



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

FACULTAD DE CIENCIAS

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA MICROESTRUCTURA A
BASE DE GRAFENO PARA APLICACIÓN DE BIOSENSOR

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

PRESENTA:

VERENICE GRACIELA BAUTISTA ARCE

Tutor Principal

Dr. Mathieu Christian Anne Hautefeuille

Facultad de Ciencias

Comité Tutor

Dr. Juan Arnaldo Hernández Cordero

Instituto de Investigaciones en Materiales

Dra. Luz María López Marín

Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria

A Socorro Arce: mamita gracias por ser mi ejemplo y mi guía en la vida, sin lugar a dudas eres la mujer más optimista que conozco, gracias por cada preocupación que me has brindado, gracias por ser siempre sincera, gracias por ser la mujer con más fortaleza, me haces sentir orgullo, te amo y jamás me alcanzará la vida para devolverte todo lo que me has dado. Este trabajo es un logro más para mi y te lo debo a ti, gracias mami por tu apoyo incondicional en todo lo que emprendo, por tu buen animo aún en los peores momentos y sobre todo por tus enseñanzas. Eres la mujer que me inspira a sonreír aun en los momentos malos.

A Miguel Ángel: mi compañero de vida, desde que te conocí me has enseñado que cada día se puede y se debe ser mejor, gracias por impulsarme cada día, por estar a mi lado en los buenos momentos, pero sobre todo por levantarme en los malos. Tu amor ha sido fundamental para culminar cada meta que me propongo. Te agradezco por tanta ayuda y tu aporte no solo para el desarrollo de mi tesis, sino también en mi vida; eres mi mayor inspiración y mi motivación para llegar al éxito. Quiero librar cada batalla a tu lado, porque eres el mejor hombre que la vida me pudo haber dado. Soy tan afortunada de formar una familia a tu lado.

A Lizeth Arce: hermana aunque se que soy tu ejemplo, tu también me has enseñado tanto. Mi agradecimiento es infinito por todo lo que has hecho por mi, por ser mi mejor amiga, por cuidarme (incluso por cuidar de mi can-hijo), por alimentarme, por acompañarme en mis depresiones y por consolarme. Agradezco que seas mi hermana, mi cómplice, mi confidente y mi persona. Juntas hasta ser polvo.

A mi abue: mi viejta hermosa que ya no esta conmigo, pero que aún en su ausencia me enseñó que cada día se debe vivir como si fuera el último, gracias por ser mi segunda madre, por educarme, por regañarme cuando era necesario, por su silencio que me decía tanto, por ser siempre un ejemplo de mujer trabajadora y una luchadora de la vida, la amo y no sabe cuanto la extraño.

Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas e instituciones que, directa o indirectamente han contribuido a hacer realidad este trabajo.

Agradezco al Dr. Mathieu Christian Anne Hautefeuille por darme la oportunidad de trabajar a su lado, por todo el apoyo, el tiempo, la confianza y la paciencia que me ha brindado y principalmente por impulsarme.

A la Dra. Luz María López Marín por acogerme en su laboratorio, por apoyarme durante mi estancia y por sus enseñanzas en biología . Así mismo al Dr. Juan Hernández Cordero por el apoyo y confianza que recibí. Estoy agradecida por su guía durante estos años.

A mis sinodales por el tiempo me dedicaron, por sus comentarios y aportaciones para enriquecer este trabajo.

Al Fís. Yasab Ruíz Hernández por las mediciones de AFM, la ayuda en la preparación de muestras, la colaboración de trabajo y por la introducción al laboratorio.

Al Fis. Aarón Cruz Ramírez por el apoyo y la capacitación para el uso del equipo de microfabricación láser.

Al M. en C. Ángel Pérez Miguel por la asesoría en circuitos electrónicos, comentarios en el análisis de impedancia y por el apoyo en arduino.

Al M. en I. Jehú López Aparicio y al Dr. Domingo Rangel Miranda por el apoyo y la colaboración en mediciones eléctricas.

A la Fís. María José González Vázquez y Dra. María Cristina Zorrilla Cangas por el apoyo en la medición de la espectroscopia Raman.

A la Ing. Socorro Cruz Ángeles y la Dra. Violeta Álvarez Venicio por la ayuda en las mediciones en las espectroscopías FTIR y UV-VIS.

Al Fis. Diego Zamarrón Hernández por el apoyo en la caracterización por perfi-lometría.

A la Dra. Adriana Tejeda Cruz por el apoyo en la caracterización por difracción de rayos X.

Al Ing. Miguel Ángel Vargas Bezares por sus comentarios, su asesoría en química y apoyo en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Edgar Jiménez Cervantes Amieva y al grupo de *nanobioopteros* por recibirme en su laboratorio y asesorarme durante mi estancia en CFATA.

A todos los miembros del grupo de Micronanotecnología (uNTec) del Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia (LaNS-BioDyT) por ser un gran ejemplo de trabajo en equipo y tener siempre la disposición de ayudar y colaborar.

A CONACYT por el financiamiento en los proyectos 246988 y 280317 y DGAPA-PAPIIT en los proyectos TA100315 e ITI102017.

Resumen

Desde el descubrimiento del grafeno, se ha iniciado una carrera por descubrir una manera de sintetizar grafeno a gran escala para aprovechar las propiedades impresionantes que exhibe, es por ello que el presente trabajo tiene como objetivo principal presentar una vía alterna para la obtención de películas de óxido de grafeno reducido a gran escala de forma rápida y de bajo costo. Se propone reducir óxido de grafeno con un equipo de microfabricación láser que consta de un quemador de disco compacto/ disco versátil digital reciclado. Se lograron obtener microestructuras grabadas de óxido de grafeno reducido térmicamente con la radiación del láser.

Otro objetivo de este trabajo se enfoca en la caracterización de las microestructuras grabadas en función del número de grabados trasladados en una superficie.

Las microestructuras de óxido de grafeno reducido fueron caracterizadas por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier para identificar los grupos funcionales presentes en los materiales; espectroscopía Raman con la finalidad de obtener información estructural, para observar las propiedades ópticas se realizó espectroscopía UV-VIS, con el objetivo de mostrar la topología de las microestructuras obtenidas se realizó microscopía de fuerza atómica, para obtener imágenes de alta resolución de las microestructuras grabadas se realizó microscopía electrónica de barrido además de microscopía óptica. Con la finalidad de identificar cambios en las propiedades eléctricas se realizó medición de impedancia.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos de las diferentes caracteri-

zaciones realizadas a las microestructuras grabadas, que hace constar que las microestructuras grabadas sufrieron una reducción gracias a los grabados láser.

Finalmente a las microestructuras grabadas se les realizó un estudio sobre su posible aplicación como superficie de inmovilización para la identificación de parámetros biológicos (ácidos micólicos, responsables de la Tuberculosis).

Acrónimos

0D	Cero dimensión
1D	Una dimensión
2D	Dos dimensiones
3D	Tres dimensiones
CVD	Deposito químico de vapor (de sus siglas en inglés Chemical Vapor Deposition)
CD	Disco compacto (de sus siglas en inglés Compact Disc)
DVD	Disco Versátil Digital (de sus siglas en inglés Digital Versatile Disc)
OPU	Captor óptico (de sus siglas en inglés Optical Pick-Up)
CCD	Dispositivo de carga acoplada (de sus siglas en inglés Charge Coupled Device)
CNC	Control Numérico Computarizado (de sus siglas en inglés Computer Numerical Control)
GOx	Óxido de Grafeno (de sus siglas en inglés Graphene Oxide)
rGO	Óxido de Grafeno reducido (de sus siglas en inglés Reduced Graphene Oxide)
FTIR	Infrarrojo con Transformada de Fourier (de sus siglas en inglés Fourier Transform Infrared)
NIR	Cerca del infrarrojo (de sus siglas en inglés near Infrared)
MIR	Medio del infrarrojo (de sus siglas en inglés Medium Infrared)
FIR	Lejano del infrarrojo (de sus siglas en inglés Far Infrared)
LA	Longitudinal acústico
LO	Longitudinal óptico

iTA	Transversal acústico en el plano
iTO	Transversal óptico en el plano
oTO	Transversal óptico fuera del plano
oTA	Transversal acústico fuera del plano
EM	Electromagnético
EF	Campos eléctricos (de sus siglas en inglés Electric Field)
MF	Campos magnéticos (de sus siglas en inglés Magnetic Field)
UV-VIS	Ultravioleta-Visible
AFM	Microscopia de Fuerza Atómica (de sus siglas en inglés Atomic Force Microscopy)
SEM	Microscopia Electrónica de Barrido (de sus siglas en inglés Scanning Electron Microscopy)
EDS	Electrones retro-esparcidos
Z	Impedancia
DUT	Dispositivo bajo prueba (de sus siglas en inglés Device Under Test)
ADN	ácido desoxirribonucleico
TB	Tuberculosis
MT	Micobacterium Tuberculosis (de sus siglas en inglés Mycobacterium Tuberculosis)
ALBN	Listas aprobadas de nombres bacterianos (de sus siglas en inglés Approved Lists of Bacterial Names)
PG	Peptidoglicano
AG	Arabinogalactano
MA_s	Ácidos Micolicos (de sus siglas en inglés Mycolic Acids)
PIM	Phosphatidylinositol (de sus siglas en inglés Fatidilinositol)
LAM	Lipoarabinomanano (de sus siglas en inglés lipoarabinomanane)
TLC	Cromatografía de Capa Fina (de sus siglas en inglés Thin-Layer Chromatography)

Índice general

Dedicatoria	iii
Agradecimientos	v
Resumen	vii
Acrónimos	ix
Índice de figuras	xi
Índice de tablas	xiii
1 Introducción	1
1.1 Estructura electrónica del Grafeno	2
1.2 Métodos de obtención de Grafeno	7
1.2.1 Exfoliación mecánica	7
1.2.2 Depósito químico de vapor	7
1.2.3 Crecimiento epitaxial en superficies eléctricamente aislantes.	8
1.2.4 A partir de nanotubos de carbono.	8
1.2.5 Reducción a partir de óxido de grafeno	8
1.2.6 Reducción láser	9
1.3 Microfabricación láser de la estructura	9
1.4 Óxido de grafeno	11

2	Técnicas de caracterización	13
2.1	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier	13
2.1.1	Modos normales	14
2.2	Espectroscopía RAMAN	15
2.2.1	Espectroscopia Raman en Grafeno	18
2.3	UV-VIS	22
2.4	Microscopia de Fuerza Atómica: AFM	27
2.4.1	AFM en modo contacto	28
2.4.2	AFM por modulación de amplitud AM	28
2.4.3	AFM por modulación de frecuencia	29
2.5	Impedancia	30
2.6	SEM	34
3	Resultados experimentales	37
3.1	Obtención del rGO a partir del GOx	37
3.1.1	GOx en presentación pasta	38
3.1.2	GOx en presentación de dispersión	38
3.1.3	Grabado de GOx para obtener rGO	39
3.2	Caracterización del material	42
3.2.1	Espectroscopia FTIR	42
3.2.2	Espectroscopia RAMAN	45
3.2.3	Espectroscopia UV-VIS	50
3.2.4	Impedancia	53
3.2.5	AFM	58
3.2.6	SEM	68
4	Discusión de resultados	73
4.1	Deposito de GOx y grabado	73
5	Conclusiones	77
6	Posible aplicación a la Biofuncionalización del rGO	79
6.1	Inmovilización en la superficie de óxido de grafeno reducido	79
6.2	Tuberculosis	80
6.3	Conclusiones del Capitulo	90
6.4	Direcciones futuras	91
	Bibliografía	93

Índice de figuras

1.1.	a) Red real y b) red reciproca de grafeno.	3
1.2.	Estructura de bandas del grafeno y puntos de Dirac [1].	6
1.3.	Equipo de microfabricación a) posicionamiento de la muestra sobre la Unidad Óptica: OPU, b) posicionamiento vertical c) arreglo de los sensores optoelectronicos y d) fuente de poder.	10
1.4.	Equipo de microfabricación (arreglo mecánico y sistema de visualización) [2].	11
1.5.	a) Estructuras químicas esquemáticas del grafeno, GOx y rGO . b) Ruta para la obtención de rGO	12
2.1.	Señales de esparcimiento Rayleigh, Raman Stokes y Anti-Stokes. [3]	16
2.2.	Proceso de esparcimiento Rayleigh, Raman Stokes y Raman anti-Stokes	17
2.3.	Esparcimiento fonónico en grafeno. Ramas fonónicas LO, iTO, oTO,LA,iTA y oTA [4].	18
2.4.	Espacio reciproco de la celda unidad de grafeno, primera zona de Brillouin [4].	19
2.5.	Eigenvectores de los seis modos normales en centro de la zona de Brillouin [5].	20
2.6.	Espectros Raman de diferentes tipos de nanocarbonos sp^2 a) grafeno, b) grafito pirolitico altamente orientado, c) nanotubos de carbono de pared simple, d) grafeno dañado, e) nanotubos de carbono de multiples paredes y f) carbono amorfo. [6]	21

2.7. Espectros Raman de GOx (GO) y rGO. [7]	22
2.8. Transiciones electronicas en la región UV-VIS en moléculas absorbentes [8]	23
2.9. Formación de orbitales moleculares a) perpendiculares y b) frontales.	25
2.10. a) Formación de orbitales moleculares para moléculas con enlaces π y σ . b) Transiciones electronicas posibles entre orbitales.	26
2.11. AFM modo contacto	28
2.12. AFM modo contacto	29
2.13. AFM modo contacto	30
2.14. Impedancia Z representada en el plano complejo.	30
2.15. Expresiones en serie y paralelo de la Impedancia, con componentes real e imaginaria	32
2.16. Reactancia: Inductiva X_L y Capacitiva X_C	32
2.17. Representación en el plano complejo de impedancia (izquierdo) y admitancia (derecha) donde observa geoméricamente el carácter de las componentes a partir de los ángulos θ y ϕ	33
2.18. Esquema del principio de la microscopia electrónica de barrido de la interfaz y GOx rGO [9]	35
3.1. Estructura del óxido de grafeno	37
3.2. Deposito de óxido de grafeno sobre sustrato de vidrio por spin-coater.	38
3.3. Microscopía óptica de GOx-pasta y rGO-pasta de 1-4 grabados con 4x aumentos.	40
3.4. Microscopía óptica de GOx-dispersión y rGO-dispersión de 1-4 grabados con 4x aumentos.	41
3.5. FTIR de GOx-pasta y rGO 1-4 grabados.	43
3.6. FTIR de GOx-pasta y rGO 1-4 grabados.	43
3.7. Espectro Raman de GOx-pasta y de rGO de 1-4 grabados.	46
3.8. Espectro Raman de GOx-dispersión y de rGO de 1-4 grabados.	47
3.9. Espectro UV-VIS de absorbancia de rGO-pasta de 1-4 grabados.	51
3.10. Espectro UV-VIS de absorbancia de GOx-dispersión de 1-4 grabados.	52
3.11. Configuración de 4 puntas.	54
3.12. Parte real de la impedancia Z de rGO-pasta 1-4 grabados.	55
3.13. Parte real de la impedancia Z de rGO-dispersión 1-4 grabados.	56
3.14. Parte imaginaria (R) de la impedancia Z de rGO-pasta de 1-4 grabados.	57

3.15. Parte imaginaria (R) de la impedancia Z de rGO-dispersión de 1-4 grabados.	57
3.16. AFM de GOx-pasta sin grabar a) vista superior, b) vista 3D del área seleccionada y c) perfil de altura de la línea seleccionada.	59
3.17. AFM de rGO-pasta de 1 grabado a) vista superior, b) vista 3D del área seleccionada y c) perfil de altura de la línea seleccionada. . . .	60
3.18. AFM de rGO-pasta de 2 grabados a) vista superior, b) vista 3D del área seleccionada y c) perfil de altura de la línea seleccionada. . . .	61
3.19. AFM de rGO-pasta de 3 grabados a) vista superior, b) vista 3D del área seleccionada y c) perfil de altura de la línea seleccionada. . . .	62
3.20. AFM de rGO-pasta de 4 grabados a) vista superior, b) vista 3D del área seleccionada y c) perfil de altura de la línea seleccionada. . . .	63
3.21. AFM de GOx-dispersión sin grabar a) vista superior, b) vista 3D del área seleccionada y c) perfil de altura de la línea seleccionada. . . .	64
3.22. AFM de GOx-dispersión 1 grabado a) vista superior, b) vista 3D del área seleccionada y c) perfil de altura de la línea seleccionada. . . .	65
3.23. AFM de GOx-dispersión 2 grabados a) vista superior, b) vista 3D del área seleccionada y c) perfil de altura de la línea seleccionada. . .	66
3.24. AFM de GOx-dispersión 3 grabados a) vista superior, b) vista 3D del área seleccionada y c) perfil de altura de la línea seleccionada. . .	67
3.25. AFM de GOx-dispersión 4 grabados a) vista superior, b) vista 3D del área seleccionada y c) perfil de altura de la línea seleccionada. . .	68
3.26. Imagen de microscopía electrónica de barrido de rGO-dispersión. . .	69
3.27. Imagen de microscopía electrónica de barrido de la interfaz y GOx rGO dispersión.	70
3.28. Imagen de microscopía electrónica de barrido de rGO-pasta	71
3.29. Imagen de microscopía electrónica de barrido de la interfaz y GOx rGO pasta.	71
4.1. a) Imagen de 2 grabados en GOx-pasta. b) Imagen de 2 grabados en GOx-pasta. c) Diagrama esquemático del tipo de microestructuras obtenidas.	74
4.2. Diagrama de la ejecución de los grabados a) inicio del grabado, b) comienzo del grabado en la siguiente línea, c) continuación del grabado en la tercera línea y d) finalización del grabado.	75
6.1. Estructura de la pared celular de una micobacteria	81
6.2. Estructura química de los ácidos micólicos	81

6.3. Cromatografía de capa fina de ácidos micólicos, carril 1 M.Fortuitum, carril 2 M. Tuberculosis y carril 3 micobacterias atípicas.	84
6.4. Deposito por Dropcasting de ácidos micólicos sobre la superficie de rG-pasta/dispersión con 2 grabados.. . . .	86
6.5. FTIR después de la inmovilización de los ácidos micólicos sobre la superficie de GOx y rGO en presentación: pasta y dispersión. . . .	87
6.6. RAMAN después de la inmovilización de los ácidos micólicos sobre la superficie de rGO en presentación: pasta y dispersión.	89

Índice de tablas

2.1. Modos normales vibracionales	14
3.1. Posición de las bandas en FTIR asociadas a grupos funcionales presentes en GOx y rGO.	44
3.2. Espectroscopia Raman en GOx-pasta y rGO de 1-4 grabados.	46
3.3. Espectroscopia Raman en GOx-dispersión y rGO de 1-4 grabados.	47
3.4. Espectroscopia Raman y razón I_D/I_G de GOx-pasta y rGO de 1-4 grabados.	48
3.5. Espectroscopia Raman y razón I_D/I_G de GOx-dispersión y rGO de 1-4 grabados.	49
6.1. Patrones de ácidos micólicos de especies de <i>Micobacterium</i>	85
6.2. Posición de las bandas en FTIR asociadas a grupos funcionales presentes en ácidos micólicos [10].	88

Introducción

El carbón es uno de los elementos más abundantes en la naturaleza [11], debido a la capacidad del carbón para formar enlaces químicos puede presentarse en diversas estructuras: el grafeno es el bloque de construcción de 2D para los alotropos del carbono de otras dimensionalidades (basados en hibridación sp^2); apilado forma grafito 3D, enrollado forma nanotubos de carbono 1D y envuelto forma fullerenos 0D [12].

El grafeno es una lámina de un átomo de espesor, los átomos de carbono forman una red hexagonal plana con distancias entre primeros vecinos de 1.42 Å. Cada átomo de carbono se encuentra unido por enlaces covalentes [13], los orbitales $2s$, $2p_x$ y $2p_y$ hibridan de forma que cada átomo de carbono se une a sus tres vecinos por enlaces sp^2 o σ (el cuarto electrón se encuentra fuera del plano). Para el grafeno bicapa, los orbitales p_z forman enlaces π . Mientras los tres enlaces σ funcionan como una columna vertebral rígida, los enlaces π sirven como control de interacción entre las diferentes capas de grafeno, cada lámina de grafeno esta unida mediante fuerzas de Van der Waals [14].

Desde su descubrimiento en 2004 por Geim y Novoselov [15], el grafeno se ha convertido en un material prometedor debido a que posee propiedades excepcionales posee una relación de absorción menor a 2.3 % de luz blanca [16], alta densidad de corriente, alta conductividad eléctrica y térmica [17] [18] consecuencia de la estructura electronica del grafeno [19]. Se ha observado en grafeno el efecto Hall cuántico a temperatura ambiente [20], movilidad de portadores de carga alta [21]. Algunas propiedades dependen de como se miden, a lo largo del plano basal u or-

togonal a él [22].

El grafeno intrínseco se considera como un semi-metal o semiconductor con brecha de energía cero [19], lo que significa que los portadores de carga viajan libremente de la banda de valencia a la banda de conducción [23] y la densidad de estados en el nivel de Fermi es nula.

La apilación de dos laminas de grafeno se le conoce como grafeno bicapa. La interacción entre las bandas π y π^* de ambas laminas ofrecen características distintas al grafeno monocapa. Las propiedades del grafeno dependerán del número de capas presentes y la calidad de la red cristalina [21], las propiedades se van degradando conforme aumenta el número de capas, debido a que crece rápidamente la densidad de fonones en el espacio 3D disponible para las vibraciones térmicas [24].

Recientemente se ha reportado que para el grafeno monocapa la capacitancia es de $\sim 21 \frac{\mu F}{cm^2}$, este valor establece la máxima capacitancia (en láminas dobles electroquímicas) para todos los materiales a base de carbono [25].

1.1. Estructura electrónica del Grafeno

La figura 1.1 a) muestra la red de Bravais del grafeno o red real. La red del grafeno es triangular con 2 átomos de carbono en la base **A** y **B** por celda unidad, representada por dos vectores. El modelo de celda unidad de Wigner-Seitz se utiliza generalmente para obtener la estructura de bandas del grafeno. Los vectores base o vectores primitivos \vec{a}_1 y \vec{a}_2 se pueden escribir como sigue:

$$\vec{a}_1 = \frac{a}{2}(\sqrt{3}, 1), \vec{a}_2 = \frac{a}{2}(\sqrt{3}, -1) \quad (1.1)$$

Donde $a \approx 1.42 \text{ \AA}$ es la distancia interatómica, la magnitud de los vectores primitivos de la red real es la misma $|\vec{a}_1| = |\vec{a}_2| = 2.46 \text{ \AA}$ y forman un ángulo de $\frac{\pi}{3}$.

En la figura 1.1 a) las líneas que unen a los átomos de carbono representan los enlaces σ . El rombo punteado corresponde a la celda unitaria. Cada átomo tiene 3 primeros vecinos, los vectores de posición en el espacio real de estos átomos se pueden escribir como:

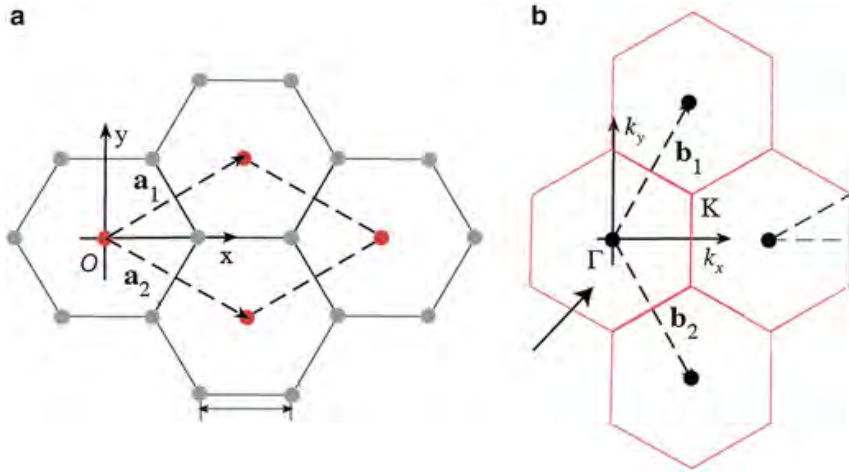


Figura 1.1: a) Red real y b) red reciproca de grafeno.

$$\vec{A}_1 = \frac{a}{2}(1, \sqrt{3}), \vec{A}_2 = \frac{a}{2}(1, -\sqrt{3}) \text{ y } \vec{A}_3 = -a(1, 0) \quad (1.2)$$

En la figura 1.1 b) se muestra la celda unidad en el espacio reciproco o espacio k , los puntos negros son los puntos de red. El hexágono que contiene el origen de las coordenadas es la primera zona de Brillouin. El paralelogramo formado por \vec{b}_1 y \vec{b}_2 es también una celda unidad primitiva, pero se prefiere usar la primera zona de Brillouin debido a su simetría. Los vectores de la red reciproca forman un ángulo de $\frac{2\pi}{3}$ y se escriben como:

$$\vec{b}_1 = \frac{2\pi}{3a}(1, \sqrt{3}), \vec{b}_2 = \frac{2\pi}{3a}(1, -\sqrt{3}) \quad (1.3)$$

Las seis esquinas de la zona de Brillouin se conocen como puntos de Dirac \vec{K} y \vec{K}' .

La simetría de traslación de la celda unitaria en la dirección de los vectores de red, \vec{a}_i , la función de la red dada por Ψ debe satisfacer el teorema de Bloch:

$$T_{\vec{a}_i} \Psi = e^{i\vec{k} \cdot \vec{a}_i} \Psi \quad (1.4)$$

Donde el operador de traslación se representa como T_{a_i} a lo largo del vector de red \vec{a}_i y el vector de onda \vec{k} . Las funciones que satisfacen la ecuación 1.4 son los orbitales j-ésimos en una celda unitaria, dichas funciones son las funciones de Bloch y están dadas por:

$$\Phi_j(\vec{k}, \vec{r}) = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_A^N e^{i\vec{k} \cdot \vec{A}} \varphi_j(\vec{r} - \vec{A}) \quad (1.5)$$

Los vectores \vec{A} son las posiciones de los átomos y φ_j representan las funciones de onda atómicas en el estado j.

Las eigenfunciones $\Psi_j(\vec{k})$ se pueden expresar como una combinación lineal de las funciones de Bloch:

$$\Psi_j(\vec{k}) = \sum_{j=1}^n C_{jj'}(\vec{k}) \Phi_j(\vec{k}, \vec{r}) \quad (1.6)$$

Los términos $C_{jj'}(\vec{k})$ son los coeficientes a determinar. La suma en la ecuación 1.6 se obtiene para los orbitales de Bloch con el mismo valor de \vec{k} .

Para obtener la relación de la energía como función del momento \vec{k} , resolvemos la ecuación secular dada por:

$$\det[H - ES] = 0 \quad (1.7)$$

H es la matriz Hamiltoniana del sistema, E es la energía del sistema y S es la matriz secular; cada uno de sus elementos son las integrales de traslape de los orbitales. Las matrices H y S se pueden escribir de la forma:

$$H = \begin{vmatrix} H_{AA} & H_{AB} \\ H_{BA} & H_{BB} \end{vmatrix}.$$

$$S = \begin{vmatrix} S_{AA} & S_{AB} \\ S_{BA} & S_{BB} \end{vmatrix}.$$

$$E_i(\vec{k}) = \frac{\langle \Psi_j | H | \Psi_j \rangle}{\langle \Psi_j | \Psi_j \rangle} \quad (1.8)$$

Los elementos jj' de H y S están dados por las siguientes expresiones:

$$H_{jj'}(\vec{k}) = \langle \Phi_j | H | \Phi_{j'} \rangle, S_{jj'}(\vec{k}) = \langle \Phi_j | \Phi_{j'} \rangle \quad \text{con } j, j' = 1, \dots, n \quad (1.9)$$

Resolviendo, tenemos que:

$$H_{AB} = t(e^{i\vec{k}\cdot\vec{A}_1} + e^{i\vec{k}\cdot\vec{A}_2} + e^{i\vec{k}\cdot\vec{A}_3}) = tf(k) \quad (1.10)$$

t es la integral de transferencia dada por:

$$t = \langle \varphi_A(\vec{r} - \vec{A}) | H | \varphi_A(\vec{r} - \vec{A} \pm \frac{a}{2}) \rangle \quad (1.11)$$

Tomando en cuenta únicamente las interacciones entre primeros vecinos tenemos que $H_{AA} = H_{BB} = \epsilon_{2p}$ la energía del orbital 2p, $S_{AA} = S_{BB} = 1$ y $S_{AB} = sf(k) = S_{BA}^*$, donde s se conoce como integral de traslape entre los átomos cercanos **A** y **B**. Sustituyendo en las matrices H y S en la ecuación secular, obtenemos los eigenvalores de la energía:

$$E(\vec{k}) = \frac{\epsilon_{2p} \pm t\omega(\vec{k})}{1 \pm s\omega(\vec{k})} \quad (1.12)$$

La energía positiva se asocia al enlace π y la energía negativa es para la banda de anti-enlace π^* , por lo que $\omega(\vec{k})$ esta dada por:

$$\omega(\vec{k}) = \sqrt{|f(\vec{k})|^2} = \sqrt{1 + 4\cos\left(\frac{\sqrt{3}k_x a}{2}\right)\cos\left(\frac{k_y a}{2}\right) + \cos^2\left(\frac{k_y a}{2}\right)} \quad (1.13)$$

Si $s = \epsilon_{2p} = 0$, la energía queda:

$$E(k_x, k_y) = \pm t\sqrt{|f(\vec{k})|^2} = \pm t\sqrt{1 + 4\cos\left(\frac{\sqrt{3}k_x a}{2}\right)\cos\left(\frac{k_y a}{2}\right) + \cos^2\left(\frac{k_y a}{2}\right)} \quad (1.14)$$

En la figura 1.2 se observan los puntos de Dirac. Los puntos de particular interés son $K = \frac{2\pi}{3a}, \frac{2\pi}{3\sqrt{3}a}$ y $K' = \frac{2\pi}{3a}, -\frac{2\pi}{3\sqrt{3}a}$, que se ubican en las esquinas de la primer zona de Brillouin del grafeno.

