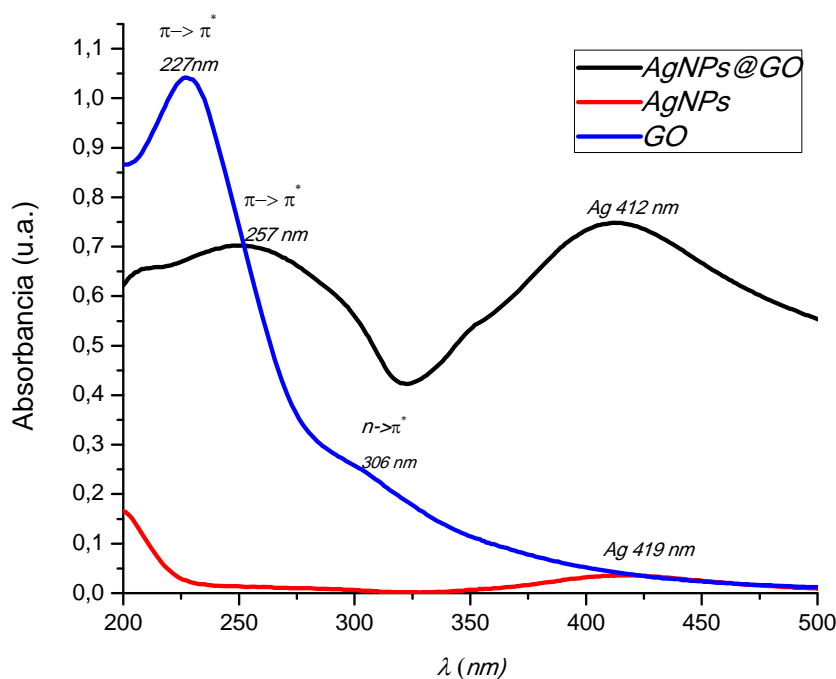


Figura 12. Espectro UV-vis del GO (Linea Azul); AgNPs@GO (Linea negra), AgNPs (Linea Azul).

3.2.2. ESPECTROSCOPÍA INFRARROJO FTIR

De acuerdo a los trabajos realizados por Yuan y Huang (Yuan et al., 2012) y (Huang, Wang, Wei, & Yan, 2015) se obtienen los picos característicos referentes a los grupos oxigenados presentes en el óxido tales como grupos hidroxilo, carbonilo, carboxílicos y epoxi, mientras que en el nanocomposito las señales características de los grupos oxigenados se ven en menor proporción y los picos representativos de la cadena carbonada son quienes se ven principalmente, lo cual permite confirmar que el efecto de la sonicación, el calor y la eliminación del agua reduce el óxido de

grafeno a grafeno. Como se puede observar, la línea roja en el espectro presenta picos en 3351 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones de estiramiento del OH, 1717 cm^{-1} equivalente a los estiramientos del C=O de los grupos COOH, 1622 cm^{-1} corresponde a las deformaciones de los OH de los grupos C-OH, el pico en 1365, 1212 y 1030 cm^{-1} para las vibraciones de deformación del anillo simétrico epoxi y las vibraciones de estiramiento del C-O respectivamente. La línea negra en el espectro corresponde al compuesto de AgNPs@GO, la señal en 3456 cm^{-1} corresponde al estiramiento de los grupos OH, los picos en 1030 cm^{-1} , 1212 cm^{-1} , 1622 cm^{-1} y 1717 cm^{-1} son más débiles, la señal en 1635 cm^{-1} corresponde a la vibración esquelética de las hojas de grafeno, y la señal en 2056 cm^{-1} corresponde a las vibraciones de los grupos C=O de los grupos carbonilo presentes aun la estructura.

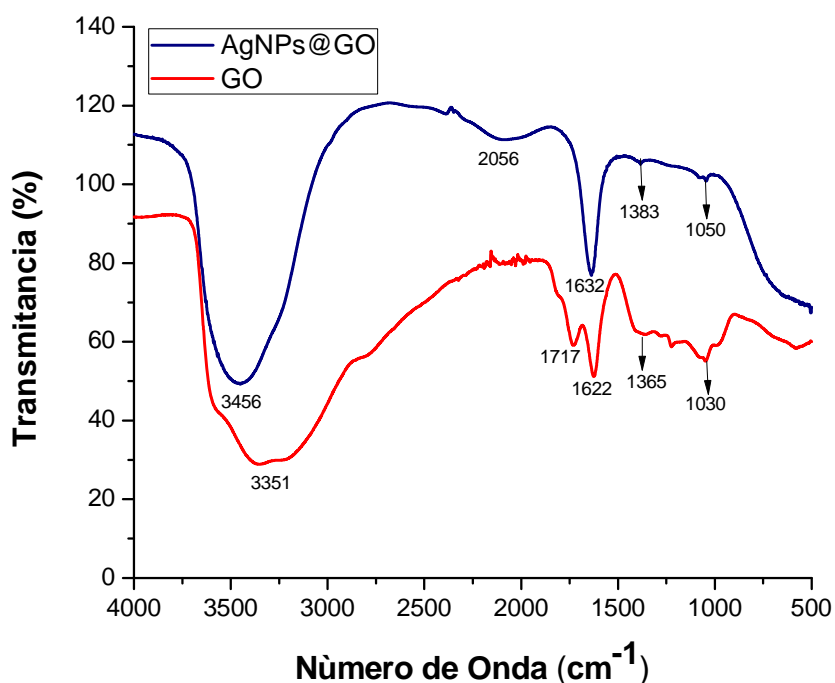


Figura 13. Espectro del FTIR del GO (línea roja); AgNPs@GO (línea negra).

Tabla 2. Asignación señales de Óxido de Grafeno y Composito.

