

**IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS PARA LA
DETERMINACIÓN DE ALBÚMINA SÉRICA BOVINA MEDIANTE
APAGAMIENTO DE LA FLUORESCENCIA POR ÓXIDO DE GRAFENO**

MILTON JAVIER BETANCOURT PAMPLONA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2013

**IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS PARA LA
DETERMINACIÓN DE ALBÚMINA SÉRICA BOVINA MEDIANTE
APAGAMIENTO DE LA FLUORESCENCIA POR ÓXIDO DE GRAFENO**

MILTON JAVIER BETANCOURT PAMPLONA

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
QUÍMICO**

DIRECTOR:

Dr. ENRIQUE MEJÍA OSPINO, QUÍMICO, *Ph. D.*

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2013

Agradecimientos

Agradezco a mi director de trabajo de grado, Dr. Enrique Mejía, por darme la oportunidad de trabajar con él, por sus consejos y sus aportes, por haberme orientado y apoyado durante mi trabajo de grado.

Agradezco a mi calificadora, Dra. Martha Cecilia Daza, por sus sugerencias y por el tiempo dedicado a evaluar mi proyecto de investigación.

Me gustaría aprovechar esta oportunidad para expresar mi gratitud a la Universidad Industrial de Santander y a la escuela de Química por permitirme acceder a sus instalaciones, tanto académicas como de investigación.

También me gustaría dar gracias a mis colegas de laboratorio por su apoyo incondicional y por hacer de nuestro entorno de trabajo muy amable y agradable. Gracias por todas sus ayudas generosas cuando y donde lo necesitaba.

Por último, me gustaría expresar mi agradecimiento a mi familia por su apoyo mental y financiero, por su apoyo incondicional y por todo el amor que me dan. Sin ellos, este trabajo no se hubiera podido llevar a cabo.

RESUMEN

TITULO: IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE ALBÚMINA SÉRICA BOVINA MEDIANTE APAGAMIENTO DE LA FLUORESCENCIA POR ÓXIDO DE GRAFENO*

AUTOR: Milton Javier Betancourt Pamplona**

PALABRAS CLAVE: Óxido de grafeno; Albúmina de suero bovino; Espectroscopia de fluorescencia; Apagamiento estático; Parámetros termodinámicos.

En este trabajo se presenta la síntesis de óxido de grafeno (GO) y el análisis de su interacción con albúmina de suero bovino (BSA). El GO fue preparado por el método químico y su estructura fue caracterizada por espectroscopia UV-vis, espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR), y determinación del tamaño de partícula mediante dispersión dinámica de la luz (DLS). La interacción entre GO y BSA bajo condiciones fisiológicas simuladas fue analizada por espectroscopia de fluorescencia. Los experimentos se llevaron a cabo a tres temperaturas diferentes (293, 298 y 303 K) y, los resultados demostraron que el GO produjo apagamiento de la fluorescencia de la BSA a través de un mecanismo de apagamiento estático para bajas concentraciones de GO, y un mecanismo de apagamiento combinado (estático y dinámico) para concentraciones altas de GO. Para el mecanismo de apagamiento estático que se da a través de la formación de un complejo entre GO y BSA, fueron determinados la constante de apagamiento de Stern-Volmer (K_{sv}), la constante de enlace (K_a), el número de sitios de enlace (n), y los correspondientes parámetros termodinámicos (ΔH , ΔS y ΔG). Los parámetros termodinámicos, indicaron que fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno fueron las fuerzas intermoleculares dominantes en la estabilización del complejo.

* Proyecto de grado

** Facultad de ciencias. Escuela de química. Director: Enrique Mejía Ospino.

ABSTRACT

TITULO: IMPLEMENTATION OF A METHOD OF ANALYSIS FOR THE DETERMINATION OF BOVINE SERUM ALBUMIN BY FLUORESCENCE QUENCHING FOR GRAPHENE OXIDE *

AUTHOR: Milton Javier Betancourt Pamplona**

KEYWORDS: Graphene oxide; Bovine serum albumin; Fluorescence spectroscopy; Static quenching; Thermodynamic parameters.

In this work is presented the synthesis of graphene oxide (GO) and the analysis of its interaction with bovine serum albumin (BSA). GO was prepared by the chemical method and its structure was characterized by UV-Vis spectroscopy, Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy, and determination of particle's size by dynamic light scattering (DLS).

The interaction between GO and BSA was investigated by the method of fluorescence spectroscopy under simulative physiological conditions. The experiments were conducted at three different temperatures (293, 298 and 303 K) and the results showed that the GO caused the fluorescence quenching of BSA through a static quenching mechanism for low concentrations of GO, and combined quenching mechanism (static and dynamic) to high concentrations of GO.

For static quenching mechanism that is through the formation of a complex between GO and BSA, were determined Stern-Volmer's quenching constant (K_{sv}), the binding constant (K_a), the number of binding sites (n), and the corresponding thermodynamic parameters (ΔH , ΔS and ΔG). The thermodynamic parameters indicated that Van der Waals forces and hydrogen bonds were the dominant intermolecular force in stabilizing the complex.

* College thesis

** Faculty of science. School of chemistry. Director: Enrique Mejía Ospino.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	17
1. MARCO CONCEPTUAL.....	20
1.1. ALBÚMINA	20
1.2. ÓXIDO DE GRAFENO	23
1.3. FLUORESCENCIA	29
1.3.1. APAGAMIENTO DE LA FLUORESCENCIA.....	31
1.3.1.1. Mecanismo Dinámico.....	31
1.3.1.2. Mecanismo Estático	33
1.4. TÉCNICAS INSTRUMENTALES DE ANÁLISIS	36
1.4.1. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.....	36
1.4.2. ESPECTROSCOPIA UV/Vis.....	37
1.4.3. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO FTIR (ATR).....	38
1.4.4. DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ (DLS)	39
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	41
2.1. SÍNTESIS DE GO	41
2.1.1. CARACTERIZACIÓN DE GO	42
2.1.1.1. Espectro UV/Vis.....	42
2.1.1.2. Espectro FTIR (ATR).....	42
2.1.1.3. Medida del tamaño de partícula (DLS).....	43
2.2. ANÁLISIS DE FLUORESCENCIA DEL SISTEMA GO-BSA.....	43
2.2.1. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE GO	44
2.2.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA	45
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
3.1. CARACTERIZACIÓN DE ÓXIDO DE GRAFENO	46
3.1.1. ESPECTRO UV/VIS DEL GO	46
3.1.2. ESPECTRO FTIR (ATR) DE GO.....	47
3.1.3. DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA DE GO.....	48

3.2.	APAGAMIENTO DE FLUORESCENCIA DE BSA INDUCIDO POR GO.....	49
3.2.1.	MECANISMO DE APAGAMIENTO DE FLUORESCENCIA	51
3.2.2.	CONSTANTE DE ENLACE Y NÚMERO DE SITIOS DE ENLACE.....	53
3.2.3.	PARÁMETROS TERMODINÁMICOS Y TIPO DE FUERZA DE INTERACCIÓN ENTRE GO Y BSA.....	55
4.	CONCLUSIONES.....	58
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
	BIBLIOGRAFÍA.....	66
	ANEXOS	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura cristalina de la BSA. Los 583 aminoácidos de la molécula están en forma de corazón y consisten de tres dominios repetidos (rotulados I-III) cada uno de los cuales está dividido en dos sub-dominios (A y B). La estructura tiene un alto contenido α -helical (~67%) y un número inusualmente grande de enlaces disulfuro (17 en total).....	22
Figura 2. Estructuras de (a) diamante y (b) grafito.....	23
Figura 3. Grafeno: padre de todas las formas gráficas.....	25
Figura 4. Óxido de grafeno (GO).	26
Figura 5. Diagrama de energía de Jablonski ilustrando las transiciones entre estados electrónicos de una molécula. Absorción (A, azul, escala de tiempo 10^{-15} s); conversión interna (CI, verde, escala de tiempo 10^{-14} - 10^{-11} s); relajación vibracional (RV, magenta, escala de tiempo 10^{-14} - 10^{-11} s); fluorescencia (F, rojo, escala de tiempo 10^{-9} - 10^{-7} s); cruce intersistema (CIS, púrpura, escala de tiempo 10^{-8} - 10^{-3} s); fosforescencia (P, amarillo, escala de tiempo 10^{-4} - 10^{-1} s).....	29
Figura 6. Gráficas modelo para distinguir entre apagamiento dinámico y estático.	35
Figura 7. Espectrofluorómetro convencional.....	37
Figura 8. Sistema ATR de reflexión múltiple.....	39
Figura 9. Imágen de la dispersión de GO obtenida y del grafito de partida.	46
Figura 10. Espectro UV-vis del GO.....	47

Figura 11. Espectro FT-IR del GO.	48
Figura 12. Distribución de tamaño de las nanocapas de GO.....	49
Figura 13. Efecto de GO en la intensidad de la fluorescencia de la BSA. [BSA] = 2.0×10^{-6} M; [GO]: 0.0 $\mu\text{g/mL}$ (1), 1.0 $\mu\text{g/mL}$ (2), 2.0 $\mu\text{g/mL}$ (3), 3.0 $\mu\text{g/mL}$ (4), 4.0 $\mu\text{g/mL}$ (5), 5.0 $\mu\text{g/mL}$ (6), 6.0 $\mu\text{g/mL}$ (7), 8.0 $\mu\text{g/mL}$ (8), 12.0 $\mu\text{g/mL}$ (9), Se corre de 280 nm a 500 nm. Temperatura 293 K. $\lambda_{\text{ex}} = 275$ nm.....	50
Figura 14. Gráficas de Stern-Volmer a diferentes temperaturas ([BSA]= $2,0 \times 10^{-6}$ M). [GO]: 0.0 $\mu\text{g/mL}$ (1), 1.0 $\mu\text{g/mL}$ (2), 2.0 $\mu\text{g/mL}$ (3), 3.0 $\mu\text{g/mL}$ (4), 4.0 $\mu\text{g/mL}$ (5), 5.0 $\mu\text{g/mL}$ (6), 6.0 $\mu\text{g/mL}$ (7), 8.0 $\mu\text{g/mL}$ (8), 12.0 $\mu\text{g/mL}$ (9).....	52
Figura 15. Regresión del doble logaritmo ($\text{Log} [(F_0-F)/F]$ vs $\text{Log} [\text{GO}]$) a diferentes temperaturas ([BSA]= $2,0 \times 10^{-6}$ M). [GO]: 1.0 $\mu\text{g/mL}$ (1), 2.0 $\mu\text{g/mL}$ (2), 3.0 $\mu\text{g/mL}$ (3), 4.0 $\mu\text{g/mL}$ (4), 5.0 $\mu\text{g/mL}$ (5), 6.0 $\mu\text{g/mL}$ (6).....	55

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Transiciones electrónicas que involucran orbitales moleculares n , σ y π	38
Tabla 2. Condiciones de medida de tamaño de partícula para el GO.....	43
Tabla 3. Parámetros del equipo para la obtención de los espectros de fluorescencia.....	44
Tabla 4. Constantes de apagamiento de Stern-Volmer para la interacción de GO con BSA a tres temperaturas diferentes.	53
Tabla 5. Constantes de enlace K_a y número de sitios de enlace a diferentes temperaturas.....	54
Tabla 6. Parámetros termodinámicos (ΔH , ΔS y ΔG) del sistema BSA-GO.	56

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Secuencia de aminoácidos de la Albúmina de Suero Humana (HSA), derivada de la secuencia de ADNc ^[13]	71
ANEXO B. Secuencia de aminoácidos de Albúmina de Suero Bovino (BSA), derivada de la secuencia de ADNc. Las posiciones de los enlaces disulfuro y la orientación de los lazos se derivan de los estudios de péptidos ^[13]	73
ANEXO C. Composición de Aminoácidos de las Albúminas Séricas Humana y Bovina ^[13]	75
ANEXO D. Equipo de fluorescencia adaptado con intercambiador de calor.....	76
ANEXO E. Efecto de GO en la intensidad de la fluorescencia de la BSA. [BSA]= 1.0×10^{-6} M; [GO]: 0.0 µg/mL (1), 1.0 µg/mL (2), 2.0 µg/mL (3), 3.0 µg/mL (4), 4.0 µg/mL (5), 6.0 µg/mL (6), 8.0 µg/mL (7), 10.0 µg/mL (8), Se corre de 280 nm a 500 nm. Temperatura 293 K. λ ex = 275 nm.....	77
ANEXO F. Gráfica de Stern-Volmer y número de sitios de unión para BSA de concentración 1×10^{-6} M a 20 °C (293 K).....	78
ANEXO G. Intensidades de fluorescencia de BSA 2×10^{-6} M a 340 nm para tres ensayos de apagamiento con GO a 20 °C (293 K).....	79
ANEXO H. Intensidades de fluorescencia de BSA 2×10^{-6} M a 340 nm para tres ensayos de apagamiento con GO a 25 °C (298 K).....	80

ANEXO I. Intensidades de fluorescencia de BSA 2×10^{-6} M a 340 nm para tres ensayos de apagamiento con GO a 30 °C (303 K).....81

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Absorción
DNA	Ácido desoxirribonucleico
BSA	Albúmina de suero bovino
HSA	Albúmina de suero humano
2D	Bidimensional
D	Coefficiente de distribución translacional
K_{SV}	Constante de apagamiento de Stern-Volmer
CI	Conversión interna
CIS	Cruce intersistema
DMF	Dimetilformamida
DLS	Dispersión dinámica de la luz
cDNA	DNA complementario
T1	Estado triplete excitado
F	Fluorescencia
FRET	Fluorescencia de transferencia de energía por resonancia
P	Fosforescencia
PM	Fototubo multiplicador
HOPG	Grafito pirolítico altamente ordenado
PDI	Índice de polidispersividad
FT-IR (<i>ATR</i>)	Infrarrojo por transformada de Fourier mediante reflectancia total atenuada
μL	Micro-litro
μm	Micrómetro
μM	Micro-molar
mL	Mili-litro
M	Molar (mol/L)
nm	Nanómetro

CNTs	Nanotubos de carbono
NMP	N-metilpirrolidina
GO	Óxido de grafeno
RV	Relajación vibracional
RMN	Resonancia magnética nuclear
T	Temperatura absoluta
THF	Tetrahidrofurano
Trp	Triptófano
UV	Ultravioleta

INTRODUCCIÓN

La estructura de este trabajo se puede organizar en tres aspectos que comprenden: una proteína de estudio (albúmina de suero bovino), un ligando de interacción con la proteína (óxido de grafeno) y una técnica instrumental para el análisis de la interacción entre ellos (fluorescencia). A continuación se dará una breve descripción de estos.

- Albúmina de suero

La albúmina de suero ha sido una de las proteínas más extensamente estudiadas durante muchos años. La albumina es la proteína más abundante en el plasma sanguíneo con una concentración típica de 50 g/L ^[1]. Entre sus funciones se encuentran: (i) ser el principal transportador de ácidos grasos que son insolubles en el plasma circulatorio ^[2], (ii) ser también capaz de enlazarse a una gran variedad de metabolitos y drogas, (iii) regulación de la presión osmótica coloidal de la sangre, esta proporciona alrededor del 80% de la presión osmótica y (iv) es responsable de mantener el pH de la sangre ^[3]. Las extraordinarias propiedades de enlace de la albúmina se han considerado para el papel central que esta puede jugar en la eficacia y rapidez de liberación de medicamentos ^[3-4].

La albúmina de suero bovino BSA se seleccionó como proteína modelo para este trabajo debido a su importancia biológica, solubilidad en agua (lo cual es importante para estudios de interacción), y por su fácil disponibilidad. Esta contiene 583 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 66411.17 Da, entre ellos, dos residuos triptófano en las posiciones 134 y 212, así como tirosina y fenilalanina, que son residuos aromáticos que presentan fluorescencia intrínseca, sin embargo, el principal responsable de la fluorescencia de la BSA es el triptófano ^[5].

- Óxido de grafeno

Actualmente, la conversión química de grafito a óxido de grafeno (GO) ha surgido como una ruta viable para obtener grafeno de una sola capa en grandes cantidades. El grafeno es el componente estructural base del grafito. Es una monocapa bidimensional (2D) de átomos de carbono de hibridación sp^2 dispuestos en los vértices de una red hexagonal similar a un enrejado de panal de abejas y es el descubrimiento por el cual, Andre Geim and Konstantin Novoselov ganaron el premio nobel de física en 2010 [6]. El grafeno presenta excepcionales propiedades térmicas, ópticas, mecánicas y de transporte de carga, es por esta razón que hoy en día ha atraído enorme atención por sus posibles aplicaciones materiales.

A partir del interés que ha despertado el grafeno, el óxido de grafeno se ha comenzado a estudiar no solo por su parentesco con el grafeno sino, por propiedades únicas que presenta, siendo el GO una molécula ambifílica 2D gigante, que presenta varios grupos funcionales oxigenados así como dobles enlaces C=C en su estructura [7].

- Espectroscopía de fluorescencia

La espectroscopía de fluorescencia se ha aplicado ampliamente para explorar la estructura y propiedades de moléculas en sistemas químicos y biológicos [8]. La técnica de fluorescencia es el método más simple para estudiar la interacción de drogas con biomacromoléculas debido a que esta tiene las ventajas de alta sensibilidad, rapidez y es de fácil implementación [9]. El apagamiento de la fluorescencia es la disminución de la fluorescencia de un analito fluorescente, denominado fluoroforo, por una molécula denominada apagador. El apagamiento se ha utilizado para determinar la ubicación de fluoroforos en macromoléculas con base en la accesibilidad de estos a los apagadores [8]. La intensidad de la fluorescencia de un fluoroforo se puede disminuir a través de diferentes

interacciones moleculares que incluyen, reacciones de estado excitado, rearrreglos moleculares, transferencia de energía, formación de un complejo de estado fundamental y apagamiento colisional [8]. El apagamiento puede ocurrir por diferentes mecanismos, los cuales usualmente se clasifican como apagamiento dinámico y estático. El apagamiento dinámico se refiere al proceso en donde el fluoroforo y el apagador entran en contacto durante la existencia transitoria del estado excitado del fluoroforo. El apagamiento estático se refiere a la formación de un complejo fluoroforo-apagador. En general, los mecanismos dinámico y estático se pueden distinguir por su diferente dependencia de la temperatura [8].