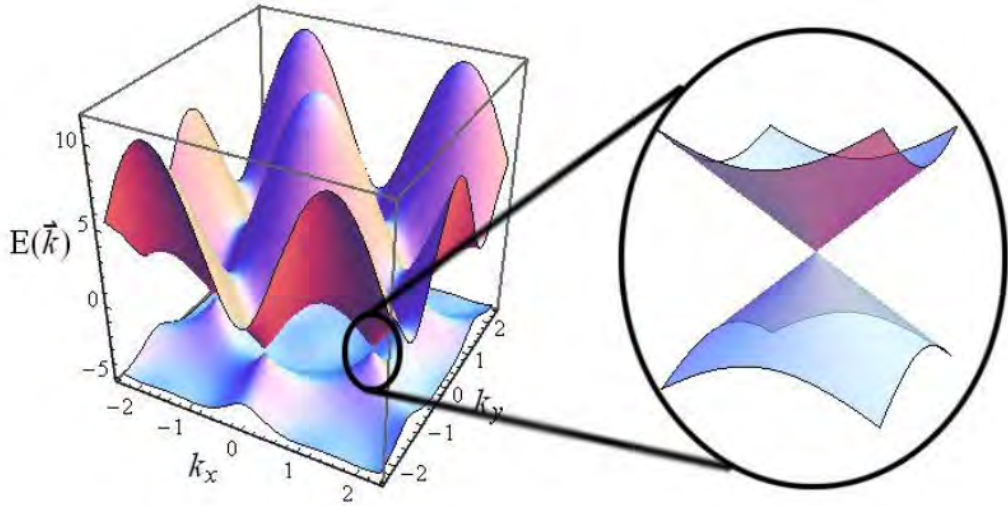


Figura 1.2: Estructura de bandas del grafeno y puntos de Dirac [1].

Se realiza entonces una expansión de Taylor de $f(\vec{k})$ cerca de los puntos de Dirac.

$$f(K+k) = f(K) + \frac{\partial f(K)}{\partial k_x}(k_x - K_x) + \frac{1}{2}[(k_x - K_x)^2 \frac{\partial^2 f(K)}{\partial k_x^2} + (k_y - K_y)^2 \frac{\partial^2 f(K)}{\partial k_y^2} + 2(k_x - K_x)(k_y - K_y) \frac{\partial^2 f(K)}{\partial k_x \partial k_y}] \quad (1.15)$$

Los dos primeros términos son igual a cero, el tercer término es igual a $\frac{9}{4}a^2|k - K|^2$, si se sustituye en la ecuación 1.14 la energía es:

$$E(k) = \pm t \sqrt{\frac{9}{4}a^2|k - K|^2} = \pm \frac{3}{2}ta|k - K| \quad (1.16)$$

Usando $\vec{p} = \hbar k$, donde \vec{p} es el momento, se obtiene la energía en función de \vec{p} .

$$E(\vec{p}) = \frac{3at}{2\hbar}|\vec{p}| = \pm \nu_F |\vec{p}| \quad (1.17)$$

Donde $\nu_F = \frac{3at}{2\hbar} \approx 10^6 \frac{m}{s}$ es la velocidad de Fermi [26].

La estructura electrónica de bandas es fundamentalmente la responsable de las propiedades que exhibe el grafeno.

El grafeno es un semimetal, debido a que no posee una brecha prohibida [27]. En los puntos K y K' las bandas de valencia y conducción se tocan en un punto, a la altura del nivel de Fermi como se observa en la figura 1.2. Cerca de los puntos K y K' la energía depende linealmente del momento del electrón.

1.2. Métodos de obtención de Grafeno

Desde su descubrimiento se ha trabajado por encontrar una forma de obtener grafeno a gran escala con la finalidad de usarlo para las diferentes aplicaciones que promete, los procesos de síntesis de grafeno juegan un papel importante sobre la calidad y cantidad de dicho material.

Como ya se mencionó, Geim y Novoselov aislaron el grafeno por primera vez, la técnica utilizada se conoce ahora como exfoliación mecánica de grafito pirolítico altamente orientado con una cinta adhesiva. Sin embargo, esta técnica a pesar de ser sencilla y de obtener láminas de grafeno de gran calidad es inadecuada para producirlo a gran escala. Es por ello que, desde el descubrimiento del grafeno comenzó la carrera por encontrar métodos de obtención de grafeno de calidad estructural, con gran área superficial y viabilidad económica.

1.2.1. Exfoliación mecánica

La técnica consiste en colocar grafito en un trozo de cinta adhesiva, la cinta se pega y se despega sobre sí misma, el grafito entonces se separa las láminas; ya que la interacción de las laminas apiladas es de tipo van der Waals basta la cinta adhesiva para separar las laminas con éxito. Posteriormente la cinta adhesiva se coloca sobre un sustrato de Si, de este modo las hojuelas se adhieren al sustrato por enlace de van der Waals [15]. Actualmente se han obtenido láminas de grafeno hasta de 1 mm. Este método se usa principalmente en investigación básica.

1.2.2. Depósito químico de vapor

El depósito químico de vapor (CVD) se realiza utilizando como sustrato algún metal de transición, generalmente níquel o cobre que se calienta a altas temperaturas. Se expone dicho sustrato a hidrocarburos (como metano), por lo que se produce una nucleación y crece la lamina de grafeno cuando se descomponen los hidrocarburos en la superficie del sustrato (se difunde o se adsorbe). De esta forma se obtiene grafeno monocapa, bicapa o multicapa (hasta 10 laminas). Cuando el sustrato se enfría se retira el grafeno del sustrato. Las altas temperaturas y las bajas presiones que se requieren para este método de obtención de grafeno hacen que sea muy costoso [28].

1.2.3. Crecimiento epitaxial en superficies eléctricamente aislantes.

Esta técnica se basa en la sublimación térmica del silicio a temperaturas de hasta 1300 °C, el carbono se reordena para formar una capa de grafeno. Las láminas de grafeno que se obtienen son de una gran calidad estructural, pero la necesidad de trabajar en ultravacío (o atmosfera inerte) y altas temperaturas [29] limitan su aplicación a gran escala, además del gran costo de los sustratos.

1.2.4. A partir de nanotubos de carbono.

Se han obtenido nanocintas de grafeno a partir de nanotubos de carbono, consiste en romperlos con permanganato de potasio y ácido sulfúrico. En otro método nanocintas de grafeno se producen mediante grabado en plasma de nanotubos de múltiples paredes parcialmente incrustados en una película de polímero [30]. La desventaja de esta técnica es que no se obtienen nanocintas de grafeno homogéneas y no se puede controlar el tamaño de las nanocintas obtenidas.

1.2.5. Reducción a partir de óxido de grafeno

Se puede obtener oxidando grafito y posteriormente exfoliando en fase líquida (agua o etanol) en baño ultrasonico. Se obtiene entonces óxido de grafeno, donde los planos de átomos de carbono tienen grupos funcionales oxigenados unidos por enlace covalente (enlaces muy fuertes). Los planos basales del grafeno poseen grupos hidroxilo y epoxi, en los bordes se hayan grupos carbonilo y carboxilo [31].

El proceso de reducción es una de las reacciones más importantes del GOx, debido a la similitud entre el rGO y el grafeno prístino.

Una opción es la reducción química con hidrazina u otros agentes reductores [32] para obtener dispersiones de grafeno. Se obtiene gran cantidad de material en medio acuoso, pero la calidad estructural de las laminas es escasa, por el ataque químico que sufre el óxido de grafeno [33].

Otros metodos de reducción son por vía solvotermal o reducción térmica [34], reducción flash donde se utiliza un destello de una cámara fotografica instantanea, lo que desencadena la reacción de desoxigenación del GOx [35].

Una técnica reciente de reducción es mediante láser, descrita en 2012 por El-Kady [25], a continuación se describe con más detalle.

1.2.6. Reducción láser

El óxido de grafeno (GOx) se deposita sobre un sustrato (puede ser vidrio u otro material que sea flexible), la película es irradiada con láser infrarrojo dentro de una unidad óptica CD/DVD. De esta forma la energía proporcionada por el láser rompe los enlaces oxigenados del GOx obteniendo lo que se conoce como óxido de grafeno reducido (rGO) [25]. La obtención de grafeno por esta técnica es de bajo costo, donde la variación de la intensidad de láser juega un papel importante en las propiedades eléctricas, como la conductividad [36].

1.3. Microfabricación láser de la estructura

En este trabajo la obtención de rGO a partir de GOx se llevo a cabo por microfabricación láser de baja energía, cuya técnica consiste en obtener estructuras bidimensionales o tridimensionales grabando diseños personalizados de un mapa de bits sobre diferentes materiales, en este trabajo se utilizó GOx.

La absorción de la radiación infrarroja por el GOx, proporciona energía a los grupos funcionales generando una reacción química de foto-reducción. La cantidad de reducción se controla con la intensidad del láser, el enfoque del láser y el tiempo de exposición del pulso [36].

Existen varios equipos comerciales para fabricación láser, en este trabajo se aprovecha un equipo de microfabricación de bajo costo creado por Kayum Jiménez [2] ver figura 1.3. El equipo consiste en una OPU (Optical Pick-up Unit) de un sistema comercial de grabación y reproducción CD/DVD, la unidad CD tiene un diodo láser en el rojo alrededor de 650 nm y la unidad DVD un diodo láser en el infrarrojo de baja energía 780 nm. Además el arreglo óptico permite un enfoque preciso del haz láser, ofreciendo un spot de escala micrométrica. La OPU cuenta con una plataforma que controla los movimientos en XY y Z con un sistema de motores eléctricos. El eje Z permite controlar la distancia de la OPU a la muestra y enfocar de forma precisa 1.4.

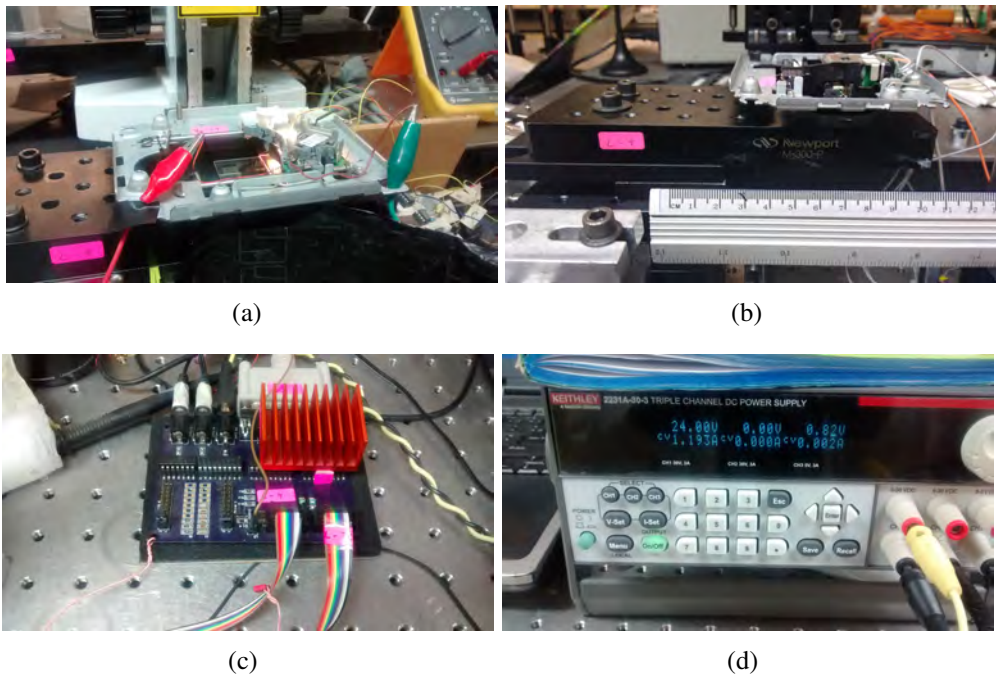


Figura 1.3: Equipo de microfabricación a) posicionamiento de la muestra sobre la Unidad Óptica: OPU, b) posicionamiento vertical c) arreglo de los sensores optoelectronicos y d) fuente de poder.

El equipo también cuenta con una cámara charge-coupled device (CCD) que permite visualizar en un monitor de computadora, a través de un objetivo de microscopio de 20X aumentos. Es posible también observar en enfoque del haz sobre la muestra. Observar en tiempo real el grabado, tomar fotografías y vídeo para reportar la imagen del enfoque o para documentar el grabado.

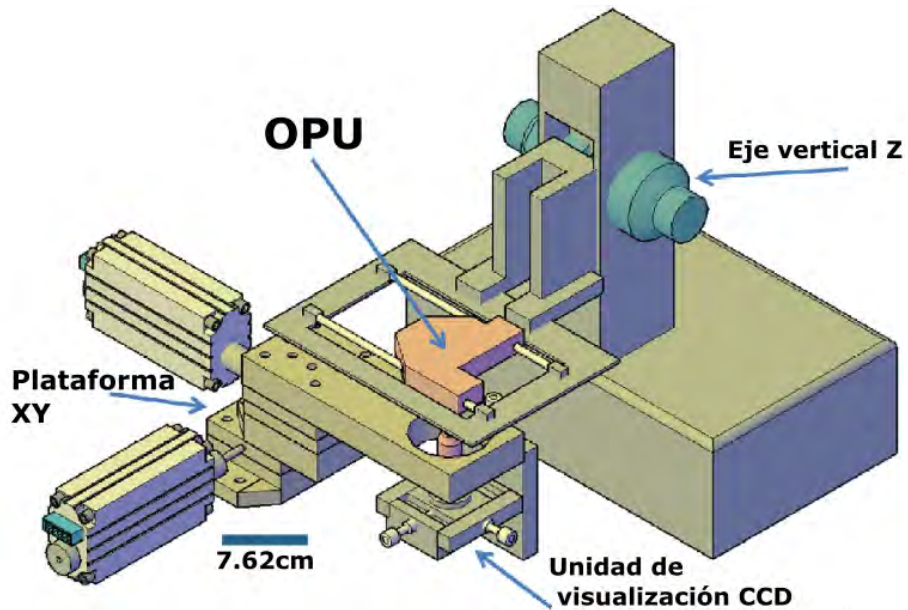


Figura 1.4: Equipo de microfabricación (arreglo mecánico y sistema de visualización) [2].

A través de la computadora se controlan las señales de encendido del haz, el desplazamiento de la plataforma en los ejes XY, además de los parámetros como tiempo de exposición, número de pulsos por pixel, distancia entre pixel y pixel. El software imita los sistemas de Control Numérico Computarizado (CNC) sincronizando las señales hacia la plataforma.

La OPU se controla mediante un software de control (archivo excel), donde se manipulan los motores de desplazamiento, también se recorre la muestra a zonas de interés a distancias específicas; el encendido y apagado del láser. Otro documento de Excel permite incluir el diseño a grabar, dicho diseño se encuentra en un formato de *bitmap* monocromático, donde se obtienen valores binarios. El diseño contiene las coordenadas de los puntos a grabar, donde 0 no graba y 1 graba. También contiene el tamaño total del grabado en pixeles

1.4. Óxido de grafeno

El óxido de grafito es una estructura apilada, cuando el material se exfolia en monocapas o pilas de poca cantidad, se obtiene el óxido de grafeno (GOx). La exfoliación se lleva a cabo utilizando agua o en medios orgánicos polares [37].

Las láminas delgadas de GOx surgieron como un material a base de carbono a nanoescala que proporciona una vía alterna al grafeno. La solubilidad del GOx en agua y otros disolventes permite que se deposite uniformemente sobre sustratos de diferentes materiales, que lo hace útil para la microelectrónica.

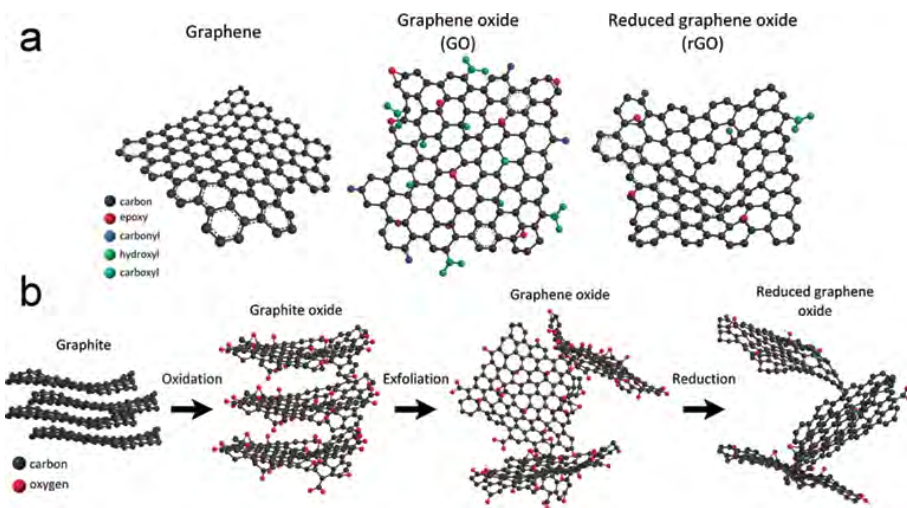


Figura 1.5: a) Estructuras químicas esquemáticas del grafeno, GOx y rGO . b) Ruta para la obtención de rGO

El GOx es un material que ha sido estudiado para ser utilizado en numerosas aplicaciones, tales como composites poliméricos, celdas solares orgánicas [38], sensores [39], conductores transparentes, biosensor de transistor de efecto de campo [40], aplicaciones biomédicas [41], debido a las excelentes propiedades que exhibe.

Técnicas de caracterización

2.1. Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier

La espectroscopia infrarroja estudia la interacción de luz infrarroja con la materia, se obtiene un gráfico llamado espectro infrarrojo el cual muestra la intensidad de radiación infrarroja (Transmitancia o Absorbancia) versus el número de onda de la luz en [cm^{-1}]. La espectroscopia es una herramienta poderosa para identificar grupos funcionales e identidades en una muestra que puede ser sólida, líquida, gas, semi-sólida, polvo, polímero, etc. En el espectro infrarrojo la posición, intensidad, ancho y forma de la banda brinda información útil para identificar los grupos funcionales [42]. El espectro infrarrojo comienza en 14000 hasta 4 cm^{-1} se divide en cercano infrarrojo NIR [$14000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$], mediano infrarrojo MIR [$4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$] y lejano infrarrojo FIR [$400\text{-}4\text{ cm}^{-1}$]. El NIR nos permite estudiar los sobretonos y armónicos o combinación de bandas de las vibraciones fundamentales. La región MIR tiene información sobre las vibraciones fundamentales que son empleadas para identificar la estructura molecular. La región FIR nos da información de las rotaciones de la molécula.

La luz posee un comportamiento de dualidad onda-partícula, considerando el comportamiento ondulatorio: la radiación electromagnética es una combinación de campos eléctricos (EF) y campos magnéticos (MF) oscilando a la misma frecuencia, pero perpendiculares entre sí. Estos campos oscilan en el tiempo y el espacio. La amplitud de campo eléctrico se encuentra en función del tiempo y tiene una forma sinusoidal. El vector de campo eléctrico interactúa con las moléculas causando

absorción infrarroja. Los parámetros importantes son: longitud de onda λ en $[cm]$, frecuencia ν en $[s^{-1}$ o $Hz]$, número de onda $\bar{\nu}$ en $[cm^{-1}]$, velocidad de la luz en el vacío c ($3 \times 10^8 m/s$).

En mecánica cuántica el fotón es la partícula responsable de la radiación, la energía del fotón $[J]$ esta relacionada con su frecuencia $[s^{-1}]$ de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$E = h\nu \quad (2.1)$$

donde h es la constante de Planck ($6,63 \times 10^{-34} J \cdot s$)

2.1.1. Modos normales

Si se considera a una molécula como un sistema de masas unidas por enlaces químicos con propiedades de resortes, cuando la molécula absorbe radiación infrarroja sus enlaces vibran. El movimiento vibracional de una molécula puede descomponerse en una serie de vibraciones constitutivas llamados: *modos normales*. Las vibraciones pueden involucrar cambios en la longitud: estiramiento (en inglés stretching) y contracción (en inglés contract) o cambios en el ángulo del enlace doblamiento (en inglés bending). Los enlaces de estiramiento que están en fase son estiramiento simétrico y los que se encuentran fuera de fase son estiramiento antisimétrico. Los enlaces de doblamiento pueden estar en el plano como el caso de deformación, tijereo (en inglés scissoring) y balanceo (en inglés rocking) pueden estar fuera del plano como meneo (en inglés wagging) y torcedura (en inglés twisting). Las moléculas contienen muchos átomos (N) y tendrán $3N$ grados de libertad. Moléculas diferentes vibran a frecuencias diferentes debido a que sus estructuras son distintas, por eso las moléculas pueden ser identificadas con la espectroscopia infrarroja. [43]

Tabla 2.1: Modos normales vibracionales

Tipo de molécula	Modos normales
Lineal	$3N-5$
No lineal	$3N-6$

La primera condición necesaria para que se dé la absorción infrarroja: es que debe existir un cambio en el momento dipolar de la molécula, durante este proceso la molécula vibra a la misma frecuencia que el vector de campo eléctrico de la radiación incidente y la energía de la radiación se transfiere a la molécula. Lo mismo ocurre cuando el vector de campo eléctrico crea un *momento dipolar inducido*, la frecuencia de la molécula entra en resonancia con la frecuencia de la energía de la radiación. La magnitud del momento dipolar se representa con la siguiente ecuación:

$$\vec{p} = q\vec{r} \quad (2.2)$$

donde:

\vec{p} = momento dipolar eléctrico

q = carga

\vec{r} = magnitud del momento dipolar eléctrico

Las vibraciones que son activas en el infrarrojo satisfacen la siguiente ecuación:

$$\frac{\partial \vec{p}}{\partial x} \neq 0 \quad (2.3)$$

Si las vibraciones tienen un cambio en el momento dipolar eléctrico con respecto a la magnitud del momento igual a cero las moléculas son inactivas en el infrarrojo.

La segunda condición necesaria para la existencia de absorción infrarroja: la energía de radiación incidente debe ser igual a la diferencia de energía entre los niveles vibracionales de la molécula [44].

$$\Delta E_{vibracional} = \frac{hc}{\lambda} \quad (2.4)$$

donde:

$\Delta E_{vibracional}$ = diferencia de energía de niveles vibracionales y

λ = longitud de onda de la radiación incidente

2.2. Espectroscopía RAMAN

La espectroscopía en el mediano infrarrojo y la espectroscopía Raman son técnicas complementarias, usualmente se utilizan ambas para obtener información completa de los modos vibracionales.

Cuando un haz de luz interactúa con la materia se da lugar a diferentes procesos físicos, existe uno conocido como esparcimiento que consiste en la desviación de la luz de su dirección original de incidencia, la interacción del vector de campo eléctrico (fotón) con la nube electrónica del sistema da lugar al esparcimiento de la luz incidente, la interacción induce oscilaciones periódicas en los electrones de la molécula y producen momentos eléctricos oscilantes que dan lugar a nuevas fuentes emisoras de radiación en todas las direcciones.

Los fotones al interactúan con el material experimentan esparcimiento elástico, es decir la frecuencia del haz incidente y el haz saliente es la misma y los fotones únicamente cambian de dirección, a este fenómeno se le conoce como esparcimiento Rayleigh. Pero una pequeña fracción de la luz sufre esparcimiento inelástico el cual experimenta cambios entre la frecuencia del haz incidente y el haz saliente, por lo tanto también en su energía y se le conoce como esparcimiento Raman.

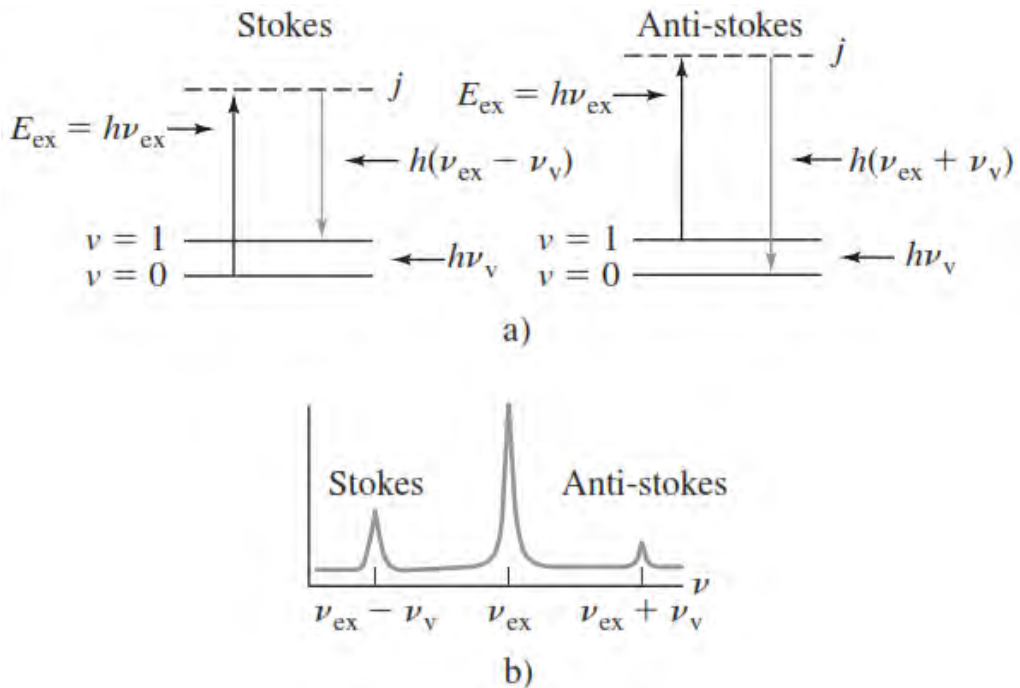


Figura 2.1: Señales de esparcimiento Rayleigh, Raman Stokes y Anti-Stokes. [3]

La luz que experimenta esparcimiento Raman proporciona información de la composición molecular de las muestras, sea ν_i la frecuencia de haz incidente y

ν_s la frecuencia del haz después del esparcimiento. Si $\nu_i > \nu_s$, el fotón después del esparcimiento es de frecuencia más baja que el fotón incidente debido a que hay una transferencia de energía del fotón a las vibraciones de red del material (fonón), es decir el fonón va de su estado base a un estado virtual y regresa a un estado de mayor energía vibracional, esto es llamado esparcimiento Raman Stokes. Si $\nu_i < \nu_s$ el fotón después del esparcimiento posee una frecuencia mayor a la del fotón incidente y posteriormente hay una transferencia de energía del fonón al fotón, significa que el fonón antes de la colisión se encontraba en un estado vibracional excitado y después de la colisión pasa al estado vibracional fundamental, a este fenómeno se le denomina esparcimiento Raman anti-Stokes.

Es importante diferenciar la fluorescencia del esparcimiento Raman, los estados virtuales en Raman no corresponden a eigenestados del sistema, por lo que cualquier energía de excitación podría inducir esparcimiento Raman. Mientras que en la fluorescencia, la energía incidente debe ser igual a la diferencia en energía entre los eigenestados electrónicos.

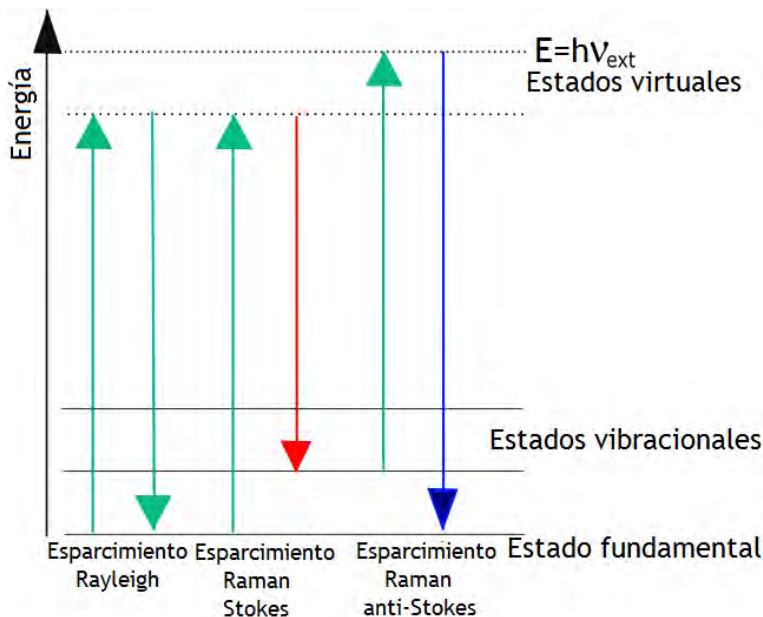


Figura 2.2: Proceso de esparcimiento Rayleigh, Raman Stokes y Raman anti-Stokes

Para obtener un espectro Raman se irradia una muestra con radiación monocromática infrarroja, las intensidades de las bandas Raman son a lo más de un 0.001 %

de la intensidad de la fuente. En el espectro Raman se grafica la intensidad de la luz después del esparcimiento como función de la diferencia entre la energía del fotón incidente y la energía del fotón después del esparcimiento, lo que se conoce como corrimiento Raman se grafica en el eje de las abscisas en unidades del número de onda [cm^{-1}].

2.2.1. Espectroscopia Raman en Grafeno

La espectroscopia Raman es una técnica útil para identificar nanoestructuras de carbono sp^2 de cero a tres dimensiones (0D, 3D), incluso se puede identificar si existen dislocaciones o dopaje. Ofrece también información precisa de los estados electrónicos, la energía del fotón esparcido y la interacción de electrón-fonón en sistemas de carbono. La variación en la posición, la intensidad y forma de las bandas en el espectro Raman permiten diferenciar a los alótropos del carbono. La interacción entre fonones y electrones es clave para comprender el esparcimiento Raman de grafeno.

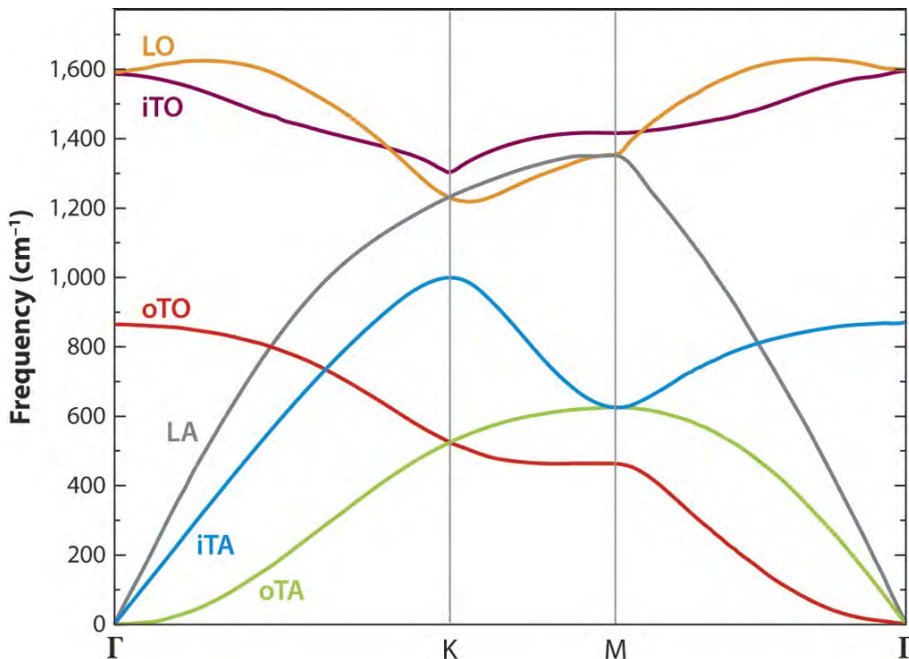


Figura 2.3: Esparcimiento fonónico en grafeno. Ramas fonónicas LO, iTO, oTO, LA, iTA y oTA [4].