FTIR GO (cm⁻¹)	FTIR AgNPs@GO (cm⁻¹)	Asignación
3351	3456	Estiramiento del OH
1717	2056	Estiramientos del C=O
1622		Deformaciones de los OH
1365	1383	Deformación del anillo simétrico epoxi
1212		Estiramiento del C-O
1030	1050	
	1632	Vibraciones del esqueleto de las hojas de grafeno

3.2.3. ESPECTROSCOPIA RAMAN Y RAMAN INTENSIFICADA POR EFECTO DE SUPERFICIE (SERS)

La espectroscopía Raman es una excelente herramienta para caracterizar grafeno y nanocompositos de grafeno, en la figura a se muestra el espectro del óxido de grafeno y en la figura

b el compuesto AgNPs@GO los cuales fueron excitados con un láser de 532nm al 5%, utilizando un objetivo de 50X, con 5 seg de acumulación y 100 scan y una rejilla de difracción de 600 líneas, las bandas D y G en ambos aparecen en 1350 y 1601 cm^{-1} . El primero se refiere a los fonones del punto k en la respiración del A_{1g} el segundo al estiramiento tangencial del fonon E_{2g} de los átomos de carbono sp^2 , así mismo se puede observar la similitud de las bandas D y G de ambos espectros, sin embargo la intensidad de las bandas en el espectro del compuesto es mayor en una proporción de 60 veces en comparación con la del GO solo en condiciones similares y la relación I_D/I_G muestra que hay mayor orden en el nuevo compuesto sintetizado en comparación al GO. Este efecto se debe a la superficie de dispersión Raman mejorado (SERS), entonces podemos inferir que los compuestos AgNPs @ GO muestra excelente actividad SERS resultado de un fenómeno de resonancia plasmónica en la superficie de las nanopartículas de plata (Huang et al., 2015) (Yuan et al., 2012).

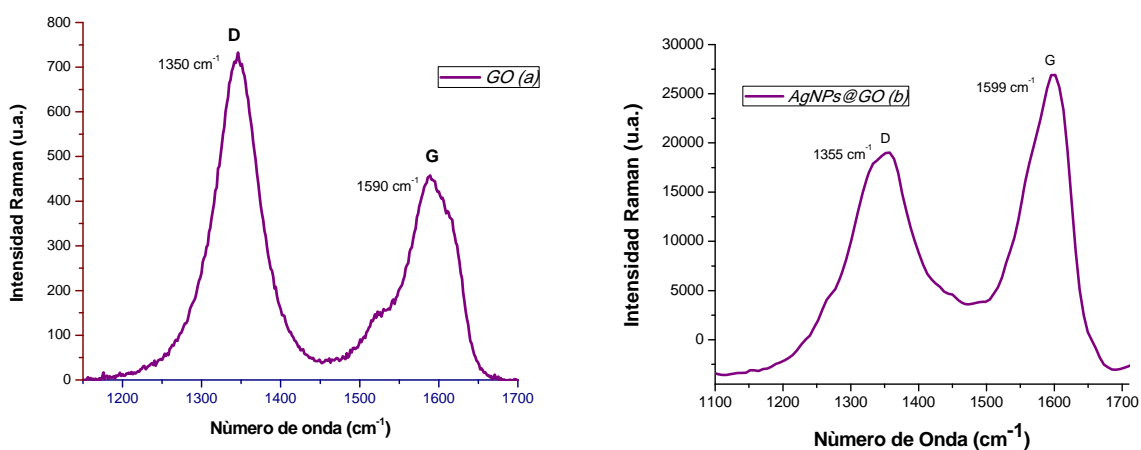


Figura 14. Espectro Raman (A) GO; (B) AgNPs@GO

Tabla 3. Señales espectro Raman GO y AgNPs@GO

	Banda D	Banda G	Intensidad D	Intensidad G	Relación Intensidad D/G
GO	1354cm⁻¹	1604 cm⁻¹	730	461	1,6
AgNPs@GO	1349 cm⁻¹	1599 cm⁻¹	19235	27005	0.7

3.2.4. ANÁLISIS POR DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX)

Los datos obtenidos, fueron tratados con PowderX el cual arrojó el espectro observado en la figura 15, según (Yuan et al., 2012) y (Rodríguez-gonzález, Velázquez-villalba, Salas, & Castaño, 2016) para el composito se obtienen picos en 38,2 °; 44,4° y 64,5° 2θ , en comparación con el composito sintetizado donde aparecen picos en 38,1 °; 44,2° y 64,4° 2θ los cuales corresponden a los planos en (111), (200) y (220) los cuales son planos de un cristal cúbico de plata, indicando que el AgNPs@GO fue funcionalizado luego de la reducción, principalmente se observan los picos característicos de la plata y el del GO se ve en menor intensidad este aparece entre los 10° y 20° 2θ debido a la alta cristalinidad de la plata y como esta técnica principalmente mide cristalinidad se van a observar en mayor proporción los elementos cristalinos presentes en la muestra .