En este trabajo se sintetizó GO, se analizó su interacción con BSA en medio acuoso, mediante la técnica de fluorescencia. Los resultados indicaron que la intensidad de la fluorescencia de la BSA disminuyó gradualmente con el incremento en la concentración de GO, lo que sugiere que el GO interactuó con la BSA y apagó su fluorescencia intrínseca. Finalmente, se llevaron a cabo las medidas de fluorescencia a tres temperaturas diferentes (293, 298 y 303 K), con el fin de determinar el mecanismo de apagamiento y el tipo de fuerza intermolecular involucrado en la interacción entre GO y BSA a partir de parámetros termodinámicos. Entre estos parámetros están: la constante de asociación, el número de sitios de unión y los parámetros termodinámicos básicos como el cambio de entalpía ΔH° , el cambio de entropía ΔS° y el cambio de energía libre ΔG° .

1. MARCO CONCEPTUAL

1.1. ALBÚMINA

Muchos investigadores han estudiado las estructuras, funciones y propiedades de las albúminas séricas (humana, bovina, equina, porcina, de ratas) para comprender sus interacciones con otras moléculas y ligandos. Entre estas, las albúminas humana (HSA) y bovina (BSA) han sido de particular interés, la primera por su importancia en estudios clínicos, metabólicos y genéticos, y la segunda por su papel como una proteína modelo y sus múltiples aplicaciones *in vitro*. Las moléculas y ligandos que han sido estudiados incluyen ácidos grasos, iones metálicos, pigmentos, y numerosos fármacos [10-12].

BSA y HSA son proteínas homologas, BSA y HSA comparten aproximadamente el 76 % de identidad en la secuencia primaria entre sí [11]. Este resultado implica que la BSA y HSA pueden tener funciones biológicas muy similares, y que los estudios realizados con la proteína modelo BSA se puedan aplicar a la HSA.

Características estructurales y propiedades químicas

La característica estructural única de las albúminas de suero humano y bovino, es su patrón de puentes disulfuro, las albúminas humana y bovina tienen cada una 17 puentes disulfuro, este enlace es una característica de las proteínas extracelulares y contribuye a la estabilidad de las proteínas plasmáticas en la circulación. Los 17 puentes disulfuro organizan la secuencia primaria de la proteína en 9 lazos [13] (VER ANEXOS A, B y C).

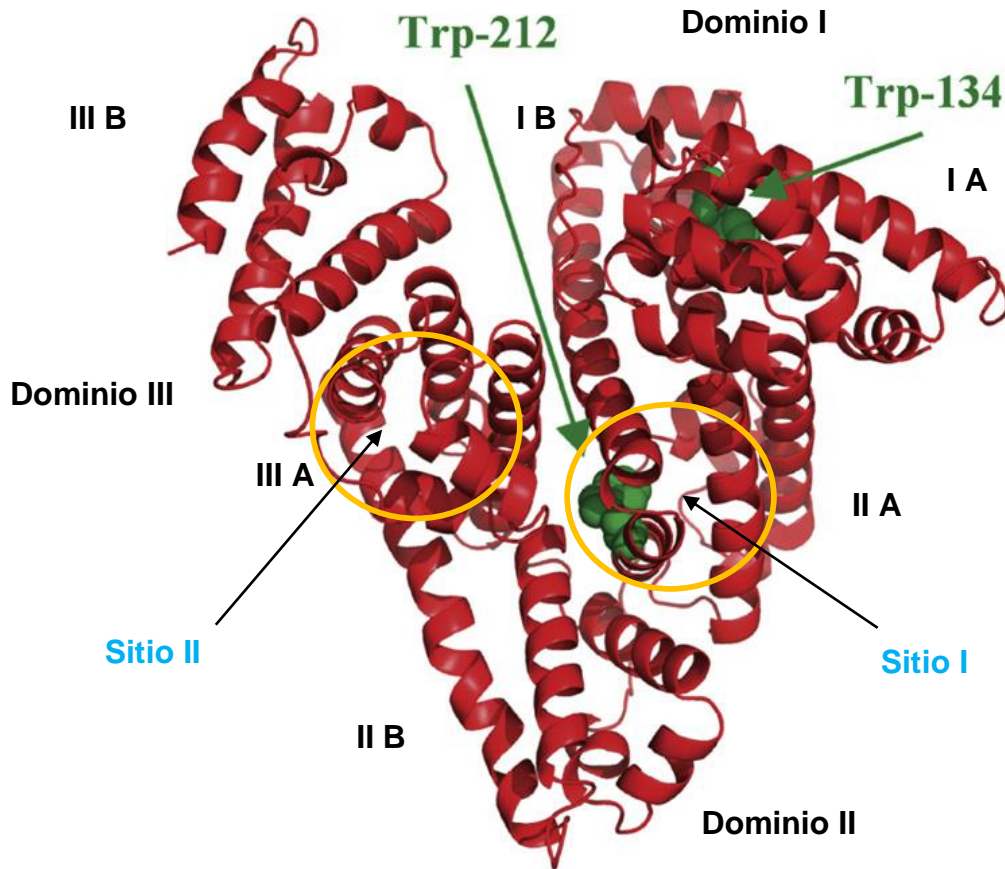
La siguiente característica estructural de las albúminas es que se componen de tres dominios homólogos. Los dominios homólogos suelen ser numerados I, II, y

III, comenzando a contar desde el extremo amino. Cada uno de los dominios comprende dos lazos largos separados por un lazo corto, y se organizan en el orden de largo-corto-largo, largo-corto-largo, largo-corto-largo en los tres dominios (ver anexos A y B). La orientación lineal de los nueve lazos no representa con precisión la disposición en un cristal como se observa por difracción de rayos X (figura 1), pero es útil para visualizar la homología entre los dominios de la molécula, donde se encuentra que comparten entre ellos 18-25% de su composición de aminoácidos [14].

Los tres dominios, aunque homólogos, tienen diferentes funciones de unión al ligando. Dentro de cada dominio los dos primeros lazos, lazos 1-2, 4-5 y 7-8, se agrupan en subdominios IA, IIA y IIIA, respectivamente, y los lazos 3, 6 y 9 son llamados subdominios IB, IIB y IIIB. Este agrupamiento tiene un significado funcional que es evidente en la estructura derivada a partir de estudios de difracción de rayos X, donde se han determinado las regiones de unión en la albumina con diversos tipos de ligandos. Se ha establecido que ligandos aromáticos y heterocíclicos se unen dentro de las dos cavidades hidrófobas en subdominios IIA y IIIA (sitios I y II figura 1), ácidos grasos se unen en los subdominios IB, IIIA, IIIB, en el dominio II se enlaza con bilirrubina y hemina [15] y, en el extremo amino terminal se enlaza con cationes Cu^{2+} y Ni^{2+} [16]. Esta capacidad de la albumina de suero, de enlazarse con diversos tipos de ligandos en diferentes regiones de unión de la proteína, es su propiedad más interesante.

Si bien hay similitudes importantes entre BSA y HSA en sus composiciones (tabla anexo C), la BSA tiene dos residuos triptófano que poseen fluorescencia intrínseca, Trp-134 en el primer dominio (subdominio IB) y Trp-212 en el segundo dominio (subdominio IIA). Trp-212 está situado dentro de una cavidad de unión hidrofóbica de la proteína y Trp-134 se encuentra en la superficie de la molécula [17]. Por otro lado, la HSA solo tiene un residuo de triptófano que posee fluorescencia intrínseca Trp-214, dentro del subdominio IIA, cavidad hidrofóbica.

Figura 1. Estructura cristalina de la BSA. Los 583 aminoácidos de la molécula están en forma de corazón y consisten de tres dominios repetidos (rotulados I-III) cada uno de los cuales está dividido en dos sub-dominios (A y B). La estructura tiene un alto contenido α -helical (~67%) y un número inusualmente grande de enlaces disulfuro (17 en total).



Adaptado de la referencia 17.

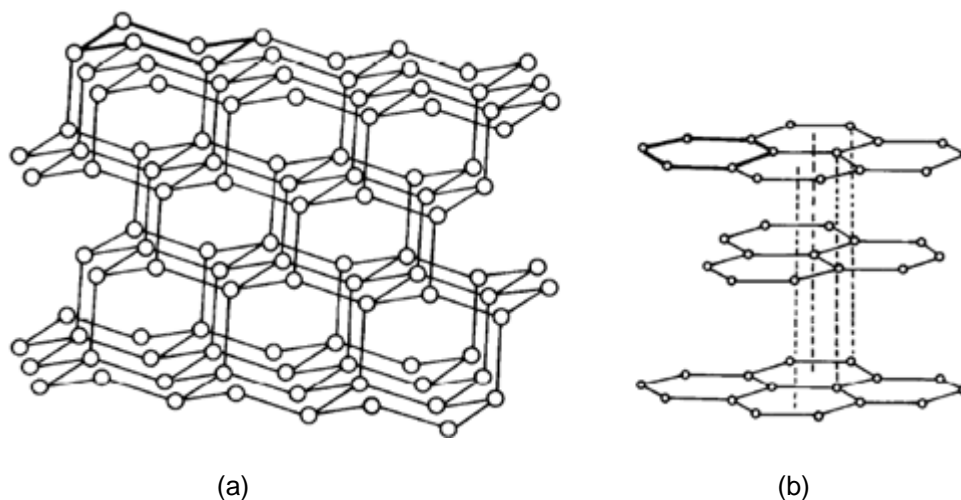
1.2. ÓXIDO DE GRAFENO

Antes de describir al GO es necesario mencionar su precursor o materia prima (grafito), así como al material que le ha hecho ganar importancia en estudios actuales (grafeno).

- Grafito

El carbono puede existir en varias formas cristalinas diferentes, entre ellas las más tradicionales son el diamante y el grafito.

Figura 2. Estructuras de (a) diamante y (b) grafito.



Adaptado de la referencia 18.

El diamante tiene átomos de carbono sp^3 (de coordinación cuatro) que forman una red tridimensional extendida cuyo motivo es la conformación de silla del ciclohexano, una molécula de anillo de seis miembros plegada ^[18]. El grafito, por otra parte, tiene carbonos sp^2 (de coordinación tres) que forman hojas planas cuyo

motivo es el anillo plano de seis miembros, estas hojas planas se organizan paralelamente entre si y se mantienen unidas por fuerzas de Van der Waals (figura 2). Se debería mencionar aquí que el grafito se considera un apilamiento de grafeno, cuando el número de capas es >10 .

Cuando se oxida el grafito forma óxido de grafito en el que están presentes varios grupos funcionales que contienen oxígeno. El óxido de grafito fue preparado por primera vez mediante la oxidación de grafito con $\text{KClO}_3/\text{HNO}_3$ por el químico de Oxford Brodie en 1859 ^[19]. Staudenmaier modificó este método mediante la adición de un ácido más (H_2SO_4) como agente oxidante ^[20]. Sin embargo, estos dos métodos son lentos y peligrosos. En 1957, Hummers y Offeman ^[21] desarrollaron un método más rápido y seguro para preparar óxido de grafito a partir de grafito en el cual una mezcla esencialmente anhidra de NaNO_3 , H_2SO_4 y KMnO_4 fue usada como agente oxidante.

Con el surgimiento del grafeno, la preparación de óxido de grafito ha revivido y el método de Hummers-Offeman se ha modificado recientemente siendo más efectivo por la adición de etapas pre-oxidativas ^[22].

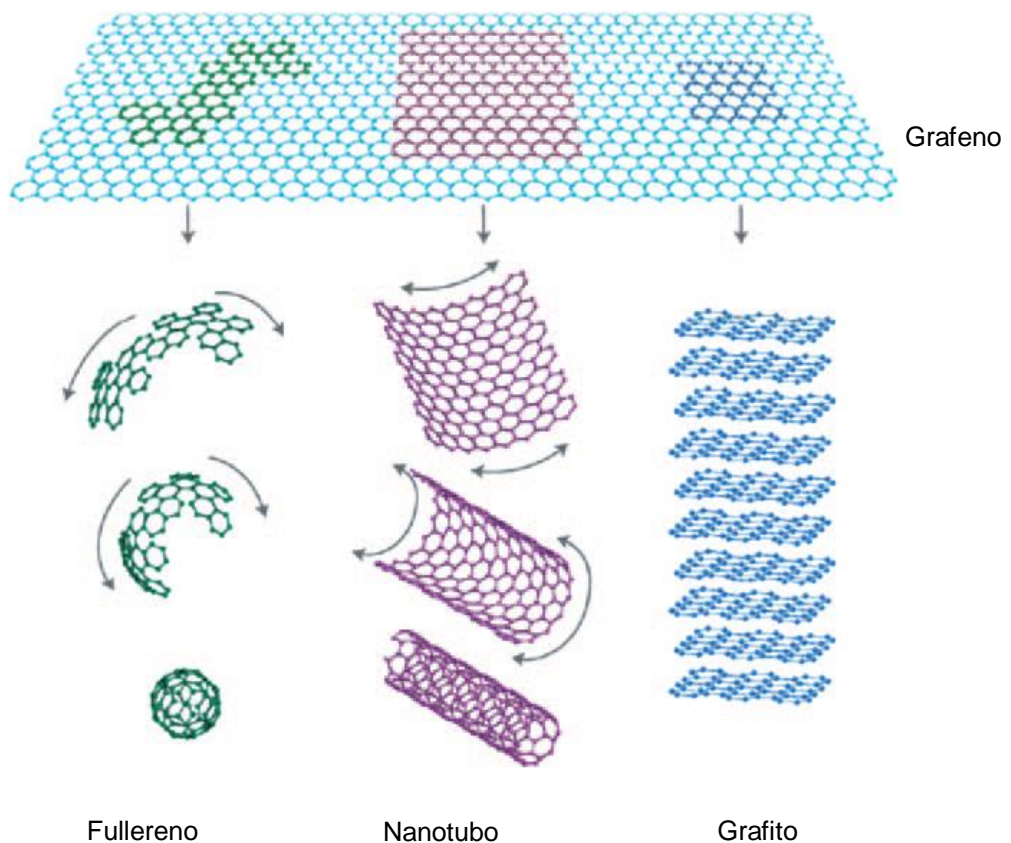
- **Grafeno**

El grafeno es una lámina de solo dos dimensiones (2D) compuesta de átomos de carbono sp^2 empaçados compactamente en un enrejado de panal de abejas. Este se puede ver como el bloque básico de construcción de otros materiales gráfiticos de varias dimensiones. Por ejemplo, se puede envolver para formar fullerenos 0D, enrollarse en nanotubos de carbono metálicos y semiconductores (CNTs), o apilarse para formar grafito semi-metálico 3D ^[23] (Figura 3).

El grafeno de una sola capa fue aislado por primera vez por Novoselov y Geim en 2004. A diferencia de otros alótropos de carbono, el grafeno exhibe propiedades

claramente diferentes. Por ejemplo, el grafeno muestra una notable conductividad térmica, resistencia estructural superlativa, e increíbles propiedades eléctricas [24]. El grafeno fue obtenido inicialmente por el método de ruptura micromecánica, en el cual se aplicó una cinta adhesiva para pelar grafito pirolítico altamente ordenado (HOPG) frotando sobre sustratos de interés (por ejemplo sobre SiO_2) con lo que se obtuvieron pequeñas piezas de grafeno de una sola capa con un tamaño de varios micrones [23]. Este método es impráctico para obtener grafeno en grandes cantidades para aplicaciones en nanoelectrónica, sensores, o materiales de relleno.

Figura 3. Grafeno: padre de todas las formas gráficas.



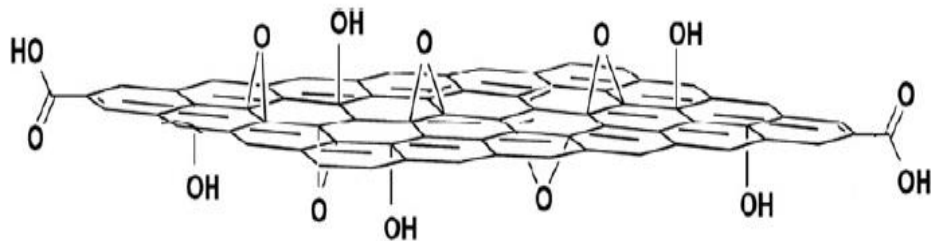
Adaptado de la referencia 23.

Para obtener grandes cantidades de grafeno, actualmente se está utilizando el método químico, en el que se oxida grafito a óxido de grafito. Después del movimiento mecánico o sonicación suave en agua, el óxido de grafito se exfolia a óxido de grafeno. Y por último mediante la reducción del óxido de grafeno se obtiene el grafeno.

- Características del óxido de grafeno

Cuando el óxido de grafito se separa o exfolia en sus hojas individuales se denomina óxido de grafeno (GO), el óxido de grafeno es óxido de grafito de una sola capa (Figura 4).

Figura 4. Óxido de grafeno (GO).



Adaptado de la referencia 25.

El GO es un soporte altamente oxigenado que lleva principalmente grupos hidroxilo y epóxido y en cantidades pequeñas grupos lactol y éster en los átomos de carbono de hibridación sp^3 en el plano basal; además, lleva grupos carbonilo y carboxilo en los átomos de carbono de hibridación sp^2 ubicados en los bordes de la hoja. Por lo tanto, el GO es altamente hidrofílico y por eso es fácilmente

exfoliado en agua, produciendo una dispersión estable que consiste principalmente de hojas de grafeno oxidadas de una sola capa. La estructura química del óxido de grafeno así como el tipo y distribución de grupos funcionales que contienen átomos de oxígeno se ha estudiado mediante RMN con óxido de grafeno marcado con carbono [25].