La celda unitaria del grafeno posee 2 átomos de carbono **A** y **B** por lo que el grafeno comprende 3 ramas acústicas (A) y tres ramas ópticas (O) de esparcimiento de fonones. Los modos fonónicos se clasifican en longitudinal (L) si las vibraciones son paralelas a la dirección de propagación de la onda dada por el vector **k** o transversal (T) si las vibraciones son perpendiculares a **k**.

Las vibraciones atómicas pueden estar en el plano del grafeno (i), pero las vibraciones atómicas también pueden ser perpendiculares al plano del grafeno correspondientes a modos fonónicos fuera del plano (o). Ahora bien los modos acústicos longitudinales LA y los modos ópticos longitudinales LO, se encuentran siempre en el plano. Los modos acústicos transversales (en el plano) iTA y los modos ópticos transversales (en el plano) iTO son normales a los modos LA y LO. Los modos que se encuentran fuera del plano son transversal acústico oTA y transversal óptico oTO y son modos normales a los cuatro modos anteriores.

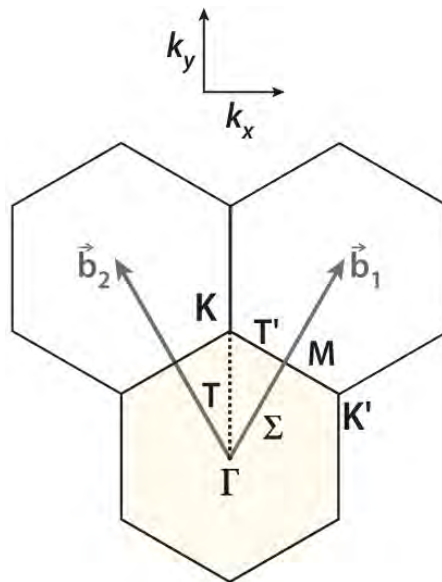


Figura 2.4: Espacio recíproco de la celda unitaria de grafeno, primera zona de Brillouin [4].

De modo que las seis curvas de esparcimiento fonónicas son: LO, iTA, oTA, LA, iTO y oTO y se encuentran a lo largo de las direcciones de alta simetría $\Gamma - \mathbf{K}$ y $\Gamma - \mathbf{M}$ mostradas en la figura 2.3.

En la figura 2.4 se observa el espacio recíproco del grafeno monocapa, los puntos de alta simetría en la primera zona de Brillouin, el punto Γ es el centro de la zona de Brillouin, el punto M se encuentra en el centro de un lado del hexágono y el punto K se encuentra en las esquinas del hexágono.

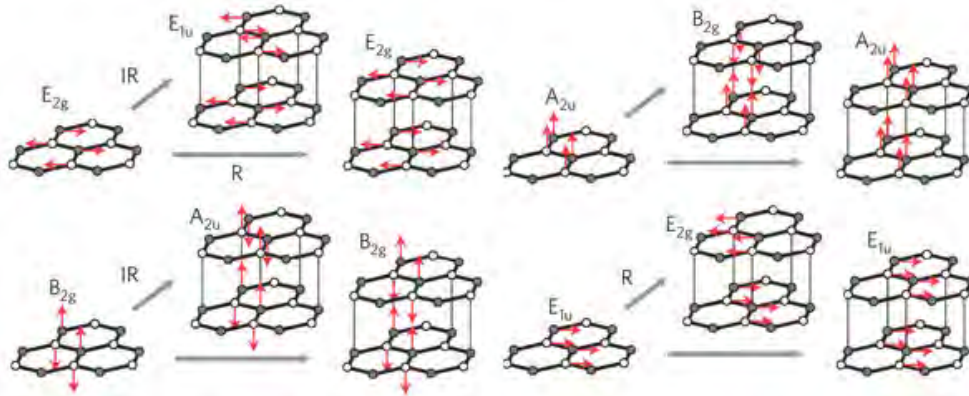


Figura 2.5: Eigenvectores de los seis modos normales en centro de la zona de Brillouin [5].

El grafeno monocapa pertenece al grupo puntual D_{6h} [45], dicho grupo puntual también corresponde a la simetría del vector de onda del fonón ($q = 0$ o Γ). Los seis modos normales del grafeno monocapa pertenece a representaciones irreducibles conocidas como: E_{2g} , B_{2g} , E_{1u} y A_{2u} , donde E_{2g} y B_{2g} son modos ópticos; E_{1u} y A_{2u} son modos acústicos.

Las representaciones A_{2u} y E_{1u} son traslaciones en el plano, el modo B_{2g} es un fonón óptico donde los átomos de carbono se mueven perpendicularmente a los planos del grafeno. Y el modo E_{2g} es una vibración óptica doblemente degenerada en el plano (LO y TO) y es un modo activo en Raman.

En la figura 2.5 se muestran los eigenvectores de los seis modos normales en $q = 0$, donde R e IR denotan los modos activos en el Raman y en el infrarrojo respectivamente.

En la figura 2.6 se presentan espectros Raman característicos de materiales de carbono y las bandas que se generan. Una banda que está asociada con una doble degeneración de los modos fonónicos en el centro de la zona de Brillouin y sucede alrededor de 1580 cm^{-1} se conoce como banda G, corresponde a un fonón de alta

frecuencia E_{2g} , esta banda es la única que sucede debido a un esparcimiento Raman de primer orden (sólo los fonones de la primera zona de Brillouin pueden ser excitados). La banda G exhibe un comportamiento de sistema nanoestructurado debido a efectos de confinamiento, efectos de curvatura y acoplamiento de electrón-fonón.

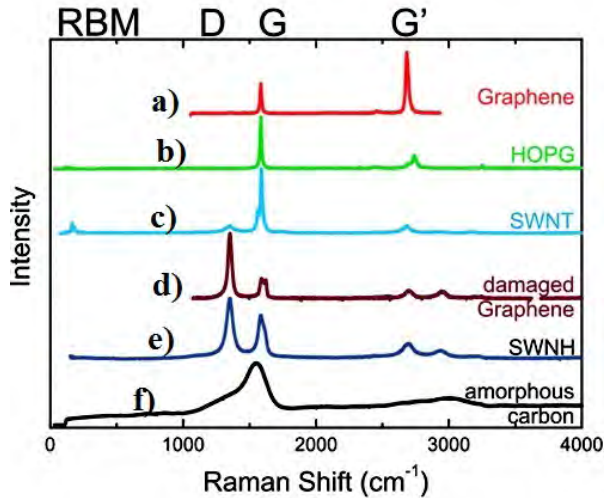


Figura 2.6: Espectros Raman de diferentes tipos de nanocarbonos sp^2 a) grafeno, b) grafito pirolítico altamente orientado, c) nanotubos de carbono de pared simple, d) grafeno dañado, e) nanotubos de carbono de múltiples paredes y f) carbono amorfo. [6]

La banda 2D (o G') sucede por esparcimiento Raman de segundo orden (dos fonones son excitados al mismo tiempo) y depende de la energía de excitación del láser y aparece de 2500-2800 cm^{-1} , es un modo de esparcimiento Raman inusual ya que usualmente los modos Raman activos no dependen de la energía de excitación. La banda G' es sensible a pequeños cambios vibracionales y electrónicos en la estructura, actúa identificando la singularidad de la interacción fonón-electrón en cada nanocarbono sp^2 .

La banda D se debe a defectos estructurales entre capas, efectos de simetría de ruptura. Aparece alrededor de 1350 cm^{-1} . Es un proceso de segundo orden y está asociada con la rama TO cerca del punto K, su energía depende de la energía de excitación debido a un proceso de doble resonancia.

La banda D' comprende a un defecto inducido de borde se asocia con la interacción entre el fonón LO cerca del punto Γ y el defecto [45].

En la figura 2.7 se muestra una referencia de espectroscopia Raman realizada sobre muestras de GOx (GO como le nombraron en la referencia) y rGO. En donde se observa que el espectro de GOx posee menor intensidad Raman en comparación con las muestras de rGO.

La banda D posee mayor contribución en la intensidad Raman en el espectro del GOx comparado con las muestras de rGO, la banda G tiene menor contribución en la intensidad Raman para la muestra de GOx y después de la reducción esta banda posee mayor intensidad. También se observa un corrimiento Raman de la banda G hacia la derecha después de la reducción. La banda D+D' se observa con mayor definición para la muestra rGO si se compara con el espectro Raman del GOx.

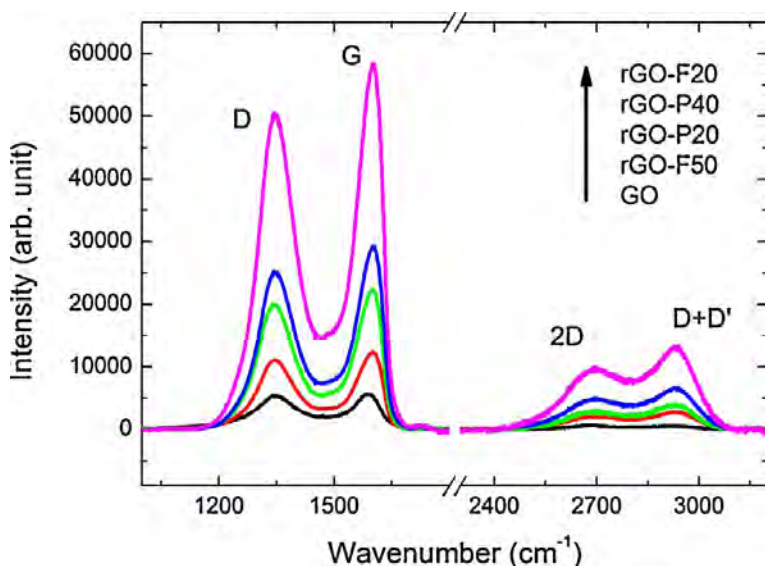


Figura 2.7: Espectros Raman de GOx (GO) y rGO. [7]

2.3. UV-VIS

Sabemos que cuando la radiación electromagnética interactúa con la materia suceden diferentes procesos. La absorbancia es uno de ellos y se utiliza en la espectroscopia UV-VIS. La región espectral que corresponde al ultravioleta-visible va desde 200 nm a 800 nm de longitud de onda.

Cuando la materia absorbe radiación electromagnética, la energía potencial de los átomos presentes en la molécula incrementa. La energía potencial de la molécula es la suma de las energías: electrónica, vibracional y rotacional. Lo que permite caracterizar las muestras es el estudio de la energía de radiación que absorbe la molécula.

En las moléculas que absorben radiación UV-VIS, los fotones provocan transiciones electrónicas a niveles de energía superiores. Las transiciones ocurren cuando la energía de los fotones incidentes coinciden con la diferencia de energía entre dos estados electrónicos de la molécula. Dichas diferencias de energía son singulares para cada especie absorbente. La complejidad del espectro UV-VIS se debe a que en la molécula ocurren simultáneamente transiciones electrónicas, vibracionales y rotacionales, ver figura 2.8. Debido a que muchas transiciones con diferentes energías pueden ocurrir, las bandas se amplían.

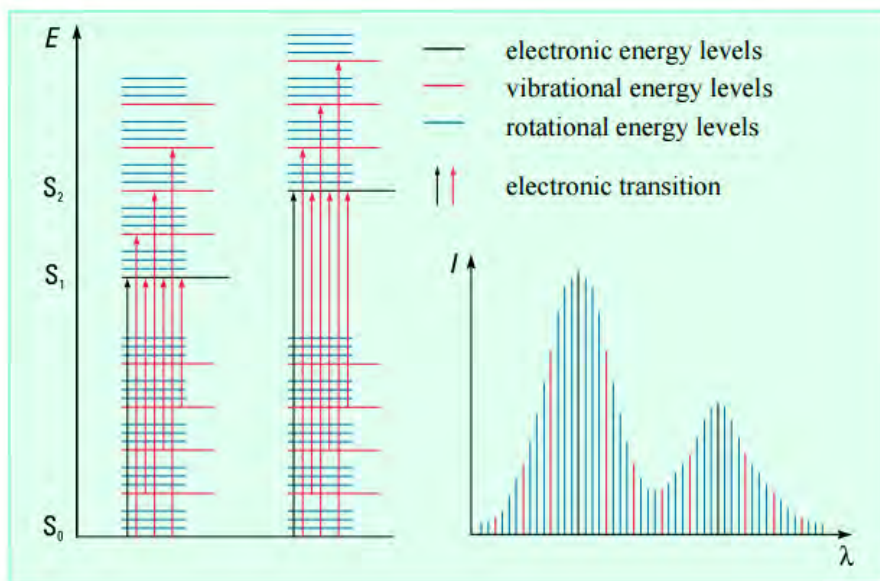


Figura 2.8: Transiciones electrónicas en la región UV-VIS en moléculas absorbentes [8]

La espectroscopia se basa en la medición de transmitancia T o de la absorbancia A ; se puede obtener A si se conoce T y viceversa, con la ley de Beer:

$$A = -\log(T) = \log\frac{I_0}{I} = \epsilon bc \quad (2.5)$$

Donde c es concentración de las especies absorbentes, ε es la absorción molar, b es la longitud de trayectoria de la muestra.

Pero A y T no pueden medirse directamente, debido a la atenuación del haz, esparcimiento causado por moléculas grandes, o por la absorción de la radiación por el recipiente o sustrato que contiene a la muestra. Se mide entonces la intensidad de radiación incidente I_0 y la radiación transmitida I . Se expresa la intensidad de luz en términos de la absorbancia y transmitancia en las siguientes ecuaciones [3]

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2.6)$$

Se define la absorbancia como:

$$A = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (2.7)$$

Comúnmente en el espectro UV-VIS se grafica absorbancia (%) contra longitud de onda [nm], debido a que la relación entre la absorción y la concentración es lineal.

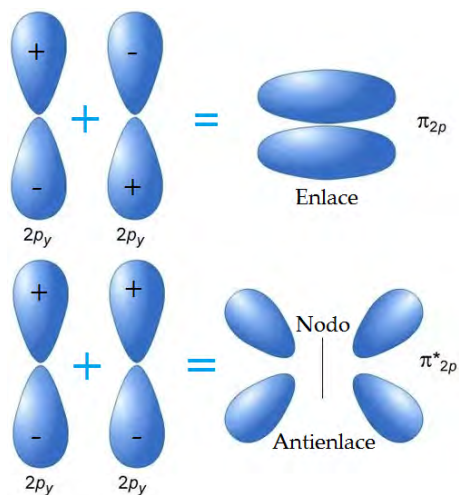
El espectro UV-VIS generalmente muestra pocas bandas de absorbancia, si lo comparamos con un espectro de radiación infrarroja. El espectro de absorbancia resulta de la presencia de los enlaces moleculares, cuando la energía de los fotones coincide con el rango de la separación energética entre los niveles electrónicos que corresponden a pares electrónicos no-enlazados y enlaces insaturados.

Los orbitales atómicos se combinan linealmente para formar orbitales moleculares. Los orbitales atómicos están definidos por una función de onda y la combinación lineal de ellos formarán interferencias constructivas (orbital molecular de enlace) y destructivas (orbital molecular antienlace):

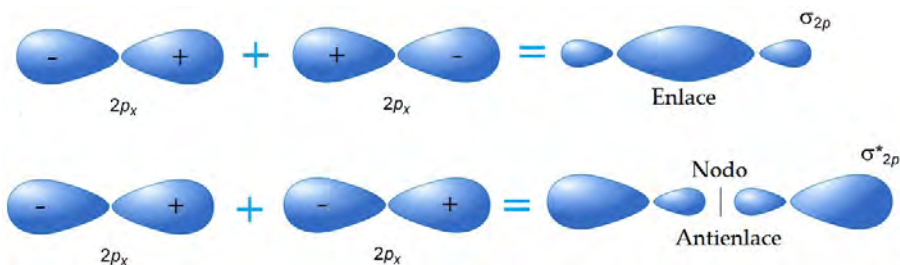
El orbital molecular de enlace: σ o π , el cual aumenta la densidad electrónica entre los átomos enlazados y por lo tanto es de menor energía que los orbitales atómicos, por lo que hay formación del enlace. El orbital molecular de antienlace σ^* o π^* tiene menor densidad electrónica entre los núcleos y mayor energía que los orbitales atómicos, se cancela el enlace y se forma un plano nodal.

Las moléculas se forman debido a que la energía del sistema disminuye con respecto a las energías de cada átomo por separados. La superposición de los orbitales

atómicos entonces da lugar a los orbitales moleculares, en la figura 2.9 se ilustran los orbitales moleculares σ y π .



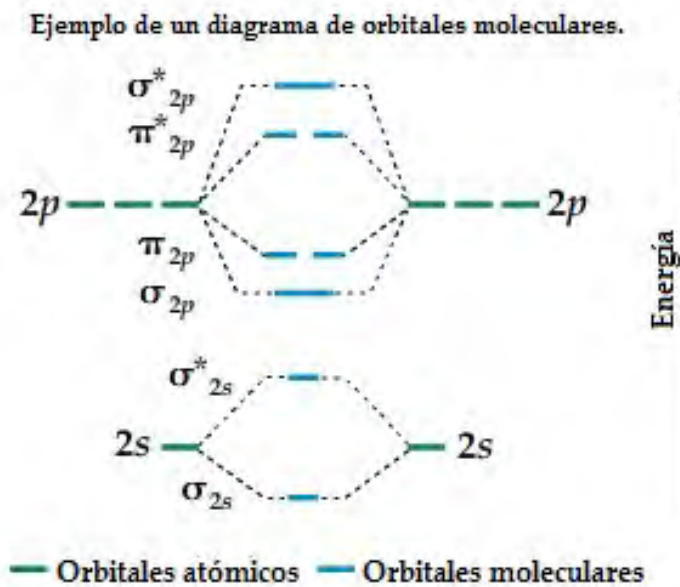
(a) Orbitales moleculares π (enlace) y π^* (antienlace)



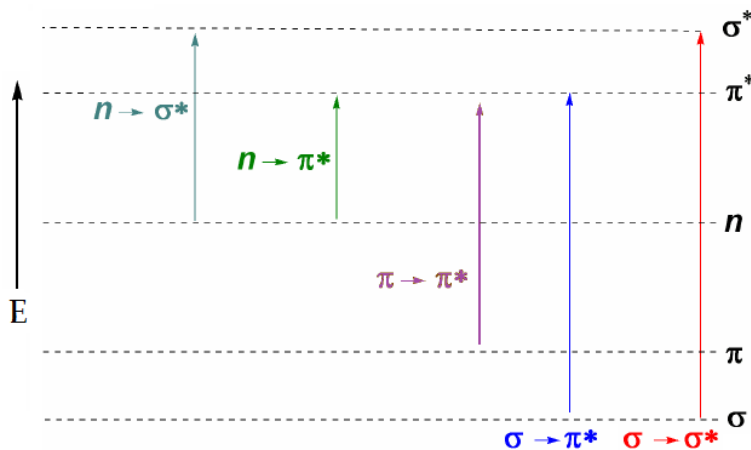
(b) Orbitales moleculares σ (enlace) y σ^* (antienlace)

Figura 2.9: Formación de orbitales moleculares a) perpendiculares y b) frontales.

La formación de orbitales moleculares para moléculas con enlaces dobles (con electrones que poseen interacción tipo π y electrones con interacción tipo σ), se presenta en la figura 2.10a. El orbital molecular describe la densidad de carga electrónica al solapamiento de orbitales atómicos. Los orbitales moleculares se llenan por orden de energía, respetando el Principio de exclusión de Pauli y la regla de Hund. El orbital de menor energía tiende a ser el orbital σ . Siendo el de mayor energía en orbital σ^* . El orbital ocupado de energía mayor a σ tiende a ser el orbital π . El orbital no ocupado π^* tiende a ser el de menor energía.



(a) Ejemplo de Diagrama de orbitales moleculares



(b) Transiciones electrónicas en orden a su energía.

Figura 2.10: a) Formación de orbitales moleculares para moléculas con enlaces π y σ . b) Transiciones electrónicas posibles entre orbitales.

La absorción de radiación UV-VIS por moléculas es por las transiciones electrónicas de los grupos que las conforman, dichos grupos son llamados cromóforos. Un cromóforo es un grupo que usualmente contiene enlaces π , la gran cantidad de elec-

trones son los causantes de la absorción de la radiación UV-VIS. Dicha absorción de energía provoca transiciones electrónicas que lleva a los electrones a estados excitados. En la figura 2.10b muestra los niveles electrónicos de energía en una molécula y sus posibles transiciones.

La respuesta espectral de las especies permite caracterizarlas químicamente. Dependiendo del tipo de transición electrónica que se produce, pueden aparecer diferentes especies absorbentes. Los tipos de transición se pueden dividir en: transiciones electrónicas entre orbitales, transiciones de transferencia de carga y transiciones de campo ligante [46].

2.4. Microscopia de Fuerza Atómica: AFM

La microscopia de fuerza atómica es una herramienta que permite explorar muestras de diferente naturaleza electrónica (aislante, semiconductor o conductor) a una escala atómica. La microscopia de fuerza atómica se fundamenta en la detección de fuerzas de interacción entre átomos (atractivas o repulsivas) y también fuerzas electromagnéticas [47]. Entonces el microscopio de fuerza atómica mide el gradiente de fuerzas que realiza la punta sobre la superficie. La resolución lateral y vertical inferior de AFM es de 0,2 Å (distancia entre átomos). En condiciones específicas las imágenes obtenidas por AFM pueden representar la topografía de la muestra y del orden de micras ($1 \times 10^{-6}\text{m}$) a ángstroms ($1 \times 10^{-10}\text{m}$).

La esencia de la técnica AFM es la interacción de la muestra y la punta. La punta se sitúa en un extremo de un pequeño brazo de palanca flexible, llamado cantilever. Cuando interacciona el cantilever con la superficie de la muestra, el cantilever modifica su comportamiento dependiendo de las fuerzas de interacción atómica (fuerzas de Van der Waals, electrostáticas) y existen variaciones en la deflexión y amplitud de oscilación.

Los principales modos de operación de AFM son: modo estático (*contacto*) y modo dinámico (modulación de amplitud *Tapping* y modulación de frecuencia *No contacto*).

2.4.1. AFM en modo contacto

También es conocido como modo de fuerza constante. La punta se encuentra en el extremo del cantilever e interactúa con la superficie de la muestra por fuerzas interatómicas, ocasionando deflexión vertical en el cantilever. La deflexión puede ser positiva o negativa, depende si se trabaja con fuerza repulsiva o atractiva, respectivamente. Como el modo de operación es de fuerza constante, la deflexión del cantilever permanece constante, debido a que la posición en el eje z del piezoelectrico se reajusta con la interacción de la punta y la muestra.

Para la detección óptica, un haz láser es reflejado detrás del cantilever (recubierto por una delgada capa metálica para que funcione como espejo) en un fotodetector sensible a la posición, es decir, los desplazamientos verticales son visualizados por la desviación del láser, la interacción entre la punta y la superficie se regula al mantener una referencia del cantilever, que se obtiene ajustando la longitud del piezoelectrico con el lazo de realimentación, de esta manera la deflexión se mantiene constante. Cuando la punta realiza el barrido sobre la superficie a fuerza constante, se obtiene la topografía de la superficie.

El inconveniente de este modo se debe a que la punta se encuentra en permanente contacto con la superficie de la muestra y el área de integración es muy grande e impide que la resolución sea atómica. Además que al momento en que la punta recorre la superficie, la punta puede dañar la muestra, lo que presenta una desventaja por la posible modificación de la superficie

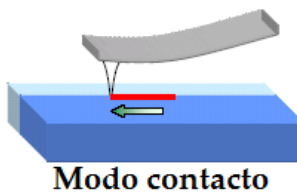


Figura 2.11: AFM modo contacto

2.4.2. AFM por modulación de amplitud AM

También conocido como modo *tapping*, es uno de los modos en los que no existe contacto continuo entre la punta y muestra. Una excitación mecánica con amplitud constante A_{ext} de oscilación del cantilever y con frecuencia fija f_{ext} se aplica al cantilever, f_{ext} es una frecuencia ligeramente menor a la frecuencia de resonancia libre

del cantilever f_c . La interacción de la punta y la muestra (por fuerzas atractivas de largo alcance o repulsivas de corto alcance) modifica la fase y frecuencia de resonancia del cantilever, estas características se utilizan para regular la distancia entre la punta-superficie considerando como referencia una amplitud y así se obtiene la formación de la imagen.

Una de las ventajas de este modo se debe a que el ruido que se origina en la deflexión del cantilever es menor en comparación con el modo de contacto, debido a que en el modo *tapping* el cantilever tiene una componente que es inversamente proporcional con la frecuencia, lo que ofrece mayor resolución.

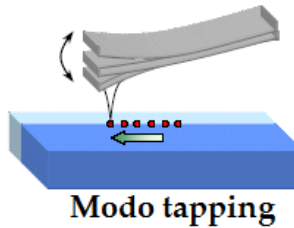


Figura 2.12: AFM modo contacto

2.4.3. AFM por modulación de frecuencia

Se desarrolló con el propósito de aumentar la sensibilidad del modo *tapping*, por lo que permite alcanzar la resolución atómica. También se le conoce como modo de no contacto. Se le denomina así porque la distancia entre la punta y la muestra se encuentra lo suficientemente alejadas para que sólo haya fuerzas atractivas, van der Waals, electrostáticas y repulsivas. Se aplica una excitación mecánica en el soporte del cantilever, se miden los cambios en la frecuencia de oscilación del cantilever Δf , inducidos durante la interacción entre la punta y la muestra. El valor de Δf se usa como señal de realimentación para obtener la topografía [48].

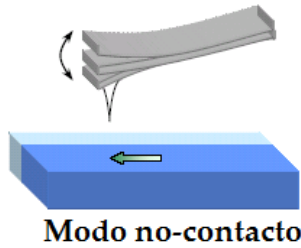


Figura 2.13: AFM modo contacto

2.5. Impedancia

La impedancia (Z) cuya unidad es $[\Omega]$ se define como la oposición que experimenta un dispositivo o circuito electrónico a la circulación de la corriente alterna (AC), dada una frecuencia. La impedancia se representa como una cantidad compleja y se grafica en el plano complejo como un vector, ver figura 2.14.

La parte real de la impedancia es la resistencia R y la parte imaginaria es la reactancia X (cuyo comportamiento indica si el elemento es capacitivo, inductivo o resistivo), como se muestra en la figura 2.14. Se representa usando coordenadas rectangulares $R + jX$ o en la forma polar como una magnitud y ángulo de fase: $|Z| \angle \theta$.

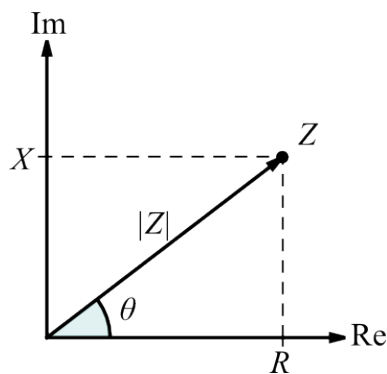


Figura 2.14: Impedancia Z representada en el plano complejo.

Con la representación matemática de la ecuación 2.9 se pueden obtener otros

parámetros convenientes como:

$$\frac{1}{Z} = \frac{1}{R + jX} = Y = G + jB \quad (2.8)$$

Donde Y es la admitancia cuya unidad es el siemen [S], G es la conductancia y B es la susceptancia.

Si la medición es en serie, se habla de impedancia. Si se lleva a cabo en paralelo, nos referimos a la admitancia. Las expresiones son las siguientes:

Impedancia, en serie:

$$Z = R + jX \quad (2.9)$$

Impedancia en paralelo, componentes real e imaginaria:

$$Z = \frac{jRX}{R + jX} = \frac{RX^2}{R^2 + X^2} + j \frac{R^2X}{R^2 + X^2} \quad (2.10)$$

Admitancia:

$$Y = G + jB \quad (2.11)$$

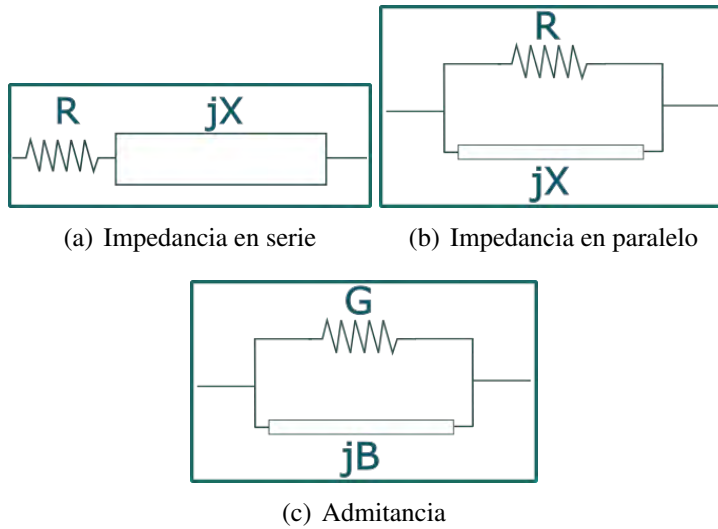


Figura 2.15: Expresiones en serie y paralelo de la Impedancia, con componentes real e imaginaria

La ecuación de la impedancia 2.10 es un poco más compleja que la ecuación de la admitancia 2.11, es por eso que para la conexión en paralelo es mejor usar la ecuación de la admitancia.

La parte imaginaria de Z es la reactancia X , la cual puede ser: inductiva X_L o capacitiva X_C . Se pueden expresar como:

$$X_L = 2\pi fL = \omega L \quad (2.12)$$

$$X_C = \frac{1}{2\pi fC} = \frac{1}{\omega C} \quad (2.13)$$

Donde f es la frecuencia de interés, L es la inductancia y C es la capacitancia.