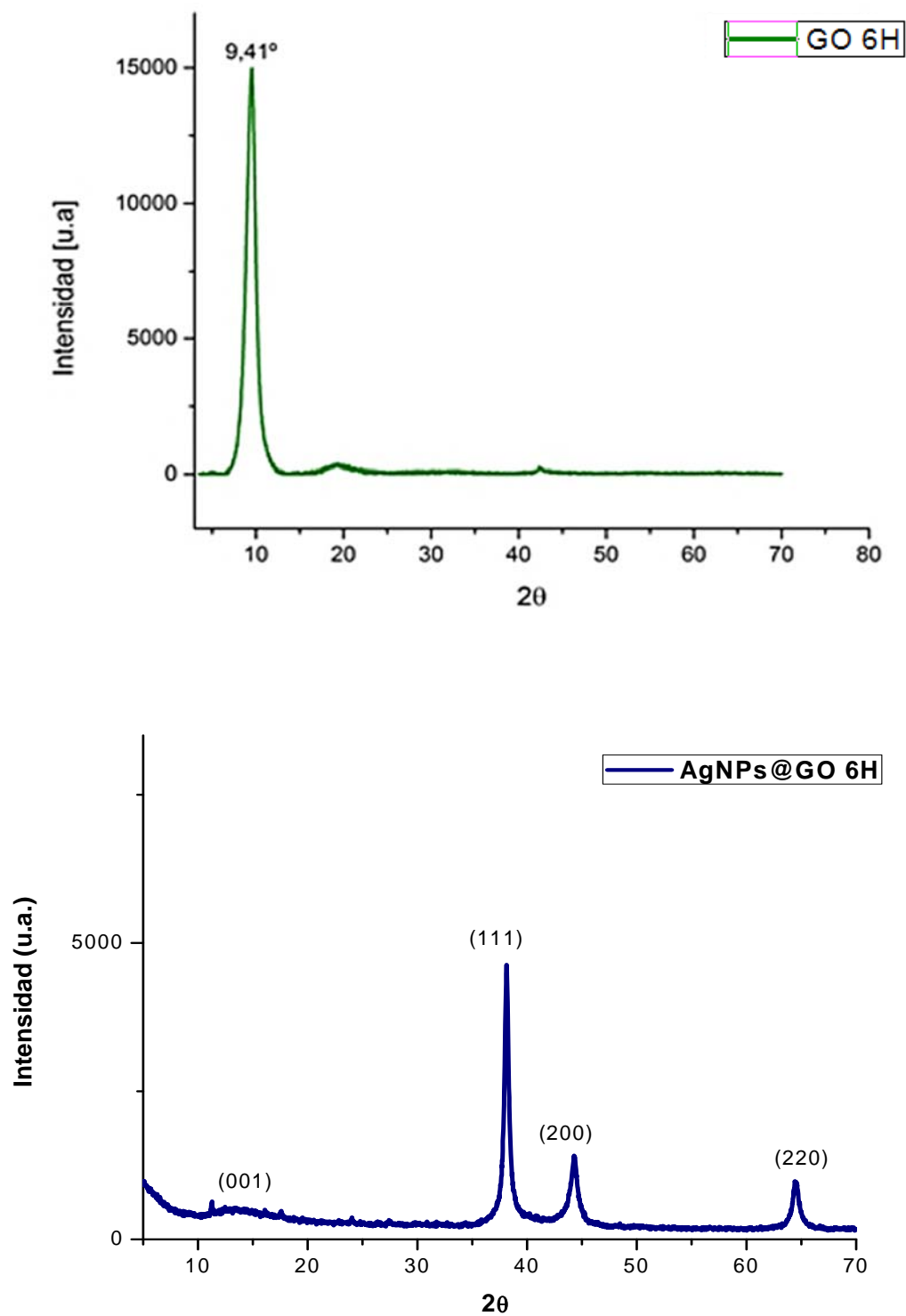


Figura 15. Difractograma del GO (Verde) y Difractograma del AgNPs@GO (Azul).

3.2.4 ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

Tanto las partículas solas de GO como el nuevo nanocomposito sintetizado fueron analizados por SEM, en el caso de GO (Figura 16) se observa la estructura laminar de óxido de grafeno a diferentes magnificaciones, donde además se observa un entrelazamiento desordenado de las láminas. Por otro lado, en la figura 17 se observan los cristalitas de plata que son depositados sobre los espacios del óxido de grafeno además las nanopartículas ancladas al óxido son predominantemente esféricas.

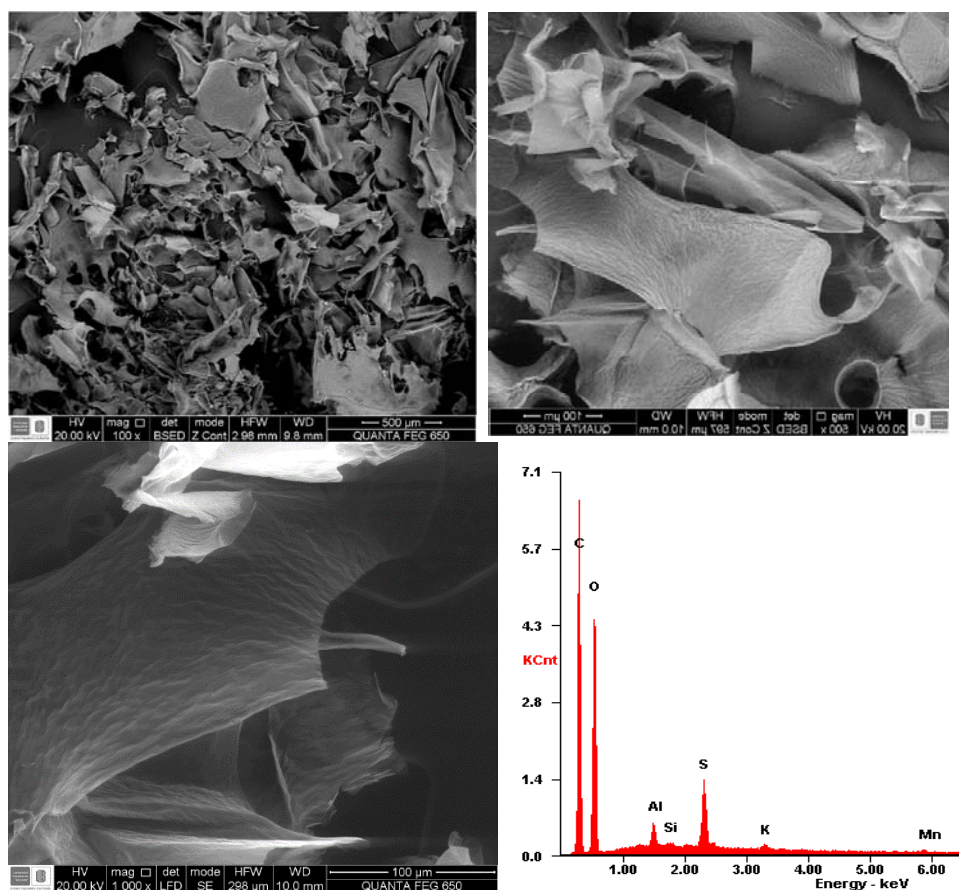


Figura 16. Imágenes del SEM y EDS del GO.

