



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

“Estudio de la interacción de ácido carmínico adsorbido en sustratos híbridos de nanopartículas de oro depositadas sobre óxido de grafeno reducido”

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q. Emilio Leal Gómez

TUTOR

Dr. José Manuel Saniger Blesa

ICAT, UNAM

Ciudad de México, Noviembre de 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Jurado asignado:

Presidente:	Dr. José Guadalupe Pérez Ramírez	Instituto de Física, UNAM
Vocal:	Dr. Vladimir A. Bassioux Evdokimenko	Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM
Vocal:	Dr. David Díaz	Facultad de Química, UNAM
Vocal:	Dr. José Alvaro Chávez Carvayar	Instituto de Inv. en Materiales, UNAM
Secretario:	Dra. María del Rocío Redón de la Fuente	ICAT, UNAM

Lugar donde se desarrolló el proyecto:

Departamento de materiales y nanotecnología

Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT)

Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México, México

Asesor:

Dr. José Manuel Saniger Blesa

Sustentante:

Q. Emilio Leal Gómez

Agradecimientos

A mis padres, Thelma Gómez y Vidal Leal, por todo el apoyo, cariño y consejos que me han otorgado durante toda mi vida. Agradezco inmensamente a mi novia, Daniela Castilla, que me ha brindado apoyo incondicional, paciencia, ayuda y mucho amor, en todo momento. A mis hermanos, Vidal y Rafael Leal, y mi tío, Rafael Gómez, por acompañarme, ayudarme y quererme siempre. A Raúl Castilla y a Laura Barrera, por todos los ánimos y la ayuda, que me han dado. A las familias Leal, Barrera y Castilla, por todo su apoyo.

A mi tutor, el Dr. José Saniger, por permitirme trabajar en su grupo de investigación, brindarme su confianza y aconsejarme cuando lo necesité.

A mis compañeros del grupo de investigación y la maestría por su amistad y ayuda.

A mis amigos por el cariño y las palabras de ánimo que me han regalado.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por todas las oportunidades que me ha dado desde que empecé a estudiar la licenciatura en Química hasta ahora.

Al Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT) y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, por brindarme los espacios y los medios para la realización el actual proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada que me permitió terminar mis estudios de maestría, con número de becario 629479, y por los recursos brindados a través del proyecto CONACYT 2014-Fronteras de la Ciencia 2016.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación en Innovación Tecnológica (PAPIIT) y a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) por el apoyo económico otorgado a través del proyecto PAPIIT-DGAPA IN 111219.

Al Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica, LUCE-ICAT-UNAM, y a la técnico académico, la Dra. Selene Islas, por toda la ayuda otorgada y las capacitaciones para la caracterización de las muestras mediante las técnicas espectroscópicas FTIR-ATR, fluorescencia, Raman y absorción UV-Vis-NIR.

Al Laboratorio Universitario de Nanotecnología Ambiental, LUNA-ICAT-UNAM, y a la técnico académico, M. en C. Viridiana Maturano, por las capacitaciones para la caracterización de las muestras mediante las técnicas de DLS y Potencial Zeta.

A los miembros del Honorable jurado: Dra. Rocío Redón, Dr. David Díaz, Dr. Vladimir Bassiuk, Dr. José Guadalupe Reyes y Dr. José Chavez, por su valioso tiempo, oportunas correcciones y enriquecedores comentarios, que han mejorado enormemente la calidad de mi trabajo. En especial al Dr. David Díaz, por su paciencia y dedicación.

Índice general

Índice de abreviaturas.....	4
1. Resumen	9
2. Introducción.....	10
2.1. Óxido de grafeno y óxido de grafeno reducido	11
2.2. Ácido carmínico y carmín	14
2.3. Espectroscopía Raman, <i>SERS</i> y <i>GERS</i>	19
3. Antecedentes	26
3.1. Dispersión del GO y separación por tamaños	26
3.2. Reducción del GO.....	29
3.3. Fluorescencia del GO y el rGO.....	31
3.4. Funcionalización del GO con NPAu.....	33
3.5. El ácido carmínico, la espectroscopía <i>SERS</i> , la comida y el arte.....	35
4. Planteamiento del problema	39
5. Objetivos	41
5.1. Objetivos Generales	41
5.2. Objetivos Particulares	41
6. Desarrollo Experimental	43
6.1. Reactivos y materiales	43
6.2. Técnicas de caracterización	45
6.3. Dispersión acuosa del GO	47
6.4. Metodología de separación del GO por tamaños	49

6.5.	Reducción del GO y síntesis de NPAu sobre rGO.....	51
6.6.	Apagamiento de la fluorescencia del AC.....	55
6.7.	Depósito de los sustratos y el ácido carmínico sobre obleas de Si para la espectroscopía Raman	57
7.	Resultados y discusión	59
7.1.	Dispersiones de GO en agua y fracciones separadas por tamaños (GOPP, GOPM y GOPG).....	59
7.1.1.	Espectro de absorción del GO y relación de la absorbancia con la concentración	59
7.1.2.	Espectroscopía FTIR-ATR del GO	61
7.1.3.	Tamaño de las obleas de GO.....	64
7.1.4.	Potencial Zeta del GO.....	67
7.1.5.	Espectroscopía Raman del GO.....	69
7.1.6.	Fluorescencia del GO.....	71
7.2.	Reducción del GO a rGO y decorado con NPAu a diferentes concentraciones de citrato de sodio.....	74
7.2.1.	Espectroscopía de absorción UV-Vis-NIR, seguimiento del grado de oxidación del rGO y plasmón superficial de las NPAu	74
7.2.2.	Espectroscopía FTIR-ATR del rGO y rGONP.....	78
7.2.3.	Potencial Zeta y medidas DLS del rGO y rGONP.....	82
7.2.4.	Espectroscopía Raman del rGO y rGONP.....	84
7.2.5.	Fluorescencia del rGO y rGONP.....	86
7.3.	Caracterización y propiedades ópticas del AC.....	90
7.3.1.	Propiedades ácido-base del AC.....	91

7.3.2. Espectroscopía de absorción electrónica en la región UV-Vis-NIR y fluorescencia del AC y el pH.....	93
7.3.3. Espectroscopía Raman del AC.....	99
7.4. Interacción del AC y los sustratos grafénicos	100
7.4.1. Apagamiento de la fluorescencia del AC en dispersiones acuosas de sustratos grafénicos.....	100
7.4.2. Espectroscopía Raman del AC sobre sustratos grafénicos	104
8. Conclusiones.....	114
9. Perspectivas.....	116
10. Referencias	117
Anexo I: Desarrollo de los protocolos de dispersión del GO en agua y separación por centrifugación.....	131
Anexo II: Concentración del AC para medidas de fluorescencia y preparación de disoluciones de AC en agua a distintos pHs.	135
Anexo III: Tratamiento de las obleas de SiO₂/Si con disolución piraña.....	136
Anexo IV: Espectros Raman, FTIR-ATR, fluorescencia y absorción UV-Vis-NIR.....	138

Índice de abreviaturas

AC: Ácido carmínico.

AE: Análisis elemental.

A_{em} y A_{exc} : Valor medido de la absorbancia del sustrato, en la concentración indicada, a la longitud de onda de emisión y excitación, respectivamente.

AFM: Microscopía de fuerza atómica, por sus siglas en inglés, *Atomic Force Microscopy*.

aq: Especie química en disolución acuosa.

ATR: Reflectancia total atenuada, por sus siglas en inglés, *Attenuated Total Reflection*.

C: Concentración.

cGO: Muestra de la dispersión original del GO en el trabajo de Wang, Bai y Shi (2012).^[68]

d_{em} y d_{exc} : Distancia del paso óptico de la luz a través de la celda en la dirección de la emisión y la excitación, respectivamente.

DLS: Dispersión dinámica de la luz, por sus siglas en inglés, *Dynamic Light Scattering*.

E_{gap} : Energía del *bandgap* de un electrón.

E_b : Energía de unión del excitón.

E_{ts} : Primer transición óptica permitida.

ESIPT: Transferencia de protón intramolecular en el estado excitado, por sus siglas en inglés, *Excited State Intramolecular Proton Transfer*.

F: Fluorescencia.

F_{corr} : Valor de la intensidad de la fluorescencia, corregido por el efecto del filtro interno en las pruebas del apagamiento de la fluorescencia.

FDGO: Muestra de GO liofilizada en el trabajo de Ye y Feng (2016).^[20]

F_{obs} : Valor de la intensidad de la fluorescencia medida por el equipo.

FTIR: Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier, por sus siglas en inglés, *Fourier Transformed Infrared Spectroscopy*.

f1: Muestra del GO con dimensiones laterales grandes en el trabajo de Wang, Bai y Shi (2012).^[68]

f2: Muestra del GO con dimensiones laterales pequeñas en el trabajo de Wang, Bai y Shi (2012).^[68]

GERS: Efecto de la amplificación de las señales Raman de una molécula, por la adsorción de la misma sobre algún sustrato grafénico. Por sus siglas en inglés, *Graphene-Enhanced Raman Spectroscopy*.

GiO: Muestra de GO sin secado posterior a la oxidación en el trabajo de Ye y Feng (2016).^[20]

Glu: Glucosa.