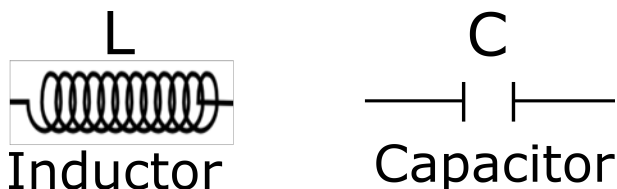


Figura 2.16: Reactancia: Inductiva X_L y Capacitiva X_C .

En la figura 2.15 se muestran planos de medida de la impedancia (en serie y paralelo), el ángulo determina el comportamiento resistivo, inductivo o conductivo.

En el plano complejo, la parte real de la impedancia es la resistencia y la imaginaria es la reactancia, como ya se había mencionado. El comportamiento de la parte imaginaria de la impedancia nos da información útil para la identificación del tipo de elemento, en la figura 2.17 se observa la representación de cada una en el plano complejo.

Si la parte imaginaria es igual a cero, es decir no tiene ángulo de desfase y el radio-vector coincide con la dirección en el eje real, estamos hablando de un componente puro y $\bar{Z} = R$

Si la parte imaginaria tiene un desfase de 90° o $\frac{\pi}{2}$, se trata de un elemento inductivo (L) y en el plano complejo estará representado en el primer cuadrante eje real - eje imaginario positivo. Representado como: $\bar{Z} = L \cdot \omega$.

Finalmente si la parte imaginaria de la impedancia está desfasada -90° o $-\frac{\pi}{2}$, el elemento es capacitivo (C) y se representa en el plano complejo en el eje real - eje imaginario negativo). Y está representado por: $\bar{Z} = -j \frac{1}{C \cdot \omega}$

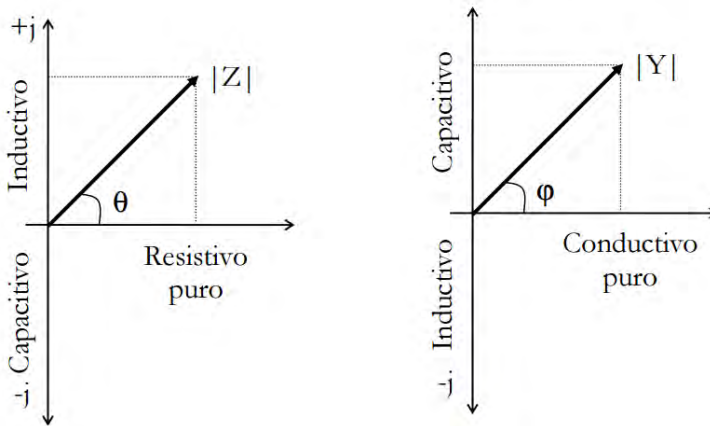


Figura 2.17: Representación en el plano complejo de impedancia (izquierdo) y admitancia (derecha) donde observa geométricamente el carácter de las componentes a partir de los ángulos θ y ϕ .

2.6. SEM

El principio de la microscopia electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy) es como el de un microscopio convencional, solo que en vez de luz se usan electrones, SEM es una de las técnicas de caracterización y análisis de microestructuras [49]. Se trata de microscopia de alta resolución del orden de nanómetros, la característica más valiosa es la apariencia tridimensional de la muestra gracias a la gran profundidad de campo, tiene un efecto de relieve producido por los electrones secundarios y retrodispersados, además que se pueden observar materiales orgánicos e inorgánicos [50].

Los componentes básicos son: el sistema de lentes, el cañón de electrones, los detectores de electrones y los monitores de imagen y fotografía 2.18.

La columna electrónica consiste en un cañón de electrones y las lentes, que operan en el vacío. Se calienta un filamento de tungsteno, lo que genera una diferencia de potencial y el cañón acelera los electrones primarios. Las lentes permiten direccionar el haz de electrones; la lente condensador enfoca el haz de electrones en una lente final la cual enfoca finalmente el haz sobre la muestra a analizar. Las lentes entonces se utilizan para reducir el diámetro de la fuente de electrones y ofrecer un haz con mayor enfoque sobre la muestra [49].

La interacción del haz con la muestra genera muchas señales que al detectarse pueden producir imágenes de alta resolución, las señales que se emplean son de los electrones secundarios y de los electrones retrodispersados. Para obtener la imagen, la intensidad de la señal que produce la interacción haz-muestra se mide a lo largo de la superficie de la muestra a analizar. Es decir, las variaciones en la señal al moverse el haz sobre la muestra generan cambios en la intensidad de la imagen. Es necesario controlar (encontrar) los parámetros para obtener buenos resultados en la obtención de imágenes.

Esta técnica además permite llevar a cabo un análisis cualitativo de la variación composicional, gracias al análisis de la intensidad de los electrones retroesparcidos (EDS).

En este trabajo se utilizó el microscopio de mesa JCM-6000 Plus Jeol, que es compacto y simple de operar como una cámara digital, con una ampliación hasta de 60,000 X aumentos. El funcionamiento es a través de una pantalla táctil, y se

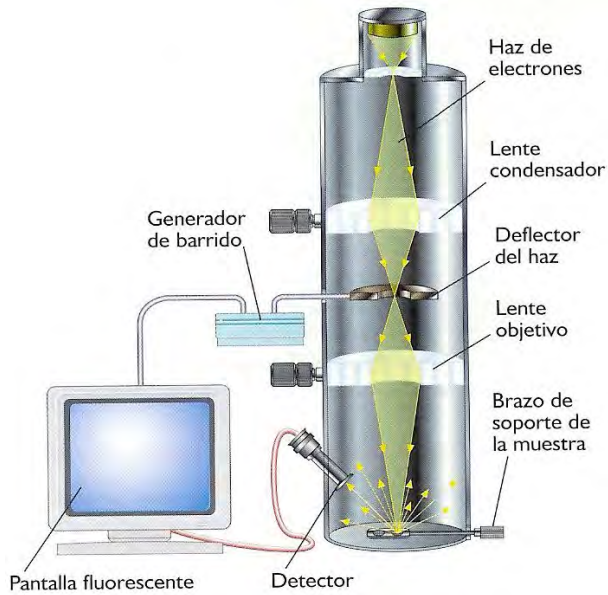


Figura 2.18: Esquema del principio de la microscopia electrónica de barrido de la interfaz y GOx rGO [9]

simplifica con un enfoque automático, alineación automática, contraste automático y controles de brillo automático. Funciona en los modos de alto vacío: bajo y alto con tres ajustes de voltaje.

Resultados experimentales

3.1. Obtención del rGO a partir del GOx

El GOx es un compuesto de carbono, oxígeno e hidrógeno ($C_xO_yH_z$), cuya estructura depende del método de obtención y el grado de oxidación. Se trabajó el GOx en dos presentaciones: *Pasta ID-NANO* con una concentración 0.005 g/mL, color ámbar saturado y *dispersión en H₂O Sigma Aldrich* con una concentración 4 mg/mL y color ámbar tenue, con la finalidad de comparar ventajas y desventajas en las etapas de la preparación de muestras.

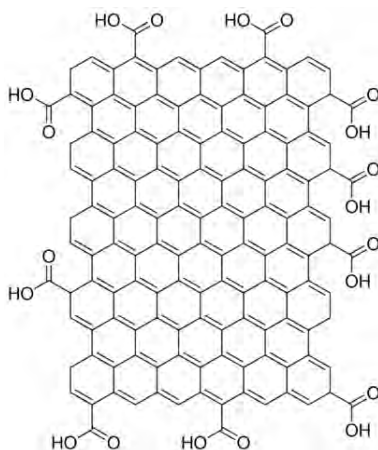


Figura 3.1: Estructura del óxido de grafeno

3.1.1. GOx en presentación pasta

Se preparó una disolución con 1 g de GOx presentación pasta con 5 mL de H_2O destilada y 5 mL de EtOH, enseguida la disolución se colocó en baño ultrasónico *Ultrasonic Cleaner SB120-DTN* durante 120 min. en un medio de agua destilada. Posteriormente la disolución se filtró con un filtro *Whatman 540* con tamaño de poro de $8 \mu m$, el filtrado se desechó y se utilizó el residuo de la filtración.

Se depositó el residuo de la filtración anterior de GOx en el centro de un portaobjetos de vidrio cuadrado de 2.5 cm de lado *VELAB GROUND EDGES VE-P20* de espesor 0.8-1.1 mm con un spin-coater casero conectado a una fuente de 2 A, el spin-coater comenzó con 200 rpm y se aumentó gradualmente hasta 300 rpm, adicionalmente se colocó un foco de 100 Watts a 30 cm por encima de las muestras como se observa en la figura 3.2 para ayudar en el secado.

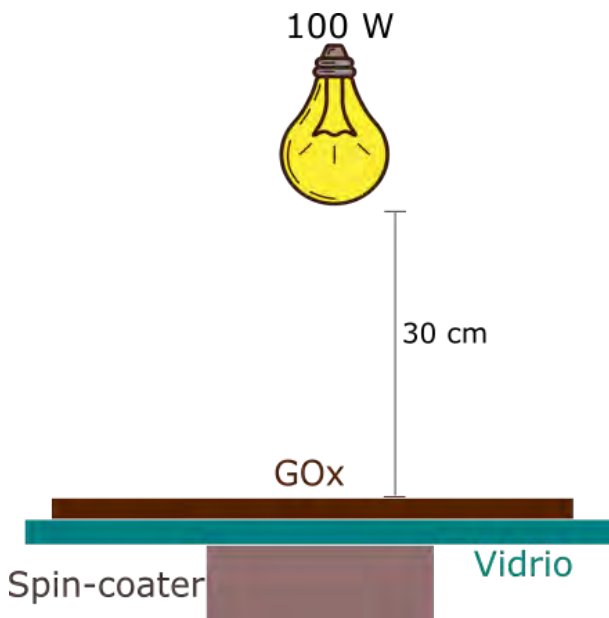


Figura 3.2: Deposito de óxido de grafeno sobre sustrato de vidrio por spin-coater.

3.1.2. GOx en presentación de dispersión

Se midieron 2.0 mL de GOx en presentación de dispersión, enseguida se colocaron en un baño ultrasónico durante 120 min. en un medio de agua destilada en el equipo *Ultrasonic Cleaner SB120-DTN*, posteriormente se depositaron $40 \mu L$ de

GOx dispersión sobre un sustrato de vidrio *VERLAB GROUND EDGES VE-P20* con espesor de 0.8-1.1 mm, en un spin-coater casero.

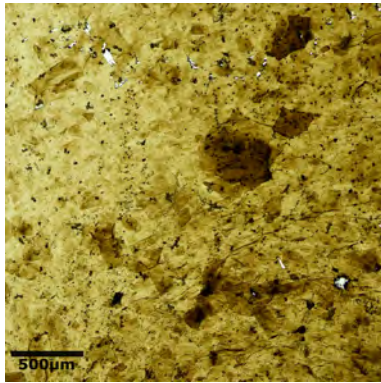
3.1.3. Grabado de GOx para obtener rGO

La superficie de GOx se redujo utilizando la técnica de grabado láser, se colocó la muestra sobre la plataforma del equipo de micro-fabricación, posteriormente la superficie de la muestra se enfocó con el objetivo del microscopio de 20x aumentos alineando en la posición z para visualizar la muestra y supervisar el proceso de grabado en tiempo real. Posteriormente se alineó la muestra en los ejes xy con el respectivo motor paso a paso en el lugar donde comenzó el grabado. Después se enfocó el láser de luz roja de 650 nm con la superficie de GOx detectando el spot del láser con un CCD y visualizando en el monitor, el GOx tiene la ventaja de ser color ámbar (absorbente) y cuando esta enfocado se observa una línea negra sobre el spot de luz láser (con forma de elipse).

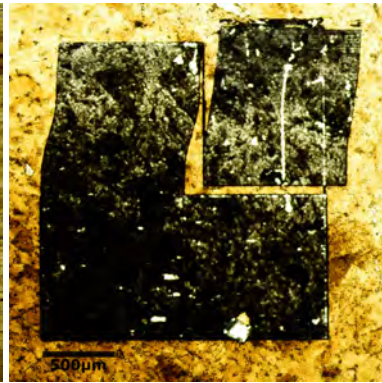
Con la hoja de cálculo de excel *CNC-laser* se controlaron los parámetros del grabado y se insertó el diseño a grabar, el cual fue una tabla llena de ceros (0) que se traduce en la conversión binaria como vacío (le indica al láser permanecer apagado), pero en el equipo de microfabricación permanece encendido el láser para un grabado continuo. Dicho patrón fue elegido para obtener una microestructura cuya superficie de GOx quedara completamente reducida.

Para los grabados se utilizó la unidad Digital Versatile Disc (DVD) con láser de luz infrarroja de baja energía (780 nm), el voltaje utilizado fue de 0.82 V y la corriente máxima utilizada fue de 150 mA, el tiempo de exposición de 5.8 ms por pulso, con 20 pulsos por pixel para obtener grabados de gran profundidad, con una distancia entre pixel y pixel de 4 μm , con el láser el modo continuo (con el láser encendido permanentemente).

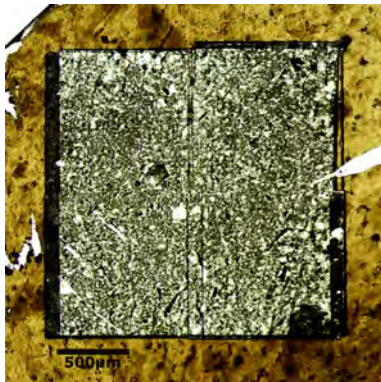
Se realizaron muestras con 1, 2, 3 y 4 grabados transpuestos en una área de $2 \times 2 \text{ mm}^2$ en el GOx en ambas presentaciones. A continuación se muestran las micrografías con 4x aumentos de los grabados en la figura 3.3 en GOx-pasta y en la figura 3.4 GOx-dispersión.



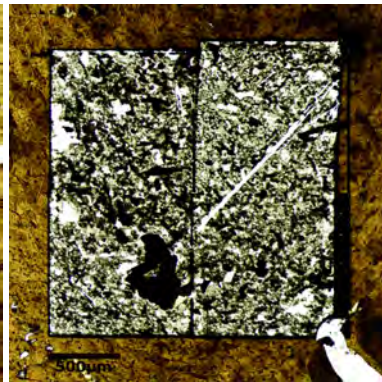
(a) GOx



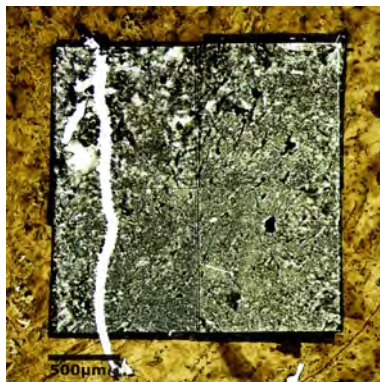
(b) rGO con 1 grabado



(c) rGO con 2 grabados



(d) rGO con 3 grabados



(e) rGO con 4 grabados

Figura 3.3: Microscopía óptica de GOx-pasta y rGO-pasta de 1-4 grabados con 4x aumentos.

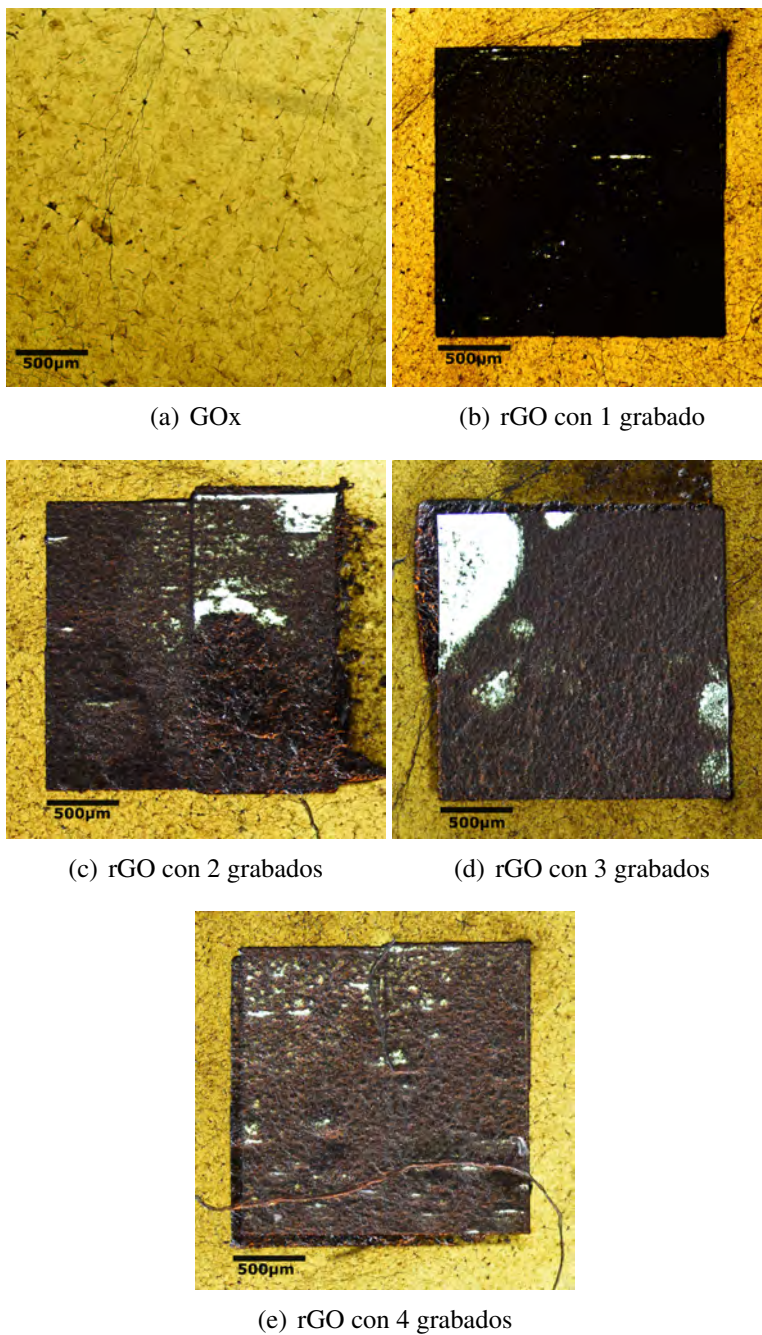


Figura 3.4: Microscopía óptica de GOx-dispersión y rGO-dispersión de 1-4 grabados con 4x aumentos.

Se muestra en la figura 3.3 a) que el GOx-pasta sin grabar tiene partículas que sobresalen, en b) se observa que el material cambió su color de ámbar a gris oscuro, en c), d) y e) se observa que el material cambio de color de ámbar a gris plata.

Se observa en la figura 3.4 a) que el GOx-dispersión sin grabar es homogéneo en la superficie y en color, en b) el cambio de color de ámbar claro a un gris oscuro en c), d) y e) la muestra cambió de color de ámbar a gris plata.

3.2. Caracterización del material

En esta sección se describen las caracterizaciones que se realizaron a las miroestructuras con la finalidad de obtener información estructural, topológica, propiedades ópticas y eléctricas de los recubrimientos grabados obtenidos.

3.2.1. Espectroscopia FTIR

Se realizó espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier FTIR en el equipo *Perkin Elmer Spectrum Two*. Los espectros muestran la transmitancia vs el número de onda [cm^{-1}], en el rango de 4500 a 550 cm^{-1} . Con una fuerza de 10 μN

En la figura 3.5 se muestran los espectros en FTIR de GOx-pasta y de rGO de 1-4 grabados en GOx-pasta.

En la figura 3.6 se muestran los espectros en FTIR de GOx-dispersión y de rGO de 1-4 grabados en GOx-dispersión.

Como ya se mencionó la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier permite identificar los grupos funcionales presentes en un compuesto, sustentado por la excitación de modos normales de vibración que son característicos de dichos grupos.

En la tabla 3.1 se muestran las bandas presentes en el espectro FTIR para óxido de grafeno y óxido de grafeno reducido.

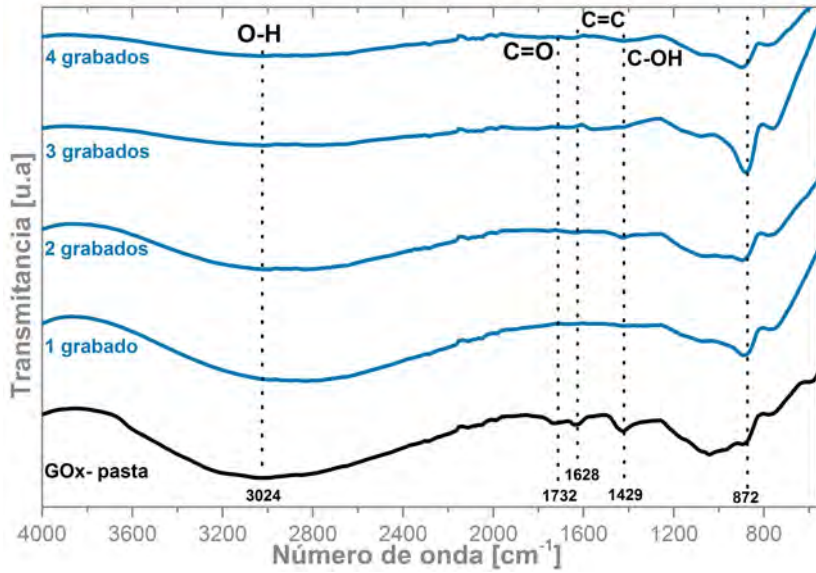


Figura 3.5: FTIR de GOx-pasta y rGO 1-4 grabados.

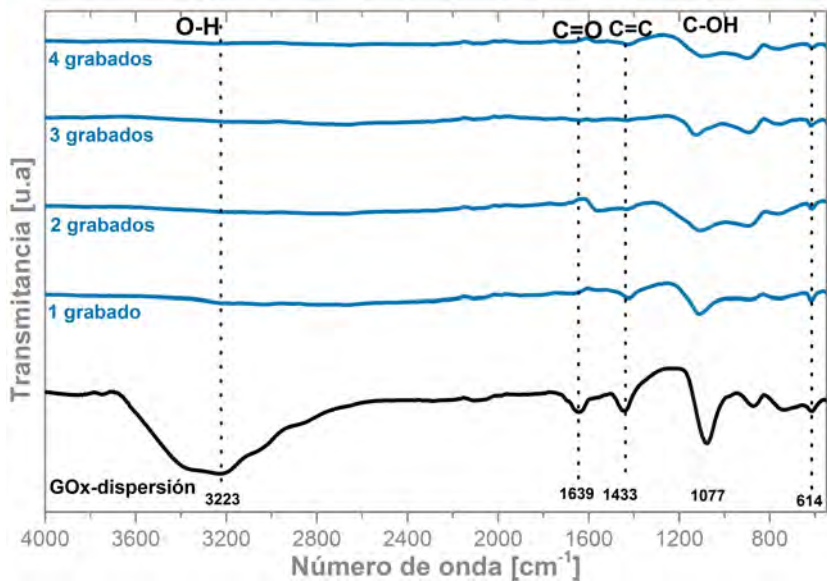


Figura 3.6: FTIR de GOx-pasta y rGO 1-4 grabados.

Tabla 3.1: Posición de las bandas en FTIR asociadas a grupos funcionales presentes en GOx y rGO.

Asignación de las bandas en FTIR para GOx y rGO		
	Posición de la banda cm^{-1}	Vibración asociada
(1)	Intensa y amplia a 3000-3600	Vibración por tensión del enlace O-H
(2)	1665-1760	Vibración por tensión del enlace C=O de grupos carboxilos y carbonilos
(3)	1400-1600	Vibración por flexión del enlace C-C, C=C debido al anillo aromático de C.
(4)	1000-1320	Vibración por flexión del enlace C-OH en los grupos hidroxilo
(5)	1020-1200	Vibración por tensión de grupos epoxi
(6)	alrededor de 980	Vibraciones por grupos epoxi, éter o peróxido

A continuación se identifican las bandas características de los espectros obtenidos:

En (1) las bandas que se encuentran en 3024 y 3223 cm^{-1} corresponden a vibraciones por tensión del enlace O-H del grupo funcional de alcoholes de las microestructuras grabadas en GOx-pasta y GOx-dispersión respectivamente.

En (2) se identifica la banda en la posición 1732 cm^{-1} más estrechas corresponden a vibraciones por estiramiento de grupos carbonilos y carboxilos (C=O).

En (3) se las bandas que aparecen en 1628 cm^{-1} y en 1639 cm^{-1} son debido a vibraciones por tensión *skeletal* de dominios sin oxidar C=C.

En (4) se observan las bandas en 1429 cm^{-1} y en 1433 cm^{-1} se atribuyen a los enlaces C-OH por vibraciones de estiramiento de grupos hidroxilo (son contribuciones del grupo funcional de alcoholes y de ácidos carboxílicos).

En (5) se aprecia la banda con una posición en 1077 cm^{-1} asociada a una vibración por tensión del enlace C-OH

En (6) se muestran las contribuciones en 872 cm^{-1} y 614 cm^{-1} corresponden a las vibraciones por estiramiento de los enlaces C-O-C epoxi o grupos alcoxi.

Los espectros de FTIR de GOx-pasta y GOx-dispersión muestran la presencia de los grupos funcionales que contienen oxígeno y que caracterizan al óxido de grafeno. Los espectros FTIR de las microestructuras después de los grabados muestran que las intensidades de las bandas asociadas a grupos funcionales con oxígeno disminuyen considerablemente en relación al GOx. La espectroscopia infrarroja nos permitió verificar la reducción del GOx-pasta y GOx-dispersión por igual, cabe resaltar que la intensidad de las bandas disminuye conforme aumenta el número de grabados sobre ambos GOx.

3.2.2. Espectroscopia RAMAN

Se realizó espectroscopia Raman el equipo Thermo Scientific DXR Raman Microscope, de resolución $9\text{-}15\text{ cm}^{-1}$, con un rango espectral $400\text{-}3793\text{ cm}^{-1}$, con tiempo de exposición 4 s, la longitud de onda del láser utilizada fue 785 nm a una potencia de 4 mW ; para todas las muestras se utilizaron los mismos parámetros. El objetivo con el que se visualizaron fue de 20×1 y 20×2 .

En la figura 3.7 se muestran los espectros Raman obtenidos y en la tabla 3.2 se muestran las posiciones de las bandas para GOx-pasta y rGO-pasta. Y en la figura 3.8 se observan los espectros Raman y en la tabla 3.3 se observan las posiciones en las que se encuentran las bandas en GOx-dispersión y rGO-dispersión.

En las figuras 3.7 a) 3.8 a) se observan los espectros Raman del GOx, en la región de 1950 cm^{-1} a 2500 cm^{-1} se observa la contribución de la fluorescencia de los grupos funcionales de enlaces de oxígeno, en la región $2400\text{ cm}^{-1}\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ de las figuras 3.7 b) y 3.8 b) se encuentran las bandas 2D y D+D' y existe ruido en los espectros.

El resto de los espectros Raman pertenecen a las microestructuras grabadas (rGO), no hay contribución de la fluorescencia y tampoco poseen ruido los espectros. En el espectro Raman 3.7 a) del GOx la posición de la banda D y G se encuentran en 1358 cm^{-1} y 1596 cm^{-1} respectivamente, con el primer grabado la posición de las bandas sufre un corrimiento Raman hacía la izquierda y las posiciones de la banda D y G son 1340 cm^{-1} y 1583 cm^{-1} respectivamente; ahora bien con el segundo

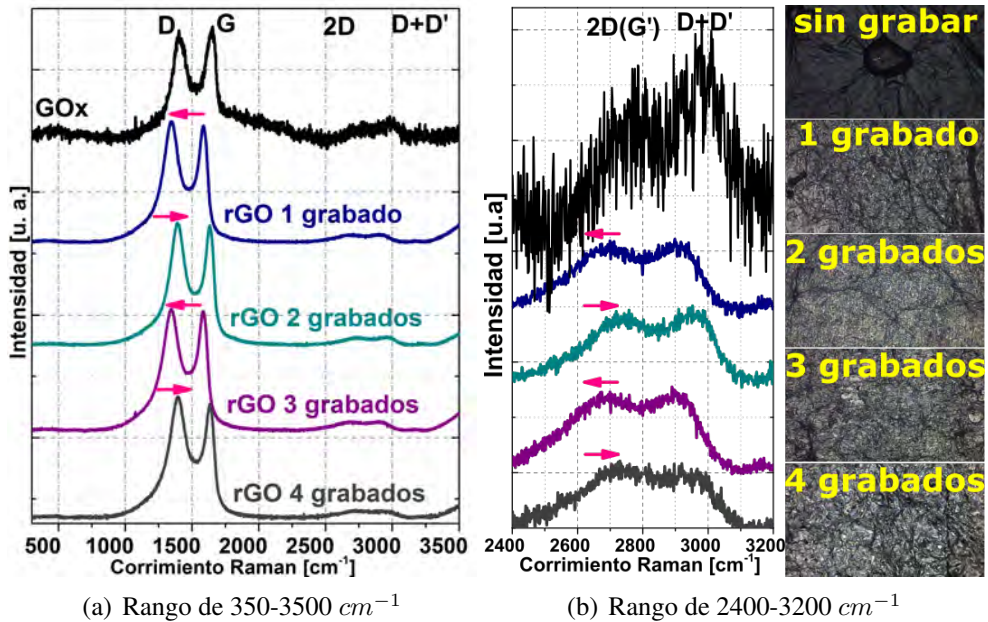


Figura 3.7: Espectro Raman de GOx-pasta y de rGO de 1-4 grabados.

grabado las nuevas posiciones de las bandas son: 1346 cm^{-1} y 1586 cm^{-1} es decir, el espectro Raman sufre un corrimiento hacia la izquierda; con el tercer grabado las posiciones de las bandas se recorren hacia la derecha con posiciones en 1344 cm^{-1} y 1583 cm^{-1} para la banda D y G respectivamente; finalmente para las microestructuras con cuatro grabados la posición de las bandas tiene un corrimiento hacia la derecha con posiciones en 1341 cm^{-1} y 1582 cm^{-1} .

Tabla 3.2: Espectroscopia Raman en GOx-pasta y rGO de 1-4 grabados.