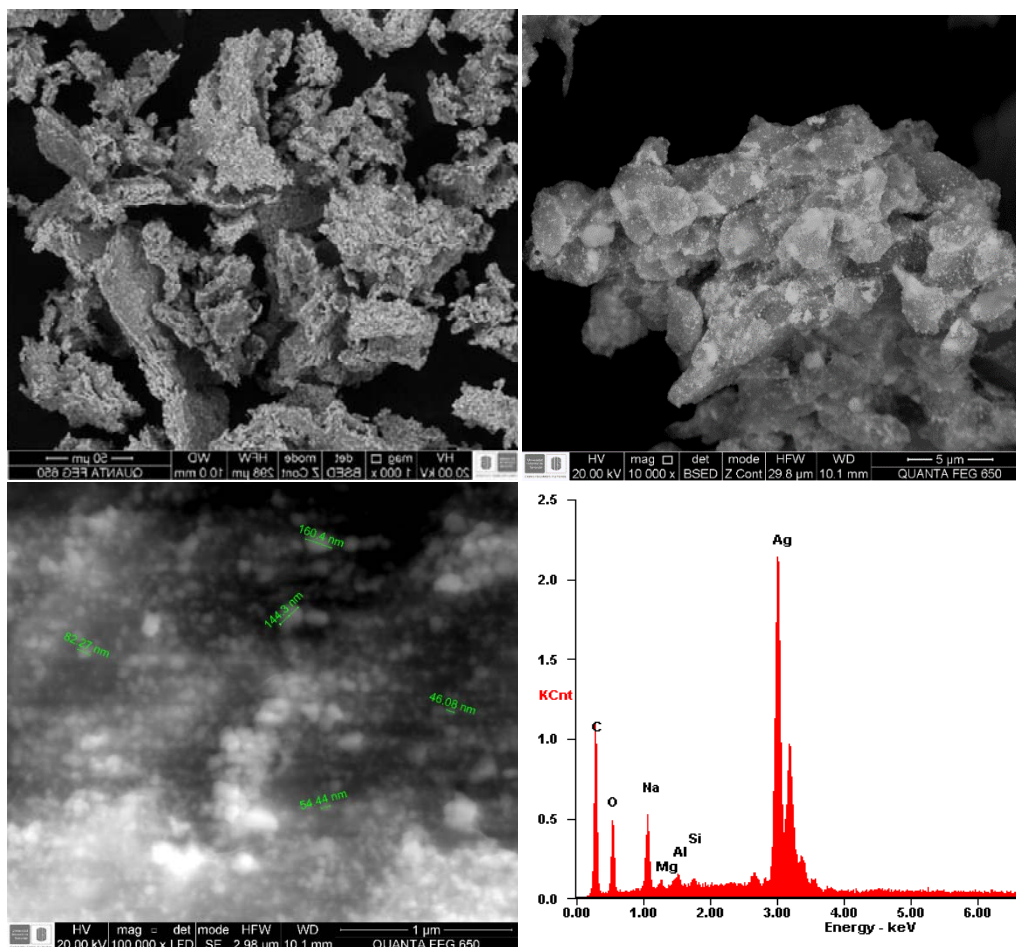


Figura 17. Imágenes del SEM y EDS del AgNPs@GO.

3.3. ANALISIS DEL VAPREOTIDE CON AGNPS@GO COMO SUSTRATO Y COMPARAR CON AgNPs COMO SUSTRATO

El espectro Raman del Vapreotide en una solución 20 mM se obtuvo usando como fuente de excitación un láser de 532 nm y una potencia de 100 mW, el tiempo de adquisición fue de 10 seg con 10 acumulaciones, El espectro en SERS del Vapreotide en una solución $1 \times 10^{-5}M$ se obtuvo usando como fuente de excitación un láser de 785 nm y una potencia de 25 mW, el tiempo de

adquisición de 40 seg con 30 acumulaciones. La asignación de las bandas se realizó basándose en publicaciones con péptidos similares, la posición de las bandas y asignaciones tentativas de estas se observan en la Figura 18 y en la tabla 5, donde se especifican los residuos de cada aminoácido y la vibraciones características.

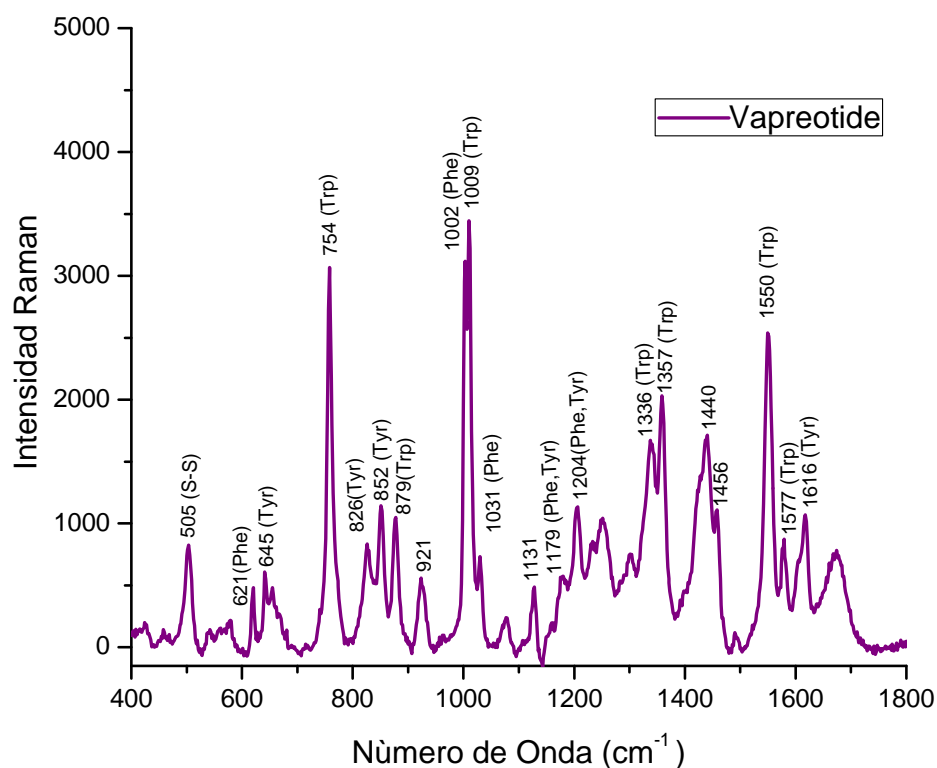


Figura 18. Espectro Raman SERS Vapreotide 0,2 M.