GO: Óxido de grafeno, por sus siglas en inglés, *Graphene Oxide*.

GOmono: Monocapa de GO, elaborada por la técnica Langmuir-Blodgett.

GOPG: Muestra de partículas grandes de GO, es decir, el precipitado del segundo ciclo ($v = 8000$ rpm) en la metodología de separación por centrifugación del GO en dispersión, realizada en este trabajo.

GOPM: Muestra de partículas medianas de GO, es decir, el sobrenadante del segundo ciclo ($v = 8000$ rpm) en la metodología de separación por centrifugación del GO en dispersión, realizada en este trabajo.

GOPP: Muestra de partículas pequeñas de GO, es decir, el sobrenadante del primer ciclo ($v = 10000$ rpm) en la metodología de separación por centrifugación del GO en dispersión, realizada en este trabajo.

HOMO: Orbital molecular ocupado de mayor energía, por sus siglas en inglés, *Highest Occupied Molecular Orbital*.

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia, por sus siglas en inglés, *High Performance Liquid Chromatography*.

I_D/I_G : Cociente del valor de la intensidad de la banda D del grafeno, sobre la intensidad de la banda G, en espectroscopía Raman.

IR: Región del infrarrojo en el espectro electromagnético.

LUMO: Orbital molecular desocupado de menor energía, por sus siglas en inglés, *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*.

M: Unidad de concentración medida en molaridad. También puede referirse a la moda.

M⁺: Cation metálico monovalente.

nD: Número de dimensiones, donde n = 0, 1, 2 y 3.

NIR: Región del infrarrojo cercano en el espectro electromagnético, por sus siglas en inglés, *Near Infrared*.

NP: Nanopartículas.

NPAu: Nanopartículas de oro.

NPAg: Nanopartículas de plata.

NPM: Nanopartículas metálicas.

ppm: Unidad de concentración medida en partes por millón, que es igual a 0.001 mg /mL.

rGO: Óxido de grafeno reducido, por sus siglas en inglés, *Reduced Graphene Oxide*.

rGO12: Muestra de rGO sintetizado en este trabajo, a partir de una reacción donde se utilizó la proporción en masa 1:12, de GO y citrato de sodio tribásico, respectivamente.

rGO20: Muestra de rGO sintetizado en este trabajo, a partir de una reacción donde se utilizó la proporción en masa 1:20, de GO y citrato de sodio tribásico, respectivamente.

rGONP: rGO decorado con NPAu.

rGONP12: Muestra de rGO decorado con NPAu sintetizado en este trabajo, a partir de una reacción donde se utilizó la proporción en masa 1:12, de GO y citrato de sodio tribásico, respectivamente.

rGONP20: Muestra de rGO decorado con NPAu sintetizado en este trabajo, a partir de una reacción donde se utilizó la proporción en masa 1:20, de GO y citrato de sodio tribásico, respectivamente.

rpm: Unidad de velocidad medida en revoluciones por minuto.

RMN ¹³C: Resonancia magnética nuclear de carbono-13.

RR: Efecto Raman resonante.

R6G: Rodamina 6G.

SEIRA: Efecto de la amplificación de las señales de absorción infrarroja de una molécula, por la adsorción de la misma sobre algún sustrato. Por sus siglas en inglés, *Surface-Enhanced Infrared Absorption*.

SEM: Microscopía electrónica de barrido, por sus siglas en inglés, *Scanning Electron Microscopy*.

SERS: Efecto de la amplificación de las señales Raman de una molécula, por la adsorción de la misma sobre algún sustrato. Por sus siglas en inglés, *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*.

S_n : Estado de espín electrónico singulete, donde $n = 0, 1, 2, 3$ y 4 .

TC: Transferencia de carga.

TEM: Microscopía electrónica de transmisión, por sus siglas en inglés, *Transmission Electron Microscopy*.

u.a.: Unidad arbitraria de medida.

UV: Región del ultravioleta en el espectro electromagnético.

VDGO: Muestra de GO secada al vacío en el trabajo de Ye y Feng (2016).^[20]

Vis: Región del visible en el espectro electromagnético.

α : Error aleatorio en el cálculo del intervalo de confianza.

γ : Vibración de deformación fuera del plano.

δ : Vibración de deformación dentro del plano.

ϵ : Coeficiente de absorción.

λ : Longitud de onda de la luz.

λ_{abs} : Longitud de onda del máximo de absorción.

λ_{em} : Longitud de onda del máximo de emisión.

λ_{exc} : Longitud de onda de excitación.

v: Vibración de estiramiento.

$\nu_{a/s}$: Vibraciones de estiramiento asimétrico y simétrico.

XPS: Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X, por sus siglas en inglés, *X-Ray Photoelectron Spectrometry*.

1. Resumen

Los nanomateriales híbridos compuestos por derivados del grafeno, en particular el óxido de grafeno y el óxido de grafeno reducido, y nanopartículas metálicas son una opción prometedora para la amplificación de las señales Raman y el apagamiento de la fluorescencia de biomoléculas. La comprensión de las interacciones entre las biomoléculas y los sustratos nanoestructurados es fundamental para el desarrollo de sensores con mayor sensibilidad, selectividad y reproducibilidad. En este trabajo se estudiaron las interacciones entre el ácido carmínico, un colorante presente en múltiples productos de consumo y objetos de enorme valor histórico, artístico y cultural, y distintos sustratos grafénicos y nanocompositos (nanopartículas de oro depositadas sobre óxido de grafeno reducido). Para lograrlo se encontraron metodologías de dispersión en agua por sonicación y separación por centrifugación de distintos tamaños del óxido de grafeno. A partir de una de las fracciones separadas de óxido de grafeno en agua se sintetizaron, óxido de grafeno reducido y nanomateriales híbridos, con citrato de sodio tribásico (agente reductor) con distintas proporciones. Por primera vez, se realizó el seguimiento del apagamiento de la fluorescencia y se obtuvieron los espectros Raman del ácido carmínico sobre los sustratos grafénicos y sus nanocompositos con nanopartículas de oro. De acuerdo con los resultados presentados en esta tesis el nanocomposito de óxido de grafeno reducido y nanopartículas de oro, sintetizado con la mayor proporción de citrato de sodio (1:20), es el sustrato que ocasiona la mayor amplificación de las señales Raman y apaga más eficientemente la fluorescencia del ácido carmínico, frente a los sustratos grafénicos y las nanopartículas de oro, por separado.

2. Introducción

La espectroscopía Raman ha demostrado ser una técnica viable para la detección cuantitativa de biomoléculas en concentraciones muy bajas gracias al efecto *surface-enhanced Raman spectroscopy*, mejor conocido como *SERS*, por sus siglas en inglés.^[1-4] Raman es una técnica rápida, selectiva y no destructiva, además, no requiere pretratamiento de la muestra ni preconcentración, por lo tanto, la preparación es sencilla, necesita cantidades mínimas de muestra y permite identificar diferentes moléculas orgánicas dentro de una mezcla.^[5,6] Los dos principales problemas intrínsecos a esta técnica son: la baja intensidad de las señales y su enmascaramiento por fluorescencia.^[7] *SERS*, es un efecto que mejora la dispersión Raman de las moléculas adsorbidas en la superficie de nanopartículas metálicas (NPM), por lo tanto, aumenta la intensidad de las señales y apaga la fluorescencia.^[8] Este fenómeno también se observa en moléculas adsorbidas en grafeno, óxido de grafeno (GO) y óxido de grafeno reducido (rGO), pero en menor medida.^[9,10]

El ácido carmínico es la molécula orgánica que da el color al carmín, una sal alumínica utilizada en el pasado en obras de arte y textiles, actualmente se emplea en la industria como colorante de origen natural en muchos productos de consumo (alimentos, bebidas, cosméticos, fármacos, etc.) para el ser humano, además tiene un enorme valor histórico y cultural para México y otros países iberoamericanos.^[11-13] Existen métodos de detección de este pigmento que se basan en sus propiedades ópticas debido a su alto coeficiente de extinción molar e intensa fluorescencia. Sin embargo, a pesar de ser técnicas metodológicamente sencillas, son poco selectivas en mezclas y los límites de detección son altos, por lo tanto, se necesitan grandes cantidades de muestra.^[14,15] Esto representa un gran problema principalmente en el análisis de obras de arte, donde las muestras que se pueden tomar deben ser mínimas y por lo general, el ácido carmínico se encuentra mezclado con muchos otros pigmentos.^[16]

2.1. Óxido de grafeno y óxido de grafeno reducido

El carbono se organiza a nivel molecular en diferentes estructuras alotrópicas tridimensionales (3D; diamante y grafito), unidimensionales (1D; nanotubos de carbono) o adimensionales (0D; fullereno). Sin embargo, hasta 1991 no se había observado que el grafito, los nanotubos de carbono y los fullerenos están formados por la misma estructura bidimensional (2D), a esta estructura se le conoce como grafeno. El grafeno es una capa de carbonos sp^2 enlazados en una red cristalina hexagonal, la cual tiene un átomo de espesor (~ 0.37 nm) y se puede extender lateralmente desde algunos nanómetros hasta centímetros.^[17] Este material fue aislado, caracterizado y estudiado a profundidad en 2004, en la Universidad de Manchester, por Andre Geim y Konstantin Novoselov, lo cual les hizo acreedores del premio Nobel de física en 2010. Debido a las propiedades y crecientes aplicaciones del grafeno se busca un método de síntesis eficiente, una de las opciones más prometedoras era la reducción del óxido de grafeno.^[18]