Propiedades del óxido de grafeno

Dispersabilidad

Las cargas sobre la superficie del óxido de grafeno son altamente negativas cuando está disperso en agua debido a la ionización de los grupos hidroxilo fenólico y ácido carboxílico. Las dispersabilidades del GO en agua son típicamente del orden de 1-4 mg/mL [26]. A partir de medidas de potencial zeta de las dispersiones acuosas de óxido de grafeno se ha comprobado la estabilización electrostática de las hojas de óxido de grafeno en un rango de 4-10 unidades de pH, se encuentran potenciales zeta negativos de 30-50 mV [27]. De esta forma, la formación de coloides estables de óxido de grafeno en agua se atribuye no solo a su hidrofobicidad sino también a la repulsión electrostática.

Por otra parte, el GO también se puede dispersar en solventes orgánicos tales como DMF, NMP y THF [28], es por esto, que el GO se considera ambifílico con el corazón más hidrofóbico y los bordes más hidrofílicos [22], actuando como un surfactante [29].

Higroscopicidad

Los grupos hidroxilo, epóxido, y carboxilo sobre el GO lo hacen muy hidrofílico, y la absorción de moléculas de agua tiende a presentarse en los espacios interlaminares incluso después de un secado prolongado. Así, el GO es bastante higroscópico, con un contenido de agua fuertemente dependiente del nivel de humedad ambiental [30].

Reactividad

La superficie de GO contiene varios grupos funcionales oxigenados que permiten la formación de enlaces covalentes con numerosos reactivos, así como, una gran cantidad de dobles enlaces (C=C). Con base en esto, se pueden realizar diversos tipos de reacciones en la superficie de GO. La adición de otros grupos funcionales directamente sobre el GO, para formar uniones covalentes o no covalentes, cae dentro de otra gran categoría de química del GO. Los grupos funcionales reactivos del GO son los residuos epóxido, hidroxilo, carbonilo, carboxilo y residuos éster [31]. Esta característica del GO sería buena si se pudiera hacer reaccionar selectivamente cada uno de estos grupos y mantener los otros intactos; sin embargo, muchos de esos tipos de reacciones ortogonales no se han demostrado. La mayoría de las funcionalizaciones ocurren sobre más de un tipo de grupos oxigenados y resulta en productos muy complicados con separación y purificación casi imposible.

Toxicidad

Reportes recientes demuestran alta biocompatibilidad del GO. Se ha verificado que el GO no es tóxico para bacterias y células de mamíferos, sin embargo, incorporando nanopartículas de Ag sobre la matriz del GO se activa significativamente su actividad antibacterial [32-34], de esta forma demuestra su inhibición hacia el crecimiento de bacterias con mínima toxicidad en humanos.

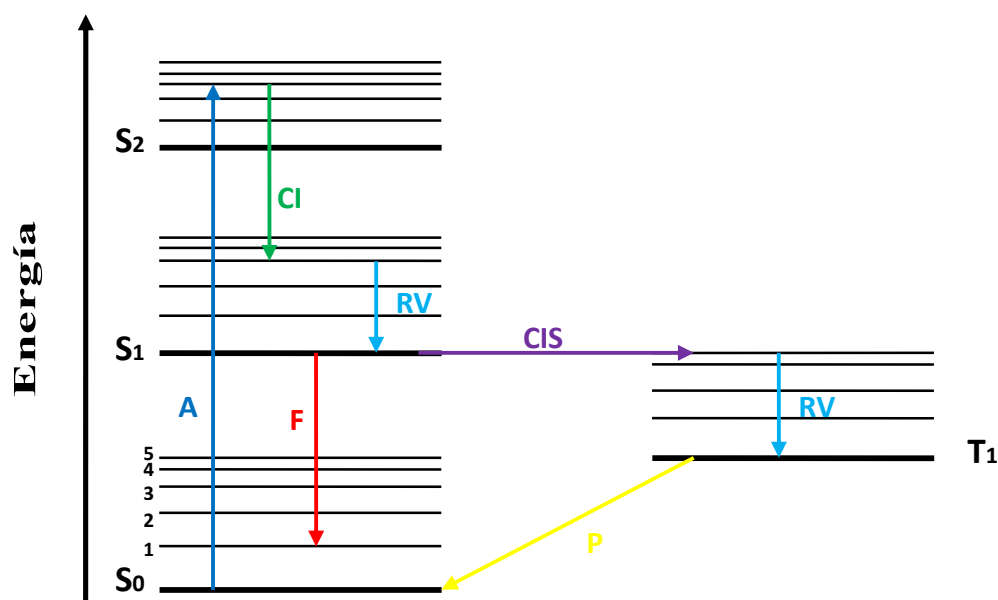
Aplicaciones

Existen numerosos informes en la literatura que sugieren posibles aplicaciones de GO y sus derivados [35-37], específicamente para el GO, como adsorbente para purificación de agua [38], sensores bioquímicos [39] y electroquímica [40].

1.3. FLUORESCENCIA

La fluorescencia es la emisión de energía, en forma de luz a una longitud de onda dada, por una molécula llamada fluoroforo, que ha absorbido energía de una longitud de onda diferente. La manera más simple para explicar los diferentes tipos de procesos de absorción, emisión y conversión que se producen en la fluorescencia es utilizando un diagrama de Jablonski (figura 5) [8].

Figura 5. Diagrama de energía de Jablonski ilustrando las transiciones entre estados electrónicos de una molécula. Absorción (A, azul, escala de tiempo 10^{-15} s); conversión interna (CI, verde, escala de tiempo 10^{-14} - 10^{-11} s); relajación vibracional (RV, magenta, escala de tiempo 10^{-14} - 10^{-11} s); fluorescencia (F, rojo, escala de tiempo 10^{-9} - 10^{-7} s); cruce intersistema (CIS, púrpura, escala de tiempo 10^{-8} - 10^{-3} s); fosforescencia (P, amarillo, escala de tiempo 10^{-4} - 10^{-1} s).



Adaptado de referencia 8.

La fluorescencia (FL) ocurre cuando una molécula en su estado fundamental (S_0) absorbe energía y se excita a un estado electrónicamente excitado (S_1 o S_2). A partir de ahí, la molécula se somete a relajación vibracional (RV) o conversión interna (CI) en la que la energía se emite generalmente en forma de calor (Δ), estos procesos no radiativos conducen rápidamente a la molécula al más bajo nivel vibracional del estado S_1 . A partir de ahí la molécula emite la energía remanente en la forma de un fotón retornando a su estado de energía original (S_0). Puesto que la molécula experimentó un decaimiento no radiativo (generación de calor), el fotón emitido tiene menos energía que el fotón incidente. Este cambio de energía se conoce como corrimiento de Stokes y su magnitud depende del fluoróforo, así como del entorno que le rodea. Por lo tanto, la fluorescencia sólo está presente a longitudes de onda más largas que la longitud de onda de excitación o luz incidente.

La escala de tiempo de la fluorescencia depende de la sustancia exacta y de la energía incidente, pero es mucho más larga que el tiempo transcurrido durante la absorción. El transcurso de tiempo de la absorción es del orden de 10^{-15} s, mientras que el tiempo de vida de la fluorescencia es del orden de 10^{-8} s. El corto tiempo de vida de absorción, de acuerdo con el principio de Franck-Condon, no permite ninguna interacción molecular durante el proceso, mientras que el tiempo de vida relativamente más largo de la emisión de fluorescencia permite una variedad de otras interacciones como el caso del apagamiento que se discute más adelante ^[41].

A partir del más bajo nivel vibracional del más bajo estado excitado, la molécula puede también caer bajo cruce intersistema (CIS), donde el electrón cambia la multiplicidad de espín, tomando un estado excitado triplete, T_1 . Aquí la molécula cae de nuevo bajo relajación vibracional antes de liberar la energía para regresar a su estado fundamental, en un proceso conocido como fosforescencia (P). Esta

transición es “prohibida” por las reglas cuánticas clásicas y como tal la velocidad es mucho menor que la fluorescencia (fosforescencia $10^{-4} - 10^{-1}$ s).

1.3.1. APAGAMIENTO DE LA FLUORESCENCIA

El apagamiento es otro camino para que el fluoróforo excitado se relaje al estado fundamental sin emitir luz. Aquí la energía es transferida de algún modo a otra molécula, partícula o estructura que es capaz de absorber la energía no radiativamente (el apagador). El apagamiento es por lo tanto, un ejemplo de decaimiento no radiativo, que puede ocurrir por varios procesos incluyendo apagamiento colisional o dinámico, apagamiento estático y apagamiento FRET [8]. En todos los casos el proceso resulta en una disminución de la fluorescencia exhibida por el fluoroforo.

1.3.1.1. Mecanismo Dinámico

Para el apagamiento dinámico, todo fluoróforo durante su tiempo de vida de estado excitado (τ), se ve afectado por el proceso de apagamiento, ya que existe la posibilidad de colisión con un apagador. Así, tanto la intensidad de fluorescencia (F) y el tiempo de vida (τ) se reducen con el aumento de la concentración del apagador. El mecanismo bimolecular de apagamiento de la fluorescencia por lo general puede ser descrito por el esquema cinético siguiente [9]:





donde M y M * representan el fluoróforo en su estado fundamental y excitado, respectivamente, Q representa al apagador, Δ el calor, K la constante de velocidad y sus subíndices, (r) proceso radiativo, (nr) no radiativo y (q) apagamiento. En ausencia de apagadores, velocidad de relajación de un fluoróforo excitado, M*, se puede escribir como

$$\frac{d[M^*]}{dt} = -(K_r + K_{nr})[M^*] \quad (\text{Ec. 5})$$

La solución de la ecuación 5 con respecto a las condiciones iniciales, en t=0, [M*] = [M*]₀ es

$$[M^*] = [M^*]_0 e^{-t/\tau_0} \quad (\text{Ec. 6})$$

donde $\tau_0 = 1/(K_r + K_{nr})$, es el tiempo de vida de la fluorescencia en ausencia de cualquier apagador. Por otra parte, si está presente en la solución un agente de apagamiento (Q), la velocidad de relajación de M* queda

$$\frac{d[M^*]}{dt} = -(K_r + K_{nr} + K_q[Q])[M^*] \quad (\text{Ec. 7})$$

Si [Q] >> [M*], hace que [Q] pueda ser tratada como una constante (en la práctica [Q] es varios órdenes de magnitud más grande que [M*]), entonces la ecuación 7 se puede integrar para obtener

$$[M^*] = [M^*]_0 e^{-t/\tau} \quad (\text{Ec. 8})$$

donde $\tau = 1/(K_r + K_{nr} + K_q[Q])$, es el tiempo de vida de la fluorescencia en presencia del apagador. A partir de la relación de tiempos de vida en ausencia y presencia del apagador, tenemos

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_q\tau_0[Q] \quad (\text{Ec. 9})$$

Como ya se mencionó para el apagamiento dinámico, la intensidad de la fluorescencia es proporcional al tiempo de vida de fluorescencia del analito por lo tanto la expresión 9 se puede escribir como

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_q\tau_0[Q] = 1 + K_{SV}[Q] \quad (\text{Ec. 10})$$

donde F_0 y F son las intensidades de fluorescencia en estado estacionario en ausencia y presencia de apagador, respectivamente. La relación entre la intensidad de la fluorescencia y la concentración de apagador (ecuación 10) se conoce como ecuación de Stern-Volmer. Si se mide la intensidad de la fluorescencia (F) (o el tiempo de vida, τ) del fluoróforo en ausencia de apagador y en presencia de cantidades crecientes de apagador, y la relación resultante de las intensidades de fluorescencia (F_0/F) (o τ_0/τ) se representa como una función de la concentración de apagador, $[Q]$, la gráfica resultante (una gráfica de Stern-Volmer) tendrá una intersección de uno, y una pendiente conocida como constante de Stern-Volmer, K_{SV} .

1.3.1.2. Mecanismo Estático

Para el apagamiento estático, únicamente las asociaciones fluoróforo-apagador dan como resultado la reducción de la intensidad de fluorescencia mientras que fluoróforos sin asociación son libres de presentar fluorescencia. El aumento de la

concentración del apagador disminuye la intensidad de fluorescencia (F), debido a que hay más asociaciones, pero no afecta el tiempo de vida de la fluorescencia (τ) debido a que los fluoróforos no asociados pueden presentar fluorescencia con su tiempo de vida de fluorescencia normal. A continuación se presenta un mecanismo de apagamiento estático: Formación de un complejo no fluorescente de estado fundamental, si se considera la formación de un complejo no fluorescente 1:1 (MQ) de acuerdo al equilibrio



En el apagamiento estático, el tiempo de vida del estado excitado del fluoroforo M no se ve afectado, en contraste con el apagamiento dinámico. La intensidad de la fluorescencia de la solución disminuye después de la adición de Q, pero el decaimiento de la fluorescencia después del pulso de excitación no se afecta. Quinonas, hidroquinonas. Purinas y pirimidinas son ejemplos bien conocidos de moléculas responsables de apagamiento estático.

Usando la relación para la constante de estabilidad del complejo

$$K_s = \frac{[MQ]}{[M][Q]} \quad (\text{Ec. 12})$$

y la ley de la conservación de la masa (donde $[M]_0$ es la concentración total de M)

$$M_0 = [M] + [MQ] \quad (\text{Ec.13})$$

Se obtiene la fracción de fluoroforos sin acomplejar

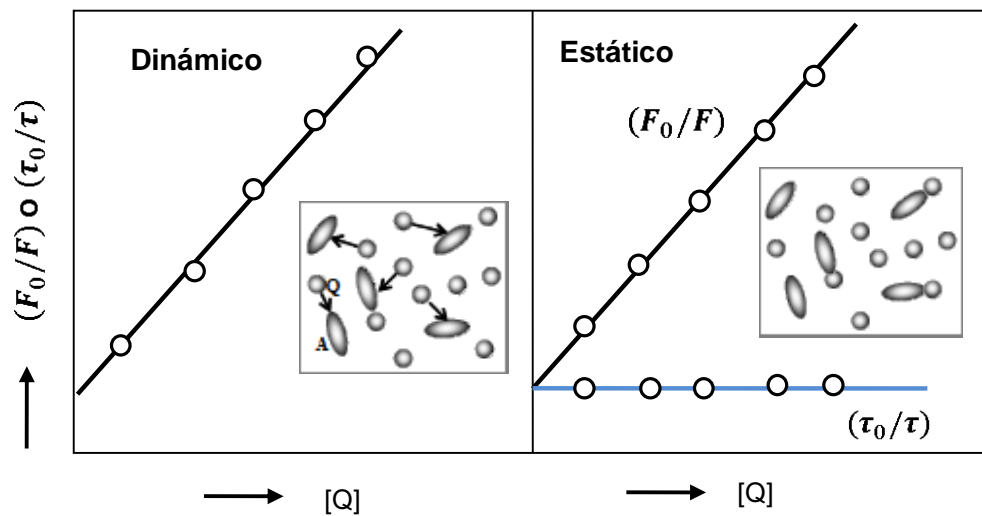
$$\frac{[M]}{[M]_0} = \frac{1}{1 + K_{sv}[Q]} \quad (\text{Ec. 14})$$

Teniendo en cuenta que las intensidades de fluorescencia son proporcionales a la concentración (valido únicamente para soluciones diluidas), esta relación se puede reescribir como

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (\text{Ec. 15})$$

Para determinar si un mecanismo de apagamiento es dinámico o estático, una prueba de diagnóstico consiste en comparar como cambia la forma en la intensidad de fluorescencia y el tiempo de vida en función del aumento de la concentración del apagador (figura 6) [9].

Figura 6. Gráficas modelo para distinguir entre apagamiento dinámico y estático.



Adaptado de referencia 9

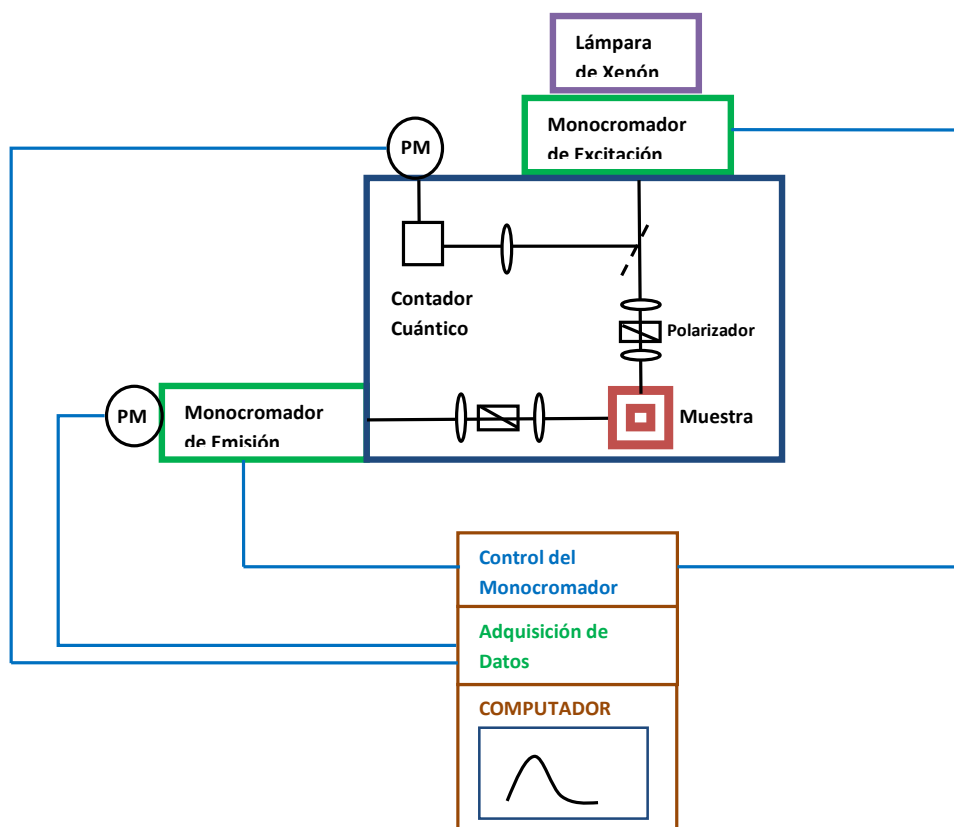
1.4. TÉCNICAS INSTRUMENTALES DE ANÁLISIS

1.4.1. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

La fluorescencia molecular se ha usado para el análisis cuantitativo directo o indirecto de analitos en diferentes matrices. El análisis cuantitativo es posible cuando el rendimiento cuántico de la fluorescencia del analito es favorable. La fluorescencia generalmente es observada en moléculas donde la energía de absorción más baja es una transición $\pi \rightarrow \pi^*$, aunque algunas transiciones $n \rightarrow \pi^*$ presentan una débil fluorescencia [41]. El diseño básico de instrumentación para el monitoreo de la fluorescencia molecular se muestra en la figura 7. El instrumento se compone de una lámpara de xenón que genera un espectro continuo de luz visible y ultravioleta, un monocromador para seleccionar la longitud de onda de excitación, un compartimento para la muestra, y un segundo monocromador acoplado a un tubo fotomultiplicador (PM) para analizar la señal de fluorescencia [42]. La rejilla en el monocromador de excitación y de emisión puede dispersar luz desde 200 hasta 900 nm. Las rendijas de entrada y salida de cada monocromador controlan la intensidad y longitud de onda de la luz de propagación. El monocromador de excitación entrega selectivamente una banda estrecha de longitudes de onda de la luz de excitación que llega a la muestra. Una parte de la luz incidente es absorbida por la muestra fluorescente. La luz emitida entra en el monocromador de emisión, que se coloca en un ángulo de 90° , con respecto a la trayectoria de la luz de excitación para minimizar el riesgo de que la luz incidente transmitida o reflejada alcance el detector.