Muestra	Posición de las bandas en cm^{-1}			
	Banda D	Banda G	Banda G'	Banda D + D'
GOx-pasta	1358	1596	2772	2979
rGO 1 grabado	1340	1583	2663	2897
rGO 2 grabados	1346	1586	2721	2951
rGO 3 grabados	1344	1583	2675	2894
rGO 4 grabados	1341	1582	2724	2951

En la figura 3.8 se muestran los espectros Raman de GOx-dispersión y de las

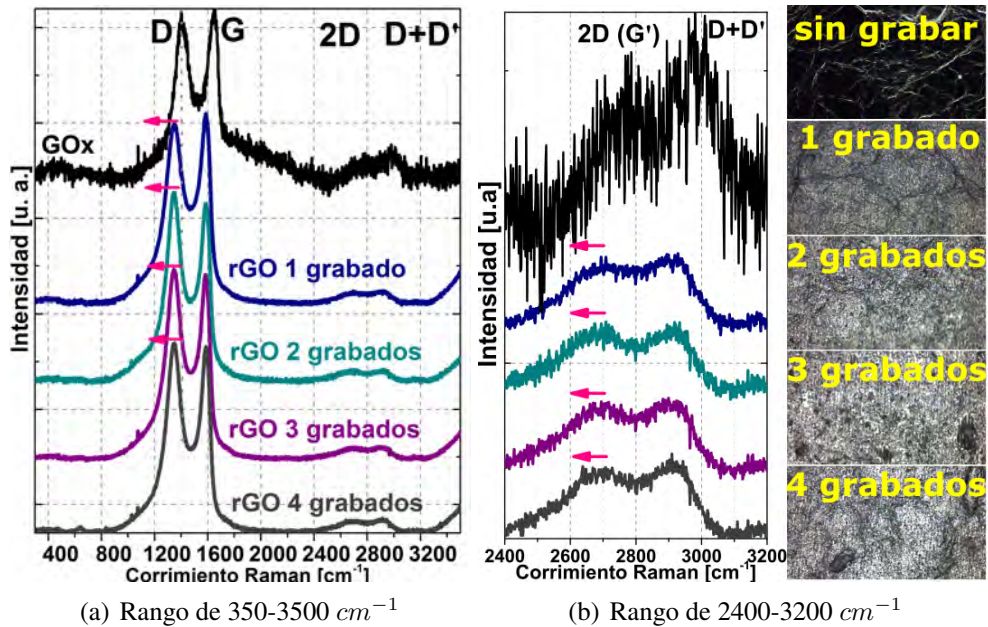


Figura 3.8: Espectro Raman de GOx-dispersión y de rGO de 1-4 grabados.

microestructuras grabadas, en la tabla 3.3 se observa la posición de la banda D y G es 1352 cm^{-1} y 1605 cm^{-1} respectivamente, para el resto de los espectros Raman de las microestructuras grabadas se observa que la posición de las bandas sufren corrimiento hacía la izquierda.

Tabla 3.3: Espectroscopia Raman en GOx-dispersión y rGO de 1-4 grabados.

Muestra	Posición de las bandas en cm^{-1} .			
	Banda D	Banda G	Banda G'	Banda D + D'
GOx-dispersión	1352	1605	2764	2982
rGO 1 grabado	1348	1583	2686	2912
rGO 2 grabados	1345	1583	2695	2918
rGO 3 grabados	1343	1583	2689	2912
rGO 4 grabados	1347	1584	2680	2915

En los espectros RAMAN se observa la banda **G** alrededor de $\sim 1585\text{ cm}^{-1}$ que está relacionada con el orden gráfico, se debe al movimiento relativo de pares de

átomos de C que se encuentran unidos en hibridación sp^2 a lo largo de la dirección del enlace. Esta banda, corresponde al fonón de alta frecuencia E_{2G} y se asocia a la doble degeneración de modos fonónicos (iTO y LO) en el centro de la zona de Brillouin. La banda G que aparece en los espectros Raman es la única que proviene de un proceso de primer orden.

También se observa la banda **D** alrededor de $\sim 1350\text{ cm}^{-1}$, la cual representa la introducción de defectos estructurales, con una densidad pequeña de defectos superficiales. El origen de la banda D se atribuye a modos vibracionales radiales de los 6 átomos de C en anillos aromáticos y requiere de un defecto para su activación [51]. Esta banda proviene de un proceso de esparcimiento de segundo orden. El origen de esta banda se debe a fonones TO alrededor de la esquina **K** de la zona de Brillouin. La posición de esta banda se debe a la interacción del láser con un desorden en la estructura o porque el láser interactúa con un borde del grafeno.

El cociente de la intensidad relativa de las bandas D y G permite obtener un parámetro relacionado con el orden y la calidad del rGO ($\frac{I_D}{I_G}$). Esta intensidad crece con el desorden estructural de la red. Sin embargo, $I_D/I_G \approx 3.4$, puede disminuir aunque aumente el desorden debido a la desaparición de anillos aromáticos. Es decir, cuando la banda D disminuye se debe a la disminución de anillos aromáticos.

Tabla 3.4: Espectroscopia Raman y razón I_D/I_G de GOx-pasta y rGO de 1-4 grabados.

Raman.			
Muestra	Banda D (cm^{-1})	Banda G(cm^{-1})	I_D/I_G (%)
GOx-pasta	1358	1596	0.92
rGO 1 grabado	1340	1583	1.02
rGO 2 grabados	1346	1586	1.03
rGO 3 grabados	1344	1583	1.06
rGO 4 grabados	1341	1582	1.01

La intensidad de la banda D en los espectros Raman es mayor para GOx-pasta y GOx-dispersión en comparación con la intensidad de la banda D de las microestructuras grabadas, lo que indica que los tamaños de los dominios sp_2 son menores para el GOx-pasta y GOx-dispersión debido a la oxidación.

La razón I_D/I_G es mayor para los recubrimientos grabados en comparación con el GOx, lo que sugiere una disminución en el tamaño medio de los dominios sp^2 después del grabado láser (reducción).

Tabla 3.5: Espectroscopia Raman y razón I_D/I_G de GOx-dispersión y rGO de 1-4 grabados.

Raman.			
Muestra	Banda D (cm^{-1})	Banda G(cm^{-1})	I_D/I_G (%)
GOx-dispersión	1352	1605	0.96
rGO 1 grabado	1348	1583	1.01
rGO 2 grabados	1345	1583	1.06
rGO 3 grabados	1343	1583	1.03
rGO 4 grabados	1347	1584	1.01

La banda D de todos los espectros obtenidos, nos indica que existe mucho desorden estructural por la unión con los grupos hidroxilo y epóxido en el plano basal del carbono.

La banda que aparece alrededor de $\sim 2700\text{ cm}^{-1}$ es la banda **2D (G')** y es un sobre tono de la banda D. Esta banda proviene de un proceso de segundo orden. Las reglas de selección Raman prohíben la presencia de la banda D para materiales sin desorden, pero la banda 2D aparece en materiales reales. La posición de esta banda es aún más sensible a la longitud de onda del láser incidente.

Otra banda que aparece alrededor de $\sim 3250\text{ cm}^{-1}$ en los espectros Raman obtenidos es la banda **2D'** o también llamada D+D' (que es un sobretono de la banda D'), a medida que el material se aleja de la estructura ideal, la banda de segundo orden se ensancha y pierde intensidad.

Después de los grabados láser hay un corrimiento de las bandas **2D** y **D+D'**. La posición de las bandas de GOx-pasta y rGO-pasta se muestra en la tabla ??, al tomar como referencia la posición de GOx-pasta se observa que las posiciones de las bandas (de los grabados) corren hacia la izquierda. Para el caso de 1 y 3 grabados con mayor corrimiento que para 2 y 4 grabados. En particular el corrimiento Raman de la banda 2D indica la reducción del GOx. Además de que el corrimiento sugiere un posible aumento en el tamaño medio de los dominios sp^2 .

La posición de las bandas de GOx-dispersión y rGO-dispersión se observan en la tabla 3.3, al tomar como referencia la posición de GOx-dispersión se observa que las posiciones de las bandas corren igualmente hacia la izquierda. Para ambos materiales las bandas se corren sin algún comportamiento que ascienda o descienda.

Al aumentar el número de laminas de grafeno, la banda G y 2D (G') cambian, para el grafeno monocapa la banda G' es mayor que la banda G, mientras que para grafeno multicapa la banda G' es más amplia y débil que la banda G. La banda 2D (G') por su parte determina el número de capas de grafeno (ver figura 2.6), cuando aumenta el número de láminas, la posición de la banda corre hacia la derecha y la banda se ensancha. Los espectros Raman obtenidos nos indican que existe gran aglomeración de hojuelas. El material obtenido en este trabajo se llama rGO debido a que el número de laminas de grafeno es mayor a 10, el análisis para identificar el número de laminas se complica y es difícil de procesar.

En la tabla 3.4 se observa el índice I_D/I_G para los grabados en GOx-pasta, como ya se mencionó al aumentar el número de grabados aumenta el cociente, esto se debe entonces a que el número de pasadas crea desorden en el material, pero en la cuarta pasada el cociente vuelve a disminuir. Lo que nos indica que los anillos aromáticos podrían estar desapareciendo, es decir la estructura hexagonal del enlace de los átomos de carbono podría presentar defectos y convertirse en pentágonos. Se observa el mismo comportamiento para el rGO obtenido al realizar los grabados sobre los recubrimientos de GOx-dispersión, como se observa en la tabla 3.5. [52]

También se observa que de 1700 a 2400 cm^{-1} en los espectros para GOx-pasta y GOx-dispersión se ven las contribuciones de la fluorescencia de los OH, también se puede observar espectros ruidosos en comparación con los espectros de rGO. El comportamiento concuerda con lo hasta ahora reportado con otros métodos de reducción, lo que nos indica que efectivamente el grabado láser es un método para reducir GOx.

3.2.3. Espectroscopia UV-VIS

Se realizó Espectroscopia UV-VIS en el equipo *Filmetrics LS-DT2, F10-RT-UV Analyzer thin-film* de Absorción, Reflexión, y Transmisión. Se midieron los espectros en el programa FILMeasure, las lámparas utilizadas fueron de Deuterio y Ha-

lógico.

En la figura 3.9 se muestran los espectros UV-VIS del recubrimiento de GOx pasta y de las microestructuras grabadas, donde se puede observar que la absorción disminuye en cuanto a intensidad, también se corre a longitudes de onda menores. Esto se debe a que la coloración del GOx y del rGO cambia, además que después del grabado hubo remoción del material en algunas zonas.

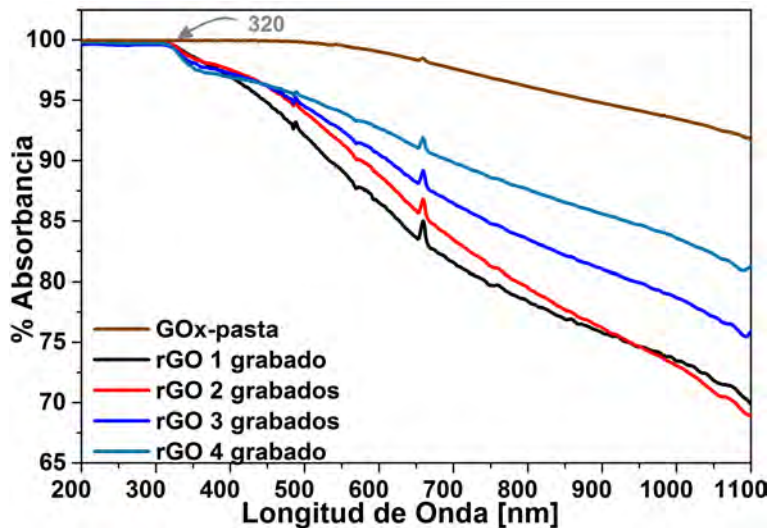


Figura 3.9: Espectro UV-VIS de absorción de rGO-pasta de 1-4 grabados.

En la figura 3.10 se muestran los espectros UV-VIS del recubrimiento de GOx-dispersión y de las microestructuras después de ser grabadas. En el rGO de 1-3 grabados se observa que la absorción disminuye en cuanto a intensidad y se corre a longitudes de onda menores. Esto se debe a que la coloración del GOx y del rGO cambia y después del grabado hay remoción del material, además que hay un cambio interesante en la coloración del material (por lo tanto en el índice de refracción). Aunque existe un cambio en el comportamiento para rGO con 4 grabados con respecto al resto, después de 303 nm de rGO de 1-3 grabados la absorción disminuye conforme aumenta el número de grabados, pero para rGO con 4 grabados la absorción permanece constante.

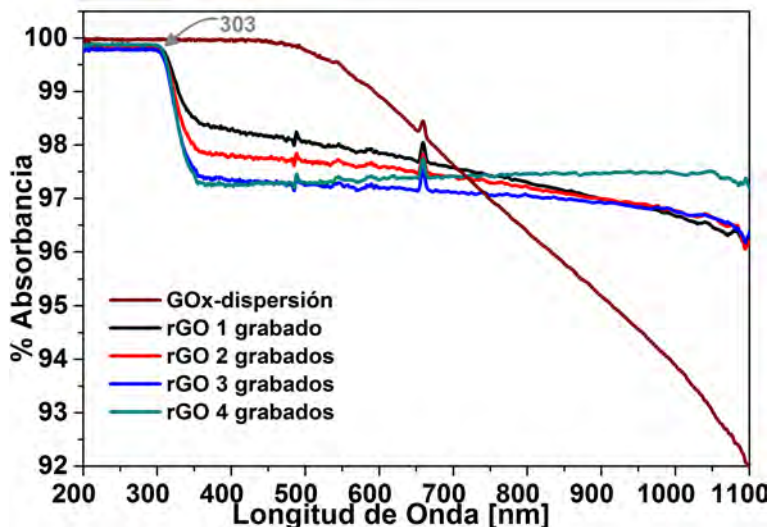


Figura 3.10: Espectro UV-VIS de absorción de GOx-dispersión de 1-4 grabados.

En materiales de carbono que contienen enlaces sp^2 y sp^3 , las propiedades optoelectrónicas están determinadas por los estados π de los sitios sp^2 [53]. Los niveles electrónicos π y π^* de sp^2 se encuentran dentro del bandgap de σ y σ^* de los estados sp^3 que se encuentran fuertemente localizados. Las propiedades ópticas de GOx y de los recubrimientos de rGO grabados con láser contienen una mezcla de enlaces sp^2 y sp^3 .

El comportamiento de los espectros obtenidos concuerdan con lo que se ha reportado en la literatura, aunque la mayoría de los autores reportan espectros tomados en soluciones o en películas delgadas [54] [55], el trabajo realizado aquí se hizo en microestructuras que son sólidas y con grandes cantidades de material si las comparamos con dichas soluciones. En la figura se observa que hay reproducibilidad en cuanto al número de grabados donde se ve cómo crece la absorción conforme aumenta el número de grabados para GOx-pasta/dispersión y rGO-pasta/dispersión, aunque hay un inconveniente con rGO de 4 grabados (parece más bien una falla a la hora de hacer la medición).

El estudio del grado de reducción del óxido de grafeno es posible debido a que su espectro de absorción presenta un máximo en 320 nm para GOx-pasta y en 303 nm para GOx-dispersión que se desplazan progresivamente hacia longitudes de onda mayores a medida que avanza el número de grabados en los recubrimientos de GOx

(grado de reducción del material).

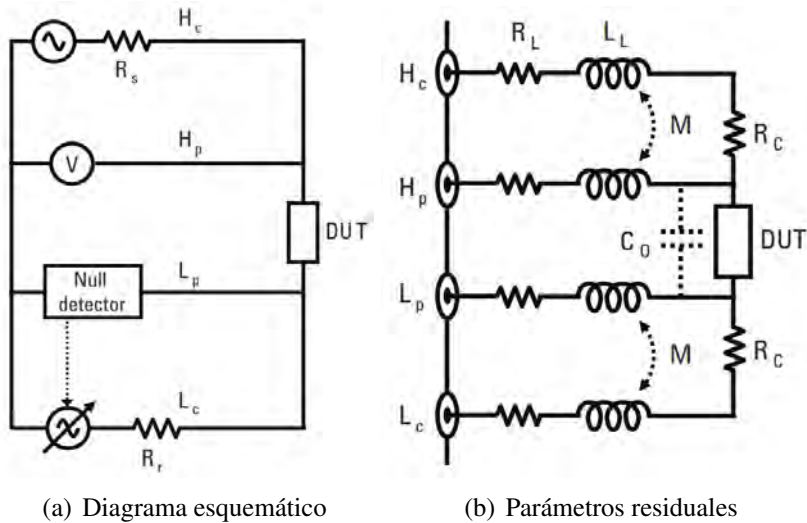
Esto es debido a que la diferencia de energía entre niveles electrónicos es sensible al grado de conjugación de los sistemas aromáticos. El máximo de absorbancia del óxido de grafeno corresponde a transiciones electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$ de C=C, y su desplazamiento hacia el rojo con la reducción se debe a la recuperación de la conjugación electrónica en las láminas.

Otra característica que debería observarse en las muestras de GOx es la presencia de un segundo hombro a la derecha, y que debe desaparecer en los espectros de rGO. Este hombro está asociado a transiciones electrónicas $n \rightarrow \pi^*$, correspondientes a grupos C=O, que van desapareciendo a medida que avanza la reducción química [56]. Pero en este trabajo dicho hombro en el GOx-pasta/dispersión no aparece, para explicar esto se tiene el apoyo de el análisis de la espectroscopia FTIR, donde se observa que la banda asociada al grupo funcional C=O en el GOx tiene una intensidad débil debido a la poca concentración de grupos carboxilo. Podría sugerirse entonces que en el espectro de UV-VIS la banda asociada a C=O se ve solapada por la alta concentración de material lo que ocasiona mayor absorbancia en esa región.

La absorbancia de las microestructuras de rGO-pasta es mayor en comparación con las microestructuras de rGO-dispersión, los recubrimientos tienen un espesor mayor a 300 nm. Por otro lado la presencia del recubrimiento de GOx bajo el grabado láser influye debido a la penetración del haz.

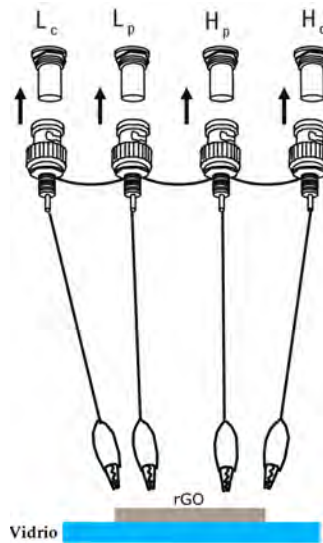
3.2.4. Impedancia

La configuración de las cuatro terminales, puede reducir los efectos de las impedancias de cable ωL_L y R_L y las resistencias de contacto R_C debido a la trayectoria de la corriente de señal y los cables de detección de voltaje son independientes. Los cables de detección de voltaje no detectan la caída de potencial causada por R_L , L_L y R_C en los conductores de corriente. Las impedancias en los cables de detección de voltaje no afectan la medición porque la corriente de la señal apenas fluye a través de estos conductores. De este modo se eliminan errores en la medición por la impedancia de los conductores y a las resistencias de contacto.



(a) Diagrama esquemático

(b) Parámetros residuales



(c) Imagen de conexión

Figura 3.11: Configuración de 4 puntas.

Cuando la impedancia del *device under test* (DUT) es inferior a $10\text{m}\Omega$, la corriente de señal es grande y fluye a través de los cables de corriente, generando campo magnético externo alrededor de los conductores. Dicho campo magnético induce voltajes de error en los cables de detección adyacentes. Por lo que los voltajes de error de inducidos en los conductores de detección de voltaje provocan un error de

medición para mediciones de impedancia muy bajas [57].

La impedancia se midió con *Agilent E4980A Precision LCR Meter* con la configuración de cuatro puntas como se muestra en la figura 3.11. Se realizó un barrido de 20 Hz a 500 kHz con pasos de 2.5 kHz, con 1 V, se midió el parámetro $|Z|$ [Ω] y θ de las microestructuras de rGO de 1-4 grabados en ambas presentaciones. Se conectaron los materiales para la medición como se muestra en la figura 3.11 c.

Los resultados se presentan en diagramas donde la impedancia se grafica de la siguiente manera: la frecuencia en el eje x y los valores de Z real y Z imaginaria en el eje y .

En las figuras 3.12 y 3.13 se observan las mediciones de Z real contra la frecuencia de las microestructuras de rGO-pasta 1-4 y rGO-dispersión 1-4 grabados respectivamente, podemos observar que el comportamiento real de la impedancia es creciente, debido a que no existe una fuente que genere energía.

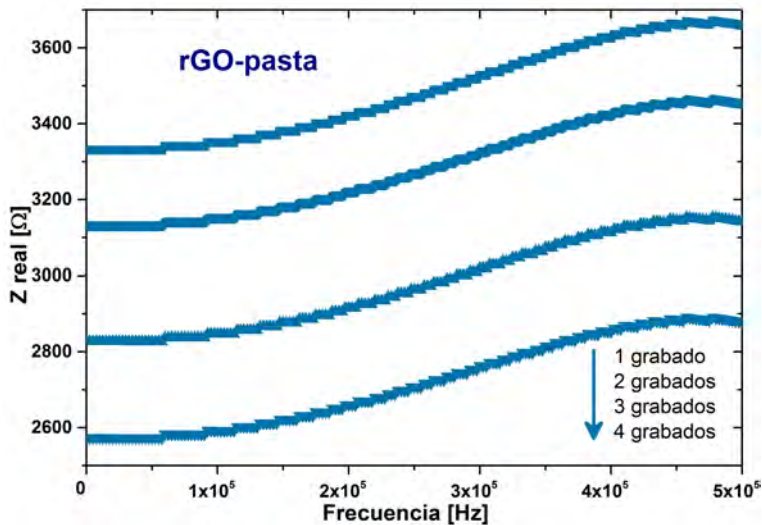


Figura 3.12: Parte real de la impedancia Z de rGO-pasta 1-4 grabados.

Los recubrimientos grabados muestran un aumento en la impedancia al aumentar la frecuencia, en ambos materiales se observa un comportamiento similar. Sin embargo, para los grabados en GOx-pasta se observa que Z real es alrededor de 4 veces mayor que en el caso de los grabados en GOx-dispersión. Lo que nos indica

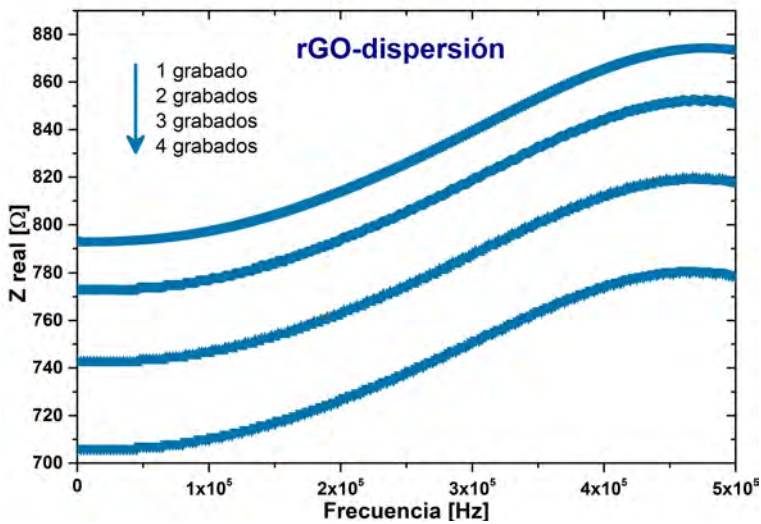


Figura 3.13: Parte real de la impedancia Z de rGO-dispersión 1-4 grabados.

entonces que las microestructuras de rGO-pasta poseen mayor resistencia en comparación con las microestructuras de rGO-dispersión. Además conforme aumenta el número de grabados en los recubrimientos disminuye la resistencia, lo que indica que existe desoxigenación y por ende disminuye el efecto Joule.

En los espectros 3.14 y 3.15 se observa el comportamiento de la parte imaginaria de la impedancia, La reactancia es negativa por lo que el comportamiento que presentan los grabados es capacitivo.

La hibridación del rGO es sp^2 y la hibridación del GOx es sp^3 lo que explica el carácter aislante de este último [58], debido a esto último no se logró obtener medición de impedancia de GOx en alguna de las dos presentaciones. La conductividad eléctrica se considera como un indicador altamente sensible que diferencia al GOx de rGO, ya que la conjugación electrónica del rGO se restaura después de la desoxigenación del GOx. Las propiedades eléctricas de los materiales de carbono dependen de las fracciones de carbono sp^2 y de la distribución espacial de de los dominios más pequeños, lo que sirve como una vía para obtener información estructural de la reducción de los recubrimientos de GOx-pasta y GOx-dispersión.

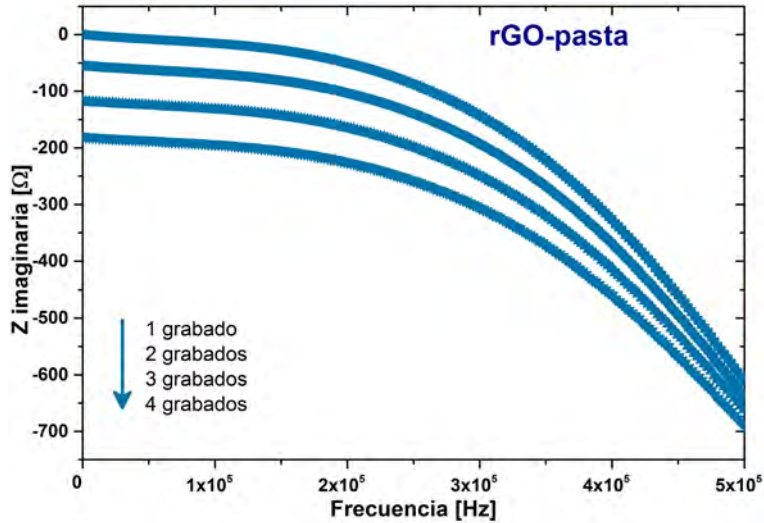


Figura 3.14: Parte imaginaria (R) de la impedancia Z de rGO-pasta de 1-4 grabados.

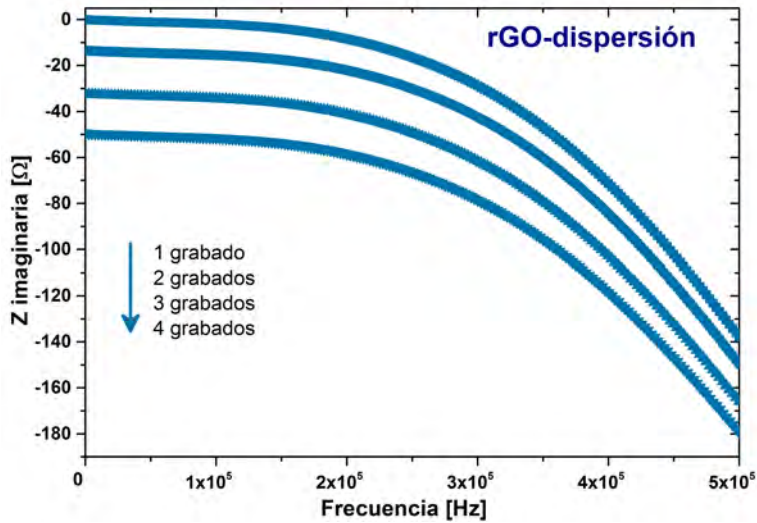


Figura 3.15: Parte imaginaria (R) de la impedancia Z de rGO-dispersión de 1-4 grabados.

3.2.5. AFM

Con el objetivo de obtener información acerca de la topología y determinación del espesor de los recubrimientos y grabados de las microestructuras, se realizó AFM con una escala de $20\ \mu\text{m}$ en modo de contacto, la punta utilizada fue *Budget Sensors Cont Al-G*.

En la figura 3.16 se observa la medición de AFM del recubrimiento de GOx-pasta sobre vidrio. En **(b)** la vista 3D se observa que el recubrimiento tiene un tamaño diferenciado de $2.75\ \mu\text{m}$ y la superficie es rugosa, esto podría deberse a la existencia de los grupos funcionales presentes en el GOx. En la vista en sección transversal a través del área plana **(a)** se midieron 3 líneas al azar donde las alturas estimadas son irregulares, como se observa en **(c)**. En la imagen **(a)** se observa un grumo y grietas como en las imágenes de microscopía óptica.

La figura 3.17 representa la imagen topográfica de AFM de la microestructura de rGO-pasta con 1 grabado, en **(b)** se muestra la zona de interés en la vista 3D y se nota que la altura máxima del material es de $1\ \mu\text{m}$, se observa que la superficie es rugosa y heterogénea. Se muestra en **(c)** las 3 alturas estimadas de la superficie con 1 grabado sobre GOx.

La figura 3.18 muestra la topografía de AFM de la microestructura con 2 grabados láser sobre GOx-pasta. Con una escala de $20\ \mu\text{m}$, en **(b)** se muestra la microscopía en 3D donde la altura diferenciada es de $1.1\ \mu\text{m}$ y se nota que en la superficie hay zonas granulares sin homogeneidad, también hay una zona en la que probablemente hubo ablación láser. En **(c)** se observan los tamaños de los bultos (granos).

El espesor máximo obtenido a partir del perfil de alturas de la imagen AFM de 3.19**(c)** es de $1.2\ \mu\text{m}$, también se observa en el perfil 3D **(b)** que la zona elegida tiene bultos o granos que sobresalen del resto de la superficie, lo que indica probable expansión del material debido a la reducción térmica que provocó la radiación láser.

En la imagen obtenida por AFM 3.20 **(b)** se observa probablemente la zona del canal grabado por el láser (por la forma del bulto), la imagen mostrada en **(c)** indica que la altura diferenciada medida es de $1.22\ \mu\text{m}$, la superficie no es uniforme, lo que se podría atribuirse principalmente a la liberación de calor del efecto Joule que induce la expansión de la superficie local por gasificación de especies de oxígeno.