El óxido de grafeno (GO, por sus siglas en inglés, *graphene oxide*) es un nanomaterial 2D no estequiométrico, químicamente reactivo e higroscópico. La fórmula y estructura química del GO no están bien definidas y sus propiedades físicas y químicas, dependen de muchos factores (Figura 1). Algunas de las variables que afectan las propiedades del GO son: tipo y procedencia del grafito, método de oxidación del grafito, método de purificación, estado de agregación (en dispersión o sólido), método de exfoliación de las obleas y el disolvente. El método de oxidación más común es el método modificado de Hummers que involucra la utilización de H_2SO_4 concentrado, $NaNO_3$ y $KMnO_4$, se deben de usar sustancias muy ácidas y oxidantes para la formación de intermediarios sumamente reactivos que puedan oxidar todas las láminas de grafeno apiladas en el grafito. Los protocolos para la eliminación de las sales y subproductos de la oxidación del grafito involucran lavados, filtración, centrifugación y diálisis. El GO se comercializa principalmente en polvo o en dispersión, se prefiere el polvo, por cuestiones de practicidad en el almacenamiento y transporte.^[19] Sin embargo, la forma de secado del GO también juega un papel importante en las características finales. Debido a que el aumento de la temperatura para la evaporación del disolvente puede originar cambios en

la estructura química, la evaporación a presión reducida y la liofilización, son técnicas viables para la eliminación del disolvente sin alterar los grupos oxigenados presentes en las láminas de GO. De estas dos, la forma más frecuentemente empleada es la primera, el producto es un polvo café oscuro. A comparación del GO liofilizado, el GO secado al vacío tiene una mayor densidad y una menor dispersabilidad.^[20]

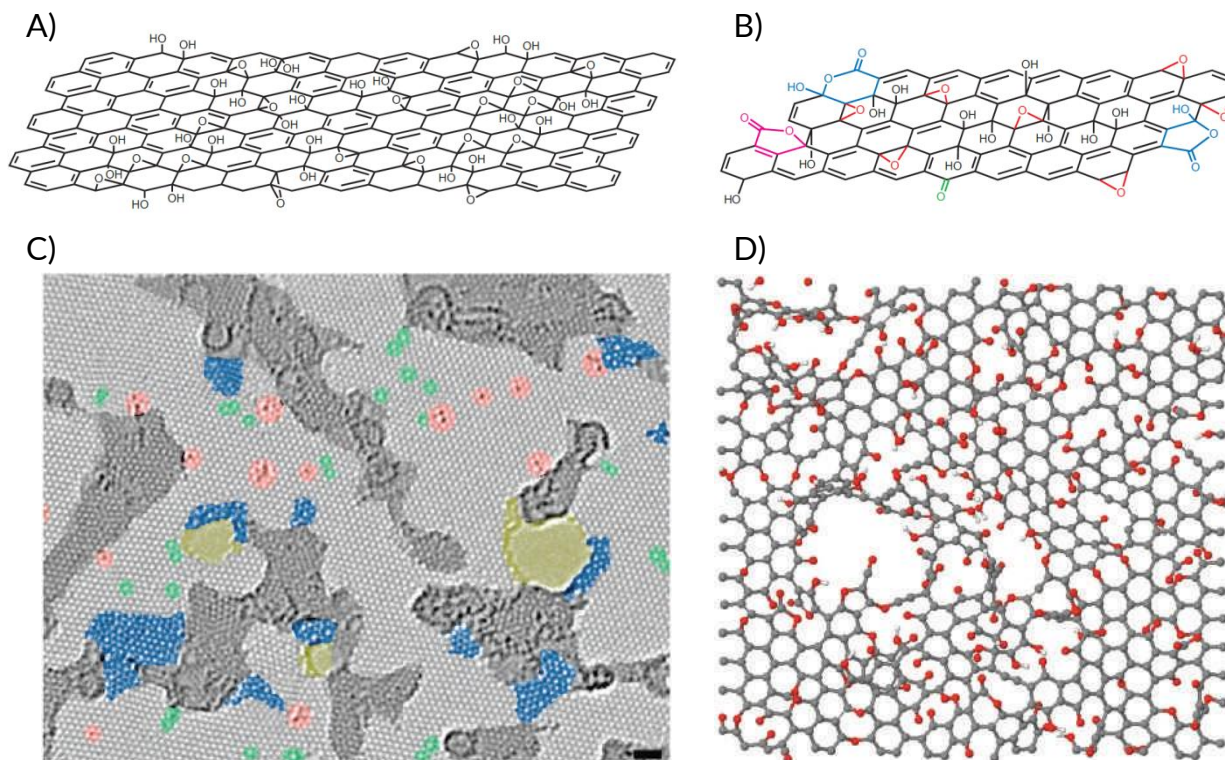


Figura 1. Estructura del GO. (a) El modelo Lerf-Klinowski es el más aceptado actualmente porque propone una composición no estequiométrica del GO. (b) Actualización del modelo Lerf-Klinowski propuesta por Gao y colaboradores en 2009,^[22] muestra nuevos grupos oxigenados en el GO, como son anillos lactoles de 5 ó 6 miembros, ésteres de alcoholes terciarios, cetonas, etc. (c) Imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de alta resolución con corrección de aberraciones de una monolamina de rGO, el color gris oscuro representa las regiones contaminadas, el azul, redes de carbono desordenadas o defectos topológicos extendidos, el rojo, sustituciones, el verde, defectos topológicos aislados y el amarillo, hoyos y sus bordes reconstruidos. (d) Representación del plano basal desordenado del rGO, hoyos, defectos topológicos y átomos de oxígeno remanentes.^[21]

Una de las principales razones por la cual se ha popularizado el uso del GO por encima del grafeno, es su capacidad para dispersarse en disolventes polares, principalmente en agua. El método más empleado para la exfoliación o dispersión del GO en agua es a través de la sonicación.^[23] El GO en polvo se mezcla con agua desionizada y se introduce en un baño ultrasónico hasta obtener una dispersión homogénea, los tiempos reportados de sonication van desde 2 minutos^[20] hasta 400 horas.^[24] El sonication del GO altera el tamaño de las obleas en la dispersión, se ha observado la disminución del tamaño promedio de las láminas de GO desde los 5 minutos de sonication. Sin embargo, la estabilidad de la dispersión es inversamente proporcional al tamaño de las láminas. La dispersabilidad no es la única propiedad que se ve afectada por el tamaño, las propiedades ópticas, eléctricas y mecánicas, dependen de la distribución de tamaños de las obleas de GO en la muestra.^[25]

Todos estos factores han causado que los resultados en la caracterización del GO sean distintos y poco reproducibles, inclusive de una muestra a otra.^[20] Para el ejercicio correcto de la investigación es de vital importancia desarrollar una metodología que permita obtener un GO con características consistentes de una muestra a otra. Con el objetivo de lograrlo se deben acotar y controlar las variables más determinantes en el proceso de dispersión de las obleas de GO en agua. En la primer sección de este trabajo se describen las consideraciones que debieron tomarse para la obtención de una dispersión de GO homogénea, estable y con caracterización reproducible, a partir del GO en polvo de un solo proveedor. Posteriormente se diseñó una metodología para separar, vía centrifugación, la dispersión original en 3 fracciones de diferentes distribuciones de tamaño: GO “partículas pequeñas”, GO “partículas medianas” y GO “partículas grandes” (GOPP, GOPM y GOPG, respectivamente). Cada una de estas fracciones presenta propiedades físicas y químicas distintas dependientes de su tamaño, que en concatenación resultan en las propiedades de la dispersión original de GO. Además, se propone que, cambiando las condiciones de centrifugación se puede elegir la distribución de tamaños que se prefiera para GOPM, dependiendo de la aplicación que se le quiera dar al GO.