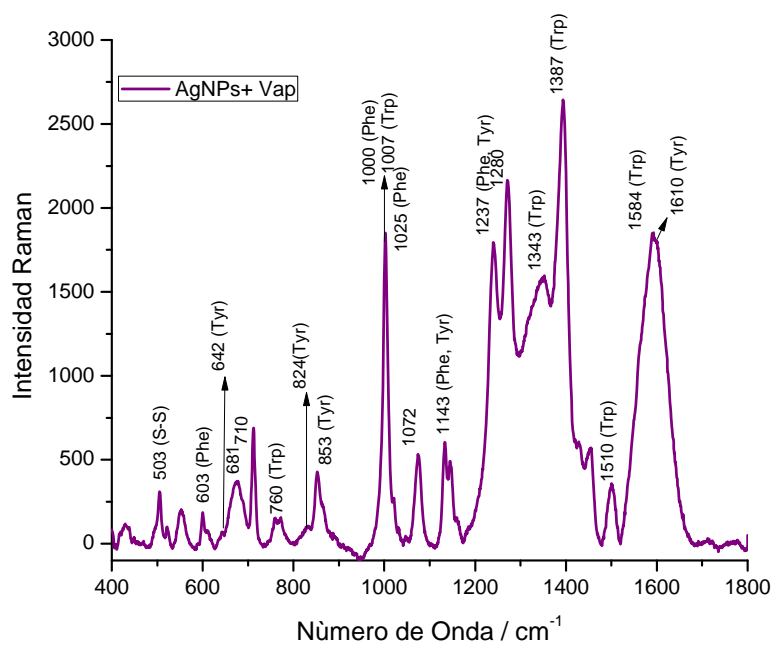


Figura 19. Espectro Raman SERS Vapreotide 1×10^{-4} M usando AgNPs como sustrato.

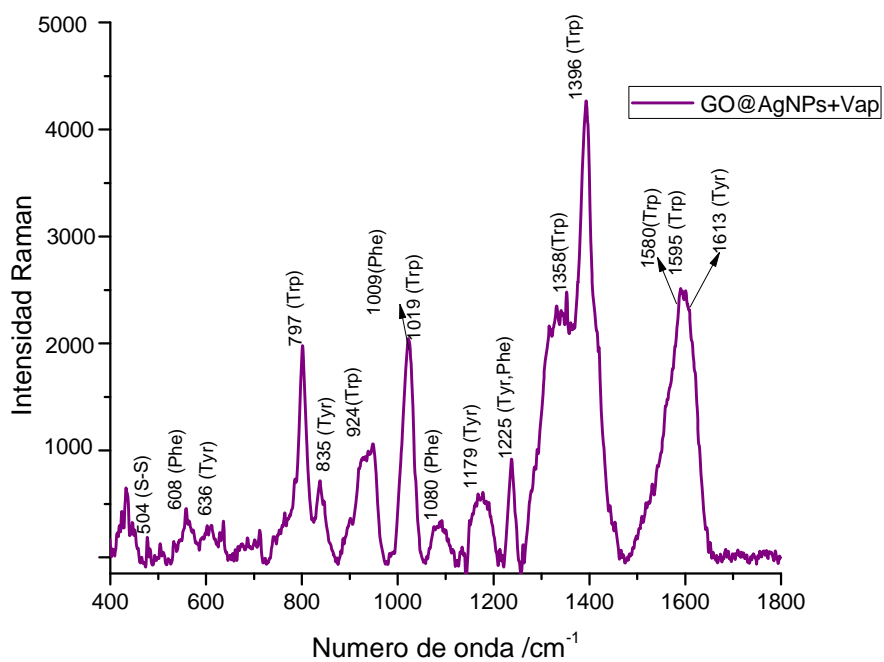


Figura 20. Espectro Raman SERS Vapreotide 1×10^{-5} M usando como sustrato AgNPs@GO.

Tabla 4. Señales en Raman y SERS para el Vapreotide (Pfluger, Pflu, Adenier, Kruglik, & Ghomi, 2014) (Pfluger, 2014)

Raman cm-1	SERS Ag cm-1	SERS AgNPs@GO cm-1	Asignación
505	503	504	N (S-S)
621	603	608	Phe
645	642	636	Tyr
754	760	797	Trp
826	824	835	Tyr
852	853		Tyr
879		924	Trp
921			Tensión C-COO-
1002	1000	1009	Phe
1009	1007	1019	Trp
1031	1025	1080	Phe
1131			Balanceo de NH ₃ ⁺ , Val
1179	1143	1179	Tyr, Phe
1204	1237	1225	Tyr, Phe
1336	1343	1358	Trp
1357	1387	1395	Trp
1440			Deformación en el plano de CH ₂
1456			Deformación en el plano de CH ₂
1557	1510	1580	Trp
1578	1584	1596	Trp
1603			Phe
1616	1610	1613	Tyr
1636			Amida

Las bandas más intensas provienen de los residuos del triptófano (Pfluger et al., 2014), también se puede observar que la banda de mayor intensidad se encuentra en 1009 cm^{-1} y corresponde al modo vibracional de respiración del anillo indol presente en el triptófano; otros modos vibracionales relacionados con el triptófano que aparecen con alta intensidad están en 754 y 1550 cm^{-1} las cuales corresponden al modo de respiración en fase anillo indol y a la tensión C-C del anillo pirrol respectivamente, en las posiciones 1336 y 1357 cm^{-1} se encuentran dos bandas muy importantes en el triptófano conocidas como doblete de Fermi (Pfluger et al., 2014), también se asignaron en 879 y 1559 cm^{-1} dos bandas de intensidad media al Triptófano, que pueden corresponder a la vibración del tijereto de los hidrógenos del anillo indol o a una deformación N-H la primera y la segunda a la tensión C-C del anillo.(Johana Gomez, 2016)(Pfluger et al., 2014)