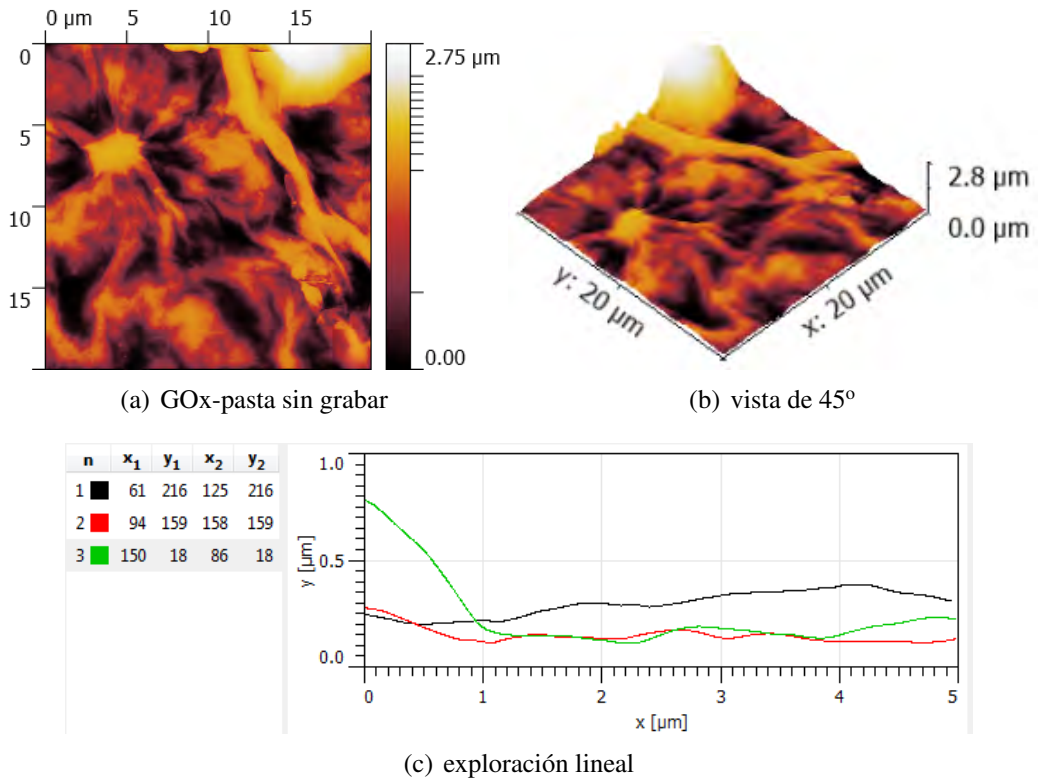


Figura 3.16: AFM de GOx-pasta sin grabar a) vista superior, b) vista 3D del área seleccionada y c) perfil de altura de la línea seleccionada.

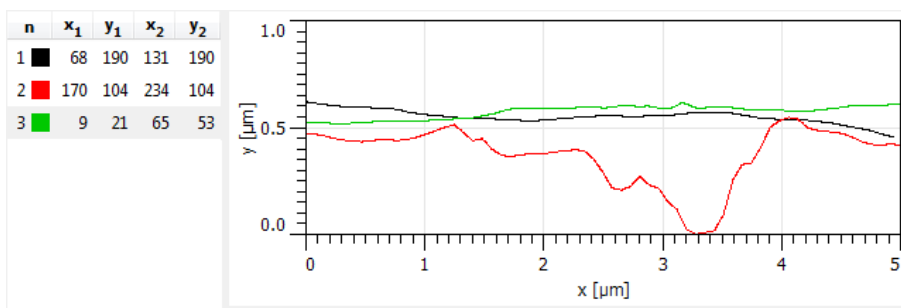
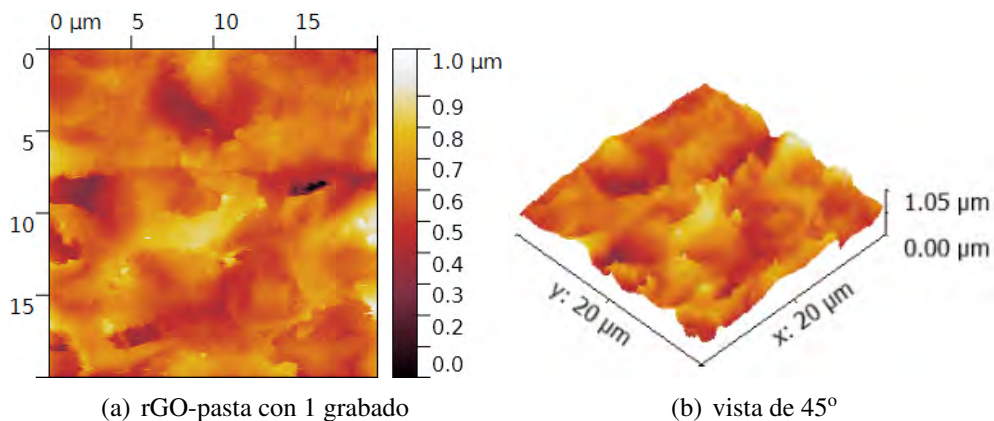


Figura 3.17: AFM de rGO-pasta de 1 grabado a) vista superior, b) vista 3D del área seleccionada y c) perfil de altura de la línea seleccionada.

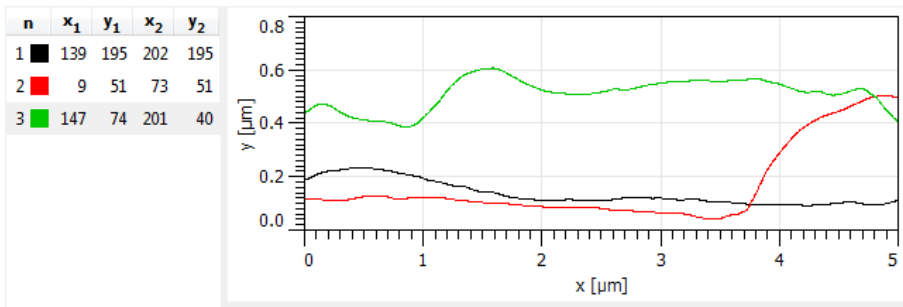
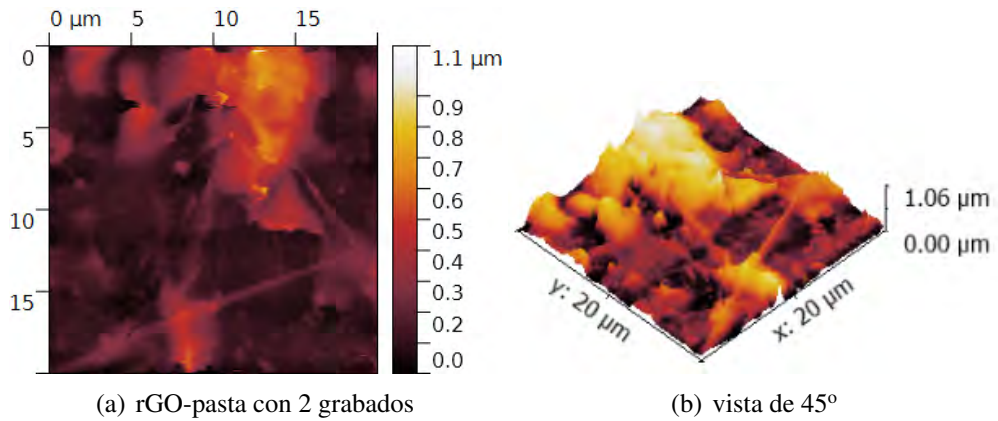


Figura 3.18: AFM de rGO-pasta de 2 grabados a) vista superior, b) vista 3D del área seleccionada y c) perfil de altura de la línea seleccionada.

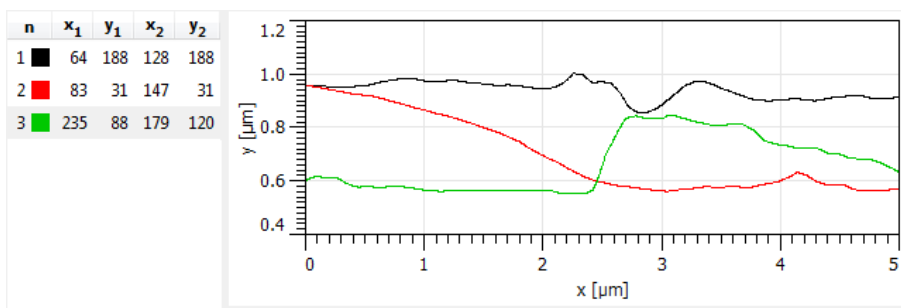
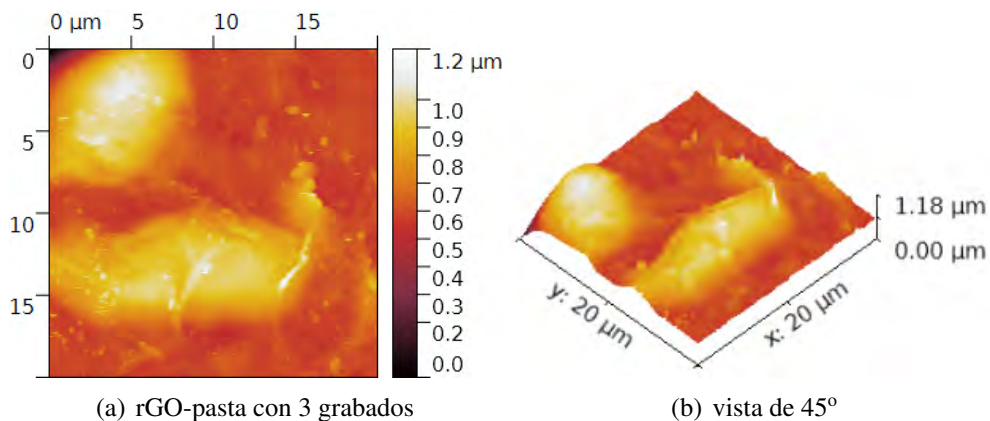
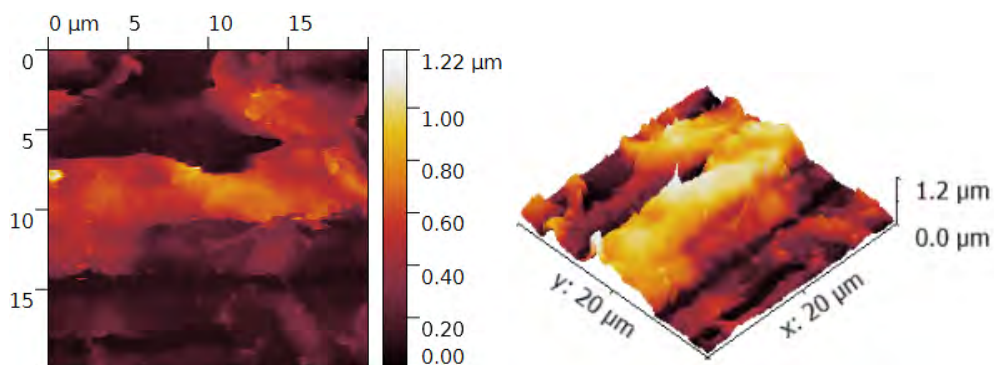
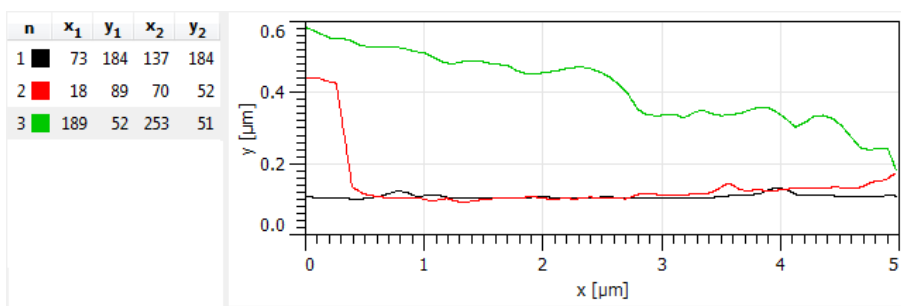


Figura 3.19: AFM de rGO-pasta de 3 grabados a) vista superior, b) vista 3D del área seleccionada y c) perfil de altura de la línea seleccionada.



(a) rGO-pasta con 4 grabados

(b) vista de 45°



(c) exploración lineal

Figura 3.20: AFM de rGO-pasta de 4 grabados a) vista superior, b) vista 3D del área seleccionada y c) perfil de altura de la línea seleccionada.

En la figura 3.21 se presenta la medición de AFM del recubrimiento de GOx-dispersión en vidrio. En la vista 3D **(b)** se observa que el recubrimiento tiene un tamaño diferenciado de $1.1 \mu\text{m}$ en la topología y la superficie es poco rugosa y con grietas (que concuerda con las imágenes de la microscopía óptica) y que podría deberse a la existencia de los grupos funcionales presentes en el GOx-dispersión **(b)**. En la vista de la sección transversal a través del área plana **(a)** se midieron 3 líneas al azar donde las alturas estimadas no son uniformes como se observa en **(c)**.

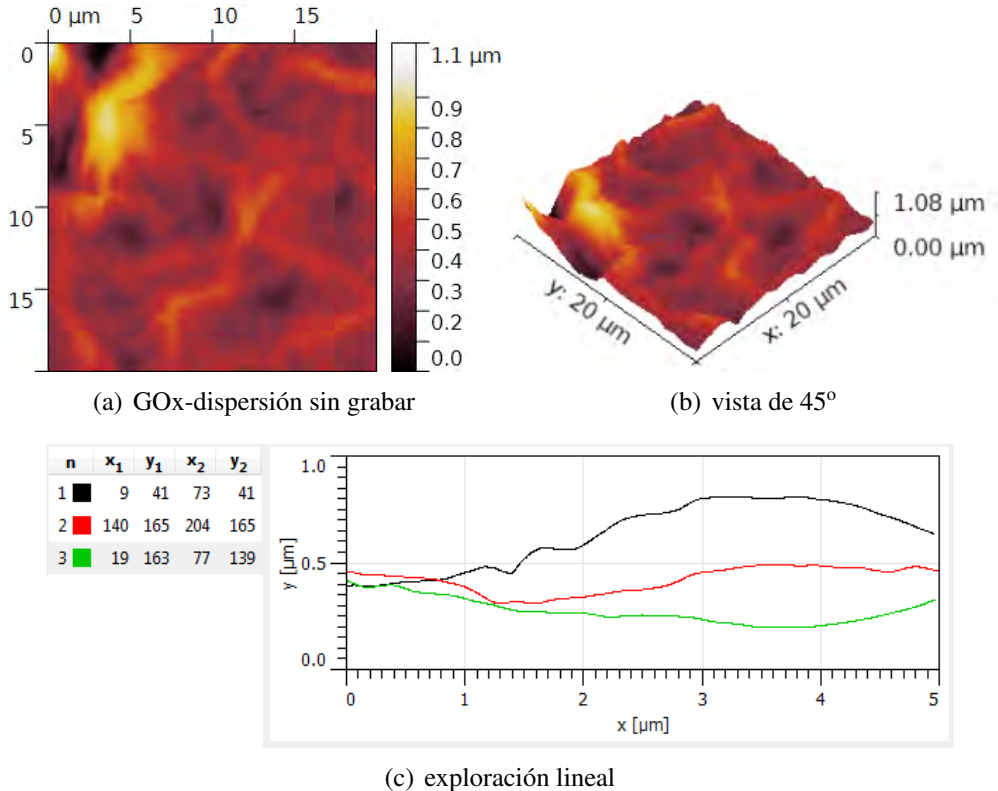


Figura 3.21: AFM de GOx-dispersión sin grabar a) vista superior, b) vista 3D del área seleccionada y c) perfil de altura de la línea seleccionada.

La figura 3.22 presenta la imagen topográfica de AFM de la microestructura de rGO-dispersión con 1 grabado, en **(b)** se muestra la vista 3D donde la superficie es irregular y se nota que la altura diferenciada del material es de $1.51 \mu\text{m}$, se observa que la superficie es rugosa y heterogénea. Se muestra en **(c)** las 3 alturas elegidas al azar de la superficie con 1 grabado sobre GOx.

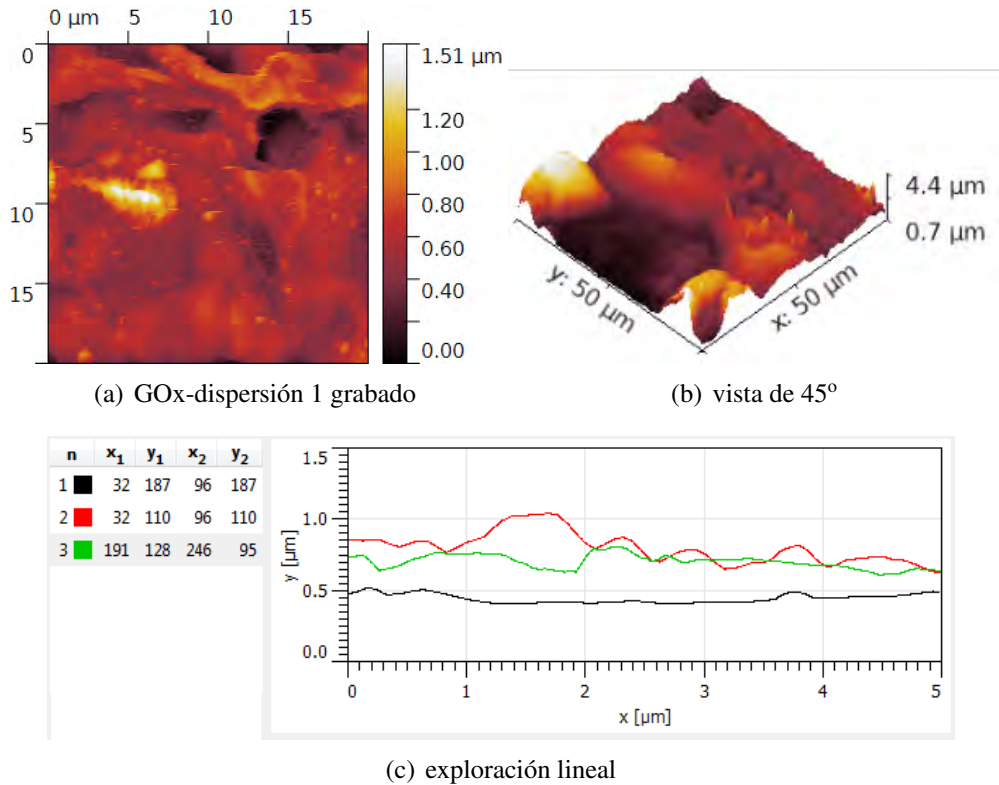
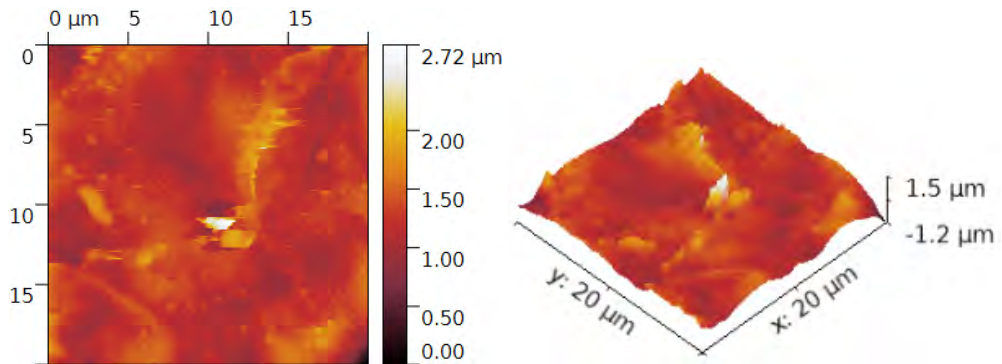


Figura 3.22: AFM de GOx-dispersion 1 grabado a) vista superior, b) vista 3D del área seleccionada y c) perfil de altura de la línea seleccionada.

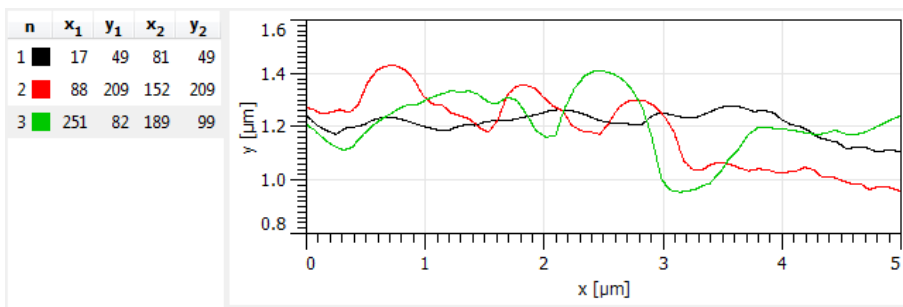
En la figura 3.23 se observa la topografía de AFM de la microestructura con 2 grabados láser sobre GOx-dispersión. Con una escala de $20 \mu\text{m}$, en (b) se muestra la microscopía en 3D donde la altura diferenciada es de $1.5 \mu\text{m}$ (la altura observada en (a) es un salto en la microscopía) y se nota que en la superficie hay irregularidades. En (c) se observan los tamaños de los bultos (granos).

En la topología obtenida se observa que el perfil de alturas de la imagen AFM 3.24(c) la altura diferenciada es de $1.9 \mu\text{m}$, también se observa en el perfil 3D (b) que la zona elegida tiene bultos o granos que sobresalen del resto de la superficie, lo que indica probable expansión del material debido a la reducción térmica que provocó la radiación láser.



(a) GOx-dispersión 2 grabados

(b) vista de 45°



(c) exploración lineal

Figura 3.23: AFM de GOx-dispersión 2 grabados a) vista superior, b) vista 3D del área seleccionada y c) perfil de altura de la línea seleccionada.

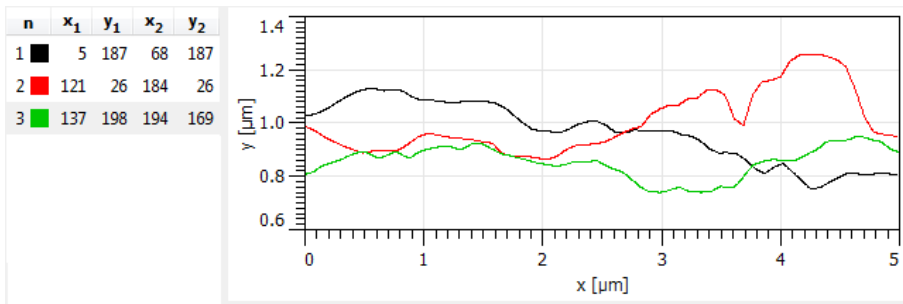
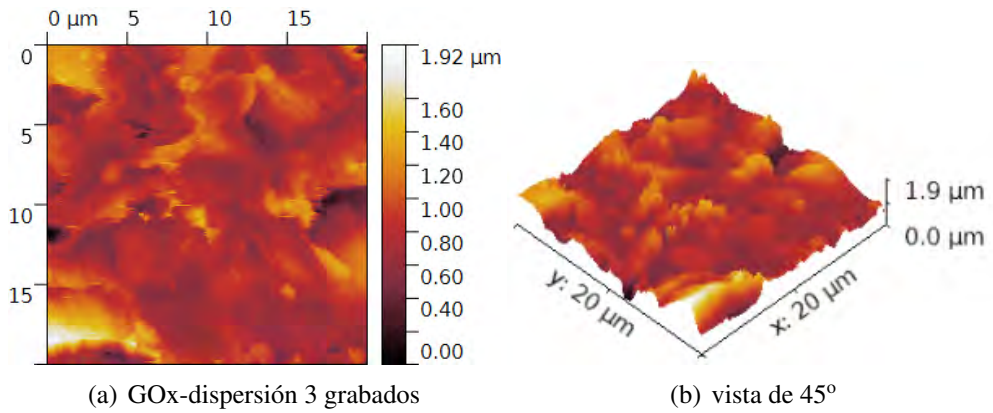


Figura 3.24: AFM de GOx-dispersión 3 grabados a) vista superior, b) vista 3D del área seleccionada y c) perfil de altura de la línea seleccionada.

En la imagen AFM 3.25 (b) la superficie no es uniforme, tiene bastantes granulos, la imagen mostrada en (a) indica que la altura diferenciada medida es de $1.56 \mu\text{m}$, la superficie no es uniforme, lo que se podría atribuir a la liberación de calor del efecto Joule que induce la expansión de la superficie local debido a las especies de oxígeno, como ya se había mencionado.

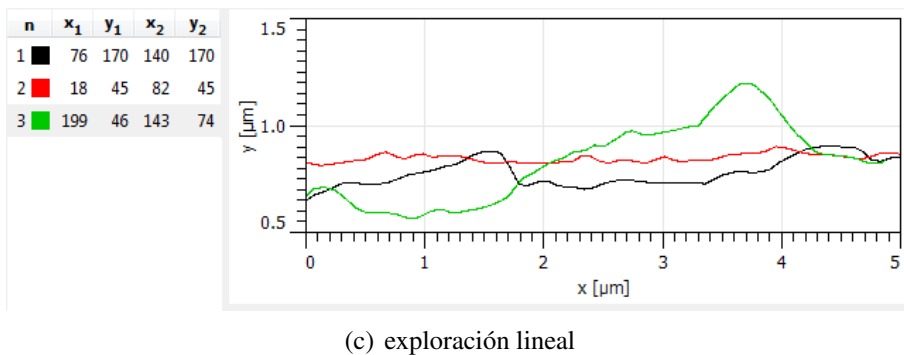
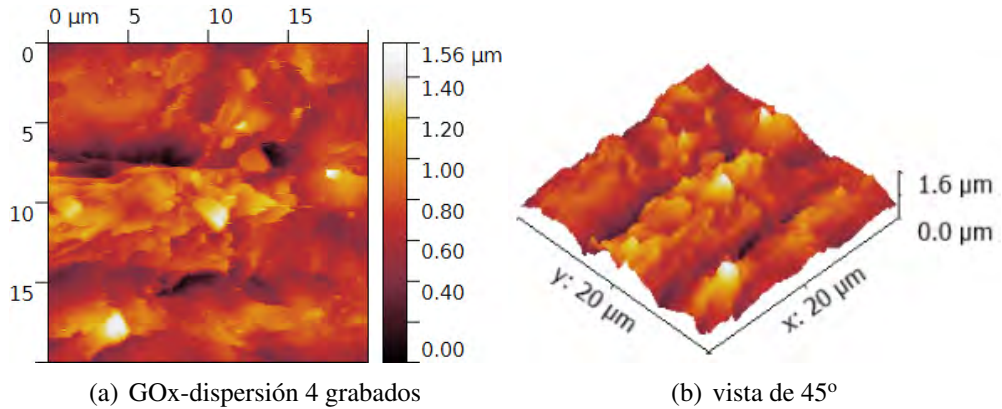


Figura 3.25: AFM de GOx-dispersion 4 grabados a) vista superior, b) vista 3D del área seleccionada y c) perfil de altura de la línea seleccionada.

3.2.6. SEM

Con la finalidad de obtener información acerca de la morfología y posibles defectos estructurales, se realizó microscopía electrónica de barrido (SEM) en el equipo de mesa JCM-6000 Plus Jeol, con secado punto crítico. Con un diámetro de haz de

50 nm - 1 μm , con alto vacío y 5 kV.

La microscopía electrónica de barrido es una herramienta esencial para la caracterización de diferentes materiales. Las imágenes SEM de alto aumento obtenidas muestran la textura de los grabados realizados sobre la superficie de GOx-pasta/dispersión y rGO-pasta/dispersión de 2 grabados.

A las muestras no se les hizo una preparación previa (como recubrimiento de oro), aprovechando el carácter conductivo de los grabados.

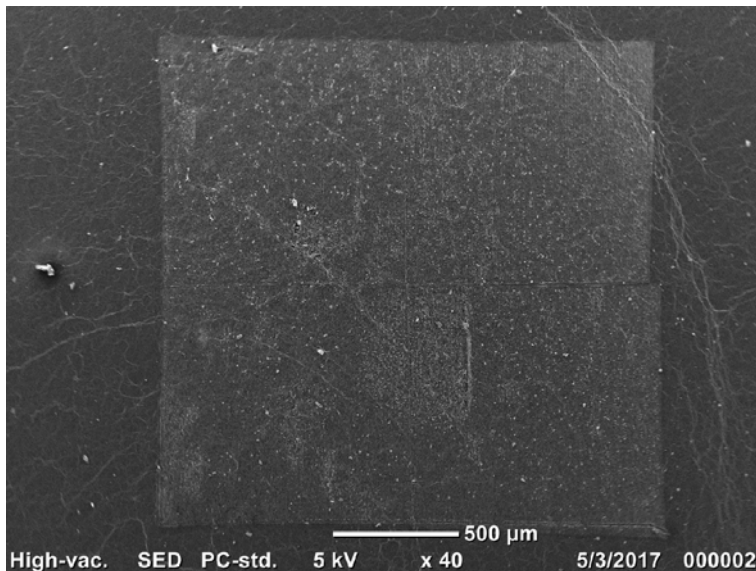


Figura 3.26: Imagen de microscopía electrónica de barrido de rGO-dispersión.

La imagen 3.26 muestra el cuadro grabado de 2mm \times 2mm, la imagen revela un cambio en la coloración alrededor se encuentra el GOx que se observa oscuro y en el centro se encuentra el grabado gris, el color es tenue pero definido. El (GOx) tiene grietas o estrías en la superficie, mientras que el grabado (rGO) tiene grietas en menor cantidad.

En la figura 3.27 la parte superior es GOx, la superficie tiene gran cantidad de arrugas o grietas. En la parte inferior se notan los canales grabados por el láser de forma vertical. La imagen SEM muestra el contraste entre el recubrimiento de GOx y la superficie grabada, lo que demuestra que la irradiación láser produce una ex-

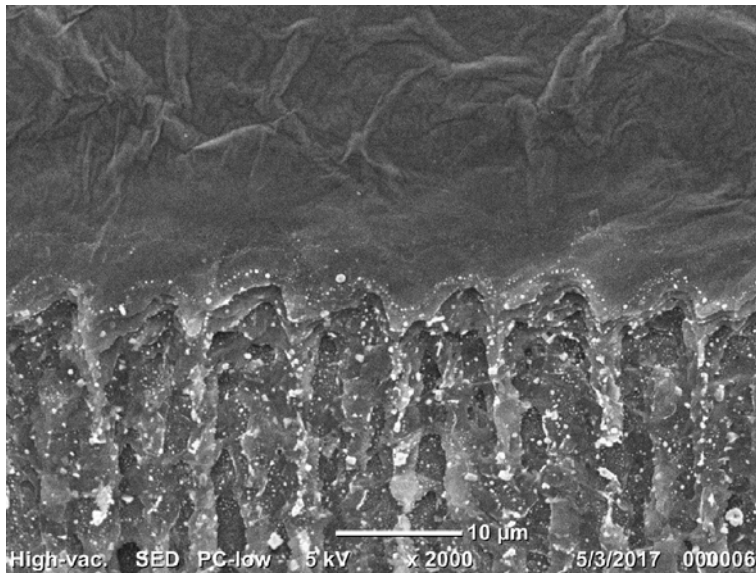


Figura 3.27: Imagen de microscopía electrónica de barrido de la interfaz y GOx rGO dispersión.

foliación y la altura de la superficie se mantiene. Las láminas del GOx al sufrir un choque térmico por la ablación láser se reducen, se exfolian y se expanden.