El GO también se puede reducir parcialmente a una estructura tipo grafeno, quitando la mayoría de los grupos oxigenados y devolviendo limitadamente la conjugación sp^2 de los enlaces en la estructura. A este material se le llama óxido de grafeno reducido (rGO, por sus siglas en inglés, *reduced graphene oxide*), la fuerte oxidación por la que pasa el óxido de grafeno provoca muchos defectos en la red, los cuales son prácticamente imposibles de corregir mediante tratamientos químicos y por lo tanto, el rGO presenta propiedades diferentes a las del grafeno.^[26] A causa de las propiedades particulares del GO y rGO, se han desarrollado una amplia gama de aplicaciones en biosensores, imagenología médica, materiales optoelectrónicos, recubrimientos, catálisis, purificación de agua, almacenamiento de energía, nanomateriales funcionalizados, entre otras.^[27-30]

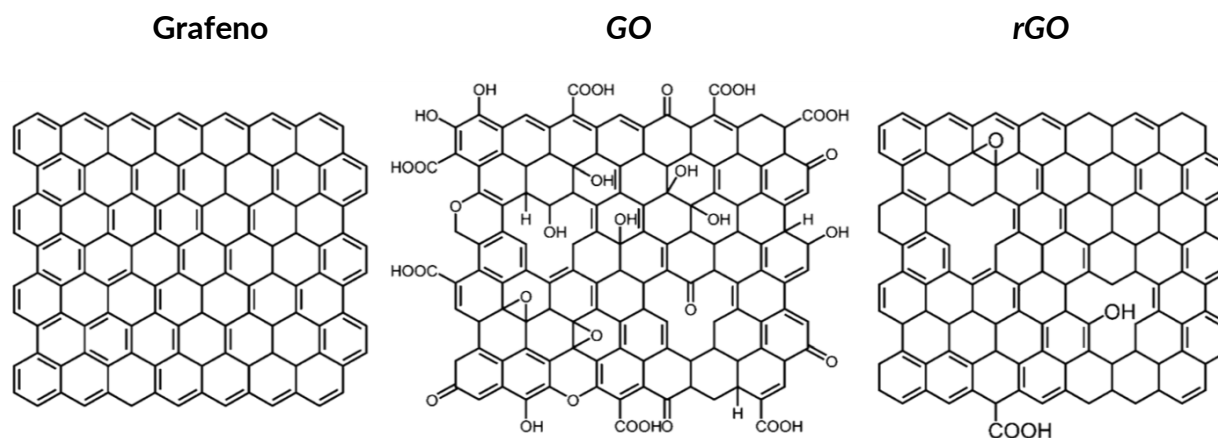


Figura 2. Estructuras propuestas para el grafeno (izquierda), GO (centro) y rGO (derecha).^[29]

2.2. Ácido carmínico y carmín

El ácido carmínico ($C_{22}H_{20}O_{13}$) es el componente principal del carmín, un colorante de color rojo que se extrae de la grana cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) y algunos otros insectos similares. Este colorante se ha empleado desde tiempos prehispánicos en México, donde se utilizaba la grana cochinilla para dar color a comida, textiles, vasijas, casas, edificios, etc.^[12] Después de la conquista, Hernán Cortés y el rey español, Carlos V, explotaron este colorante por su inigualable color y popularizaron su uso en Europa. La cochinilla reemplazó al quermes como el colorante rojo más utilizado y España fue el

único exportador de este producto al resto del mundo durante aproximadamente 300 años, desde el siglo XVI hasta el XIX. El precio de la grana cochinilla siempre ha sido elevado, ya que para producir 1 kg del colorante se necesitan cerca de 155000 insectos secos.^[11] En un principio la mayor parte de la producción se llevaba a cabo en lo que actualmente es el estado de Oaxaca, México. Una de las metas de los colonizadores era cultivar la grana cochinilla fuera de América Central y Sudamérica, a pesar del poco éxito obtenido en los primeros intentos, se logró cultivar en las Islas Canarias, donde actualmente se sigue produciendo. Los principales exportadores de este colorante al día de hoy son Perú, Bolivia, Argentina y las Islas Canarias (España).^[13] Existen pocos registros del uso del carmín en algunos alimentos y bebidas prehispánicas, sin embargo, se ha reportado su utilización en la preparación de tamales. Lo que se sabe con certeza es que, al igual que otros colorantes extraídos de insectos, extractos de la grana cochinilla fueron utilizados como medicinas para la cabeza, el corazón y el estómago. Esto se atribuyó primero a un médico de Felipe II de España y se continuó su uso hasta mediados del siglo XIX, aunque ahora se sabe que estas recetas tienen un origen prehispánico.^[12]

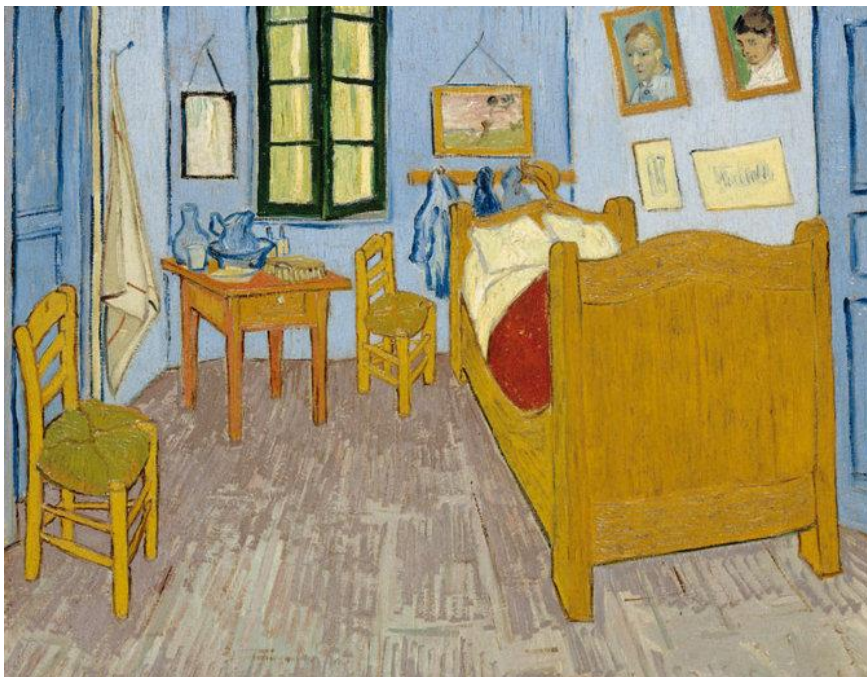


Figura 3. La tercera versión de "La habitación de Van Gogh en Arlés" que usa grana cochinilla. Vincent Van Gogh comparó el color de la cochinilla con "el rojo del vino".^[31]

La grana cochinilla o también llamada cochinilla fina, vive como parásito sobre las pencas del nopal verdulero (*Opuntia ficus-indica*). Esta cochinilla se cultiva durante 80-90 días, lo cual corresponde al ciclo completo de vida de las cochinillas hembras. La concentración de ácido carmínico es mayor en las hembras, se reportan diferentes porcentajes pero en condiciones óptimas de cultivo puede alcanzar valores de entre 19 y 25 %.^[32] Las hembras se encuentran fijadas sobre el nopal cubiertas de una seda blanquecina, sin embargo, su cuerpo es rojo debido a las altas concentraciones de ácido carmínico. Los machos presentan menores concentraciones del colorante y en su etapa adulta son insectos alados que mueren después de la reproducción. Las hembras adultas se cosechan, se secan y son la materia prima para la extracción del colorante (Figura 4). No se sabe con exactitud la razón por la cual estos insectos producen tan altas cantidades de ácido carmínico pero se piensa que sirve como método de defensa contra depredadores, ya que se ha reportado que ahuyenta a las hormigas y otros depredadores.^[33]