El espectro de fluorescencia de una muestra se registra haciendo un escaneo del monocromador de emisión para una longitud de onda de excitación constante (λ_{ex}). Del mismo modo, un espectro de excitación se adquiere mediante el escaneo del monocromador de excitación a una longitud de onda de emisión fija (λ_{em}).

Figura 7. Espectrofluorómetro convencional.



Adaptado de la referencia 42.

1.4.2. ESPECTROSCOPIA UV/vis

La espectroscopia UV-vis se utiliza para aplicaciones cualitativas y cuantitativas; en el análisis cualitativo, las bandas de absorción UV/vis se correlacionan con la estructura química del analito. Cuando la molécula o ion absorbe la radiación ultravioleta o visible sufre un cambio en su configuración de electrones de valencia. Los electrones de valencia en estos analitos generalmente, ocupan enlaces sigma, σ , enlaces pi, π y orbitales moleculares no enlazantes, n, cuantizados. Cuatro tipos de transiciones entre niveles de energía cuantizados se

consideran para el espectro molecular UV/Vis [41]. En la Tabla 1 se muestran los intervalos aproximados de longitud de onda para estas absorciones, así como una lista parcial de enlaces, grupos funcionales, o moléculas que dan lugar a estas transiciones. De estas transiciones, las más importantes son $n \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$, porque implican grupos funcionales que son características del analito y longitudes de onda que son fácilmente accesibles. Los enlaces y los grupos funcionales que dan lugar a la absorción de la radiación ultravioleta y visible son llamados cromóforos.

Tabla 1. Transiciones electrónicas que involucran orbitales moleculares n , σ y π .

Transición	Rango de longitud de onda (nm)	Ejemplos
$\sigma \rightarrow \sigma^*$	<200	C-C, C-H
$n \rightarrow \sigma^*$	160-260	H ₂ O, CH ₃ OH, CH ₃ Cl
$\pi \rightarrow \pi^*$	200-500	C=C, C=O, C=N
$n \rightarrow \pi^*$	250-600	C=O, C=N, N=N, N=O

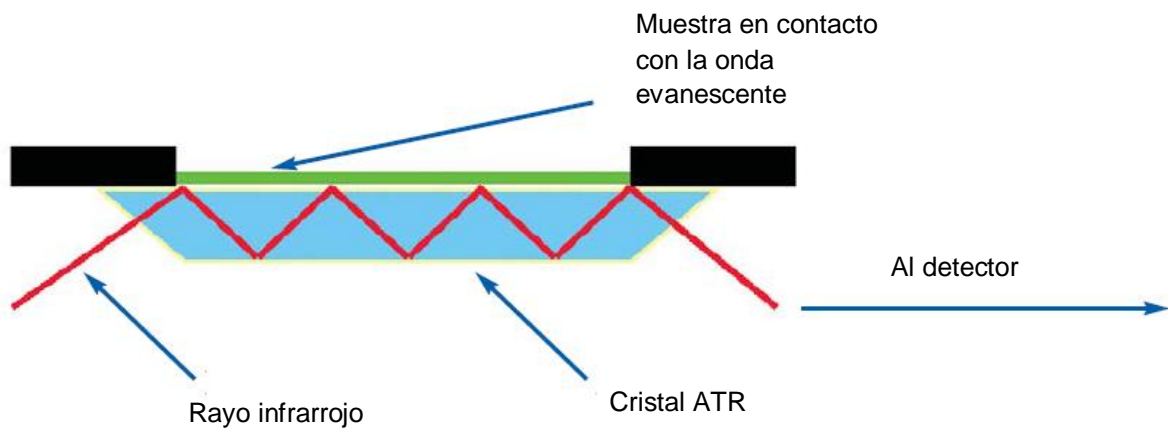
1.4.3. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO FTIR (ATR)

La espectroscopia de infrarrojo empleando la técnica de ATR se utiliza para el análisis superficial de materiales. También sirve para caracterizar materiales, muy concentrados o que absorben fuertemente como para ser analizados mediante espectroscopia de transmisión. Para estos materiales no se requiere una preparación previa de la muestra, para el análisis por ATR, se coloca directamente la muestra pulverizada o en película.

Para esta espectroscopía, la radiación IR se pasa a través de un cristal que tenga un alto índice de refracción (usualmente de ZnSe o Ge), permitiendo así que la radiación se refleje dentro del elemento de ATR varias veces. La radiación IR del espectrómetro entra en el cristal y luego refleja el rayo dentro del mismo y penetra

en una pequeña cantidad de muestra con cada reflexión a lo largo de la superficie mediante la llamada onda "evanescente" o que se desvanece. Al final del cristal, el rayo sale y es dirigido fuera del cristal hacia el espectrómetro (figura 8) [43].

Figura 8. Sistema ATR de reflexión múltiple.



Adaptado de la referencia 43.

1.4.4. DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ (DLS)

La dispersión dinámica de la Luz (DLS) se utiliza para determinar el tamaño de nanopartículas. Se puede calcular su tamaño al medir el movimiento Browniano de las partículas. A tamaños mayores de partículas, menor será el movimiento browniano. La velocidad del movimiento de partícula es definida por el llamado coeficiente de difusión translacional D , a partir del cual se calcula el diámetro hidrodinámico d_H usando la ecuación de Einstein-Stock [44]:

$$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (\text{Ec. 16})$$

donde k es la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta y η la viscosidad del solvente. El diámetro que es obtenido por esta técnica es el diámetro de una esfera que tiene el mismo coeficiente de difusión translacional que la partícula y es así llamado diámetro hidrodinámico. A partir de la distribución de tamaño se obtiene el Índice de polidispersividad (PDI). A valores menores PDI de una muestra, mas monodispersas son las partículas ^[45].

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. SÍNTESIS DE GO

La síntesis se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento implementado por el Químico Iván Gómez ^[46] en su trabajo de pregrado de química en la Universidad Industrial de Santander, este es una modificación al método de Hummers y se describe a continuación.

Se sintetizó óxido de grafito a partir de grafito natural, 0.3 g de grafito se adicionaron a una mezcla de H₂SO₄ 98%, 0.5 g KMnO₄ y 8.0 mL de H₃PO₄ 85%, la solución se mantuvo a 80°C durante 4 horas. Después de dejar decantar por un día la solución obtenida, el producto resultante preoxidado se lavó con agua. Luego, al producto preoxidado se le adicionaron 12 mL de H₂SO₄ del 98%, seguido por adición lenta de 1.5 g de KMnO₄ manteniendo la temperatura <20°C para evitar sobrecalentamiento y explosión, la temperatura de la solución se aumentó a 35 ° C y se mantuvo por 2 horas. Luego se adicionaron 25 mL de agua después de 2 h, se adicionaron 70 mL de H₂O para diluir la solución, y se inyectaron 2 mL de H₂O₂ al 30 % en la solución para que reaccionara con el exceso de KMnO₄ completamente. Se obtuvo una solución amarilla brillante. La mezcla resultante se lavó con HCl y H₂O y se obtuvo el óxido de grafito. El óxido de grafito se dispersó en 100 mL de agua tipo I y subsecuentemente se sonicó para dar GO.

La caracterización se llevó a cabo mediante análisis espectroscópicos UV/VIS y de infrarrojo y medida del tamaño de partícula empleando la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS).

Cuantificación de la dispersión de óxido de grafeno

Para la cuantificación de óxido de grafeno se midió un volumen de 50 mL de la dispersión de GO obtenida y, se transfirió este volumen a una cápsula de porcelana limpia y seca, registrando el peso de la cápsula antes de la adición del GO. Luego, se llevó a sequedad este volumen en un horno a 80 °C hasta obtener un peso constante.

2.1.1. CARACTERIZACIÓN DE GO

2.1.1.1. Espectro UV/Vis

Este análisis se realizó en un espectrofotómetro ultravioleta visible, marca SHIMADZU modelo UV-2401PC, con lámpara de deuterio y un fotomultiplicador R-928; operado en un rango visible 200-800 nm con ancho de banda espectral de 1.0 nm de paso. Se colocó un volumen aproximado de 3 mL de la dispersión de GO obtenida con una concentración de 5.0 µg/mL en una celda de cuarzo de 10 mm de paso óptico.

2.1.1.2. Espectro FTIR (ATR)

La caracterización estructural del óxido de grafeno se realizó mediante espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) en un espectrofotómetro Bruker Tensor 27, empleando la técnica ATR (*Attenuated Total Reflection*). Se puso una pequeña cantidad de GO en polvo sobre el cristal dispuesto en el dispositivo de ATR de tal forma que cubriera todo el cristal. El GO en polvo utilizado para este análisis fue el que se obtuvo en la cuantificación.

2.1.1.3. Medida del tamaño de partícula (DLS)

La medida de tamaño de partícula se realizó en un equipo Zetasizer Nano Series marca MALVERN INSTRUMENT, de acuerdo con los parámetros establecidos en la tabla 2. Se colocó aproximadamente 1.5 mL de una dispersión de GO de concentración 2.0 µg/ml, en una cubeta rectangular de poliestireno de base cuadra (Ref. DTS0012, *Malvern Instrument*).

Tabla 2. Condiciones de medida de tamaño de partícula para el GO.

Número de mediciones	1/1
Temperatura	25 °C
Dispersante	Agua
Índice de refracción del dispersante	1.333

2.2. ANÁLISIS DE FLUORESCENCIA DEL SISTEMA GO-BSA

Los análisis de fluorescencia se realizaron en el espectrofotómetro de fluorescencia PTI/QM-40 (Photon Technology International/Quanta Master) (Figura 6). El equipo cuenta con lámpara de arco de Xenón, rendijas, monocromadores, compartimiento para la muestra, filtros, detector y un computador instalado con el software Felix GX usado para la obtención y análisis de datos de fluorescencia. Además el equipo cuenta con un compartimiento de la muestra que permite hacer análisis de fluorescencia a diferentes temperaturas. El control de temperatura se hace con un termostato.

Los parámetros del equipo de fluorescencia se listan en la tabla 3 y fueron aplicados para obtener los espectros de fluorescencia de cada solución empleada en este trabajo.

Tabla 3. Parámetros del equipo para la obtención de los espectros de fluorescencia.

Ancho de las dos rendijas de excitación	0.5 mm
Ancho de las dos rendijas de emisión	0.25 mm
Tamaño de paso	1 nm
correcciones de excitación y emisión	habilitadas
Ganancia de la señal	4.5
Longitud de onda de excitación	275 nm
Longitud de onda de emisión	280-500 nm; $\Delta\lambda= 220$ nm.

Se dispuso de un volumen aproximado de 3 mL de cada solución preparada (BSA, o BSA-GO), en una en una celda de cuarzo *Starna* con tapón, de camino óptico 10 mm, rectangular, con espesor de base y ventana de 1.25 mm, volumen nominal de 3.5 mL y pulida por las cuatro caras y la base.

Antes de disponer cada solución en la celda fue necesario realizar el lavado de ésta, para evitar que residuos de soluciones anteriores dispuestas en ella, interfirieran en las medidas actuales, para ello se lavó la celda con Extran concentrado, ácido clorhídrico 2 M, abundante agua del grifo y agua tipo I.

Las soluciones de partida para estos análisis fueron: (i) una solución patrón de albumina de concentración 3.0×10^{-5} M que se preparó en agua tipo I a partir de BSA cristalina proporcionada por el Grupo de investigación en Bioquímica y microbiología (GIBIM), y (ii) la solución de óxido de grafeno de concentración 2.12 mg/mL en agua tipo I, obtenida del proceso de síntesis.

2.2.1. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE GO

Las mezclas de las soluciones patrón de albúmina y óxido de grafeno, para el análisis de fluorescencia, se prepararon en balones aforados de 5.0 mL,

añadiendo 1 mL de solución buffer de fosfato-acetato de concentración 0.04 M, se aforaron con agua tipo I, y registraron un pH de 7.20 el cual se midió con un pH metro marca HASH modelo HQ40.

Se fijó la concentración de albúmina en 1.0 μM y se varió la concentración de óxido de grafeno hasta encontrar la concentración necesaria que apagara la fluorescencia de la BSA, lo cual se verificó mediante el registro del espectro de fluorescencia.

2.2.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA

Luego de encontrar el rango de concentración de GO que apaga la fluorescencia de la albúmina de concentración 1.0 μM , se ensayó el apagamiento para una concentración de albúmina de concentración 2.0 μM , con las mismas concentraciones de GO a tres temperaturas diferentes 20, 25 y 30 °C. Para ajustar estas temperaturas se utilizó un circulador de inmersión *Thermo Electron* marca THERMO SCIENTIFIC cuyo montaje se muestra en el Anexo D.

Todas las medidas de fluorescencia para esta parte se realizaron por triplicado para garantizar la reproducibilidad del método y tener datos para el análisis estadístico de los diferentes parámetros calculados.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. CARACTERIZACIÓN DE ÓXIDO DE GRAFENO

Como resultado del proceso de síntesis, se obtuvo una suspensión de óxido de grafeno de color marrón, translúcida, estable y homogénea (figura 9). La concentración de esta dispersión de óxido de grafeno, preparada en agua tipo I, fue de 2.12 mg/mL.

Figura 9. Imágen de la dispersión de GO obtenida y del grafito de partida.



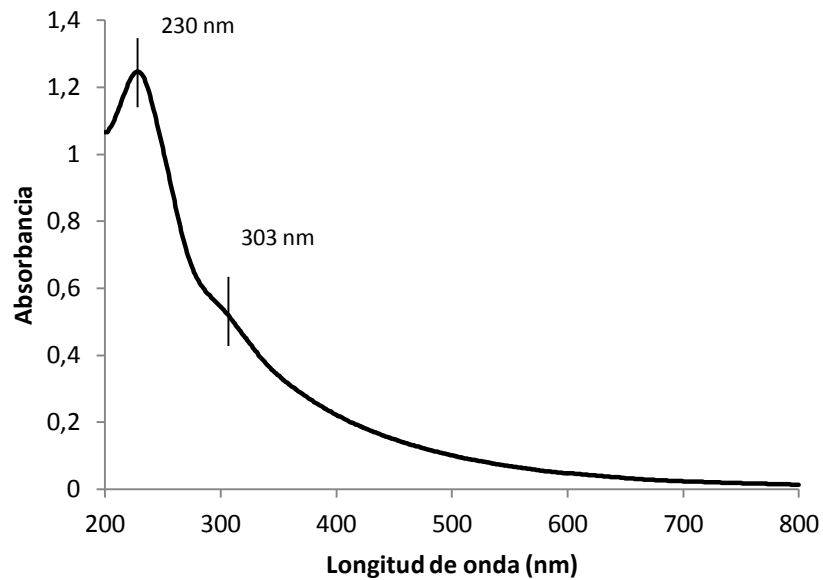
Fuente: autor

3.1.1. ESPECTRO UV/VIS DEL GO

El espectro UV-VIS del GO presentó dos picos característicos como se muestra en la figura 10, un máximo en 230 nm que corresponde a transiciones $\pi-\pi^*$ de los

enlaces C-C aromáticos y un hombro en 303 nm que es atribuido a transiciones $n-\pi^*$ de los enlaces C=O [47].

Figura 10. Espectro UV-vis del GO.



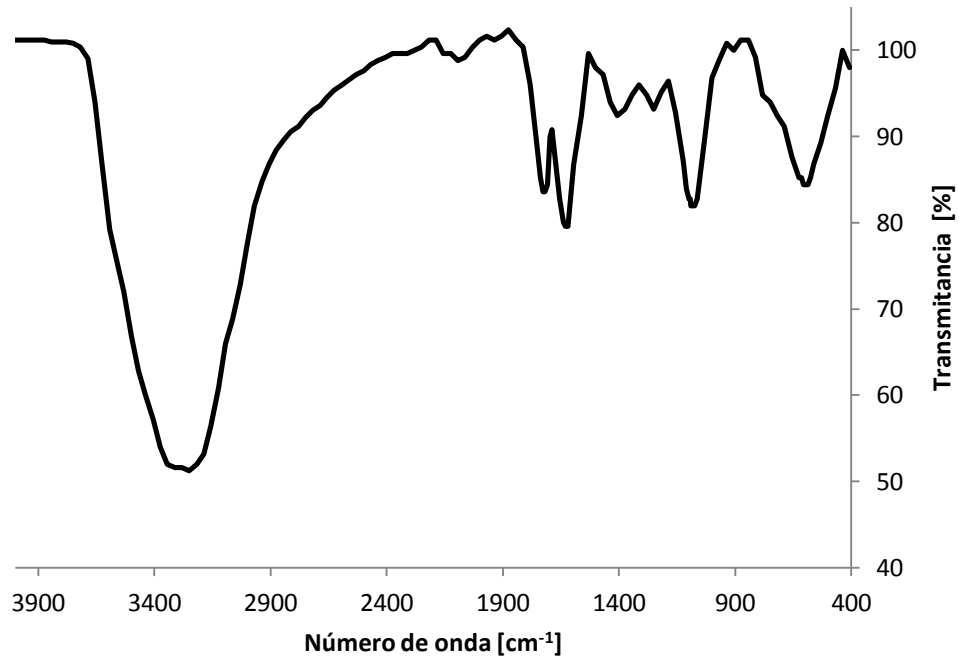
Fuente: autor

3.1.2. ESPECTRO FTIR (ATR) DE GO

En la figura 11 se muestra el espectro FTIR del GO y se detectan los siguientes modos de absorción: 1620 cm^{-1} debido al enlace aromático C=C, 1065 cm^{-1} atribuidas modo de vibración de estiramiento C-O en el grupo alcohol, en 1220 cm^{-1} asignado al estiramiento C-O del grupo epóxido, en 1406 cm^{-1} que proviene de estiramiento C-OH del grupo carboxilo, en 1718 cm^{-1} correspondiente al modo de estiramiento C = O en el grupo carboxilo, y 3300 cm^{-1} de los grupos O-H [48]. Este

resultado indica que el grafito se oxidó con éxito y probablemente se exfolia en forma de GO.