El tamaño de cada canal de grabado es aproximadamente de $5 \mu\text{m}$ (diámetro del spot del láser).

Las imágenes SEM indican el cambio químico del recubrimiento de GOx a una estructura no ordenada (rGO). En la imagen SEM 3.28 se muestra en el cuadrado de $2\text{mm} \times 2\text{mm}$ de GOx-pasta con 2 grabados que en la parte superior izquierda hay una remoción total del material lo que puede deberse al enfoque del láser sobre la superficie, donde el recubrimiento de GOx se observa con gran irregularidad.

La imagen SEM 3.29 a una escala de $20 \mu\text{m}$ muestra en la parte superior GOx y en la parte inferior la zona grabada (rGO) se aprecia la ablación del láser que formó canales de aproximadamente $5 \mu\text{m}$.

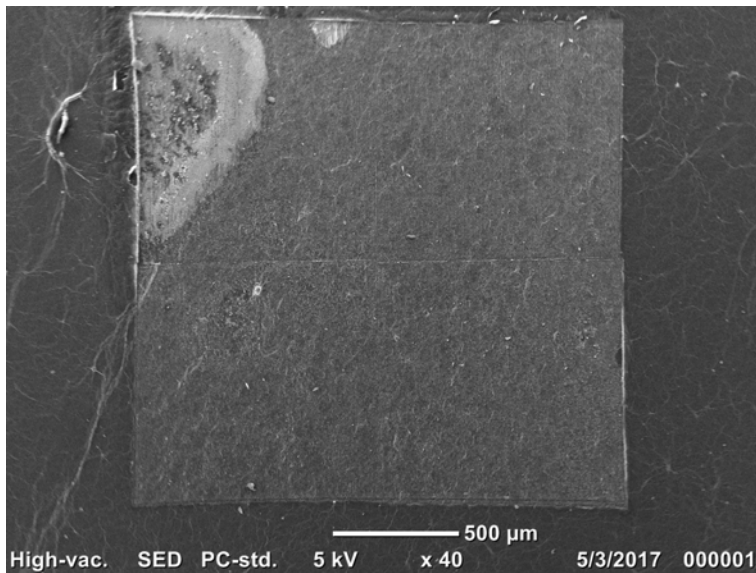


Figura 3.28: Imagen de microscopia electrónica de barrido de rGO-pasta

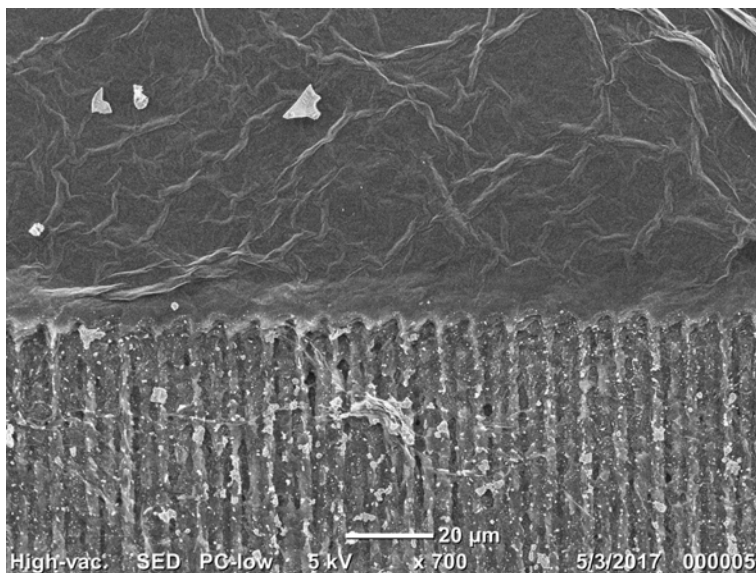


Figura 3.29: Imagen de microscopia electrónica de barrido de la interfaz y GOx rGO pasta.

Discusión de resultados

4.1. Deposito de GOx y grabado

En este trabajo se estudia el efecto del número de grabados traslapados o como lo llamamos *número de pasadas*. Las microestructuras obtenidas de rGO son irregulares en la superficie debido a la heterogeneidad del deposito del GOx. En la figura 4.1 c) se muestran los tipos de microestructuras obtenidas que se observaron.

Durante el deposito del GOx por spin coater *casero* se controló el volumen del GOx que se depositó, las revoluciones por minuto, pero no la temperatura, la cual se considera influyó en el secado del material, ya que además de formar burbujas sobre la superficie (debido a que el secado fue de afuera hacia adentro) las burbujas formaron grietas. Y en el caso particular de GOx-pasta, el material contenía partículas de gran tamaño que sobresalían y ocasionaron mayor rugosidad en la superficie ver la parte externa de 4.1 a). Lo que abre una área de oportunidad para mejorar los depósitos sobre los diferentes sustratos y obtener recubrimientos homogéneos.

El grabado láser se realizó en GOx sobre vidrio, pero es posible utilizar otros sustratos, desde polímeros [59] [60] e incluso silicio [61]. Cada cuadro grabado de $1\text{mm} \times 1\text{mm}$ se realizó en 24 min aproximadamente. Fue grabado cuadro por cuadro de 1mm^2 hasta formar el área total. Un cuadrado de rGO de $8\text{mm} \times 8\text{mm}$ se graba en 25 horas aproximadamente ver figura 4.2.

Las micrográficas muestran cambio en la coloración de los materiales antes y des-

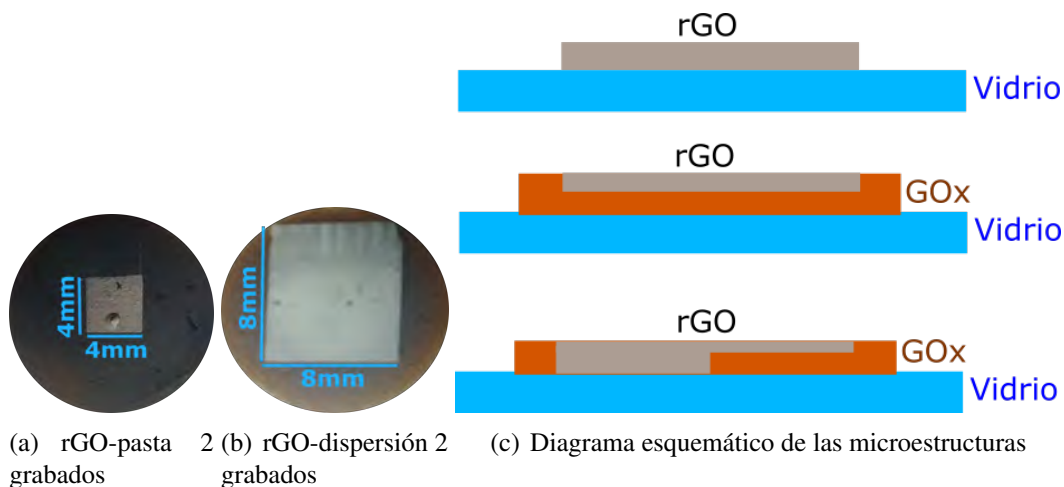


Figura 4.1: a) Imagen de 2 grabados en GOx-pasta. b) Imagen de 2 grabados en GOx-pasta. c) Diagrama esquemático del tipo de microestructuras obtenidas.

pués de ser grabados debido a la energía fototérmica del láser; se observa que debido al grabado láser los recubrimientos cambian su índice de refracción. Para un grabado se observa que el color se convierte de ámbar a negro, conforme aumenta el número de grabados, el material cambia de color a gris plata. Es un comportamiento interesante ya que sucede tanto en los recubrimientos de GOx-pasta y GOx-dispersión.

Las muestras obtenidas de rGO-pasta tienen una área de $2\text{mm} \times 2\text{mm}$ y hasta de $8\text{mm} \times 8\text{mm}$ cada una, obteniendo así superficies con áreas grandes para caracterizar, no obstante como ya se mencionó las superficies de los recubrimientos son irregulares como se puede observar en la figura 4.1 a). Los grabados obtenidos en GOx-dispersión (ver figura 4.1 b) se notan con mayor homogeneidad en la superficie que en GOx-pasta. Sin embargo, el espesor no es homogéneo en ambos grabados.

En la figura 4.1 c) se observan el tipo de microestructuras que se obtuvieron: en la imagen superior se ve que el láser penetró completamente el material, reduciendo por completo el recubrimiento del GOx; en la imagen del centro se observa que el láser redujo el GOx sin penetrar hasta el vidrio, la muestra consta de sustrato de vidrio-GOx-rGO; en la imagen inferior se observa una microestructura en la que

el láser penetra a diferentes distancias el GOx por lo que la reducción es heterogénea, es importante mencionar que la mayoría de las estructuras obtenidas fue de este tipo.

Por otro lado, debido a lo irregular de los recubrimientos de GOx, se observa que los grabados en GOx-dispersión hay remoción de material, debido al enfoque del láser. Al iniciar el grabado se enfoca en la zona de interés como se muestra en la figura 4.2 a), pero una vez iniciado el grabado no hay auto-enfoque en el resto de la zona.

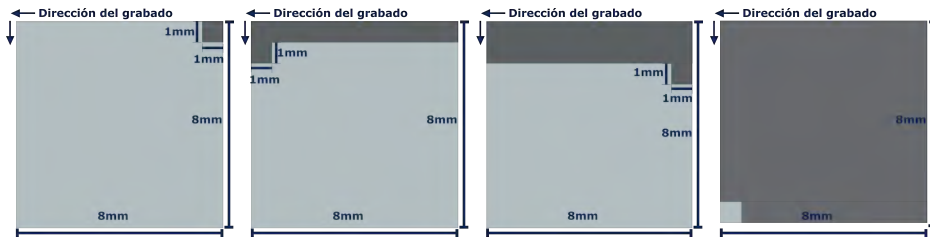


Figura 4.2: Diagrama de la ejecución de los grabados a) inicio del grabado, b) comienzo del grabado en la siguiente línea, c) continuación del grabado en la tercer línea y d) finalización del grabado.

Las microestructuras grabadas pueden ser diseñadas con un gran número de patrones elegidos por el usuario, lo que hace que esta técnica posea ventaja sobre otras [25] en la posible fabricación de microcircuitos. Con producción a escala viable, debido a la gran área superficial que se obtiene. Además que el tiempo de grabado se puede optimizar [60].

Por su parte, en la caracterización de FTIR los espectros indican que al aumentar el número de grabados en GOx-pasta, disminuye la contribución de los grupos funcionales relacionados con el oxígeno. Y para el caso de los grabados en los recubrimientos de GOx-dispersión los espectros FTIR indican que el grupo funcional O-H desaparece por completo al aumentar el número de grabados y llegar a 4. La espectroscopía Raman indica que al aumentar el número de grabados aumenta la razón $\frac{I_D}{I_G}$, es decir, aumentan el desorden del rGO al aumentar el número de pasadas por el láser. Debido a que ambas espectroscopias son complementarias, podemos concluir entonces que al aumentar el número de grabados y a su vez el grado de reducción (que indica FTIR), aumentan las dislocaciones o defectos de las micro-

estructuras de rGO. Además de que con ambas espectroscopias se infiere que se reduce el óxido de grafeno.

La espectroscopia UV-VIS muestra que las mediciones obtenidas de GOx y rGO poseen un *comportamiento similar* al de la literatura [62], pero debido a que los grabados obtenidos no se encuentran en solución o son películas delgadas; los espectros UV-VIS muestran mayor absorción que lo reportado para grafeno multicapa. En los espectros UV-VIS se nota que la absorción aumenta conforme aumenta el número de grabados. Los espectros de rGO-pasta con 1 grabado tiene un máximo en 320 nm que se recorre hacia longitudes de onda mayores conforme aumenta el número de grabados. El espectro de rGOx-dispersión con 1 grabado, por su parte tiene un máximo en 303 nm y se desplaza hacia la derecha al aumentar el número de grabados.

Los resultados de la medición de Impedancia indican los grabados en GOx-pasta poseen mayor resistencia que los grabados en GOx-dispersión; por otro lado los diagramas de Bode mostrados en la sección de impedancia, muestran que al aumentar el número de grabados la impedancia disminuye; los diagramas de Bode del ángulo de fase muestran que las microestructuras poseen un carácter capacitivo.

Las imágenes obtenidas por AFM y SEM indican que los grabados realizados sobre GOx-pasta y GOx-dispersión son irregulares por igual, además que indican que el espesor de las microestructuras se mantiene o se expande debido a la liberación de energía al momento de la reducción vía láser. Una vez más se recalca que hay trabajo futuro para la obtención de recubrimientos homogéneos sobre los sustratos.

Conclusiones

A continuación se resumen los principales resultados en la obtención de las microestructuras.

Una ventaja de la técnica de fotoreducción láser del GOx es que se puede obtener rGO de gran área superficial, lo que permite que sea reproducible, escalable y lo más importante rentable, además que los diseños grabados son elegidos por el usuario para diferentes aplicaciones. Como se mostró el número de grabados influye en gran medida a las propiedades de las microestructuras de rGO obtenidas:

Al aumentar el número de grabados disminuye la contribución de los grupos relacionados con el oxígeno. Lo que nos puede indicar que al incidir la radiación láser más de una vez, el grado de reducción aumenta.

Al aumentar el número de grabados aumenta la razón $\frac{I_D}{I_G}$ relacionada con los defectos estructurales. Esto debido a que posiblemente al aumentar la radiación láser en una zona, los enlaces quedan expuestos y con mayores defectos debido a la energía térmica.

Al aumentar el número de grabados disminuye la resistencia, aunque las microestructuras de rGO poseen defectos y tienen menor conductividad en comparación con las láminas de grafeno, la excelente escalabilidad de su obtención promete la aplicación en materiales basados en grafeno con excelentes propiedades físicas. El grabado láser transformó el GOx aislante en microestructuras con comportamiento de semiconductor.

Los recubrimientos grabados mantienen o expanden su espesor debido a la radiación incidente del láser. El espesor de los recubrimientos debe mejorarse cuando se deposita el GOx para controlar por completo la producción de las microestructuras y garantizar grabados homogéneos, incluso disminuir hasta el límite el espesor con la finalidad de obtener multicapas de grafeno.

Las propiedades presentadas por las microestructuras de rGO obtenidas pueden ser sintonizadas variando el número de grabados. Lo que nos permite caracterizar dichas microestructuras, de forma óptica, química y eléctrica. Teniendo en cuenta los materiales y el equipo de bajo costo necesario para preparar las microestructuras de rGO y las propiedades que exhibe, se considera que este estudio puede abrir oportunidades para producir recubrimientos en diferentes materiales de rGO, que se desea sean de interés en microcircuitos y películas robustas para su aplicación en sensores.

Posible aplicación a la Biofuncionalización del rGO

6.1. Inmovilización en la superficie de óxido de grafeno reducido

Actualmente los nanomateriales están proporcionando oportunidades interesantes en el desarrollo biotecnológico debido a las estructuras y propiedades únicas que poseen [1]. Los nanomateriales a base de carbono y en especial el grafeno son prometedores para desarrollar electrodos [63], el grafeno tiene gran área superficial [64], es biocompatible y tiene alta conductividad eléctrica [65]. El GOx también ha atraído la atención en el ámbito de la biotecnología, los grupos funcionales presentes en el GOx presentan ventajas potenciales, se ha estudiado para inmovilización de enzimas y como biosensores, gracias a la presencia de carboxilos, hidroxilos y grupos epoxi [56].

La peroxidasa de rábano picante y la lisozima se inmovilizan de forma espontánea en GOx, debido a que los grupos funcionales (que contienen oxígeno) presentes en el GOx hacen posible inmovilizar las enzimas sin la necesidad de modificar la superficie [55]. Se ha reportado que el GOx ha servido como plataforma de detección sensible y selectiva de ADN y proteínas [66].

6.2. Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa bacteriana crónica. Se presenta la formación de granulomas en los tejidos infectados (usualmente los pulmones) [67]. Debido a la ausencia de un tratamiento, el humano infectado sucumbe a la infección. En 2015 se estimaron 480,000 nuevos casos de TB multiresistente y aproximadamente 1.4 millones de personas fallecieron. En el mismo año la TB se encontró entre las 10 principales causas de muerte [68]. La infección tuberculosa es el resultado del contacto entre un individuo con *Mycobacterium tuberculosis* (MT), el cual generalmente se aloja en el pulmón, aunque puede afectar otros órganos [69].

Poco después que se descubriera MT en 1882, fueron identificadas otras micobacterias [70]. Las micobacterias son agentes de enfermedades infecciosas que han adquirido gran importancia debido a que han acompañado al hombre a través de la historia. La tuberculosis y la lepra son las enfermedades más destacables causadas por micobacterias [71]. Por lo que, la identificación oportuna y correcta de los organismos causantes, es necesaria para el diagnóstico, terapia y control [72].

Mycobacterium

Mycobacterium (M) es uno de los taxones bacterianos que más se han estudiado, son muy valiosos desde el punto de vista clínico [73]. Hay cientos de especies micobacterianas, pero sólo 42 están incluidas en las listas aprobadas de nombres bacterianos (ALBN) desde 1990 [74]. El género Micobacteriano se compone de *M. tuberculosis*, *M. leprae* y micobacterias no tuberculosas (generalmente se le llaman micobacterias atípicas) [75].

La estructura de *Mycobacterium* es compleja y bien organizada. Las características más importantes del género *Mycobacterium* están determinadas por su pared celular. Estudios han revelado que la pared celular micobacteriana está compuesta de tres macromoléculas unidas por enlaces covalentes. Estas moléculas son peptidoglicano, arabinogalactano y el sello característico de la micobacteria, ácido micólico [76]. En la figura 6.1 se observa la pared celular, en la parte inferior se encuentra peptidoglicano (PG) unido a arabinogalactano (AG), que a su vez está unido a los ácidos micólicos (MAs). Se encuentran intercalados las proteínas, los manósidos fosfatidilinositol (PIM) y los lipoarabinomano (LAM). Los lípidos y polisacáridos complejos presentes en la pared celular de *Mycobacterium*, se postula son la

causa de la patogénesis característica de la TB [77].

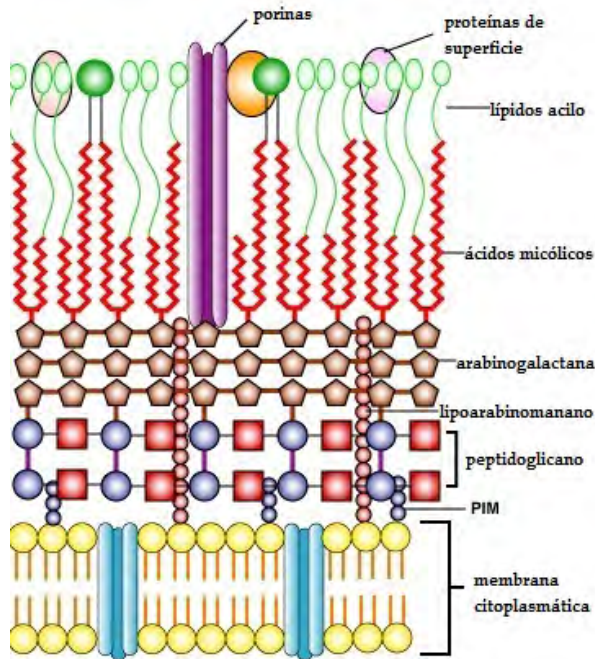


Figura 6.1: Estructura de la pared celular de una micobacteria

Los ácidos micólicos, son cadenas largas de ácidos grasos α - alquilo- β -hidroxilados. Los MAs son componentes lípidicos se encuentran en la envoltura celular de micobacterias y son esenciales para los miembros del género *Mycobacterium* [78]. En la figura 6.2 se muestra la estructura general de los ácidos micólicos.

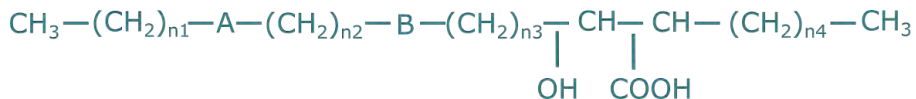


Figura 6.2: Estructura química de los ácidos micólicos

Los ácidos micólicos varían en su estructura dependiendo de la especie micobacteriana, de modo que se puede diferenciar micobacterias y otros taxones que contienen ácidos micólicos. Para la identificación de ácidos micólicos existen varias técnicas, en este trabajo se utiliza cromatografía de capa fina (TLC), la cual es

una técnica rápida, sencilla y de bajo costo. [79].

La TLC es una técnica en la que participan dos fases: sólido (fase estacionaria) y líquido (fase móvil). Los sólidos más utilizados son de sílice SiO_2 o alumina Al_2O_3 , los cuales son adsorbentes polares (pero la alumina es más polar).

La muestra que se analiza se deposita en un extremo de una lámina de aluminio la cual se recubre de una capa fina de adsorbente que es un sólido (en fase estacionaria) [80], se deja secar. Posteriormente, la lamina se coloca en un envase cerrado con uno o más disolventes (eluyente o fase móvil). Se tapa y se deja correr. A medida que el disolvente asciende (por capilaridad) a través del adsorbente, arrastra las moléculas de la muestra, dichas moléculas se moverán según la afinidad con la fase estacionaria. Lo que produce una separación diferencial entre los componentes presentes. [81].

Los ácidos micólicos se clasifican como sigue: Tipo I: α - micolatos (micolatos largos no oxigenados), Tipo II: α' - micolatos (micolatos cortos no oxigenados), Tipo III: metoximicolatos, Tipo IV: ceto-micolatos, Tipo V: epoxi-micolatos y Tipo VI: Wax ester micolatos, Tipo VII: ω - l metoximicolatos [82] [83]. El tipo I se encuentra presente en todas las especies, los otros tipos de ácidos micólicos se encuentran distribuidos en las distintas especies, algunas micobacterias poseen 2 o 3 tipos de ácidos micólicos [84]. Por ejemplo MT presenta los ácidos I, III y IV. M. Fortuitum presenta ácidos micólicos de los tipos I, II y V [85].

Lo que permite determinar la posición de los micolatos en la TLC es la elución de cada micolato en particular, como se menciona antes, los micolatos más polares se adherirán más fuertemente a la fase estacionaria. En general, entre menos polar sea el micolato, más lento eluirá. Los micolatos aparecerán de acuerdo a su polaridad (creciente).

Extracción de ácidos micólicos.

Para la extracción de los ácidos micólicos se deben liberar de la arabinogalactana, la cual es un polisacárido parietal al que se encuentran esterificados.

La extracción de los ácidos micólicos se realizó mediante una saponificación. En un tubo de ensayo de vidrio de 16×150 mm, se midieron 200 mg de cuerpos celulares de M. Fortuitum, se agregó KOH al 5 % (wt/vol) en Metanol-Benceno (8:2,

vol/vol). La mezcla se incubó bajo reflujo en un baño seco durante 14 h a una temperatura de 62° (se colocó una canica para tapar el tubo). El solvente al evaporarse se condensó al tocar la canica.

Posteriormente se retiraron los tubos del calentador y se agregaron 20 gotas de ácido acético para neutralizar la muestra (se comprobó que el pH cambiará de básico a ácido). Enseguida se agitó la mezcla en el *Vortex Genie 2 Scientific-Industries*.

Se lavaron los extractos etéreos agregando 3 mL de Éter y 3 mL de H₂O y a continuación se agitaron en el Vortex, posteriormente cuando las fases se dividieron, se extrajo la fase inferior (éter) con una pipeta Pasteur y se recuperó en un tubo de ensayo limpio. Se repitió el lavado otras dos veces.

Para extraer los lípidos se evaporó el éter, se calentó agua destilada en un vaso de precipitados (en microondas) durante 60 s. Enseguida el tubo de ensayo con los extractos se introdujeron en el vaso de precipitados por 5 s y se retiraron, repetidas veces hasta la evaporación del éter.

Derivatización de ácidos micólicos con diazometano.

La preparación de la solución éterea de diazometano, se llevó a cabo en la campana de extracción de 0-4° C aproximadamente. En un baño de hielo se colocó un matraz erlenmeyer de 500 mL se colocaron 3 mL de la solución acuosa KOH al 40 % (wt/vol) y 15 mL de éter etílico.

Posteriormente se agregó a la fase acuosa 1 g de nitrosometilurea. El diazometano gaseoso se solubiliza en el éter (el diazometano gaseoso es toxico, pero soluble en éter frío).

Enseguida la fase etérea se decantó en otro matraz erlenmeyer (previamente enfriado) que contenía NaOH para eliminar la humedad. Se dejó reposar durante 15 min. La solución se cubrió perfectamente con papel aluminio para conservarla.

A los ácidos grasos se les añadió 1 mL de éter etílico y 1 mL de solución etérea de diazometano, se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 min para la reacción. Posteriormente se evaporó el diazometano con corriente de nitrógeno.

Análisis de los micolatos mediante TLC

Para la identificación de ácidos micólicos se realizó TLC, los ésteres metílicos disueltos en éter etílico fueron vistos sobre una placa de gel de sílice de 0.2-0.25mm de espesor, se utilizó como eluyente diclorometano, se aplicó ácido fosfomolibdico al 10 % en acetona y se reveló.

En la figura 6.3 se muestra la TLC los ácidos micólicos extraídos y de otros dos tipos de ácidos micólicos a identificar.

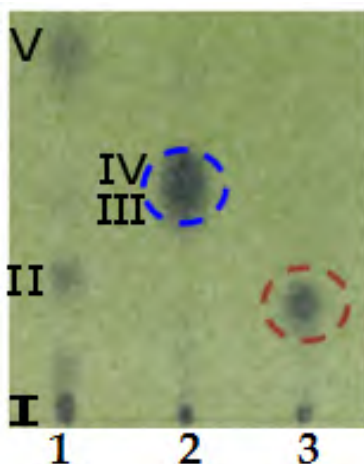


Figura 6.3: Cromatografía de capa fina de ácidos micólicos, carril 1 *M. Fortuitum*, carril 2 *M. Tuberculosis* y carril 3 micobacterias atípicas.

Las manchas del primer carril en la TLC se identifican micolatos tipo I (α - micolatos), II (α - micolatos) y V (epoxi-micolatos) el comportamiento que presenta es característico de *M. Fortuitum*.

Los patrones de manchas en el segundo carril se identifican micolatos tipo I (α - micolatos), III (metoximicolatos) y IV (ceto-micolatos) los cuales pertenecen a *M. Tuberculosis*.

Y en el tercer carril se observan en orden de movilidad creciente micolatos tipo I (α - micolatos), II (α - micolatos) y III (metoximicolatos) que pertenecen a micobacterias atípicas.

Tabla 6.1: Patrones de ácidos micólicos de especies de *Micobacterium*.

Ácidos micólicos de algunas especies de <i>Micobacterium</i>.							
Micolatos	I	II	III	IV	V	VI	VII
M. Fortuitum	*	*			*		
M. Tuberculosis	*		*	*			
Micobacterias atípicas	*	*	*				

Como se puede observar en la TLC la identificación de lípidos es primordial para la identificación de los miembros del genero *Micobacterium* y separar las micobacterias de otros taxones micólicos.

Es importante la técnica TLC para la identificación y clasificación de micobacterias, se aprecia también que *M. Fortuitum*, *M. Tuberculosis* y micobacterias atípicas comparten micolatos de tipo I. Para las micobacterias atípicas se ve una gran mancha, un patrón correspondiente a dos puntos que se unieron, que podría ser la unión de micolatos de tipo II y III.

La identificación de estos tipos de ácidos micólicos es sencilla debido a que los diferentes tipos de ácidos micólicos se encuentran muy bien caracterizados por TLC [83].

Posterior a la extracción se realizó la inmovilización sobre la superficie de rGO-2 grabados en ambas presentaciones.

Inmovilización de ácidos micólicos sobre rGO

Se disolvieron 2 mg de ácidos micólicos en 100 mL de éter, posteriormente se depositaron por dropcasting sobre la superficie de rGO-pasta y rGO-dispersión ver figura 6.4, se eligieron las muestras con 2 grabados, el área de los grabados fue de 4 mm × 4 mm. Finalmente las muestras fueron colocadas un contenedor a temperatura ambiente y libre de polvo, durante 24 h, para obtener microestructuras secas. Los lípidos tienen la ventaja que no se desnaturalizan por lo que no requieren condiciones especiales de almacenamiento.



Figura 6.4: Deposito por Dropcasting de ácidos micólicos sobre la superficie de rG-pasta/dispersión con 2 grabados..

FTIR después de la Inmovilización de ácidos micólicos.

Se realizó espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier FTIR en el equipo *Perkin Elmer Spectrum Two*. Los espectros muestran la transmitancia vs el número de onda [cm^{-1}], en el rango de 4500 a 550 cm^{-1} . Los espectros fueron tomados sin aplicar fuerza.

En la figura 6.5 se muestra los espectros FTIR después de la inmovilización de ácidos micólicos sobre las superficies de GOx y rGO con 2 grabados para ambas presentaciones.

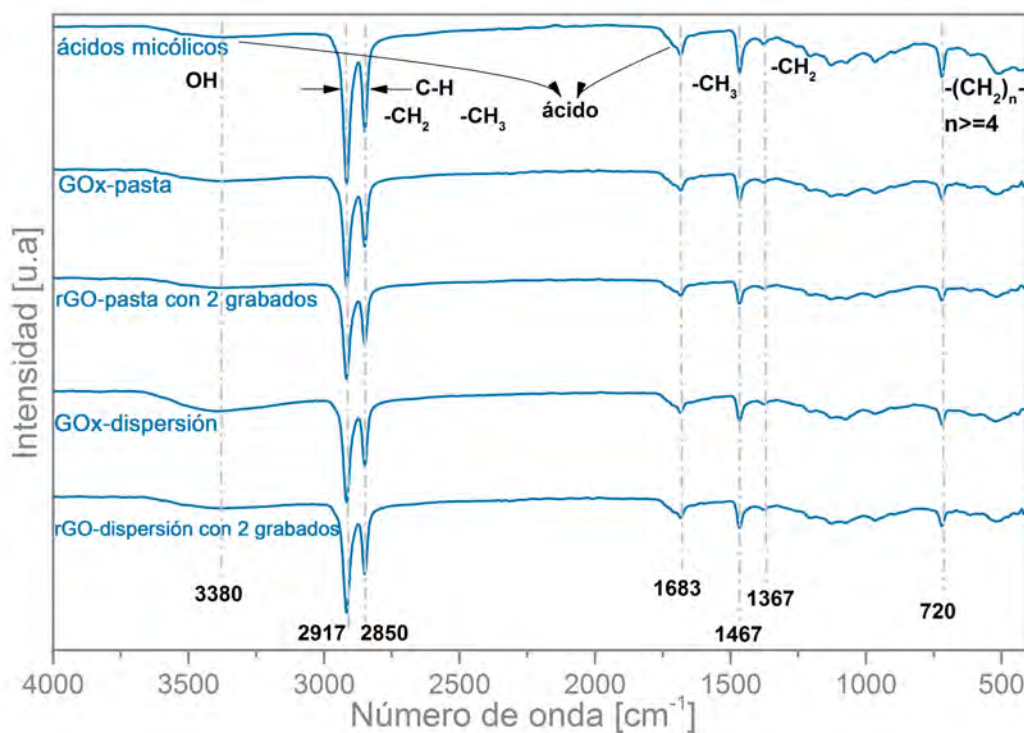


Figura 6.5: FTIR después de la inmovilización de los ácidos micólicos sobre la superficie de GOx y rGO en presentación: pasta y dispersión.