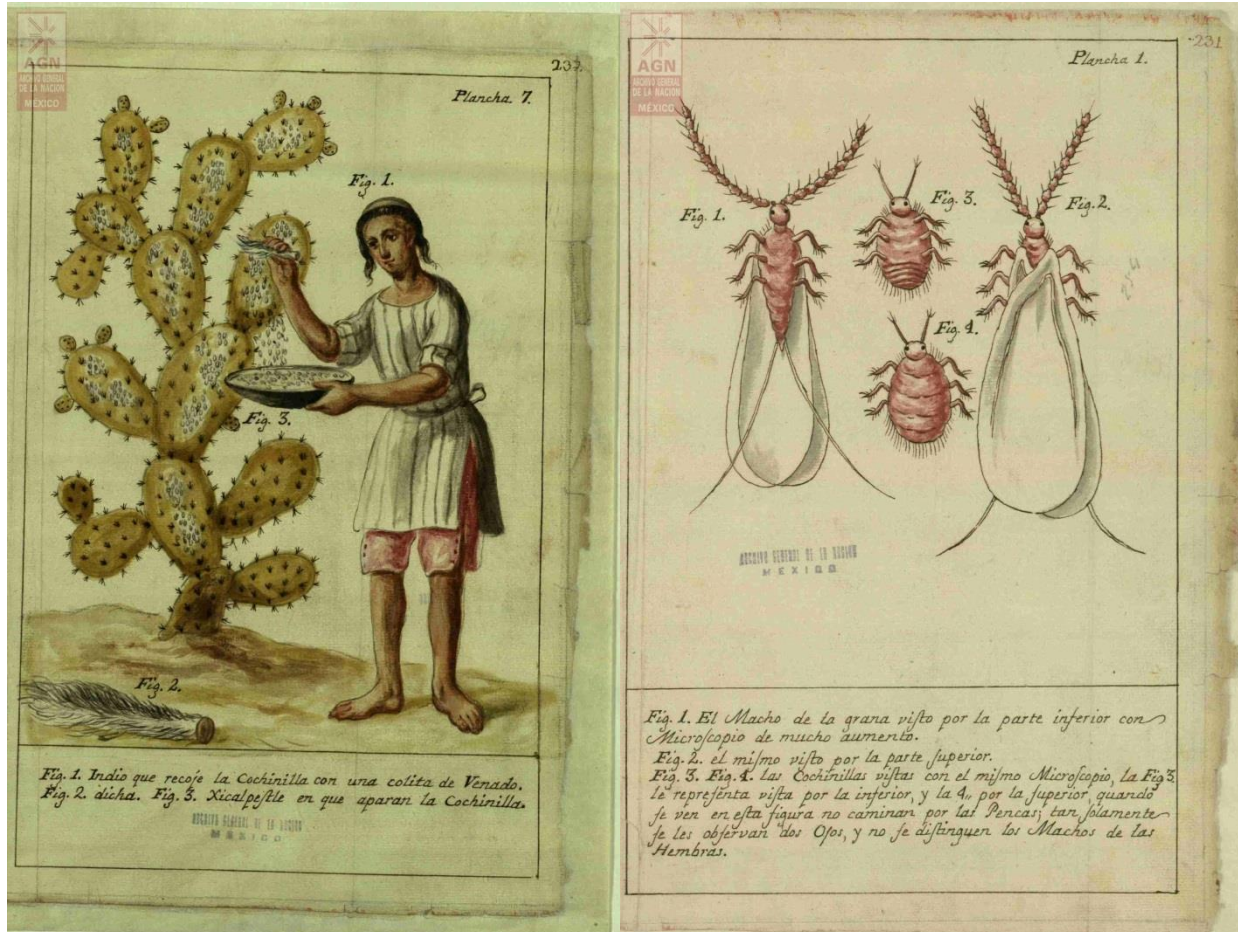


Figura 4. Ilustraciones de la recolección de la grana cochinilla utilizando una cola de venado, la grana es recolectada en un xicalpextle o jícara (izquierda). Insectos *Dactylopius coccus* Costa macho alado y hembra (derecha). Realizadas por José Antonio de Alzate y Ramírez en 1777. ^[34]

El ácido carmínico (AC) es un glucósido de antraquinona y su nombre IUPAC es ácido 7-D-glucopiranosil-3,5,6,8-tetrahidroxi-1-metil-9,10-dioxo-antraceno-2-carboxílico (Figura 5). El AC puede sufrir 5 desprotonaciones en medio acuoso, siendo el protón más ácido del grupo carboxílico, seguido por los hidrógenos fenólicos C₅, C₆, C₈ y C₃^[35]. Este ácido tiene una solubilidad en agua de aproximadamente 3 g/100 mL, además de ser soluble en disolventes orgánicos como dietiléter, metanol y etanol, pero insoluble en benceno, éter de petróleo y cloroformo. El AC es un cromóforo y su color se origina de los dobles enlaces conjugados de los tres anillos de la antraquinona, otros ejemplos de colorantes con esta estructura son el alzarín (1,2-dihidroxi-antraquinona) y la purpurina (1,2,4-

trihydroxiantraquinona), no obstante, estos colorantes son hidrofóbicos, los múltiples hidroxilos del AC le otorgan su carácter hidrofílico. El color del AC en disoluciones acuosas depende del pH y va desde amarillo a $\text{pH} \approx 3$, hasta morado a $\text{pH} \approx 9$. El color característico del carmín, E120 o *Natural Red 004*, se obtiene al coordinar el ácido carmínico los cationes de Al^{3+} ó Ca^{2+} , para algunas aplicaciones se utiliza amoníaco. Sin embargo, los colores más brillantes y por lo tanto la sal más común del ácido carmínico es con aluminio (Figura 5).

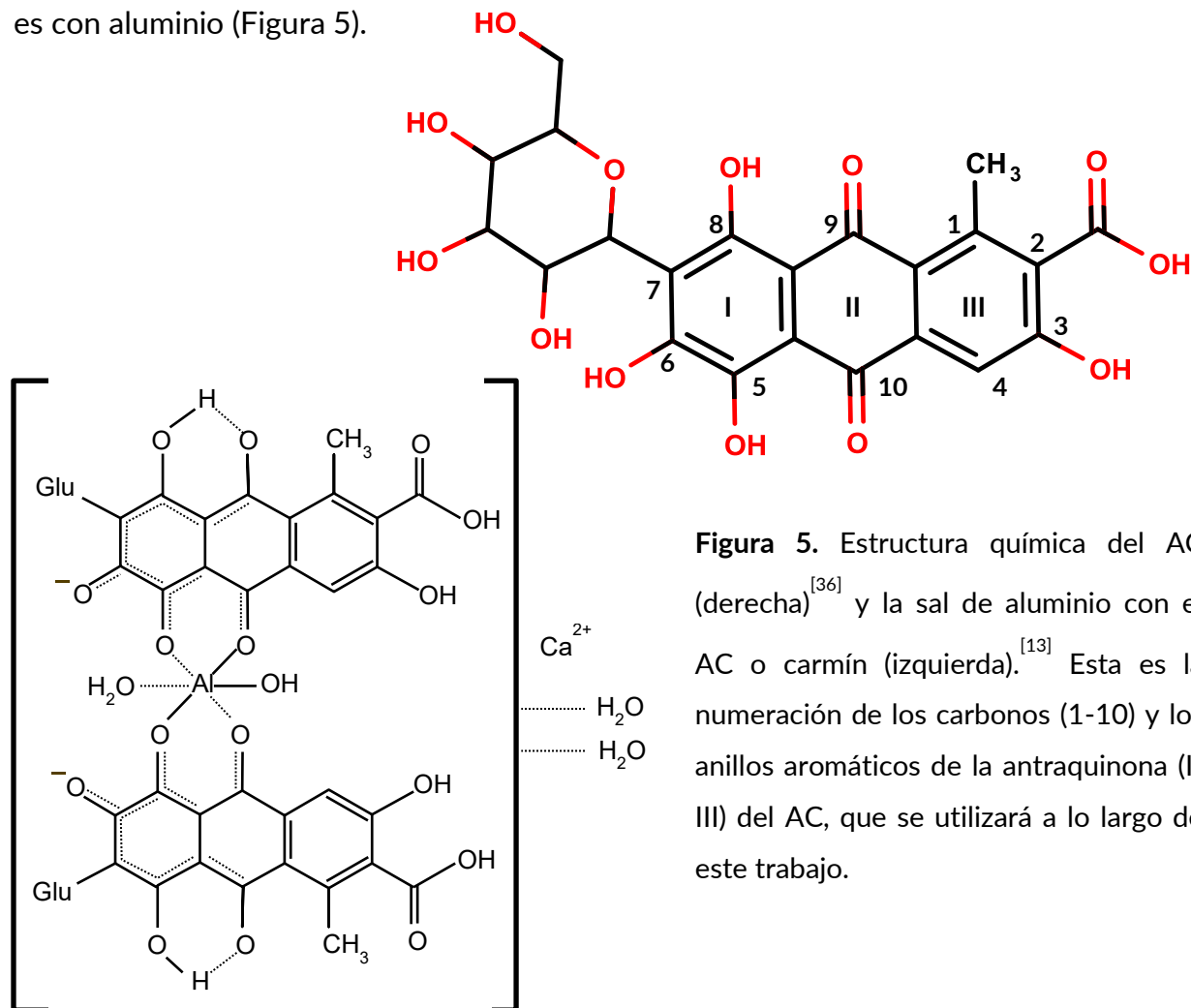


Figura 5. Estructura química del AC (derecha)^[36] y la sal de aluminio con el AC o carmín (izquierda).^[13] Esta es la numeración de los carbonos (1-10) y los anillos aromáticos de la antraquinona (I-III) del AC, que se utilizará a lo largo de este trabajo.

El carmín, la sal o laca del ácido carmínico con aluminio, se utiliza como colorante natural en una amplia variedad de productos como: flores artificiales, pinturas, tinta roja, cosméticos, alimentos y bebidas. Algunos productos para el consumo humano a los que contienen AC o carmín son: leche, fruta, pescado, yogurt, carne, cápsulas, etc.^[11] Existe una controversia de años sobre el uso del AC como aditivo en productos de consumo, los

beneficios son su relativa estabilidad a altas temperaturas y a la exposición de la luz, además tiene un alto poder de tinción y es de origen natural. Por otra parte, el AC es un extracto de insectos, por lo tanto, existe un rechazo generalizado de los consumidores después de ser informados sobre su origen, adicionalmente, la laca contiene aluminio y se han reportado casos de fuertes reacciones alérgicas relacionadas con su consumo.^[13,37] En la comunidad científica existe interés alrededor de esta biomolécula por sus particulares propiedades ópticas,^[38,39] redox,^[40] fotoquímicas^[41,42] y como agente quelante.^[35] Además, se han publicado trabajos donde se investigan sus posibles aplicaciones como agente anti-tumoral,^[43] antioxidante,^[44] fluoróforo,^[45,46] componente en celdas solares,^[47,48] entre otras.