Figura 11. Espectro FT-IR del GO.

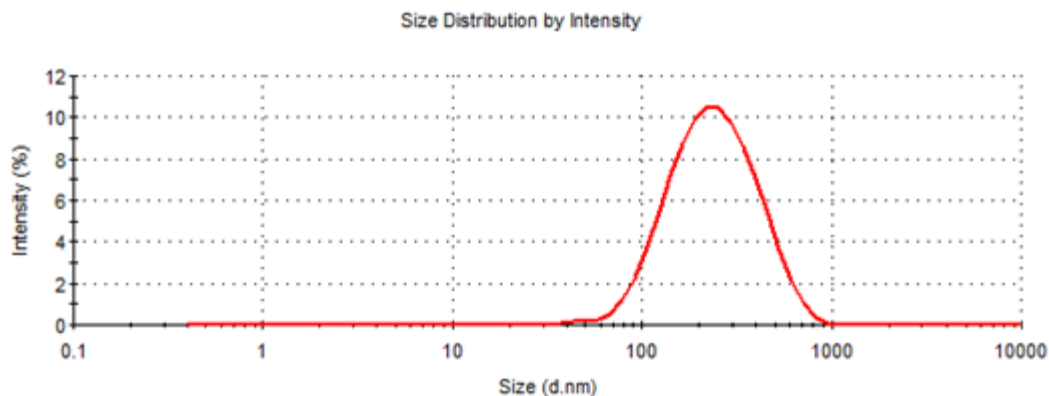


Fuente: autor

3.1.3. DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA DE GO

La gráfica de distribución de tamaño de partícula resultante del GO se muestra en la figura 12. En esta grafica se puede ver que el GO fue homogéneo en tamaño con un diámetro medio de aproximadamente 264.9 nm y una distribución de tamaño estrecha (PDI = 0.242) ^[45].

Figura 12. Distribución de tamaño de las nanocapas de GO.



Fuente: autor

3.2. APAGAMIENTO DE FLUORESCENCIA DE BSA INDUCIDO POR GO

- Espectros de fluorescencia

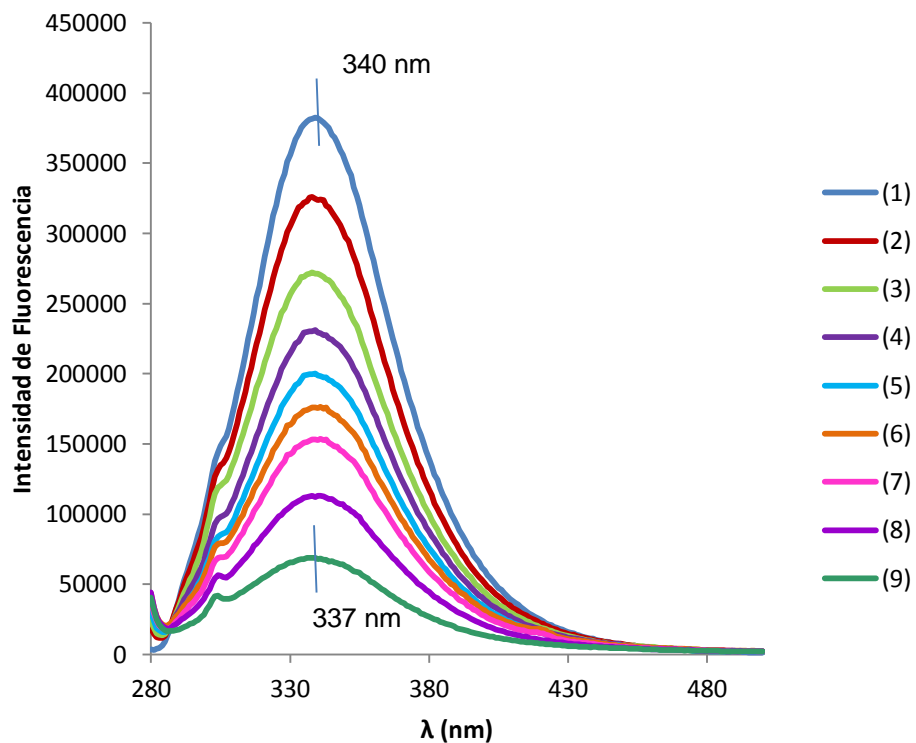
El efecto de la concentración de GO en el apagamiento de la fluorescencia de la BSA a 293 K se muestra en la figura 13. En ella se observa que la BSA exhibe su espectro fluorescente característico en ausencia de GO, es decir, presenta un máximo de emisión en 340 nm al excitar en 275 nm (espectro 1 línea azul).

Tras la adición de GO se puede apreciar que la intensidad de fluorescencia de la BSA disminuye de manera proporcional con el incremento de la concentración de GO.

También se puede observar que la forma del espectro de emisión de la albúmina se conserva tras la adición de GO y que no aparecen otros picos de emisión, lo cual significa, que no hay ninguna emisión de fluorescencia del GO en el rango de medida.

Lo anterior indica que hubo interacción entre GO y BSA y que el efecto de apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la BSA, fue debido a la formación de un complejo no fluorescente.

Figura 13. Efecto de GO en la intensidad de la fluorescencia de la BSA. [BSA] = 2.0×10^{-6} M; [GO]: 0.0 $\mu\text{g/mL}$ (1), 1.0 $\mu\text{g/mL}$ (2), 2.0 $\mu\text{g/mL}$ (3), 3.0 $\mu\text{g/mL}$ (4), 4.0 $\mu\text{g/mL}$ (5), 5.0 $\mu\text{g/mL}$ (6), 6.0 $\mu\text{g/mL}$ (7), 8.0 $\mu\text{g/mL}$ (8), 12.0 $\mu\text{g/mL}$ (9), Se corre de 280 nm a 500 nm. Temperatura 293 K. $\lambda_{\text{ex}} = 275$ nm.



Fuente: autor

Por otra parte, el máximo de emisión se corre hacia longitudes de onda más cortas (corrimiento azul), este cambio es de 340 a 337, para el caso del apagamiento de BSA de concentración 2 μM . Mientras que para el caso de la BSA de

concentración 1 μM el cambio es mayor, de 340 se corre a 332 nm, lo cual indica que se afecta la conformación molecular de la proteína (ANEXO E).

3.2.1. MECANISMO DE APAGAMIENTO DE FLUORESCENCIA

- Stern-Volmer

En general, el mecanismo de apagamiento es usualmente clasificado como proceso estático o dinámico, y estos dos procesos se pueden distinguir por su diferente dependencia de la temperatura, viscosidad y tiempo de vida del estado excitado [8]. De acuerdo con la literatura [8] para el apagamiento dinámico, los valores de K_{SV} incrementan con el aumento de la temperatura. En contraste, el incremento en la temperatura da como resultado la disminución de la estabilidad del complejo para el apagamiento estático, y una disminución de los valores de la constante de apagamiento. El mecanismo de apagamiento se puede distinguir con el uso de la ecuación de Stern-Volmer (ecuación 17), y las gráficas lineales asociadas a diferentes temperaturas [8]:

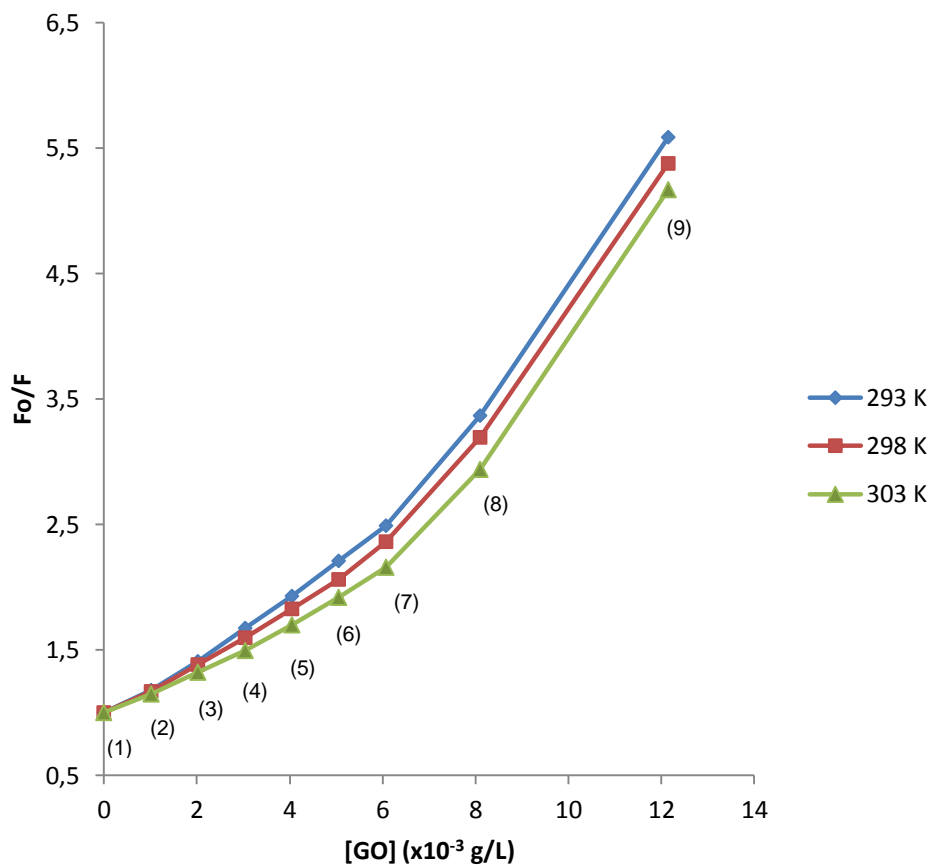
$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (\text{Ec. 17})$$

donde F_0 y F son las intensidades de fluorescencia antes y después de la adición de apagador, respectivamente; K_{SV} es la constante de apagamiento de Stern-Volmer; $[Q]$ es la concentración de ligando (GO en nuestro caso).

Las curvas de Stern-Volmer del sistema GO-BSA a diferentes temperaturas (293, 298 y 303 K) se muestran en la figura 14; en esta gráfica se puede observar que para concentraciones de GO menores a 6,0 $\mu\text{g/mL}$, las curvas fueron lineales, mientras que para concentraciones de GO mayores a 6,0 $\mu\text{g/mL}$, presentaron una

curvatura hacia arriba. Esto demuestra que el tipo de apagamiento es probablemente de un solo tipo (apagamiento estático o dinámico) para bajas concentraciones de GO (menores a 6,0 $\mu\text{g/mL}$). Por otra parte, para concentraciones más altas de GO se podrían obtener apagamiento combinado (estático y dinámico).

Figura 14. Gráficas de Stern-Volmer a diferentes temperaturas ($[\text{BSA}] = 2,0 \times 10^{-6} \text{ M}$). $[\text{GO}]$: 0.0 $\mu\text{g/mL}$ (1), 1.0 $\mu\text{g/mL}$ (2), 2.0 $\mu\text{g/mL}$ (3), 3.0 $\mu\text{g/mL}$ (4), 4.0 $\mu\text{g/mL}$ (5), 5.0 $\mu\text{g/mL}$ (6), 6.0 $\mu\text{g/mL}$ (7), 8.0 $\mu\text{g/mL}$ (8), 12.0 $\mu\text{g/mL}$ (9).



Fuente: autor

En la tabla 4 se presentan los valores de K_{SV} a las temperaturas que se trabajaron, en ella se observa que los valores K_{SV} disminuyen cuando aumenta la temperatura lo que corresponde a un mecanismo de apagamiento estático, y revela la formación de un complejo entre el GO y BSA.

Tabla 4. Constantes de apagamiento de Stern-Volmer para la interacción de GO con BSA a tres temperaturas diferentes.

T (K)	K_{SV} (L/g) ^a	R ^b
293	248.8 ± 7.1	0.9960
298	223.2 ± 7.5	0.9944
303	190.3 ± 6.7	0.9938

^a Los valores de K_{SV} y sus incertidumbres se obtienen a partir de las curvas de regresión lineal y comprenden concentraciones de GO menores a 6,0 µg/mL

^b R es el coeficiente de correlación

3.2.2. CONSTANTE DE ENLACE Y NÚMERO DE SITIOS DE ENLACE

Como ya se determinó que el mecanismo de apagamiento para la interacción de GO con BSA es el apagamiento estático, es útil otra forma de relación entre la intensidad del apagamiento de fluorescencia y la concentración del apagador (ecuación 18), para hallar la constante de enlace para la formación del complejo BSA-GO y el número de sitios de unión de GO a la proteína.

$$\text{Log} \left(\frac{(F_0 - F)}{F} \right) = \text{Log}K_a + n * \text{Log}[Q] \quad (\text{Ec. 18})$$

donde K_a y n son la constante de enlace, y el número de sitios de enlace, respectivamente.

La figura 15 muestra la curva de regresión del doble logaritmo ($\text{Log} [(F_0-F)/F]$ vs $\text{Log} [GO]$). K_a y n a diferentes temperaturas (293, 298 y 303 K) fueron determinados a partir de la pendiente y el intercepto de estas curvas y, en la tabla 5 se da el resultado del cálculo correspondiente. Los resultados obtenidos demuestran que las constantes de enlace para el sistema GO-BSA disminuyen con el incremento en la temperatura, es decir, se presenta una reducción en la estabilidad de los complejos con el aumento en la temperatura ^[49].

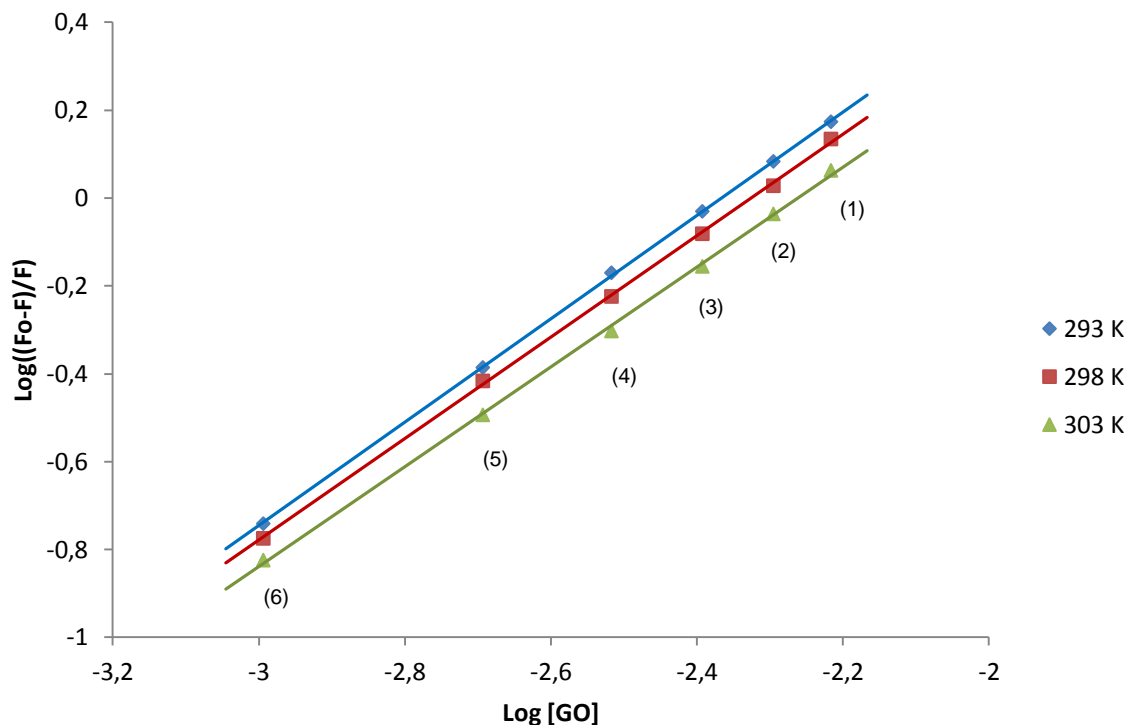
Los valores de n cercanos a 1 hacen inferir que hubo una clase independiente de sitios de unión en la BSA para la molécula de GO, formando el GO y la BSA un complejo de relación molar 1:1.

Tabla 5. Constantes de enlace K_a y número de sitios de enlace a diferentes temperaturas.

T (K)	K_a (L/g)	n	R^a
293	608.9 ± 3.1	1.177 ± 0.006	0.9999
298	485.0 ± 3.9	1.155 ± 0.012	0.9996
303	373.4 ± 4.0	1.137 ± 0.016	0.9992

^a R es el coeficiente de correlación.

Figura 15. Regresión del doble logaritmo ($\text{Log} [(F_0-F)/F]$ vs $\text{Log} [GO]$) a diferentes temperaturas ($[BSA]=2,0 \times 10^{-6} M$). $[GO]$: 1.0 $\mu\text{g/mL}$ (1), 2.0 $\mu\text{g/mL}$ (2), 3.0 $\mu\text{g/mL}$ (3), 4.0 $\mu\text{g/mL}$ (4), 5.0 $\mu\text{g/mL}$ (5), 6.0 $\mu\text{g/mL}$ (6).