Se muestran cinco espectros, el primero corresponde únicamente a los ácidos micólicos, el segundo espectro corresponde a GOx-pasta, el tercero es el espectro de rGO-pasta con 2 grabados, el cuarto espectro le pertenece a GOx-dispersión y el último espectro es de rGO-dispersión con 2 grabados. A los espectros se les resta la contribución del espectro del sustrato de vidrio.

Se observa que todos espectros tienen el mismo comportamiento aunque el espectro de los ácidos micólicos poseen mayor intensidad que el resto. Lo que hace suponer que la espectroscopia FTIR está obteniendo la contribución de los ácidos micólicos y las bandas asociadas a las microestructuras de rGO se encuentran ocultas, debido a que la intensidad de las vibraciones asociadas del rGO-pasta/dispersión son menores en comparación con las intensidades de los grupos funcionales de los MAs.

Tabla 6.2: Posición de las bandas en FTIR asociadas a grupos funcionales presentes en ácidos micólicos [10].

Asignación de las bandas en FTIR.	
Posición de la banda cm^{-1}	Vibración asociada
Intensa y amplia a 3000-3600	Vibración por tensión del enlace O-H
2880-2950	Vibración por tensión de $-CH_3$
2865-2845	Vibración del enlace $-CH_2-$
1700-1660	Vibración por estiramiento de $-COOH$
1470-1445	Vibración tijera del enlace $-CH_2-$
1385-1365	Vibración del enlace $-CH_3$
730-710	Vibración <i>rocking</i> $-(CH_2)_n-$

Los espectros FTIR muestran contribuciones en 3380 cm^{-1} debido a modos *stretching* de grupos hidroxilo (OH), la región de $3100 - 2800\text{ cm}^{-1}$ exhibe vibraciones por *stretching* de C-H por grupos funcionales $-CH_3$ y CH_2 de los ácidos grasos, en 2917 cm^{-1} asimétrico y en 2850 cm^{-1} por simétrico.

La banda que se encuentra en 1683 cm^{-1} se debe a las vibraciones simétricas de *stretching* de $-COO$ asociado a la cadena lateral del ácido graso.

Las bandas que se encuentran en 1467 y 1367 cm^{-1} ofrecen información complementaria de los grupos funcionales $-CH_2$ y $-CH_3$, surgen por modos de *flexion* de lípidos.

Y la banda que aparece en 720 cm^{-1} se debe a la resultante de CH_2 modos *rocking* de las cadenas de ácidos grasos. Por lo que esta banda aparece en un dominio espectral que se considera una región de "huella dactilar" [86].

RAMAN antes y después de la Inmovilización de ácidos micólicos.

Se realizó espectroscopia Raman en el equipo Senterra Bruker Infinity 1 OPUS-Software, con una resolución de $9-15\text{ cm}^{-1}$, rango espectral de $400- 3793\text{ cm}^{-1}$, con un tiempo de integración de 8 ms, la longitud del laser es 785 nm, la potencia fue de 10 mW y se visualizó la muestra con un objetivo de 20X aumentos.

La espectroscopia Raman ha aumentado su aceptación en la microbiología como una herramienta de identificación de microorganismos, tales como bacterias [87].

En la figura 6.6 se observan los espectros RAMAN de rGO- pasta y rGO-dispersión antes y después del deposito de los ácidos micólicos.

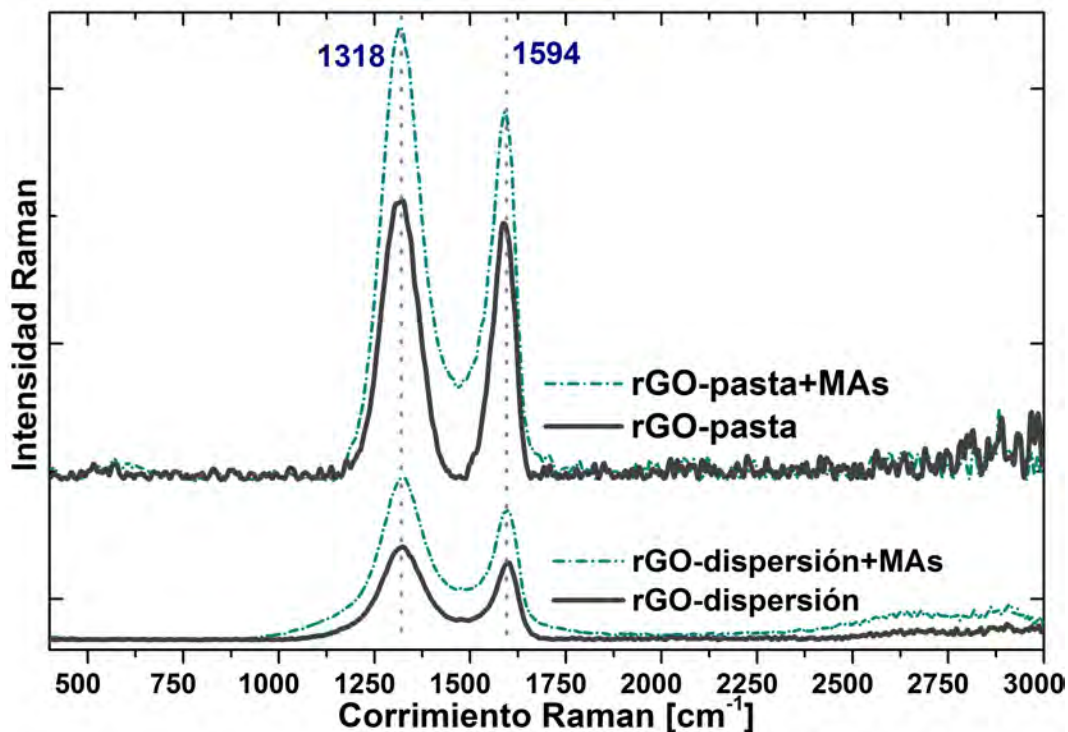


Figura 6.6: RAMAN después de la inmovilización de los ácidos micólicos sobre la superficie de rGO en presentación: pasta y dispersión.

En los espectros se observa la banda **G** alrededor de $\sim 1598 \text{ cm}^{-1}$, también se observa la banda **D** alrededor de $\sim 1321 \text{ cm}^{-1}$ que corresponde al rGO. Además que hay contribuciones alrededor de $\sim 1450 \text{ cm}^{-1}$ de grupos C-H (grupo funcional que pertenece a los lípidos) [10].

Las contribuciones que se observan de 2550 a 3000 cm^{-1} son por las bandas **G'** y **D+D'** en los espectros de rGO-pasta/dispersión. Y en los espectros de rGO-pasta/dispersión + MAs se observa un aumento significativo en estas bandas, que se

debe a las contribuciones de CH_3 y CH_2 en $2700\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ [10], el débil aumento de las bandas se debe a la superposición de las bandas del rGO, que son más intensas. Se ha reportado que los compuestos lípidicos contribuyen significativamente a los espectros Raman [10], pero en los espectros obtenidos las intensidades se ven solapadas por las bandas del rGO.

En los espectros donde es más evidente el aumento de los grupos funcionales es para la microestructura de rGO-dispersión. En la cual se observa un mayor aumento de la intensidad de todas las bandas.

6.3. Conclusiones del Capitulo

Se logro la extracción de los ácidos micólicos de *M. Fortuitum* por medio de saponificación a partir de micobacterias incubadas en papa. Los resultados de la cromatografía de placa fina permitió el reconocimiento de los ácidos micólicos extraídos como *M. Fortuitum* (carril 1), además también se corrió la placa para *M. Tuberculosis* (carril 2) y de micobacterias atípicas (carril 3) que fueron tomadas como referencia. La corrida permitió la identificación de otros micolatos, debido al perfil característico que presentan. Se distinguieron micolatos de tipo I-V, conocidos como: α - micolatos, α' - micolatos, metoximicolatos, ceto-micolatos, epoxi-micolatos. Reconocidos por la polaridad que presenta cada tipo de micolatos con respecto a los demás y la posición en la que se encuentran.

Al realizar la espectroscopia Raman a las microestructuras de rGO-pasta/dispersión con 2 grabados antes y después del deposito de los MAs, en los espectros obtenidos se identificaron las contribuciones del rGO-pasta/dispersión. Sin embargo, los grupos funcionales asociados a los ácidos micólicos tienen contribuciones en Raman que se superponen a las contribuciones de los espectros Raman de rGO-pasta/dispersión. Debido a que los materiales inorgánicos son generalmente mejor identificados en Raman.

La espectroscopia FTIR que se realizó para los MAs, GOx-pasta/dispersión + MAs y rGO-pasta/dispersión + MAs se observan en todos los espectros las contribuciones que corresponden a los grupos funcionales asociados a los MAs. Y la intensidad de las bandas de los MAs es mayor que la intensidad del resto. Por lo que se especula que la contribución de las bandas que corresponden a las microes-

estructuras y al GOx se ven solapadas por las contribuciones de los MAs.

La ventaja de las espectroscopias FTIR y Raman es, que al ser complementarias, es posible identificar la contribución de grupos funcionales que se presentan en una o en otra espectroscopia. Además las microestructuras que se analizaron no requirieron de preparación complicada para las espectroscopias, así como tampoco fue necesario almacenar las muestras en condiciones especiales, debido a que los lípidos no se desnaturalizan. Ambas espectroscopias son relativamente rápidas y no requieren de altas cantidades de material a analizar. Los resultados también sugieren que los MAs fueron adsorbidos por las superficies de las microestructuras de rGO-pasta/dispersión. Lo que lleva a plantear que, la exploración de la información complementaria de las espectroscopias podría abrir vías en la identificación de los 7 diferentes tipos de ácidos micólicos.

6.4. Direcciones futuras

Teniendo en cuenta la espectroscopia de impedancia, la cual se ha utilizado en los últimos años en aplicaciones en la biotecnología para la caracterización de células, diagnóstico de biomoléculas, en la caracterización de superficies funcionalizadas y caracterización de cultivos celulares [88]. Se ha utilizado como principio de transducción para detectar y cuantificar microorganismos patógenos. Esta técnica ha sido útil debido a la pequeña señal que minimiza las alteraciones del medio, es decir, el estímulo aplicado no altera las condiciones de equilibrio del sistema [89]. El uso de la espectroscopia por impedancia en las microestructuras obtenidas y funcionalizadas con ácidos micólicos, sugiere una vía para desarrollar e integrar un biosensor de impedancia a base de óxido de grafeno reducido.

Bibliografía

- [1] A. H. Castro Neto, F. Guinea, N. M. R. Peres, K. S. Novoselov, and A. K. Geim. The electronic properties of graphene. *Rev. Mod. Phys.*, 81:109–162, Jan 2009.
- [2] Alejandro Kayum Jiménez Zenteno. *Fabricación de microsistemas y máscaras de alta resolución con tecnología láser*, volume Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional Autónoma de México, 2012.
- [3] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, and M.C.M. Gómez. *Principios de análisis instrumental*. McGraw-Hill, 2000.
- [4] MS Dresselhaus, A Jorio, and R Saito. Characterizing graphene, graphite, and carbon nanotubes by raman spectroscopy. *Annu. Rev. Condens. Matter Phys.*, 1(1):89–108, 2010.
- [5] Andrea C Ferrari and Denis M Basko. Raman spectroscopy as a versatile tool for studying the properties of graphene. *Nature nanotechnology*, 8(4):235–246, 2013.
- [6] Andrea C Ferrari. Raman spectroscopy of graphene and graphite: disorder, electron–phonon coupling, doping and nonadiabatic effects. *Solid state communications*, 143(1):47–57, 2007.
- [7] Syed Muhammad Hafiz, Richard Ritikos, Thomas James Whitcher, Nadia Md Razib, Daniel Chia Sheng Bien, Narong Chanlek, Hideki Nakajima, Thanit

- Saisopa, Prayoon Songsiriritthigul, Nay Ming Huang, et al. A practical carbon dioxide gas sensor using room-temperature hydrogen plasma reduced graphene oxide. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 193:692–700, 2014.
- [8] T. Owen. *Fundamentals of UV-visible Spectroscopy: A Primer*. Hewlett Packard, 1996.
- [9] J. A. Regodón. Microscopio electrónico de barrido. url <http://almez.pntic.mec.es/jrem0000/dpbg/1bch/tema1/micros-barr.JPG>, 2017.
- [10] Dieter Naumann. Ft-infrared and ft-raman spectroscopy in biomedical research. *Applied Spectroscopy Reviews*, 36(2-3):239–298, 2001.
- [11] Norman Neill Greenwood and Alan Earnshaw. *Chemistry of the Elements*. Elsevier, 2012.
- [12] Matthew J Allen, Vincent C Tung, and Richard B Kaner. Honeycomb carbon: a review of graphene. *Chemical reviews*, 110(1):132–145, 2009.
- [13] Sameh M. Mahdy, E. Gewfiel, and Ashraf A. Ali. Production and characterization of three-dimensional graphite nanoplatelets. *Journal of Materials Science*, 52(10), 2017.
- [14] Wonbong Choi, Indranil Lahiri, Raghunandan Seelaboyina, and Yong Soo Kang. Synthesis of graphene and its applications: a review. *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*, 35(1):52–71, 2010.
- [15] Kostya S Novoselov, Andre K Geim, Sergei V Morozov, D Jiang, Y_ Zhang, Sergey V Dubonos, Irina V Grigorieva, and Alexandr A Firsov. Electric field effect in atomically thin carbon films. *science*, 306(5696):666–669, 2004.
- [16] Rahul Raveendran Nair, Peter Blake, Alexander N Grigorenko, Konstantin S Novoselov, Tim J Booth, Tobias Stauber, Nuno MR Peres, and Andre K Geim. Fine structure constant defines visual transparency of graphene. *Science*, 320(5881):1308–1308, 2008.
- [17] Andre K Geim and Philip Kim. Carbon wonderland. *Scientific American*, 298(4):90–97, 2008.

- [18] Jian-Hao Chen, Chaun Jang, Shudong Xiao, Masa Ishigami, and Michael S Fuhrer. Intrinsic and extrinsic performance limits of graphene devices on sio₂. *Nature nanotechnology*, 3(4):206–209, 2008.
- [19] AB Kuzmenko, Erik Van Heumen, Fabrizio Carbone, and Dirk Van Der Marel. Universal optical conductance of graphite. *Physical review letters*, 100(11):117401, 2008.
- [20] Kostya S Novoselov, Edward McCann, SV Morozov, Vladimir I Fal’ko, MI Katsnelson, U Zeitler, D Jiang, F Schedin, and AK Geim. Unconventional quantum hall effect and berry’s phase of 2π in bilayer graphene. *Nature physics*, 2(3):177–180, 2006.
- [21] Kirill I Bolotin, KJ Sikes, Zd Jiang, M Klima, G Fudenberg, J Hone, Ph Kim, and HL Stormer. Ultrahigh electron mobility in suspended graphene. *Solid State Communications*, 146(9):351–355, 2008.
- [22] D DL Chung. Review graphite. *Journal of materials science*, 37(8):1475–1489, 2002.
- [23] P. R. Wallace. The band theory of graphite. *Phys. Rev.*, 71:622–634, May 1947.
- [24] Andre Konstantin Geim. Graphene: status and prospects. *science*, 324(5934):1530–1534, 2009.
- [25] Maher F El-Kady, Veronica Strong, Sergey Dubin, and Richard B Kaner. Laser scribing of high-performance and flexible graphene-based electrochemical capacitors. *Science*, 335(6074):1326–1330, 2012.
- [26] Choongyu Hwang, David A Siegel, Sung-Kwan Mo, William Regan, Ariel Ismach, Yuegang Zhang, Alex Zettl, and Alessandra Lanzara. Fermi velocity engineering in graphene by substrate modification. *arXiv preprint arXiv:1208.0567*, 2012.
- [27] Melinda Y Han, Barbaros Özyilmaz, Yuanbo Zhang, and Philip Kim. Energy band-gap engineering of graphene nanoribbons. *Physical review letters*, 98(20):206805, 2007.
- [28] Dacheng Wei, Yunqi Liu, Yu Wang, Hongliang Zhang, Liping Huang, and Gui Yu. Synthesis of n-doped graphene by chemical vapor deposition and its electrical properties. *Nano letters*, 9(5):1752–1758, 2009.

- [29] J Penuelas, A Ouerghi, D Lucot, C David, J Gierak, H Estrade-Szwarczkopf, and C Andreazza-Vignolle. Surface morphology and characterization of thin graphene films on sic vicinal substrate. *Physical Review B*, 79(3):033408, 2009.
- [30] Liying Jiao, Li Zhang, Xinran Wang, Georgi Diankov, and Hongjie Dai. Narrow graphene nanoribbons from carbon nanotubes. *Nature*, 458(7240):877–880, 2009.
- [31] Héctor A Becerril, Jie Mao, Zunfeng Liu, Randall M Stoltenberg, Zhenan Bao, and Yongsheng Chen. Evaluation of solution-processed reduced graphene oxide films as transparent conductors. *ACS nano*, 2(3):463–470, 2008.
- [32] Scott Gilje, Song Han, Minsheng Wang, Kang L Wang, and Richard B Kaner. A chemical route to graphene for device applications. *Nano letters*, 7(11):3394–3398, 2007.
- [33] Hiany Mehl, Carolina F Matos, Eduardo GC Neiva, Sergio H Domingues, and Aldo JG Zarbin. The effect of variation of reactional parameters in the preparation of graphene by oxidation and reduction of graphite. *Química Nova*, 37(10):1639–1645, 2014.
- [34] Sergey Dubin, Scott Gilje, Kan Wang, Vincent C Tung, Kitty Cha, Anthony S Hall, Jabari Farrar, Rupal Varshneya, Yang Yang, and Richard B Kaner. A one-step, solvothermal reduction method for producing reduced graphene oxide dispersions in organic solvents. *ACS nano*, 4(7):3845–3852, 2010.
- [35] Laura J Cote, Rodolfo Cruz-Silva, and Jiaying Huang. Flash reduction and patterning of graphite oxide and its polymer composite. *Journal of the American Chemical Society*, 131(31):11027–11032, 2009.
- [36] Veronica Strong, Sergey Dubin, Maher F El-Kady, Andrew Lech, Yue Wang, Bruce H Weiller, and Richard B Kaner. Patterning and electronic tuning of laser scribed graphene for flexible all-carbon devices. *ACS nano*, 6(2):1395–1403, 2012.
- [37] JI Paredes, S Villar-Rodil, Amelia Martínez-Alonso, and JMD Tascon. Graphene oxide dispersions in organic solvents. *Langmuir*, 24(19):10560–10564, 2008.

- [38] Daniel Romero-Borja, José-Luis Maldonado, Oracio Barbosa-García, Mario Rodríguez, Enrique Pérez-Gutiérrez, Rosalba Fuentes-Ramírez, and Guadalupe de la Rosa. Polymer solar cells based on p3ht: Pc 71 nm doped at different concentrations of isocyanate-treated graphene. *Synthetic Metals*, 200:91–98, 2015.
- [39] Zengguang Cheng, Qiang Li, Zhongjun Li, Qiaoyu Zhou, and Ying Fang. Suspended graphene sensors with improved signal and reduced noise. *Nano letters*, 10(5):1864–1868, 2010.
- [40] Shun Mao, Ganhua Lu, Kehan Yu, Zheng Bo, and Junhong Chen. Specific protein detection using thermally reduced graphene oxide sheet decorated with gold nanoparticle-antibody conjugates. *Advanced Materials*, 22(32):3521–3526, 2010.
- [41] Chul Chung, Young-Kwan Kim, Dolly Shin, Soo-Ryoon Ryoo, Byung Hee Hong, and Dal-Hee Min. Biomedical applications of graphene and graphene oxide. *Accounts of chemical research*, 46(10):2211–2224, 2013.
- [42] Y.R. Sharma. *Elementary Organic Spectroscopy*. S. Chand Limited.
- [43] B.H. Stuart. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Analytical Techniques in the Sciences (AnTs). Wiley, 2004.
- [44] B.C. Smith. *Infrared Spectral Interpretation: A Systematic Approach*. Taylor & Francis, 1998.
- [45] S.K. Pati, T. Enoki, and C.N.R. Rao. *Graphene and Its Fascinating Attributes*. World Scientific, 2011.
- [46] Jose Solé, Luisa Bausa, and Daniel Jaque. *An introduction to the optical spectroscopy of inorganic solids*. John Wiley & Sons, 2005.
- [47] G. Binnig, C. F. Quate, and Ch. Gerber. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.*, 56:930–933, Mar 1986.
- [48] Pier Carlo Braga and Davide Ricci. *Atomic force microscopy: biomedical methods and applications*, volume 242. Springer Science & Business Media, 2004.
- [49] P.J. Goodhew, J. Humphreys, and R. Beanland. *Electron Microscopy and Analysis, Third Edition*. Taylor & Francis, 2000.

- [50] Tal-cashi Nagatani and Shoubu Saito. Development of an ultra high resolution scanning electron microscope by means of a field emission source and in-lens srsram. *Scanning Microscopy*, 1(3):901–909, 1987.
- [51] Andrea C Ferrari and Jf Robertson. Interpretation of raman spectra of disordered and amorphous carbon. *Physical review B*, 61(20):14095, 2000.
- [52] Dongxing Yang, Aruna Velamakanni, Gülay Bozoklu, Sungjin Park, Meryl Stoller, Richard D Piner, Sasha Stankovich, Inhwa Jung, Daniel A Field, Carl A Ventrice, et al. Chemical analysis of graphene oxide films after heat and chemical treatments by x-ray photoelectron and micro-raman spectroscopy. *Carbon*, 47(1):145–152, 2009.
- [53] J. Robertson and E. P. O’Reilly. Electronic and atomic structure of amorphous carbon. *Phys. Rev. B*, 35:2946–2957, Feb 1987.
- [54] Xiaoming Sun, Zhuang Liu, Kevin Welsher, Joshua Tucker Robinson, Andrew Goodwin, Sasa Zaric, and Hongjie Dai. Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery. *Nano research*, 1(3):203–212, 2008.
- [55] Jiali Zhang, Feng Zhang, Haijun Yang, Xuelei Huang, Hui Liu, Jingyan Zhang, and Shouwu Guo. Graphene oxide as a matrix for enzyme immobilization. *Langmuir*, 26(9):6083–6085, 2010. PMID: 20297789.
- [56] Dan Li, Marc B Müller, Scott Gilje, Richard B Kaner, and Gordon G Wallace. Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets. *Nature nanotechnology*, 3(2):101–105, 2008.
- [57] Agilent Technologies. *Agilent E4980A Precision LCR Meter, User’s Guide*. Keysight Technologies, 2013.
- [58] Min Yi and Zhigang Shen. A review on mechanical exfoliation for the scalable production of graphene. *Journal of Materials Chemistry A*, 3(22):11700–11715, 2015.
- [59] Jonathan K Wassei and Richard B Kaner. Oh, the places you’ll go with graphene. *Accounts of chemical research*, 46(10):2244–2253, 2013.
- [60] Zhong-Shuai Wu, Xinliang Feng, and Hui-Ming Cheng. Recent advances in graphene-based planar micro-supercapacitors for on-chip energy storage. *National Science Review*, 1(2):277–292, 2014.

- [61] Golap Kalita, Litao Qi, Yoshiharu Namba, Koichi Wakita, and Masayoshi Umeno. Femtosecond laser induced micropatterning of graphene film. *Materials Letters*, 65(11):1569–1572, 2011.
- [62] Lei Huang, Yang Liu, Le-Chun Ji, Yi-Qun Xie, Tao Wang, and Wang-Zhou Shi. Pulsed laser assisted reduction of graphene oxide. *Carbon*, 49(7):2431–2436, 2011.
- [63] Yuyan Shao, Jun Wang, Hong Wu, Jun Liu, Ilhan A Aksay, and Yuehe Lin. Graphene based electrochemical sensors and biosensors: a review. *Electroanalysis*, 22(10):1027–1036, 2010.
- [64] Da Chen, Longhua Tang, and Jinghong Li. Graphene-based materials in electrochemistry. *Chemical Society Reviews*, 39(8):3157–3180, 2010.
- [65] Sasha Stankovich, Dmitriy A Dikin, Geoffrey HB Dommett, Kevin M Kohlhass, Eric J Zimney, Eric A Stach, Richard D Piner, SonBinh T Nguyen, and Rodney S Ruoff. Graphene-based composite materials. *nature*, 442(7100):282–286, 2006.
- [66] C. . Lu, H. . Yang, C. . Zhu, X. Chen, and G. Chen. A graphene platform for sensing biomolecules. *Angewandte Chemie - International Edition*, 48(26):4785–4787, 2009.
- [67] PJ Brennan, M Souhrada, B Ullom, JK McClatchy, and MB Goren. Identification of atypical mycobacteria by thin-layer chromatography of their surface antigens. *Journal of clinical microbiology*, 8(4):374–379, 1978.
- [68] Organización Mundial de la Salud. Global report tuberculosis 2016. url http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2016_executive_summary 1, 2016.
- [69] Barry R Bloom, Joanne Flynn, Kathleen McDonough, Yvonne Kress, and John Chan. Experimental approaches to mechanisms of protection and pathogenesis in m. tuberculosis infection. *Immunobiology*, 191(4-5):526–536, 1994.
- [70] GM Taylor, GR Stewart, M Cooke, S Chaplin, S Ladva, J Kirkup, S Palmer, and DB Young. Koch’s bacillus—a look at the first isolate of mycobacterium tuberculosis from a modern perspective. *Microbiology*, 149(11).

- [71] ST Cole, K Eiglmeier, J Parkhill, KD James, NR Thomson, PR Wheeler, N Honore, T Garnier, C Churcher, D Harris, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*, 409(6823):1007–1011, 2001.
- [72] David E Griffith, Timothy Aksamit, Barbara A Brown-Elliott, Antonino Cantanzaro, Charles Daley, Fred Gordin, Steven M Holland, Robert Horsburgh, Gwen Huitt, Michael F Iademarco, et al. An official ats/idsa statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 175(4):367–416, 2007.
- [73] Michael Goodfellow and John G Magee. Taxonomy of mycobacteria. In *Mycobacteria*, pages 1–71. Springer, 1998.
- [74] Enrico Tortoli. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clinical microbiology reviews*, 16(2):319–354, 2003.
- [75] Talita T Rocchetti, Suzane Silbert, Alicia Gostnell, Carly Kubasek, Antonio C Campos Pignatari, and Raymond Widen. Detection of mycobacterium chelonae, mycobacterium abscessus group, and mycobacterium fortuitum complex by a multiplex real-time pcr directly from clinical samples using the bd max system. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 19(2):295–302, 2017.
- [76] Delphi Chatterjee. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Current opinion in chemical biology*, 1(4):579–588, 1997.
- [77] David E Minnikin, Laurent Kremer, Lynn G Dover, and Gurdyal S Besra. The methyl-branched fortifications of mycobacterium tuberculosis. *Chemistry & biology*, 9(5):545–553, 2002.
- [78] Hedia Marrakchi, Marie-Antoinette Lanéelle, and Mamadou Daffé. Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond. *Chemistry & biology*, 21(1):67–85, 2014.
- [79] DE Minnikin, L Alshamaony, and M Goodfellow. Differentiation of mycobacterium, nocardia, and related taxa by thin-layer chromatographic analysis of whole-organism methanolysates. *Microbiology*, 88(1):200–204, 1975.
- [80] Simion Gocan. Stationary phases for thin-layer chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 40(10):538, 2002.

- [81] AL Homans and A Fuchs. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *Journal of Chromatography A*, 51:327–329, 1970.
- [82] M Daffé, MA Lanéelle, C Asselineau, V Lévy-Frébault, and H David. Intérêt taxonomiquedes acides gras des mycobactéries: Proposition d’une méthode d’analyse. In *Annales de l’Institut Pasteur/Microbiologie*, volume 134, pages 241–256. Elsevier, 1983.
- [83] M Luquin, MA Lanéelle, V Ausina, M Garcia Barceló, F Belda, C Alonso, and G Prats. Distribution of a novel mycolic acid in species of the genus mycobacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41(3):390–394, 1991.
- [84] V.A. Ruiz and S.M. Guillén. *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Editorial Médica Panamericana, 2006.
- [85] David E Minnikin, S Megan Minnikin, James H Parlett, Michael Goodfellow, and Mogens Magnusson. Mycolic acid patterns of some species of mycobacterium. *Archives of microbiology*, 139(2):225–231, 1984.
- [86] Mingjie Tang, Gerald D McEwen, Yangzhe Wu, Charles D Miller, and An-hong Zhou. Characterization and analysis of mycobacteria and gram-negative bacteria and co-culture mixtures by raman microspectroscopy, ftir, and atomic force microscopy. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405(5):1577–1591, 2013.
- [87] Petra Rösch, Michaela Harz, Michael Schmitt, Klaus-Dieter Peschke, Olaf Ronneberger, Hans Burkhardt, Hans-Walter Motzkus, Markus Lankers, Stefan Hofer, Hans Thiele, et al. Chemotaxonomic identification of single bacteria by micro-raman spectroscopy: application to clean-room-relevant biological contaminations. *Applied and environmental microbiology*, 71(3):1626–1637, 2005.
- [88] Leslie A Geddes and LE Baker. Principles of applied biomedical instrumentation.
- [89] Gideon Eden and Ruth Eden. Enumeration of microorganisms by their dynamic ac conductance patterns. *IEEE transactions on biomedical engineering*, (2):193–198, 1984.