2.3. Espectroscopía Raman, SERS y GERS

La espectroscopía Raman se basa en un fenómeno de dispersión inelástica de la luz postulado por Adolf Smekal en 1923 y observado experimentalmente por primera vez por los físicos indios C. V. Raman y K. S. Krishnan en el año 1928. Raman fue galardonado con el premio Nobel de física en 1930, por este descubrimiento. A la dispersión elástica de la luz se le conoce como dispersión Rayleigh y, básicamente se describe como el cambio de dirección de un fotón al interactuar con partículas pequeñas. La longitud de onda del fotón permanece igual después de este tipo de dispersión. La longitud de onda de la luz es inversamente proporcional a su dispersabilidad y la eficiencia de la dispersión aumenta aproximadamente a la cuarta potencia de la frecuencia de la luz incidente. No obstante, la dispersión Raman es muy ineficiente, aproximadamente 1 en 1 millón de fotones sufren dispersión Raman. Este tipo de dispersión, cambia la frecuencia de la luz dispersada. Si la energía final es menor a la inicial se le conoce como corrimiento Stokes y, si es mayor, como corrimiento anti-Stokes.^[49]

En la espectroscopía Raman se utiliza una fuente de luz monocromática (láser) para irradiar a la muestra, a diferencia de otras técnicas espectroscópicas que se basan en la absorción electrónica, la frecuencia de la luz irradiada es constante y no debe coincidir con la energía de ningún estado excitado. Los fotones interactúan con las moléculas distorsionando la forma de la nube electrónica alrededor de los núcleos, es decir, la polarizan. Esto origina una transición de energía a un estado de corta vida, llamado “estado virtual” y la energía decae rápidamente de este estado virtual emitiendo un fotón. Si la molécula regresa a su estado basal se trata de una dispersión Rayleigh, sin embargo, puede decaer a un estado vibracional excitado y emitir un fotón de menor energía (corrimiento Stokes) o, es posible que la molécula ya se encontrara en un estado vibracional excitado y emita un fotón de mayor energía al regresar al estado basal (corrimiento anti-Stokes). La mayoría de las moléculas se encuentran en su estado fundamental a temperatura ambiente, por eso es más eficiente la dispersión Raman con corrimiento Stokes (Figura 6).^[3]

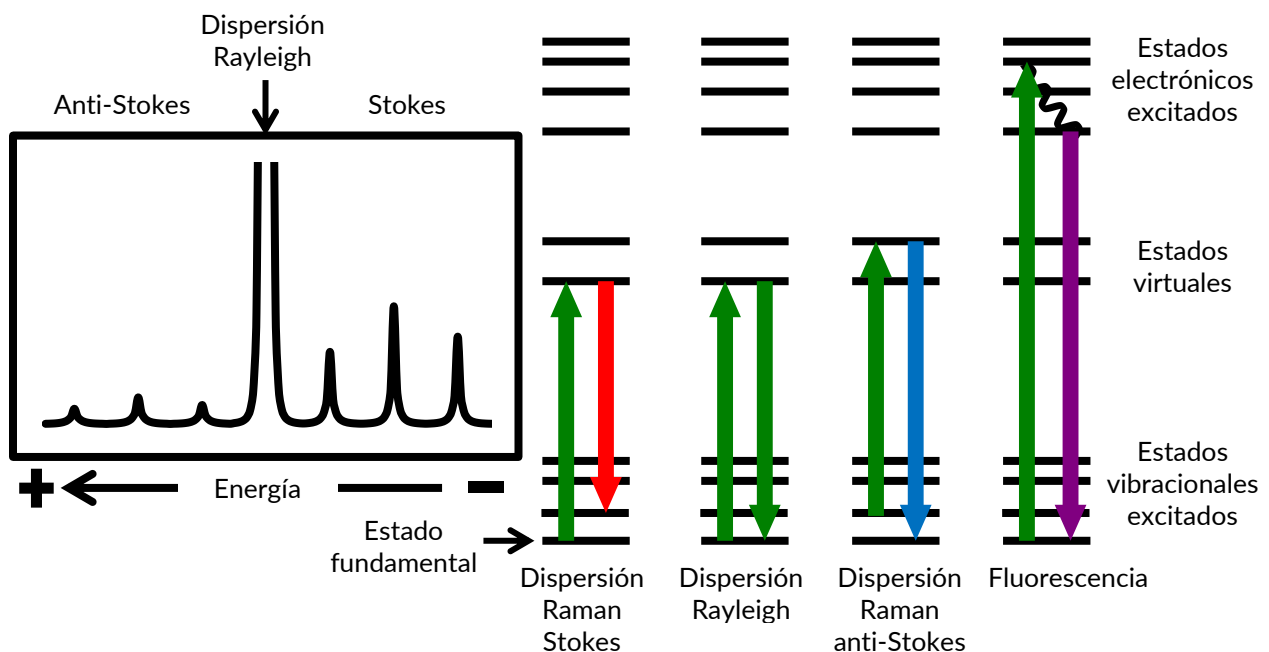


Figura 6. Representación de las dispersiones Rayleigh y Raman observadas en un espectro (izquierda), esquema de los estados energéticos de una molécula y los diferentes procesos involucrados en cada uno de los fenómenos espectroscópicos de dispersión y fluorescencia (derecha).

Los espectros Raman por lo general abarcan la región del corrimiento Stokes y utilizan filtros para cubrir la intensa señal de la dispersión Rayleigh, el número de onda de las señales es la resta entre la energía de la luz irradiada y la luz dispersada por la muestra. Gracias a este fenómeno se puede obtener información de la estructura y los grupos funcionales de una molécula. Cada molécula presenta un conjunto de vibraciones particulares que originan espectros característicos que permiten identificarla de otras moléculas. Estas señales se presentan en una parte del espectro denominada “región de la huella digital” o *fingerprint región*, en inglés, y va de 400 a 1800 cm^{-1} . Además, la intensidad de las señales Raman depende de la cantidad de material en la muestra, por lo que en ciertas condiciones es posible calcular la concentración de las moléculas.^[50]

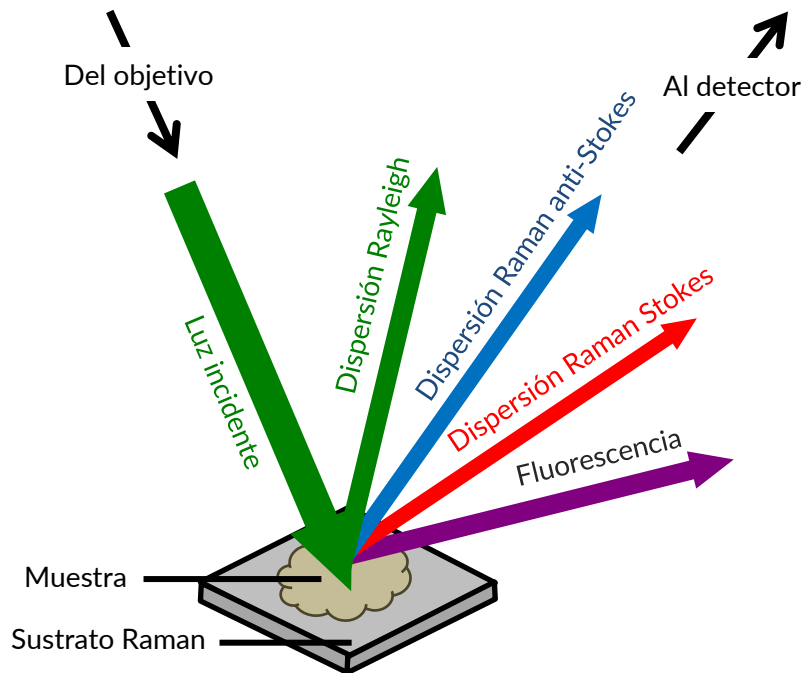


Figura 7. Dibujo de las distintas interacciones de la luz irradiada con la muestra sobre un sustrato Raman.^[50]

Sin embargo, la poca intensidad de las señales Raman obstaculiza la sensibilidad de esta técnica. A causa de la proporcionalidad entre la frecuencia y la dispersibilidad de la luz, la intensidad de las señales Raman aumenta al disminuir la longitud de onda de la luz irradiada. Los láseres que comúnmente se usan en los equipos Raman para irradiar las muestras emiten luz desde el UV hasta el NIR. Aunque esta solución puede causar otro problema, ya que si la longitud del láser coincide con alguna transición electrónica de la molécula es posible que se produzca fluorescencia. El fenómeno de la fluorescencia

también ocasiona un corrimiento Stokes entre la luz absorbida y la emitida, por lo tanto, la fluorescencia se observa en el espectro como una señal muy ancha e intensa que enmascara las señales Raman e impide el análisis e interpretación de los espectros.