Fuente: autor

3.2.3. PARÁMETROS TERMODINÁMICOS Y TIPO DE FUERZA DE INTERACCIÓN ENTRE GO Y BSA

Teniendo en cuenta la dependencia de la constante de enlace (K_a) con la temperatura, se consideró que un proceso termodinámico fue el responsable de la formación del complejo ^[50]. En general, las fuerzas moleculares que contribuyen a

las interacciones de moléculas pequeñas con las proteínas incluyen puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas y, fuerzas electrostáticas ^[51]. Los valores de los parámetros termodinámicos, el cambio de entalpía (ΔH), el cambio en la energía libre (ΔG) y el cambio de entropía (ΔS) pueden ayudar a definir los tipos de fuerza vinculante involucrados ^[52], estos valores se calcularon a partir de las ecuaciones (19), (20) y (21):

$$\ln\left(\frac{K_2}{K_1}\right) = \left(\frac{\Delta H^0}{R}\right)\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right) \quad (\text{Ec. 19})$$

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_a^0 \quad (\text{Ec. 20})$$

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (\text{Ec. 21})$$

donde K es la constante de unión K_a a las temperaturas correspondientes (293, 298, y 303 K), R es la constante universal de los gases. Los valores correspondientes de ΔH , ΔG y ΔS se listan en la tabla 6.

Tabla 6. Parámetros termodinámicos (ΔH , ΔS y ΔG) del sistema BSA-GO.

T (K)	ΔH (KJ mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG (KJ mol ⁻¹)
293		- 59.49 ± 0.05	- 15.62 ± 0.02
298	- 33.05 ± 0.65	- 59.50 ± 0.08	- 15.32 ± 0.02
303		- 59.82 ± 0.08	- 14.92 ± 0.03

En la tabla 6, se observa un valor negativo de ΔH que indica que la formación del complejo BSA-GO fue un proceso de reacción exotérmico, el signo negativo de ΔG

significa que el proceso de unión fue espontáneo y el ΔS negativo indica que el proceso no fue conducido por entropía, sino por entalpía.

Adicionalmente, los valores negativos de ΔH y ΔS indican que están involucradas principalmente fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno en el proceso de formación del complejo GO-BSA ^[53]. El carácter ambifílico del GO haría posible que se presentaran este tipo de interacciones con la BSA. El GO cuenta en su estructura con grupos funcionales oxigenados tales como, carbonilo y carboxilo (regiones hidrofílicas) que le permitirían establecer puentes de hidrógeno con la BSA. Por otra parte, el GO también cuenta en su estructura con dobles enlaces C=C o anillos aromáticos (regiones hidrofóbicas) que podrían hacer que el GO se una a la BSA por medio de fuerzas de Van der Waals.

Otros estudios ^[53-55] sobre las interacciones entre la BSA (o HSA) con otros ligandos, que contienen en su estructura los grupos funcionales que se acaban de mencionar, están en acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo. En ellos, también se determinó que los puentes de hidrógeno y las fuerzas de Van der Waals son las fuerzas intermoleculares dominantes en la formación del complejo proteína-ligando.

4. CONCLUSIONES

- El método de síntesis de GO utilizado fue satisfactorio y permitió obtener una dispersión estable de hojuelas de GO en agua. Estas hojuelas presentaron una distribución de tamaño estrecha alrededor de 269.4 nm y se caracterizaron por medio de sus espectros de absorción UV/Vis y FTIR (*ATR*).
- La interacción entre el GO obtenido y la BSA en medio acuoso se investigó mediante espectroscopia de fluorescencia. Los resultados experimentales indicaron que el GO apaga la fluorescencia intrínseca de la proteína BSA y que este proceso involucra un mecanismo de apagamiento estático (constante de Stern-Volmer, K_{SV} , disminuye con el aumento de la temperatura) para concentraciones de GO menores a 6.0 $\mu\text{g/mL}$.
- Por otra parte, los resultados de los experimentos de fluorescencia, permitieron el cálculo de las constantes de enlace entre GO y BSA, así como la determinación de los sitios de unión para GO en la proteína. Los valores de las constantes de enlace disminuyeron con el aumento de la temperatura dando a entender que reduce la estabilidad del complejo BSA-GO formado al aumentar la temperatura. El número de sitios de enlace en la BSA para el GO fue de 1, indicando que se formó un complejo BSA-GO de relación molar 1:1.
- Los valores experimentales obtenidos para los parámetros termodinámicos, cambio de entalpía (ΔH^0), cambio de entropía (ΔS^0) y cambio en la energía libre (ΔG^0) fueron de $-33.05 \pm 0.65 \text{ KJ mol}^{-1}$, $-59.50 \pm 0.08 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ y $-15.32 \pm 0.02 \text{ KJ mol}^{-1}$ (298 K), respectivamente. Los valores y signos de estos parámetros muestran que la interacción de la proteína con el GO fue

un proceso espontáneo, exotérmico, y que las fuerzas de Van der Waals y los puentes de hidrógeno fueron las interacciones intermoleculares dominantes en la estabilización del complejo GO-BSA.

- Se logró por primera vez la caracterización de la interacción entre la BSA y el GO mediante análisis termodinámico, lo cual es biológicamente importante ya que la albumina sirve como una molécula transportadora para múltiples fármacos, y el GO y sus derivados se están investigando como agentes antibacteriales. Se espera que este estudio sea de utilidad para suministrar información sobre la interacción de la proteína fisiológicamente importante con el óxido de grafeno y sus derivados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CARTER, D. C.; HO, J. X. Structure of Serum Albumin. *Adv. Protein Chem.* 45, (1994). p. 153-203.
- [2] VUSSE, G. J. Albumin as Fatty Acid Transporter. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 24 (4), (2009). p. 300–307.
- [3] DUTTA, S: K.; BASU, S.K.; SEN, K. Binding of Diclofenac Sodium with Bovine Serum Albumin at Different Temperatures, pH and Ionic Strengths. *Indian Journal of Experimental Biology*, 44, (2006). p. 123-127.
- [4] SUŁKOWSKA, A. Interaction of Drugs with Bovine and Human Serum Albumin. *Journal of Molecular Structure* 614, (2002). p. 227–232.
- [5] WANG, Y.Q.; ZHANG, H.M.; ZHANG, G.C.; TAO, W.H.; FEI, Z.H.; LIU, Z.T. Spectroscopic Studies on the Interaction between Silicotungstic Acid and Bovine Serum Albumin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43, (2007). p. 1869.
- [6] WEI, D.; CHUNDI, T. V.; GRANDE, L.; BOWER, C.; RYHÄNEN, T.; ANDREW, P. Graphene for Energy Harvesting/Storage Devices and Printed Electronics. *Particuology* 10, (2012). p. 1– 8.
- [7] KIM, J.; COTE, L. J.; HUANG, J. Two Dimensional Soft Material: New Faces of Graphene Oxide. *Acc. Chem. Res.*, 45(8), (2012). p 1356–1364.
- [8] LAKOWICZ, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd Ed. New York. *Springer*, 2004.
- [9] VALEUR, B. Molecular fluorescence: principles and applications. Weinheim. *Wiley-VCH*, 2002.
- [10] ZHANG, Y.; WILCOX, D. E. Thermodynamic and spectroscopic study of Cu(II) and Ni(II) Binding to Bovine Serum Albumin . *J. Biollnorg. Chem* 7, (2002). p. 327–337.
- [11] HUANG, B. X.; KIM, H. Probing Three-Dimensional Structure of Bovine Serum Albumin by Chemical Cross-Linking and Mass Spectrometry. *J. Am Soc. Mass Spectrom.* 15, (2004). p. 1237-1247.

- [12] SHAIKH, S. M. T.; SEETHARAMAPPA, J.; KANDAGAL, P. B.; MANJUNATHA, D. H.; ASHOKA, S. Spectroscopic Investigations on the Mechanism of Interaction of Bioactive Dye with Bovine Serum Albumin. *Dyes and Pigments* 74, (2007). p. 665-671.
- [13] PETERS, T.; PETERS, T. Jr. All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. 1 edition. London, UK. *Academic Press*, 1996.
- [14] BROWN, J. R. Structural origins of mammalian albumin. *Federation Proceedings* 35, (1976). p. 2141-2144.
- [15] VARSHNEY, A.; SEN, P.; AHMAD, E.; REHAN, M.; SUBBARAO, N.; KHAN, R. H. Ligand Binding Strategies of Human Serum Albumin: How Can the Cargo be Utilized?. *Chirality* 22, (2010). p. 77–8.
- [16] SADLER, P. J.; VILES, J. H. ^1H and ^{113}Cd NMR Investigations of Cd^{2+} and Zn^{2+} Binding Sites on Serum Albumin: Competition with Ca^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} . *Inorg. Chem.*, 35, (1996). p. 4490-4496.
- [17] DAOJIN LI, MEI ZHU, CHEN XU, BAOMING JI. Characterization of the Baicaleine-Bovine Serum Albumin Complex without or with Cu^{2+} or Fe^{3+} by Spectroscopic Approaches. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46, (2011). p. 588-599.
- [18] RAO, C. N. R.; SESHADRI, R.; GOVINDARAJ, A.; SEN, R. Fullerenes, Nanotubes, Onions and Related Carbon Structures. *Materials Science and Engineering*, RI5 95, (1995). p. 209-262.
- [19] SCHINEPP, H. C.; LI, J-L.; Mc CALISTER, M. J.; SAI, H.; HERRERA-ALONSO, M.; ADAMSON, D. H.; PRUDOHOMME, R. K.; SAVILLE, D. A. Functionalized Single Graphene Sheets derived from Splitting Graphite Oxide. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110, (2006). p. 8535-8539.
- [20] DREYER, D. R.; PARK, S.; BIELAWSKI, C. R.; RUOFF, R. S. The Chemistry of Graphene Oxide. *Chem. Soc. Rev.*, 39, (2010). p. 228–240.
- [21] HUMMERS, W. S.; OFFEMAN, R. E. Preparation of Graphitic Oxide. *Journal of the American Chemical society*, 80, (1958). p. 1339.

- [22] KIM, J.; COTE, L. J.; KIM, F.; YUAN, W.; SHULL, K. R.; HUANG, J. Graphene Oxide Sheets at Interfaces. *Journal of the American Chemical Society*, 132(23), (2010). p. 8180-8186.
- [23] NOVOSELOV, K. S.; GEIM A. K. The rise of Graphene. *Nat. Mater.* 6, (2007). 183-191.
- [24] WEI, W.; QU, X. Extraordinary Physical Properties of Functionalized Graphene. *Small* 8, No. 14, (2012). p. 2138–2151.
- [25] KUILA, T.; BOSE, S; MISHRA, A. K.; KHANRA, P.; KIM, N. H.; LEE, J. Chemical Functionalization of Graphene and its Applications. *Progress in Materials Science* 57 (2012). p. 1061–1105.
- [26] KUILA, T.; KHANRA, P.; BOSE, S.; KIM, N.; KU, B.; MOON, B.; LEE J. Preparation of Water-dispersible Graphene by Facile Surface modification of Graphite Oxide. *Nanotechnology*, 22(30), (2011). p. 130-136.
- [27] HUA, X.; YUA, Y.; HOUA, W.; ZHOUB, J.; SONG, L. Effects of Particle Size and pH Value on the Hydrophilicity of Graphene Oxide. *Applied Surface Science* 273 (2013). p. 118– 121.
- [28] PAREDES, J. I.; VILLAR-RODIL, A.; MARTINEZ-ALONSO, A.; TASCÓN, J. M. D. Graphene Oxide dispersions in Organic Solvents. *Langmuir*, 24(19), (2008). p. 10560-10564.
- [29] COTE, L. J.; KIM, J.; TUNG, V. C.; LUO, J. Y.; KIM, F. Graphene Oxide as Surfactant Sheets. *Pure and Applied Chemistry*, 83(1), (2011). p. 95-110.
- [30] DIKIN, D. A.; STANKOVICH, E. J.; ZIMNEY, R. D.; PINER, R. D.; DOMMETT, G.; NGUYEN, S. T.; EVMENENKO, G. Preparation and Characterization of Graphene Oxide paper. *Nature*, 448 (7152), (2007). p. 457-460.
- [31] BAGRI, A. C.; MATTEVI, M.; ACIK, Y. J.; CHABAL. M.; CHWALLA, M.; SHENCY, V. B. Structural Evolution during the Reduction of Chemically derived Graphene Oxide. *Nat. Chem.*, 2(7), (2010). p. 581-587.

- [32] DAS, M. R.; SARMA, R. K.; SENGUPTA, P.; SAIKA, R.K. Synthesis of Silver Nanoparticles in an Aqueous Suspension of Graphene Oxide Sheets and Its Antimicrobial Activity. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 83, (2011). p. 16-22.
- [33] BAO, Q.; ZHANG, D.; QI, P. Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticle and Graphene Oxide Nanosheet Composites as a Bactericidal Agent for water Disinfection. *Journal of Colloid and Interface Science*, 360 (2), (2011). p. 463-470.
- [34] WOJTONISZAK, M.; CHEN, W.; KALENCZUK, R. J.; WAJDA, A.; KALENCZUK, R.; WAIDAB, J.; BOROWIAK-PALEN, E. Synthesis, Dispersion, and Cytocompatibility of Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 89, (2012). p. 79-85.
- [35] GAO, W.; MAJUMDER, M.; ALEMANY, L.B.; NARAYANAN, T.N.; IBARRA, M.A.; PRADHAN, B.K.; AJAYAN, P.M. Engineered Graphite Oxide Materials for Application in Water Purification. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 3(6), (2011). p. 1821-1826.
- [36] LU, H.H.; YANG, C.L.; ZHU, X.; CHEN G.N. A Graphene Platform for Sensing Biomolecules. *Angewandte Chemie-International Edition*, 48 (26), (2009). p. 4785-4787.
- [37] GILJE, S.; HAN, S.; WANG, M.; WANG, K.L.; KANER, R.B. A Chemical Route to Graphene for Device Applications. *Nano Letters*, 7(11), (2007). p. 3394-3398.
- [38] ZHAO, G. ; REN, X.; GAO, X.; TAN, X.; LI, J.; CHEN, C.; HUANG, Y.; WANG, X. Removal Of Pb(II) Ions from Aqueous Solutions on Few-Layered Graphene Oxide Nanosheets. *Dalton Transactions*, 40 (41), (2011). p. 10945-10952.
- [39] CHUN-HUA LU, JUAN LI, XIAO-LONG ZHANG, AI-XIAN ZHENG, HUANG-HAO YANG, XI CHEN, GUO-NAN CHEN. General Approach for

- Monitoring Peptid Protein Interactions Based on Graphen Peptide Complex. *Anal. Chem.* 83, (2011). p. 7276–7282.
- [40] WANG, S.; JIANG, S.P.; WANG, X. Microwave-Assisted One-Pot Synthesis of Metal/Metal Oxide Nanoparticles on Graphene and their Electrochemical Applications. *Electrochem. Acta* 56, (2011). p. 3338.
- [41] SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R.; HOLLE, F. J. Principios de Análisis Instrumental. Sexta edición. Mexico. Cengage Learning Editores, 2008.
- [42] PTI Fluorescence Master System. FelixGX Software User's Manual. PTI, Photon Technology International. Version 2.0 (2009).
- [43] FT-IR Spectroscopy Attenuated Total Reflectance (ATR). Shelton, CT, USA. *Perkin Elmer*, (2005). p. 1-5.
- [44] PHILIPSE, A.P. Notes on Brownian Motion. Utrecht, NL, (2011). p. 5.
- [45] MALVERN INSTRUMENTS. Dynamic Light Scattering: Common Terms Defined. Worcestershire, UK, (2011). p. 1-6.
- [46] GÓMEZ, I. Síntesis Y Caracterización de Grafeno Químicamente Reducido (CRG), empleando Técnicas Espectroscópicas Y Microscopia Electrónica de Barrido. Universidad Industrial de Santander. Escuela de química, (2012). Tesis de pregrado. Director: Enrique Mejía Ospino.
- [47] YAN LIUA B, CHUN-YAN LIUA, YUN LIU. Investigation on Fluorescence Quenching of Dyes by Graphite Oxide and Graphene. *Applied Surface Science*, 257, (2011). p. 5513–5518.
- [48] DONG, H.; GAO, W.; YAN, F.; JI, H.; JU, H. Fluorescence Resonance Energy Transfer between Quantum Dots and Graphene Oxide for Sensing Biomolecules. *Anal. Chem.* 82, (2010). p. 5511-5517.
- [49] DU, W.; TENG, T.; ZHOU, C.; WANG, J. Spectroscopic Studies on the Interaction of Bovine Serum Albumin with Ginkgolic Acid: Bending Characteristics and Structural Analysis. *Journal of luminescence* 132, (2012). p. 1207-1214.

- [50] GUO, J.; DONGHUA, C.; SONG, Z. Determination of the Binding Parameters between Proteins and Luminol by Chemiluminescence Using Flow Injection Technique. *ISRN Analytical Chemistry* (2013). p. 1-5.
- [51] WANG, G.; TANG, W.; HAO, X.; YAN, C. Binding Mechanism of Halide Ions to Bovine Serum Albumin and Hemoglobin: Investigated by Ion Selective-Electrode. *Journal of Biophysical Chemistry* 2, (2011). p. 194-201.
- [52] ZHANG, G.; ZHAO, N.; HU, X.; TIAN, J. Interaction of Alpinetin with Bovine Serum Albumin: Probing of the Mechanism and Binding Site by Spectroscopic Methods. *Spectrochimica Acta Part A* 76, (2010). p. 410–417.
- [53] SHAHABADI, N.; MOHAMMADPOUR, M. The Interaction of Sodium Morin-5-Sulfonate with Bovine Serum Albumin by Spectroscopic Techniques. *Spectrochimica Acta Part A* 86, (2012). p. 191-195.
- [54] GONG, A.; ZHU, X.; HU, Y.; YU, S. A. Fluorescence Spectroscopic Study of the Interaction between Epristeride and Bovin Serum Albumine and its Analytical Application. *Talanta* 73 (2007). p. 668–673.
- [55] MIN, J.; MENG-XIA, X.; DONG, Z.; YUAN, L.; XIAO-YU, L.; XING, C. Spectroscopic Studies on the Interaction of Cinnamic Acid and its Hydroxyl Derivatives with Human Serum Albumin. *Journal of Molecular Structure* 692 (2004). p. 71–80.