En el espectro SERS del Vapreotide la banda más intensa se encuentra en 1387 cm^{-1} que corresponde junto a la banda en 1343 cm^{-1} al doblete de Fermi del triptófano (Pfluger et al., 2014), que difiere del espectro Raman en el cual la banda más intensa se encuentra en 1009 cm^{-1} que corresponde a la vibración del anillo Indol de triptófano, aunque en este caso esta banda tuvo un corrimiento en 1007 cm^{-1} , así mismo todas la bandas en Raman características del Triptófano aparecen en el SERS entre $5\text{-}10\text{ cm}^{-1}$; estas bandas se observan en 760 , 1007 , 1510 y 1584 cm^{-1} que corresponden a la vibración del anillo indol, Vibración en fase anillo Indol, vibración de tensión del esqueleto en el anillo aromático y de pirrol y la vibración de tensión del esqueleto del anillo Indol respectivamente, observando las intensidades relativas se puede decir que el triptófano es afectado por la presencia de las nanopartículas de plata.

Las bandas correspondientes a las vibraciones de la Fenilalanina se pueden observar en el espectro SERS, aparecen en 603 , 1000 , 1025 , 1143 y 1237 cm^{-1} , las cuales poseen corrimientos y una intensificación relativa respecto a las bandas en Raman lo cual sugiere que hay una interacción

con la plata, del mismo modo las bandas características de la Tirosina que aparecen en 642, 824, 853, 1143, 1237 y 1610 cm^{-1} que aparecen con ligeros corrimientos (Pfluger et al., 2014)(Pflu, Derbel, Coninck, Ghomi, & Total, 2010), sin embargo la relación entre la intensidad relativa del doblete de fermi de la Tirosina entre el Raman y el SERS se ve modificada y la banda en 505 cm^{-1} que corresponde a la tensión S-S se observa en menor intensidad sugiere que este enlace interactúa con las nanopartículas de plata sin romperse. (Pfluger et al., 2014)

En el espectro SERS del vaporeotide utilizando como sustrato óxido de grafeno funcionalizado con nanopartículas de plata la banda más intensa aparece en 1396 cm^{-1} que corresponde junto a la banda en 1358 cm^{-1} al doblete de Fermi del triptófano (Pfluger et al., 2014) a diferencia del espectro Raman del Vaporeotide donde la banda más intensa se encuentra en 1009 cm^{-1} corresponde a la respiración del anillo Indol presente en el triptófano, se observan corrimientos en la banda de 10-20 cm^{-1} , estas bandas aparecen en 797, 924, 1019, 1580 y 1595 cm^{-1} que corresponden a la vibración del anillo Indol, vibraciones en fase del anillo aromático indol y pirrol del triptófano y la vibración de tensión del esqueleto del anillo Indol respectivamente, lo cual sugiere que el triptófano es afectado por la presencia de las nanopartículas de plata. (Pflu, Nsangou, & Ghomi, 2009)(Pfluger et al., 2014)

Las bandas que corresponden a las vibraciones de la Fenilalanina se observan en 608, 1009, 1080, 1179 y 1225 cm^{-1} en comparación al espectro Raman hay corrimientos entre 20 - 30 cm^{-1} con leve intensificación esto sugiere que hay una leve interacción entre la plata y el vaporeotide, así mismo, las bandas características de la Tirosina aparecen en 635, 835, 1179 y 1225 cm^{-1} , se encuentran con leves corrimientos (Pfluger et al., 2014), sin embargo la señal en 852 cm^{-1} que aparece en el espectro Raman a cambio de esto la banda en 879 cm^{-1} que corresponde al Triptófano se observa más ancha y corrida a 924 cm^{-1} lo cual sugiere un solapamiento entre la banda en 852 cm^{-1}

correspondiente a la Tirosina y 879 cm^{-1} del Triptófano (Pflu et al., 2010), la banda que aparece 504 cm^{-1} corresponde a la tensión S-S se observa en menor intensidad respecto al Raman lo que indica que el puente disulfuro está interactuando con las nanopartículas de plata sin romperse. (Pflu et al., 2009)

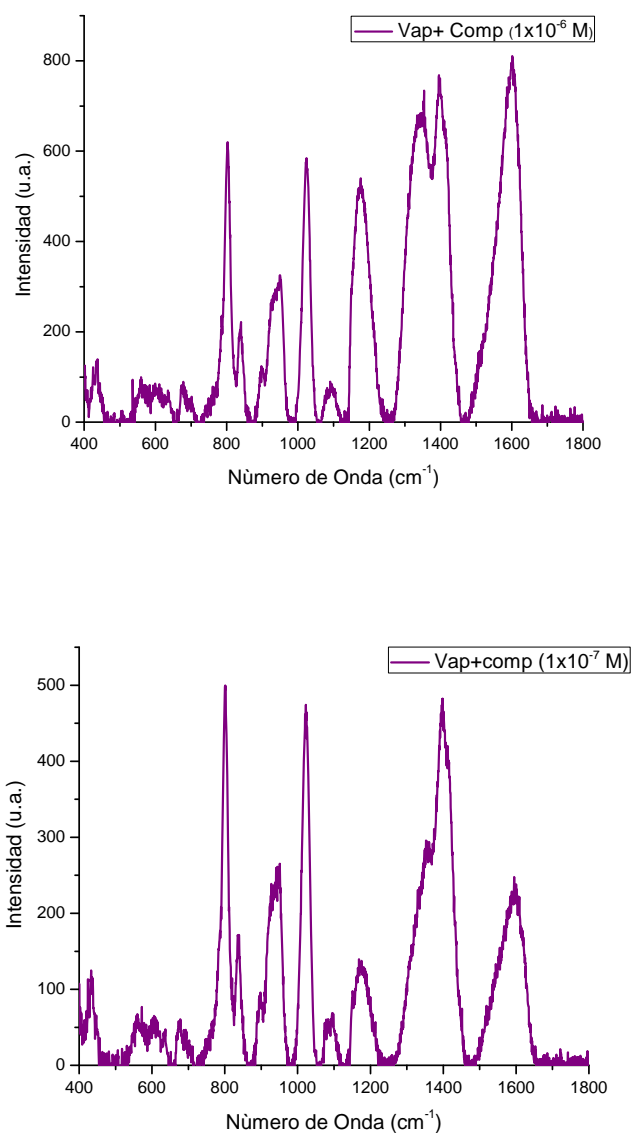


Figura 21. Espectro SERS de Vapreotide a concentraciones de $1 \times 10^{-6}\text{ M}$ y $1 \times 10^{-7}\text{ M}$