Cuando la longitud de onda del láser irradiado coincide con alguna transición electrónica del analito, se presenta un fenómeno de resonancia que puede aumentar las señales Raman de 3 a 5 órdenes de magnitud.^[51] Esto se acentúa en moléculas con varios dobles enlaces conjugados (cromóforos) ya que la brecha energética entre el estado basal y los estados excitados de la molécula (transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$) es menor que en otras moléculas orgánicas y puede coincidir con láseres que emitan en la región del visible en el espectro electromagnético (por ejemplo, 514.5 y 532 nm). Este efecto se conoce como Raman resonante (RR), las bandas del espectro RR que más incrementan su intensidad son las que están asociadas a las vibraciones de los enlaces que en el estado excitado presentan cambios en su longitud y fuerza de enlace, ya que estas partes de la molécula sufren un aumento en su polarizabilidad. Sin embargo, muchas de estas moléculas cromóforas también producen una intensa fluorescencia, por lo tanto, la aplicación del RR se ve limitada.^[52]

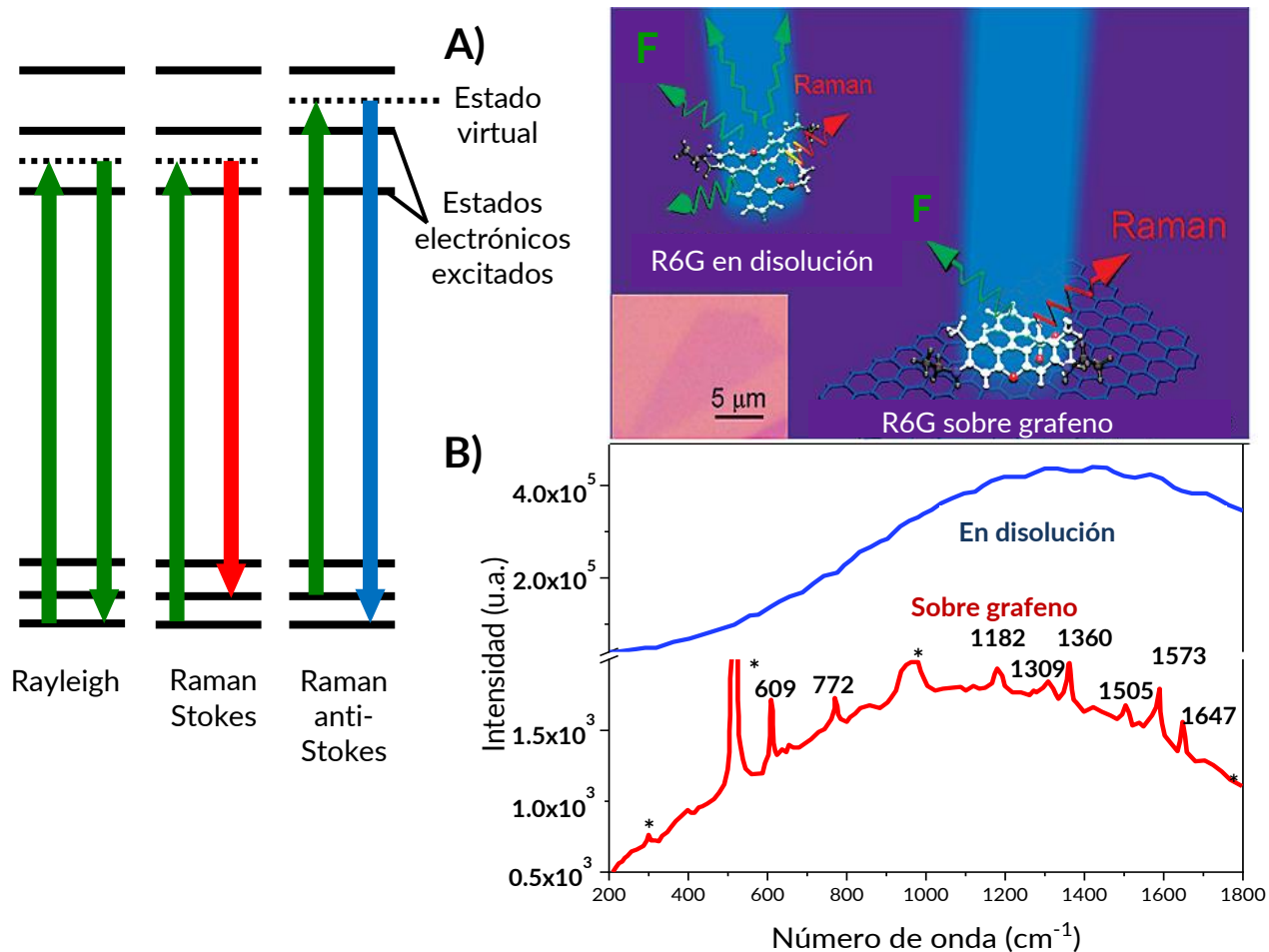


Figura 8. Esquema del efecto RR (izquierda),^[56] (a) representación de una molécula de rodamina 6G (R6G) en disolución y sobre grafeno al ser irradiada por luz, y (b) espectros Raman donde se observa que el apagamiento de la fluorescencia de R6G sobre grafeno permite observar sus señales RR, donde F es fluorescencia (derecha).^[53]

El apagamiento de la fluorescencia de las moléculas adsorbidas en sustratos grafénicos ha probado ser una buena opción para la observación de las señales RR de moléculas cromóforas a bajas concentraciones (Figura 8).^[53] Se ha reportado que el apagamiento de la fluorescencia también es eficiente en sustratos de nanopartículas metálicas.^[54,55]

Existe otro fenómeno, conocido como *SERS*, que es capaz de amplificar las señales Raman aún más que el efecto del RR y el apagamiento de la fluorescencia. Adicionalmente, el efecto *SERS* no es específico a moléculas con dobles enlaces

conjugados. El *SERS* es una técnica que mejora la dispersión Raman de moléculas adsorbidas en la superficie de NPM, existen dos mecanismos propuestos de cómo esta técnica mejora las señales Raman de las moléculas: el mecanismo electromagnético y el químico. El primero propone que el incremento en intensidad de las señales Raman resulta de la amplificación de la luz por la resonancia del plasmón superficial localizado de la nanopartículas (NP). Los plasmones superficiales son oscilaciones colectivas de los electrones libres frente a los núcleos positivos de los metales en las NP (Figura 9). Hoy en día se coincide en que la principal contribución del efecto *SERS* en NPM se origina del mecanismo electromagnético y cálculos teóricos predicen factores de amplificación de 10^{10} a 10^{11} , dependiendo del material (comúnmente Ag, Au y Cu) y la forma de las NP (nanoesferas, nanobarras, nanotubos, etc.). El mecanismo químico propone la formación de complejos de transferencia de carga entre el metal y la molécula que aumentan la polarizabilidad de la última, si la longitud de onda de la luz irradiada es resonante con los estados electrónicos de la transferencia de carga. Para este mecanismo se calculan factores de amplificación de hasta 10^3 , no obstante, la amplificación total se calcula como el factor de ambos mecanismos. Por estas razones la técnica *SERS* mejora el límite de detección de la espectroscopía Raman significativamente y ha sido el objeto de estudio de una gran cantidad de publicaciones científicas.^[1-4,7,8]

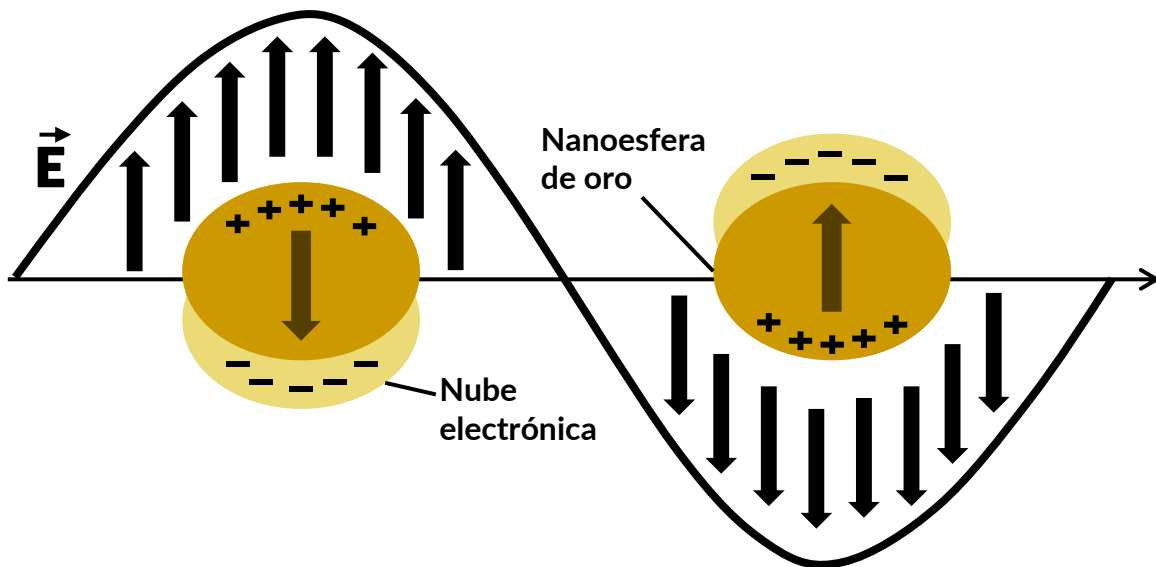


Figura 9. Ilustración de la resonancia del plasmón superficial localizado de las NPM.^[96]

Un fenómeno similar también se ha observado en sustratos de grafeno, GO y rGO, en estos casos se le llama, en inglés, *Graphene-enhanced Raman spectroscopy* o *GERS*, por sus siglas en inglés. De acuerdo a la bibliografía el *GERS* incrementa la intensidad de las señales Raman en menor medida que las NP de Ag y Au, porque el grafeno no presenta la contribución del campo electromagnético a diferencia de los materiales plasmónicos.^[58] Por lo tanto, el efecto *GERS* se atribuye únicamente al mecanismo químico y consecuentemente depende del estado químico del grafeno. De hecho, en algunos casos se han observado mejores factores de amplificación *GERS* en GO que en láminas de grafeno prístino.^[76] Estos nanomateriales de carbono 2D junto con NPM pueden superar algunos de los problemas experimentales que presentan las NP por separado. Los sustratos híbridos (NPM y sustratos grafénicos) para amplificación *SERS* pueden tener una doble contribución a través del mecanismo electromagnético de las NPM y el químico de los sustratos grafénicos.^[59,76]

3. Antecedentes

3.1. Dispersión del GO y separación por tamaños

La mayoría de los trabajos de investigación publicados que utilizan dispersiones de GO no hacen hincapié en la metodología empleada para la obtención de dichas dispersiones. Esto ha ocasionado que las propiedades (por ejemplo: absorción, fotoluminiscencia, biocompatibilidad, resistencia a la tracción, conductividad eléctrica, potencial Zeta, área superficial, etc.) de los materiales desarrollados a partir del GO varíen significativamente entre los artículos publicados y sean difícilmente reproducibles. Como para cualquier material, las propiedades que se busquen ajustar del GO, dependerán de la aplicación que se le quiera dar. Algunos grupos de investigación se han dado a la tarea de determinar las variables que originan propiedades específicas, la distribución de tamaños del GO es uno de los principales factores que se busca controlar.