BIBLIOGRAFÍA

BAGRI, A. C.; MATTEVI, M.; ACIK, Y. J.; CHABAL, M.; CHWALLA, M.; SHENCY, V. B. Structural Evolution during the Reduction of Chemically derived Graphene Oxide. *Nat. Chem.*, 2(7), (2010). p. 581-587.

BAO, Q.; ZHANG, D.; QI, P. Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticle and Graphene Oxide Nanosheet Composites as a Bactericidal Agent for water Disinfection. *Journal of Colloid and Interface Science*, 360 (2), (2011). p. 463-470.

BROWN, J. R. Structural origins of mammalian albumin. *Federation Proceedings* 35, (1976). p. 2141-2144.

CARTER, D. C.; HO, J. X. Structure of Serum Albumin. *Adv. Protein Chem.* 45, (1994). p. 153-203.

CHUN-HUA LU, JUAN LI, XIAO-LONG ZHANG, AI-XIAN ZHENG, HUANG-HAO YANG, XI CHEN, GUO-NAN CHEN. General Approach for Monitoring Peptid Protein Interactions Based on Graphen Peptide Complex. *Anal. Chem.* 83, (2011). p. 7276–7282.

COTE, L. J.; KIM, J.; TUNG, V. C.; LUO, J. Y.; KIM, F. Graphene Oxide as Surfactant Sheets. *Pure and Applied Chemistry*, 83(1), (2011). p. 95-110.

DAOJIN LI, MEI ZHU, CHEN XU, BAOMING JI. Characterization of the Baicaleine-Bovine Serum Albumin Complex without or with Cu^{2+} or Fe^{3+} by Spectroscopic Approaches. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46, (2011). p. 588-599.

DAS, M. R.; SARMA, R. K.; SENGUPTA, P.; SAIKA, R.K. Synthesis of Silver Nanoparticles in an Aqueous Suspension of Graphene Oxide Sheets and Its Antimicrobial Activity. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 83, (2011). p. 16-22.

DIKIN, D. A.; STANKOVICH, E. J.; ZIMNEY, R. D.; PINER, R. D.; DOMMETT, G.; NGUYEN, S. T.; EVMENENKO, G. Preparation and Characterization of Graphene Oxide paper. *Nature*, 448 (7152), (2007). p. 457-460.

DONG, H.; GAO, W.; YAN, F.; JI, H.; JU, H. Fluorescence Resonance Energy Transfer between Quantum Dots and Graphene Oxide for Sensing Biomolecules. *Anal. Chem.* 82, (2010). p. 5511-5517.

DREYER, D. R.; PARK, S.; BIELAWSKI, C. R.; RUOFF, R. S. The Chemistry of Graphene Oxide. *Chem. Soc. Rev.*, 39, (2010). p. 228–240.

DU, W.; TENG, T.; ZHOU, C.; WANG, J. Spectroscopic Studies on the Interaction of Bovine Serum Albumin with Ginkgolic Acid: Bending Characteristics and Structural Analysis. *Journal of luminescence* 132, (2012). p. 1207-1214.

DUTTA, S: K.; BASU, S.K.; SEN, K. Binding of Diclofenac Sodium with Bovine Serum Albumin at different Temperatures, pH and Ionic Strengths. *Indian Journal of Experimental Biology*, 44, (2006). p. 123-127.

FT-IR Spectroscopy Attenuated Total Reflectance (ATR). Shelton, CT, USA. *Perkin Elmer*, (2005). p. 1-5.

GAO, W.; MAJUMDER, M.; ALEMANY, L.B.; NARAYANAN, T.N.; IBARRA, M.A.; PRADHAN, B.K.; AJAYAN, P.M. Engineered Graphite Oxide Materials for Application in Water Purification. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 3(6), (2011). p. 1821-1826.

GILJE, S.; HAN, S.; WANG, M.; WANG, K.L.; KANER, R.B. A Chemical Route to Graphene for device Applications. *Nano Letters*, 7(11), (2007). p. 3394-3398.

GÓMEZ, I. Síntesis Y Caracterización de Grafeno Químicamente Reducido (CRG), empleando Técnicas Espectroscópicas Y Microscopia Electrónica de Barrido. Universidad Industrial de Santander. Escuela de química, (2012). Tesis de pregrado. Director: Enrique Mejía Ospino.

GONG, A.; ZHU, X.; HU, Y.; YU, S. A. Fluorescence Spectroscopic Study of the Interaction between Epristeride and Bovin Serum Albumine and its Analytical Application. *Talanta* 73 (2007). p. 668–673.

GUO, J.; DONGHUA, C.; SONG, Z. Determination of the Binding Parameters between Proteins and Luminol by Chemiluminescence Using Flow Injection Technique. *ISRN Analytical Chemistry* (2013). p. 1-5.

HUA, X.; YUA, Y.; HOUA, W.; ZHOUB, J.; SONG, L. Effects of Particle Size and pH Value on the Hydrophilicity of Graphene Oxide. *Applied Surface Science* 273 (2013). p. 118– 121.

HUANG, B. X.; KIM, H. Probing Three-Dimensional Structure of Bovine Serum Albumin by Chemical Cross-Linking and Mass Spectrometry. *J. Am Soc. Mass Spectrom.* 15, (2004). p. 1237-1247.

HUMMERS, W. S.; OFFEMAN, R. E. Preparation of Graphitic Oxide. *Journal of the American Chemical society*, 80, (1958). p. 1339.

- KIM, J.; COTE, L. J.; HUANG, J. Two Dimensional Soft Material: New Faces of Graphene Oxide. *Acc. Chem. Res.*, 45 (8), (2012). p 1356–1364.
- KIM, J.; COTE, L. J.; KIM, F.; YUAN, W.; SHULL, K. R.; HUANG, J. Graphene Oxide Sheets at Interfaces. *Journal of the American Chemical Society*, 132(23), (2010). p. 8180-8186.
- KUILA, T.; BOSE, S; MISHRA, A. K.; KHANRA, P.; KIM, N. H.; LEE, J. Chemical Functionalization of Graphene and its Applications. *Progress in Materials Science* 57 (2012). p. 1061–1105.
- KUILA, T.; KHANRA, P.; BOSE, S.; KIM, N.; KU, B.; MOON, B.; LEE J. Preparation of Water-dispersible Graphene by Facile Surface modification of Graphite Oxide. *Nanotechnology*, 22(30), (2011). p. 130-136.
- LAKOWICZ, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd Ed. New York. Springer, 2004.
- LU, H.H.; YANG, C.L.; ZHU, X.; CHEN G.N. A Graphene Platform for Sensing Biomolecules. *Angewandte Chemie-International Edition*, 48 (26), (2009). p. 4785-4787.
- MALVERN INSTRUMENTS. Dynamic Light Scattering: Common Terms Defined. Worcestershire, UK, (2011). p. 1-6.
- MIN, J.; MENG-XIA, X.; DONG, Z.; YUAN, L.; XIAO-YU, L.; XING, C. Spectroscopic Studies on the Interaction of Cinnamic Acid and its Hydroxyl Derivatives with Human Serum Albumin. *Journal of Molecular Structure* 692 (2004). p. 71–80.
- NOVOSELOV, K. S.; GEIM A. K. The rise of Graphene. *Nat. Mater.* 6, (2007). 183-191.
- PAREDES, J. I.; VILLAR-RODIL, A.; MARTINEZ-ALONSO, A.; TASCÓN, J. M. D. Graphene Oxide dispersions in Organic Solvents. *Langmuir*, 24(19), (2008). p. 10560-10564.
- PETERS, T.; PETERS, T. Jr. All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. 1 edition. London, UK. Academic Press, 1996.
- PHILIPSE, A.P. Notes on Brownian Motion. Utrecht, NL, (2011). p. 5.

PTI Fluorescence Master System. FelixGX Software User's Manual. PTI, Photon Technology International. Version 2.0 (2009).

RAO, C. N. R.; SESHADRI, R.; GOVINDARAJ, A.; SEN, R. Fullerenes, Nanotubes, Onions and Related Carbon Structures. *Materials Science and Engineering*, RI5 95, (1995). p. 209-262.

SADLER, P. J.; VILES, J. H. ^1H and ^{113}Cd NMR Investigations of Cd^{2+} and Zn^{2+} Binding Sites on Serum Albumin: Competition with Ca^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} . *Inorg. Chem.*, 35, (1996). p. 4490-4496.

SCHINEPP, H. C.; LI, J-L.; Mc CALISTER, M. J.; SAI, H.; HERRERA-ALONSO, M.; ADAMSON, D. H.; PRUDOHOMME, R. K.; SAVILLE, D. A. Funcionalized Single Graphene Sheets derived from Splitting Graphite Oxide. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110, (2006). p. 8535-8539.

SHAHABADI, N.; MOHAMMADPOUR, M. The Interaction of Sodium Morin-5-Sulfonate with Bovine Serum Albumin by Spectroscopic Techniques. *Spectrochimica Acta Part A* 86, (2012). p. 191-195.

SHAIKH, S. M. T.; SEETHARAMAPPA, J.; KANDAGAL, P. B.; MANJUNATHA, D. H.; ASHOKA, S. Spectroscopic Investigations on the Mechanism of Interaction of Bioactive dye with Bovine Serum Albumin. *Dyes and Pigments* 74, (2007). p. 665-671.

SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R.; HOLLE, F. J. Principios de Análisis Instrumental. Sexta edición. Mexico. Cengage Learning Editores, 2008.

SUŁKOWSKA, A. Interaction of Drugs with Bovine and Human Serum Albumin. *Journal of Molecular Structure* 614, (2002). p. 227–232.

VALEUR, B. Molecular fluorescence: principles and applications. Weinheim. Wiley-VCH, 2002.

VARSHNEY, A.; SEN, P.; AHMAD, E.; REHAN, M.; SUBBARAO, N.; KHAN, R. H. Ligand Binding Strategies of Human Serum Albumin: How Can the Cargo be Utilized? *Chirality* 22, (2010). p. 77–8.

VUSSE, G. J. Albumin as Fatty Acid Transporter. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 24 (4), (2009). p. 300–307.

WANG, G.; TANG, W.; HAO, X.; YAN, C. Binding Mechanism of Halide Ions to Bovine Serum Albumin and Hemoglobin: Investigated by Ion Selective-Electrode. *Journal of Biophysical Chemistry* 2, (2011). p. 194-201.

WANG, S.; JIANG, S.P.; WANG, X. Microwave-Assisted One-Pot Synthesis of Metal/Metal Oxide Nanoparticles on Graphene and their Electrochemical Applications. *Electrochem. Acta* 56, (2011). p. 3338.

WANG, Y.Q.; ZHANG, H.M.; ZHANG, G.C.; TAO, W.H.; FEI, Z.H.; LIU, Z.T. Spectroscopic Studies on the Interaction between Silicotungstic Acid and Bovine Serum Albumin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43, (2007). p. 1869.

WEI, D.; CHUNDI, T. V.; GRANDE, L.; BOWER, C.; RYHÄNEN, T.; ANDREW, P. Graphene for Energy Harvesting/Storage Devices and Printed Electronics. *Particuology* 10, (2012). p. 1– 8.

WEI, W.; QU, X. Extraordinary Physical Properties of Functionalized Graphene. *Small* 8, No. 14, (2012). p. 2138–2151.

WOJTONISZAK, M.; CHEN, W.; KALENCZUK, R. J.; WAJDA, A.; KALENCZUK, R.; WAIDAB, J.; BOROWIAK-PALEN, E. Synthesis, Dispersion, and Cytocompatibility of Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 89, (2012). p. 79-85.

YAN LIUA B, CHUN-YAN LIUA, YUN LIU. Investigation on Fluorescence Quenching of Dyes by Graphite Oxide and Graphene. *Applied Surface Science*, 257, (2011). p. 5513–5518.

ZHANG, G.; ZHAO, N.; HU, X.; TIAN, J. Interaction of Alpinetin with Bovine Serum Albumin: Probing of the Mechanism and Binding Site by Spectroscopic Methods. *Spectrochimica Acta Part A* 76, (2010). p. 410–417.

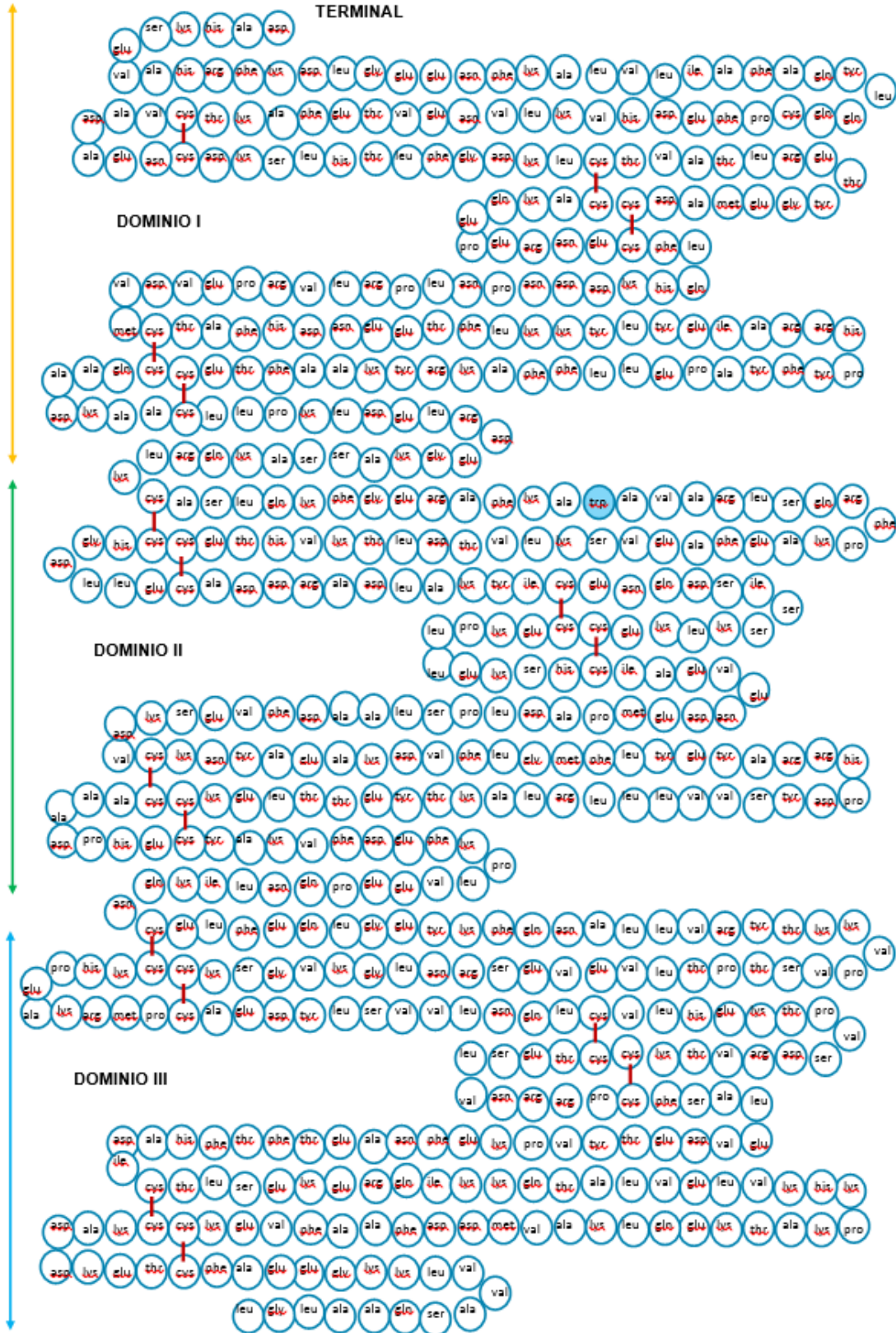
ZHANG, Y.; WILCOX, D. E. Thermodynamic and spectroscopic study of Cu(II) and Ni(II) Binding to Bovine Serum Albumin. *J. Biollnorg. Chem* 7, (2002). p. 327–337.

ZHAO, G. ; REN, X.; GAO, X.; TAN, X.; LI, J.; CHEN, C.; HUANG, Y.; WANG, X. Removal Of Pb(II) Ions from Aqueous Solutions on Few-Layered Graphene Oxide Nanosheets. *Dalton Transactions*, 40 (41), (2011). p. 10945-10952.