4. CONCLUSIONES

Una reacción de un solo paso fue implementada para la síntesis de nanocomposito de AgNPs@GO. El óxido de grafeno fue obtenido por el método de Hummer's modificado el cual fue el precursor para el nanocomposito con nanopartículas de plata usando una reacción "*In situ*" con presencia de nitrato de plata y citrato de sodio, este método es amigable con el ambiente ya que se tuvo en cuenta la toxicidad presente en la fichas de seguridad y se eligió el que no presentaba toxicidad reemplazando lo agentes reductores orgánicos convencionales para la síntesis de las nanopartículas de plata.

El espectro SERS de una biomolécula dependerá de las condiciones a las cuales se realice el análisis, ya que no solo depende de la molécula si no del sustrato sobre el cual se encuentra depositada.

La interacción entre las nanopartículas de plata y el óxido de grafeno sugieren un incremento en la intensidad de las señales, donde el las nanopartículas y el óxido de grafeno proporcionaran un efecto sinérgico, sin embargo, el espectro en SERS del óxido de grafeno con el vapreotide no fue posible tomarlo debido a aglomeración del óxido presente en la mezcla.

5. RECOMENDACIONES

Teniendo en cuenta que el nuevo compuesto es útil como sustrato en SERS, se recomienda observar la concentración mínima a la cual el péptido se puede tener y ser observado en Raman aplicando el efecto SERS, teniendo en cuenta que la concentración con la cual se ha trabajado hasta el momento es $1 \cdot 10^{-7}$ M.

Se sugiere probar el compuesto con otros compuestos tanto orgánicos como inorgánicos y observar su efectividad en SERS, para posteriormente buscar nuevas aplicaciones.

Es necesario hacer uso de otras técnicas de caracterización estructural más sensibles tales como Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) y Microscopio de Fuerza Atómica (AFM) para observar de mejor manera la funcionalización del GO con las nanopartículas de plata.

Se recomienda probar diferentes tiempos de oxidación del GO en la funcionalización del Óxido de grafeno con las nanopartículas de plata.

BIBLIOGRAFIA

- Albretch, G. (1978). Plasma Resonance Enhancement of Raman Scattering by Pyridine Adsorbed on Silver or Gold Sol Particles of Size, 790–798.
- Andrada, Ana María. Nanotecnología: descubriendo lo invisible. Argentina: Editorial Maipue, 2012. (2012), 2012.
- Chen, J., Yao, B., Li, C., & Shi, G. (2013). An improved Hummers method for eco-friendly synthesis of graphene oxide. *Carbon*, 64(1), 225–229.
- Childres, I., Jauregui, L. A., Park, W., Cao, H., & Chen, Y. P. (n.d.). R AMAN S PECTROSCOPY OF G RAPHENE AND RELATED MATERIALS.
- Consuelo, F. M. G. (2011). Faraldos, Marisol, and Goberna, Consuelo, eds. Técnicas de análisis y caracterización de materiales (2a. ed.). España: Editorial CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 2011, 2011.
- Creighton, A., Jennings, C., & Aroca, R. (1986). Distance Dependence of SERS Enhancement Factor from Langmuir-Blodgett Monolayers on Metal Island Films: Evidence for the Electromagnetic Mechanism, 2(6).
- Du, A. W., & Stenzel, M. H. (2014). Drug Carriers for the Delivery of Therapeutic Peptides. *Biomacromolecules*, 15, 1097–1113.
- Dutta, S., Ray, C., Sarkar, S., Pradhan, M., Negishi, Y., & Pal, T. (2013). Silver nanoparticle decorated reduced graphene oxide (rGO) nanosheet: a platform for SERS based low-level detection of uranyl ion. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5(17), 8724–32.

<https://doi.org/10.1021/am4025017>

Espectroscop, L., Descripci, B., Efecto, D. E. L., El, R., & Raman, C. V. (1930). Capítulo 1: FUNDAMENTOS DE ESPECTROSCOPIA RAMAN, 10–34.

Félix-Rivera, H., González, R., Rodríguez, G. D. M., Primera-Pedrozo, O. M., Ríos-Velázquez, C., & Hernández-Rivera, S. P. (2011). Improving SERS Detection of *Bacillus thuringiensis* Using Silver Nanoparticles Reduced with Hydroxylamine and with Citrate Capped Borohydride. *International Journal of Spectroscopy*, 2011, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2011/989504>

Guo, Z. Y. (2013). Graphene oxide based surface-enhanced Raman scattering probes for cancer cell imaging Graphene oxide based surface-enhanced Raman. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15, 2961–2966. <https://doi.org/10.1039/c2cp43715e>

Halvorson, R. A., & Vikesland, P. J. (2010). Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) for environmental analyses. *Environmental Science and Technology*, 44(20), 7749–7755. <https://doi.org/10.1021/es101228z>

He, S., Liu, K., Su, S., Yan, J., Mao, X., Wang, D., ... Fan, C. (2012). Graphene-Based High-Efficiency Surface-Enhanced Raman Scattering-Active Platform for Sensitive and Multiplex DNA Detection. *Analytical Chemistry*.

Hernández, Alfonso. Aminoácidos y proteínas. Argentina: El Cid Editor | apuntes, 2009. (2009), 2009.

Huang, Q., Wang, J., Wei, W., & Yan, Q. (2015). A facile and green method for synthesis of reduced graphene oxide / Ag hybrids as efficient surface enhanced Raman scattering

- platforms. *Journal of Hazardous Materials*, 283, 123–130.
- Jeanmaire, D. L., & Duynes, R. P. V. A. N. (1977). Surface Raman Electrochemistry, 84.
- Johana Gomez, U. I. de S. (2016). *Estudio de la intensificación de las señales de Dispersión Raman de péptidos sobre superficies nano estructuradas*.
- Kamat, P. V. (2010). Graphene-Based Nanoarchitectures. Anchoring Semiconductor and Metal Nanoparticles on a Two-Dimensional Carbon Support. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 1(2), 520–527. <https://doi.org/10.1021/jz900265j>
- Leopold, N., & Lendl, B. (2003). A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride. *The Journal of Physical Chemistry B*, 107(24), 5723–5727. <https://doi.org/10.1021/jp027460u>
- Lerf, A. (2017). Graphite Oxide Story – From the Beginning Till the Graphene Hype. *Graphene Oxide: Fundamentals and Applications*, 1, 1–35.
- Ling, X., Xie, L., Fang, Y., Xu, H., Zhang, H., Kong, J., ... Liu, Z. (2010). Can graphene be used as a substrate for Raman enhancement? *Nano Letters*, 10(2), 553–61. <https://doi.org/10.1021/nl903414x>
- Liu, Z., Hu, C., Li, S., Zhang, W., & Guo, Z. (2012). Rapid Intracellular Growth of Gold Nanostructures Assisted by Functionalized Graphene Oxide and Its Application for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 84, 10338–10344.
- Menéndez, Rosa, and Blanco, Clara. El grafeno. España: Editorial CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 2014. (2014), 2014.

- Pandurangan, T. V. M. S. M. (2016). Eco-friendly decoration of graphene oxide with green synthesized silver nanoparticles : cytotoxic activity. *Research on Chemical Intermediates*.
<https://doi.org/10.1007/s11164-015-2394-6>
- Peters, B. M., Shirtliff, M. E., & Jabra-Rizk, M. A. (2010). Antimicrobial peptides: Primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathogens*, 6(10), 4–7.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001067>
- Pflu, F., Derbel, N., Coninck, D., Ghomi, M., & Total, F. I. F. A. (2010). Vibrational Analysis of Amino Acids and Short Peptides in Hydrated Media . VI . Amino Acids with Positively Charged Side Chains : L -Lysine and L -Arginine ´ n Herna both AAs could be carried out thanks to the theoretical calculations performed by means o, *10(i)*, 1077–1088.
- Pflu, F., Nsangou, M., & Ghomi, M. (2009). Vibrational Analysis of Amino Acids and Short Peptides in Hydrated Media . IV . Amino Acids with Hydrophobic Side Chains : L -Alanine , L -Valine , and L -Isoleucine ´ n Herna, 3169–3178.
- Pfluger, F. (2014). Vibrational Analysis of Amino Acids and Short Peptides in Hydrated Media . I . L-glycine and L- leucine, (March 2007). <https://doi.org/10.1021/jp0633953>
- Pfluger, F., Pflu, F., Adenier, A., Kruglik, S. G., & Ghomi, M. (2014). Vibrational Analysis of Amino Acids and Short Peptides in Hydrated Media . VIII . Amino Acids with Aromatic Side ..., (October). <https://doi.org/10.1021/jp106786j>
- Ren, W., Fang, Y., & Wang, E. (2011). A Binary Functional Substrate for Enrichment and Ultrasensitive SERS Spectroscopic Detection of Folic Acid Using Graphene Oxide / Ag Nanoparticle Hybrids. *Acs NANO*, 5(8), 6425–6433.

Rodríguez-gonzález, C., Velázquez-villalba, P., Salas, P., & Castaño, V. M. (2016). Green synthesis of nanosilver-decorated graphene oxide sheets, 1–7. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2015.0043>

Wang, Y., Irudayaraj, J., & Irudayaraj, J. (2012). Surface-enhanced Raman spectroscopy at single-molecule scale and its implications in biology.

Yuan, W., Gu, Y., & Li, L. (2012). Green synthesis of graphene / Ag nanocomposites. *Applied Surface Science*, 261, 753–758. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.08.094>

ANEXO A

PARÁMETROS DE EQUIPOS

PARÁMETROS ESPECTROMETRO UV-Vis

Se utilizó un espectrómetro UV-Vis spectrophotometer 2600 Shimadzu, en el rango de 200 a 900 nm, con celdas de cuarzo, para el blanco se utilizó agua tipo I.

PARÁMETROS DE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (FTIR)

Para los análisis de IR se utilizó un espectrofotómetro con transformada de Fourier FTIR, con celda de ATR para el análisis de la muestra en transmitancia.

PARÁMETROS ESPECTROMETRO RAMAN

Se utilizó un espectrómetro Horiba Scientific LabRAM HR Evolution Raman Spectrometre de distancia focal 600 mm, con filtro para eliminar la radiación Rayleigh y resolución de 1 cm^{-1} . Se utilizó una potencia de 2.5 mW sobre la muestra con la finalidad de no producir aumento de temperatura.

PARÁMETROS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

La caracterización por microscopía electrónica de barrido se realizó con un equipo SEM, Quanta FEG 650, se realizó análisis estructural de la morfología de la estructura comparando la estructura del óxido de grafeno con la estructura del nanocomposito sintetizado, tomando micrografías a diferentes rangos de magnificación además de realizarle un análisis elemental haciendo EDS.

PARÁMETROS DIFRACTOMETRO DE RAYOS X

La toma de datos de difracción se realizó con un difractómetro D8-AVANCE (BRUKER) con geometría DaVinci. Los parámetros están descritos en la tabla A1.

Tabla A1. Parámetros instrumentales para el análisis de materiales por DRX.

PARÁMETRO	DESCRIPCIÓN
Voltaje	40 Kv
Corriente	40 mA
Rendija de divergencia	0.6 mm
Rendijas Soller primario	2.5°
Muestreo	0.02035° 2theta
Rango de medición	3.5-70° 2theta
Radiación	CuK α 1 (1.54059 Å)
Filtro	Níquel
Tipo de barrido	A pasos
Tiempo de muestreo	0.4 segundos
Detector	Lineal LynxEye