ANEXOS

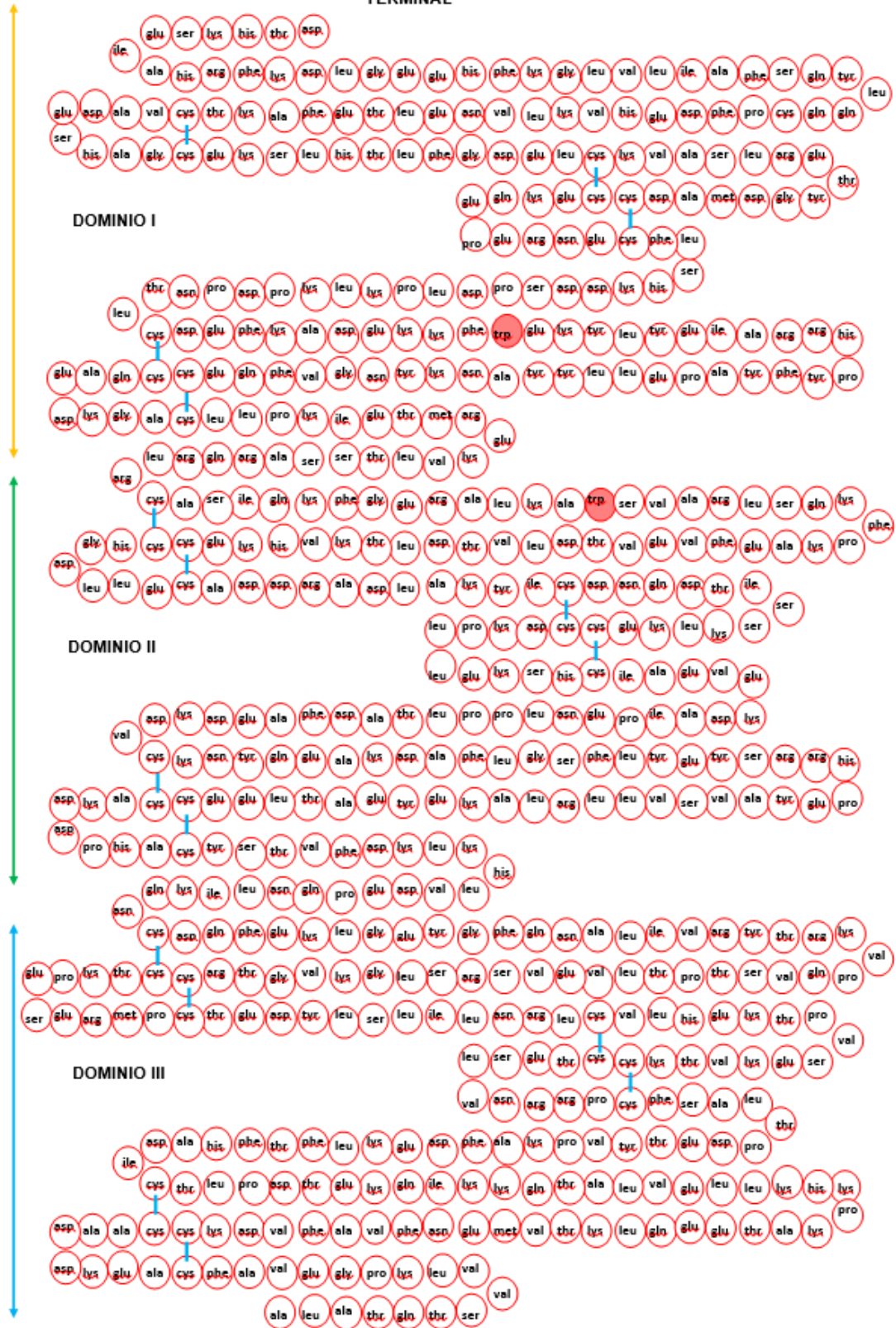
ANEXO A. Secuencia de aminoácidos de la Albúmina de Suero Humana (HSA), derivada de la secuencia de ADNc ^[13].

EXTREMO AMINO
TERMINAL



ANEXO B. Secuencia de aminoácidos de Albúmina de Suero Bovino (BSA), derivada de la secuencia de ADNc. Las posiciones de los enlaces disulfuro y la orientación de los lazos se derivan de los estudios de péptidos ^[13].

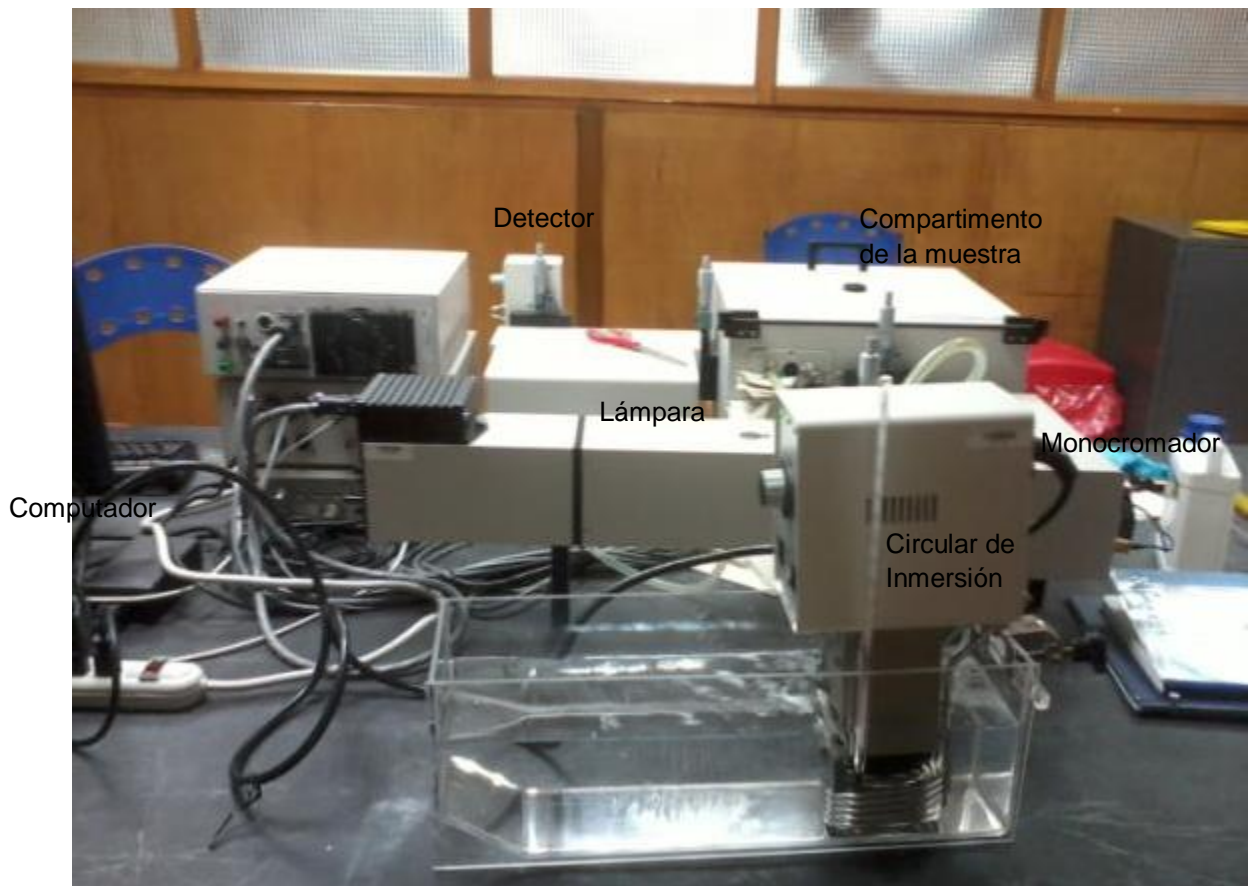
EXTREMO AMINO
TERMINAL



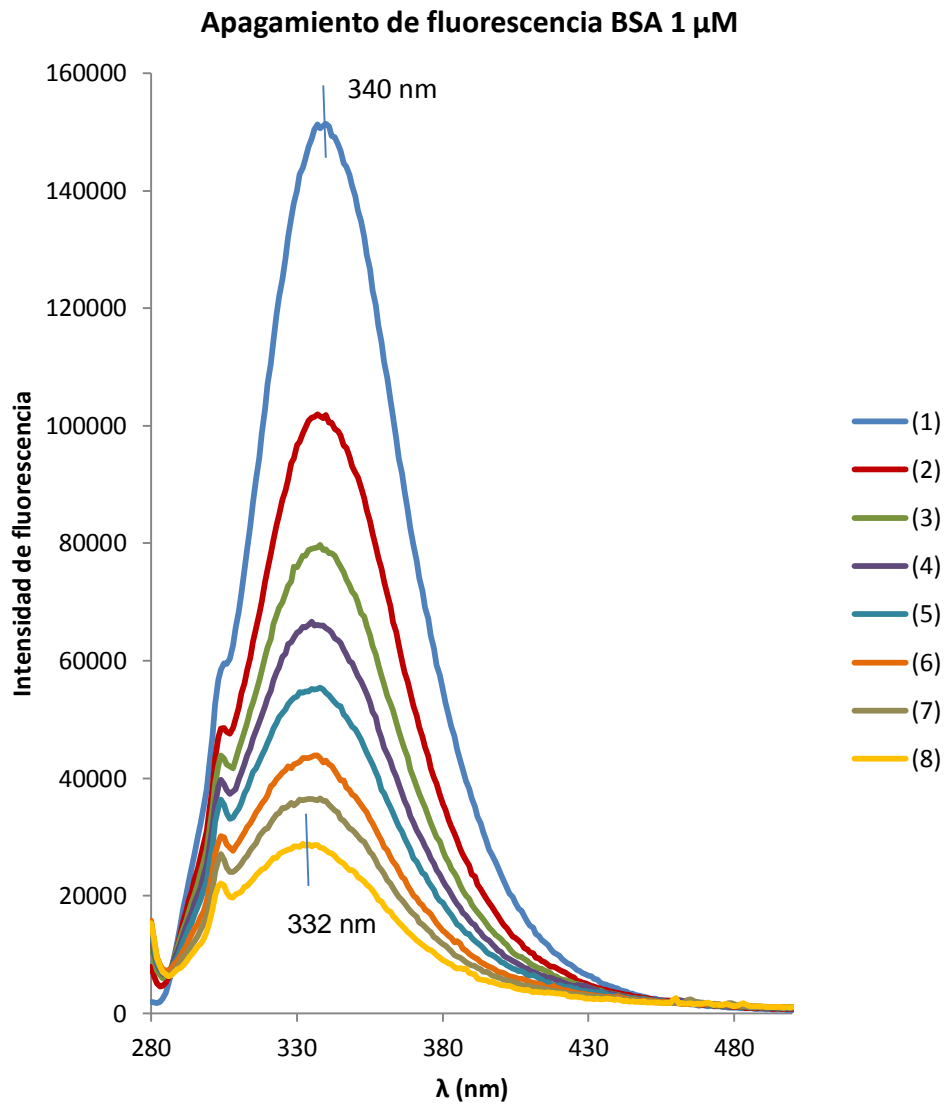
ANEXO C. Composición de Aminoácidos de las Albúminas Séricas Humana y Bovina ^[13].

Aminoácido	Abreviatura	Humana	Bovina
Glicina	gly	12	16
Alanina	ala	62	46
Prolina	pro	24	28
Valina	val	41	36
Leucina	leu	61	61
Isoleucina	ile	8	14
Metionina	met	6	4
Fenilalanina	phe	31	27
Tirosina	tyr	18	20
Triptófano	trp	1	2
Serina	ser	24	28
Treonina	thr	28	34
Cisteina	cys	35	35
Asparagina	asn	17	14
Glutamina	gln	20	20
Lisina	lys	59	59
Arginina	arg	24	23
Hitidina	his	16	17
Ácido aspártico	asp	36	40
Ácido glutámico	glu	62	59
Total		585	583
Peso molecular (Da)		66438.41	66411.17

ANEXO D. Equipo de fluorescencia adaptado con intercambiador de calor.

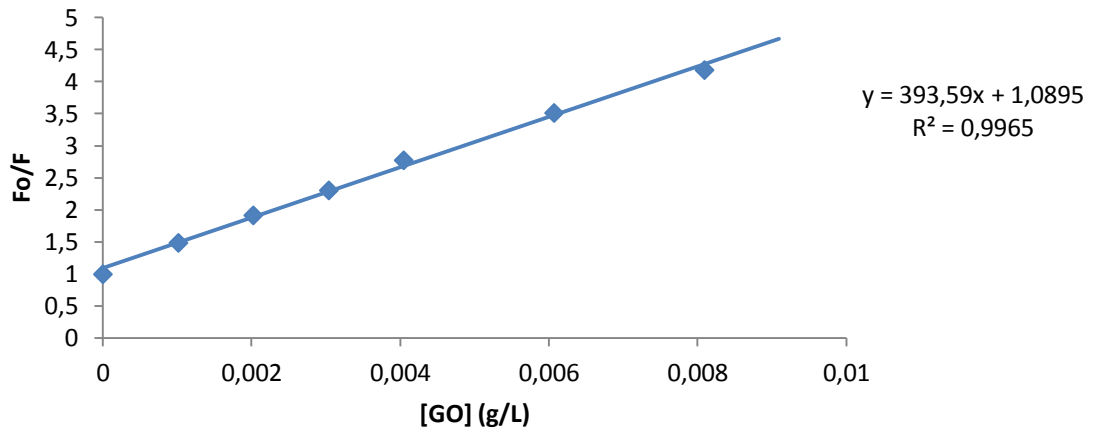


ANEXO E. Efecto de GO en la intensidad de la fluorescencia de la BSA. [BSA]= 1.0×10^{-6} M; [GO]: 0.0 $\mu\text{g/mL}$ (1), 1.0 $\mu\text{g/mL}$ (2), 2.0 $\mu\text{g/mL}$ (3), 3.0 $\mu\text{g/mL}$ (4), 4.0 $\mu\text{g/mL}$ (5), 6.0 $\mu\text{g/mL}$ (6), 8.0 $\mu\text{g/mL}$ (7), 10.0 $\mu\text{g/mL}$ (8), Se corre de 280 nm a 500 nm. Temperatura 293 K. $\lambda_{\text{ex}} = 275$ nm.



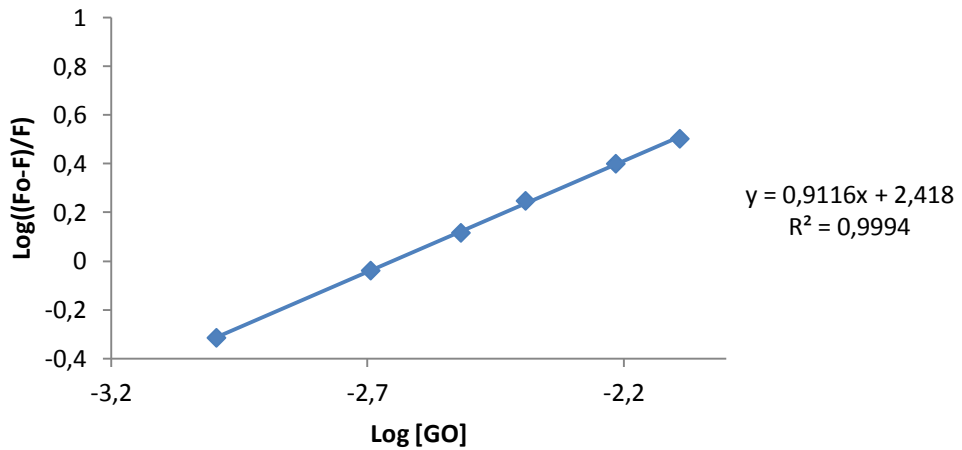
ANEXO F. Gráfica de Stern-Volmer y número de sitios de unión para BSA de concentración 1×10^{-6} M a 20 °C (293 K).

Gráfica de Stern-Volmer



$$K_{SV} = 393.59 \text{ L/g}$$

número de sitios de unión



$$n = 0,9116 ; K_a = 261.8 \text{ L/g} (\text{Log } K_a = 2,418)$$

ANEXO G. Intensidades de fluorescencia de BSA 2×10^{-6} M a 340 nm para tres ensayos de apagamiento con GO a 20 °C (293 K).

[GO] ($\times 10^{-3}$ g/L)	MEDIDA DE FLUORESCENCIA			PROMEDIO
	1	2	3	
0	382444	381671	382008	382041
1,0	323349	322745	323907	323334
2,0	270648	270542	271141	270777
3,0	226947	228058	229143	228049
4,0	198983	195885	198718	197862
5,0	170492	172763	175631	172962
6,0	153883	153292	152851	153342
8,0	113541	113940	113061	113514
12,0	68692	68507	67968	68389

Valores promedio y error absoluto para K_a , ΔG y ΔS a 293 K.

ENSAYO	ΔH (KJ mol $^{-1}$)	K_a (L/g)	ΔG (KJ mol $^{-1}$)	ΔS (J mol $^{-1}$ K $^{-1}$)
1	----	612,02	-15.63	-59,45
2	----	609,25	-15.62	-59,49
3	----	605,48	-15.61	-59,54
PROMEDIO		608,92	-15.62	-59,49
ERROR ABSOLUTO		3,11	0,02	0,047

ANEXO H. Intensidades de fluorescencia de BSA 2×10^{-6} M a 340 nm para tres ensayos de apagamiento con GO a 25 °C (298 K).

	MEDIDA DE FLUORESCENCIA			
[GO] ($\times 10^{-3}$ g/L)	1	2	3	PROMEDIO
0	340241	340832	340736	340603
1,0	291049	291517	292467	291678
2,0	246816	244192	247521	246176
3,0	212623	212463	215053	213380
4,0	186749	184421	187818	186329
5,0	164320	163815	166824	164986
6,0	143710	143803	145082	144198
8,0	106734	106306	106874	106638
12,0	63162	63455	63338	63318

Valores promedio y error absoluto para K_a , ΔH , ΔG y ΔS a 298 K.

ENSAYO	ΔH (KJ mol $^{-1}$)	K_a (L/g)	ΔG (KJ mol $^{-1}$)	ΔS (J mol $^{-1}$ K $^{-1}$)
1	33,50	486,07	-15,32	-59,48
2	31,96	488,88	-15,34	-59,42
3	33,70	480,07	-15,29	-59,58
PROMEDIO	33,05	485,00	-15,32	-59,49
ERROR ABSOLUTO	0,65	3,87	0,02	0,084

ANEXO I. Intensidades de fluorescencia de BSA 2×10^{-6} M a 340 nm para tres ensayos de apagamiento con GO a 30 °C (303 K).

	MEDIDA DE FLUORESCENCIA			
[GO] ($\times 10^{-3}$ g/L)	1	2	3	PROMEDIO
0	288615	292389	284440	288481
1,0	251216	253313	248356	250962
2,0	218722	217598	218955	218425
3,0	191214	192263	194567	192681
4,0	171364	168657	169272	169764
5,0	150865	150526	149134	150175
6,0	133594	133385	134279	133753
8,0	98447	98123	97705	98092
12,0	55800	56292	55337	55810

Valores promedio y error absoluto para K_a , ΔG y ΔS a 303 K.

ENSAYO	ΔH (KJ mol $^{-1}$)	K_a (L/g)	ΔG (KJ mol $^{-1}$)	ΔS (J mol $^{-1}$ K $^{-1}$)
1	----	370,42	-14,90	-59,91
2	----	373,51	-14,92	-59,84
3	----	378,01	-14,95	-59,74
PROMEDIO		373,98	-14,92	-59,83
ERROOR ABSOLUTO		4,03	0,027	0,079