Debido a su estructura bidimensional, una de las aplicaciones más prometedora de GO es el desarrollo de películas o recubrimientos que mejoren las propiedades ópticas, eléctricas, térmicas o mecánicas de otros materiales. Sin embargo, para que estas películas sean viables comercialmente deben de poseer propiedades mecánicas óptimas. En 2016, Shibing Ye y Jiachun Feng realizaron un estudio del efecto de la sonicación en las propiedades mecánicas de películas de GO. En dicho trabajo se realizó un seguimiento del tamaño del GO en dispersiones con distintos tiempos de sonicado por microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés, *atomic force microscopy*). Ellos reportan que la muestra sin sonicar presenta una distribución de tamaños de 5 a 20 μm y después de 60 minutos de sonicado, prácticamente todas las láminas de GO (97 - 99 %) poseen tamaños menores a 1 μm . Además, se usó el GO con distintos tratamientos previos a la exfoliación, la primera muestra (GiO) no se secó después de la oxidación (método modificado de Hummers), la segunda se liofilizó (FDGO) y la tercera se secó al vacío (VDGO). Para la muestra, GiO, las obleas de GO se dispersaron óptimamente después de tan solo 2 minutos de sonicación, para la muestra FDGO se obtuvo una dispersión homogénea después de 30 minutos de sonicado y para la última muestra, un polvo café

oscuro, se necesitaron 60 minutos de sonicado para obtener una dispersión visiblemente homogénea. Es la muestra de VDGO la que coincide con el GO en polvo que se utilizó durante este trabajo (Figura 10).^[20] Varios trabajos reportan tiempos de sonicación de 1 hora para alcanzar una dispersión acuosa que parezca homogénea a simple vista, cuando se trabaja a partir del GO en polvo.^[60-64] Aunque en muchos casos no se busca tener una dispersión homogénea, porque se le da prioridad a conservar mayores tamaños de las obleas de GO. También se ha observado que otros factores, como el grado de oxidación del GO o la estructura cristalina del grafito de partida, se pueden ajustar para disminuir el tiempo de sonicación necesario para obtener una exfoliación completa.^[65]

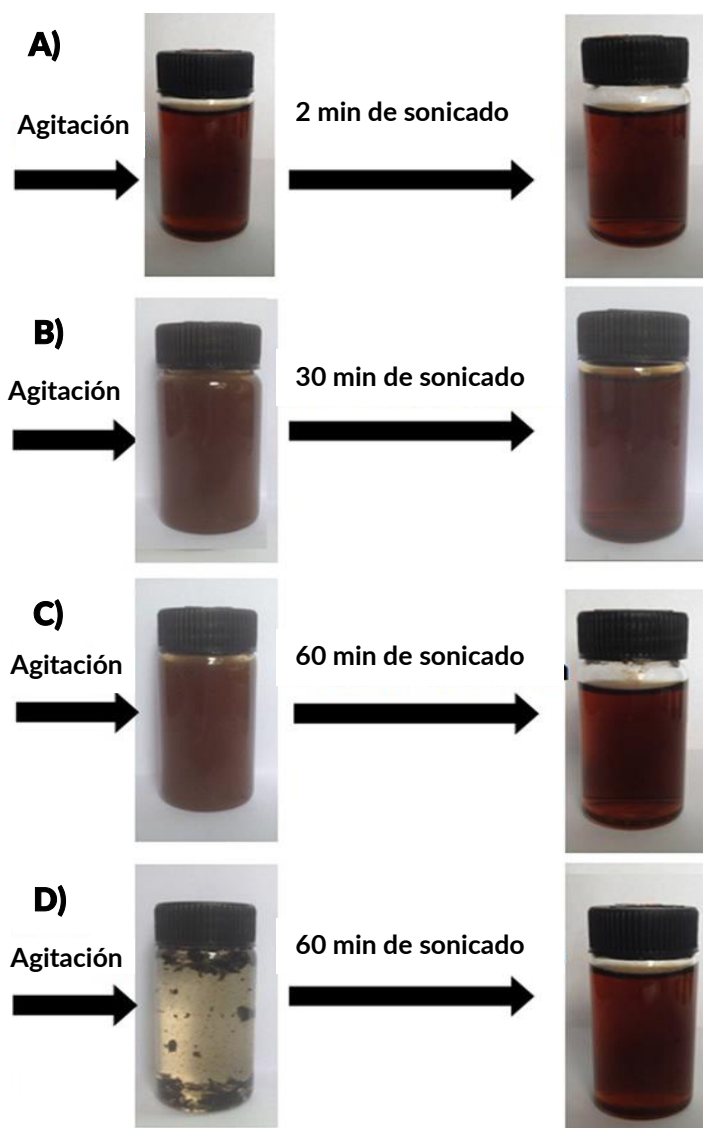


Figura 10. Fotografías del GO sin tratamiento después de la preparación (A), el polvo de FDGO sonicado durante 30 (B) y 60 minutos (C), y el polvo de VDGO (D).^[20] El último polvo de GO es el que coincide con el GO que se trabajó.

Además de la disminución del tamaño del GO, se ha reportado que el sonicado puede mejorar las propiedades de adsorción de ciertas moléculas orgánicas contaminantes, por ejemplo: diclofenaco y sulfametoxazol, sobre su superficie.^[66] La sonicación aumenta el número de monoláminas de GO separando los aglomerados presentes en la dispersión, es decir, incrementa su área superficial. Asimismo aplicar sonicación de alta intensidad a dispersiones de GO, resulta en cargas superficiales de menor magnitud, medidas por potencial Zeta. Este fenómeno se debe a que la sonicación puede reducir el GO, favoreciendo las interacciones $\pi - \pi$ entre esos contaminantes, y las regiones de carbonos sp^2 . En otros trabajos se ha propuesto este tratamiento ultrasónico como método de reducción.^[19]

La preocupación de mantener tamaños de micrómetros en dispersiones acuosas de monoláminas de GO no es ubicua en los grupos de investigación que trabajan con el GO, se ha observado que las películas de GO de mayores tamaños tienen mejores propiedades mecánicas y mayor conductividad, sin embargo, para las aplicaciones médicas y optoelectrónicas, se prefieren obleas de menor tamaño.^[67] La biocompatibilidad y toxicidad del GO están correlacionadas con su tamaño y grado de oxidación, menor tamaño y mayor oxidación resultan en mayor biocompatibilidad y menor toxicidad. Por lo tanto, los tamaños menores se prefieren para aplicaciones como liberación programada de fármacos o genes, así como diagnóstico médico e imagenología.^[25]

Wang, Bai y Shi (2012) publicaron la separación de dos fracciones de GO, f1 y f2, de dimensiones laterales grandes y pequeñas, respectivamente, por sedimentación selectiva de las obleas de GO ajustando el pH a 4 y esperando 4 horas la formación de un precipitado (f1) de una dispersión en agua sonicada durante 30 minutos (Figura 11).^[68] El mismo año, Khan y colaboradores,^[69] realizaron la separación por centrifugación controlada de una dispersión de láminas exfoliadas de grafito en N-metil pirrolidona. La exfoliación de 1.65 g de grafito en 500 mL del disolvente se preparó en un baño ultrasónico durante 168 horas. Se realizaron ciclos consecutivos de 45 minutos en la centrifuga, el sobrenadante se extraía y el precipitado se redispersaba, posteriormente se

volvía a centrifugar a una velocidad menor, siendo la mayor de 4000 rpm y la menor de 500 rpm. Ellos encontraron que los tamaños promedio de las fracciones de grafito exfoliado iban de $\sim 1 \mu\text{m}$, para los sobrenadantes de la mayor velocidad de centrifugación, hasta $\sim 3.5 \mu\text{m}$ para la menor velocidad. En ambos trabajos se obtuvieron resultados de caracterización y propiedades distintas para cada fracción.

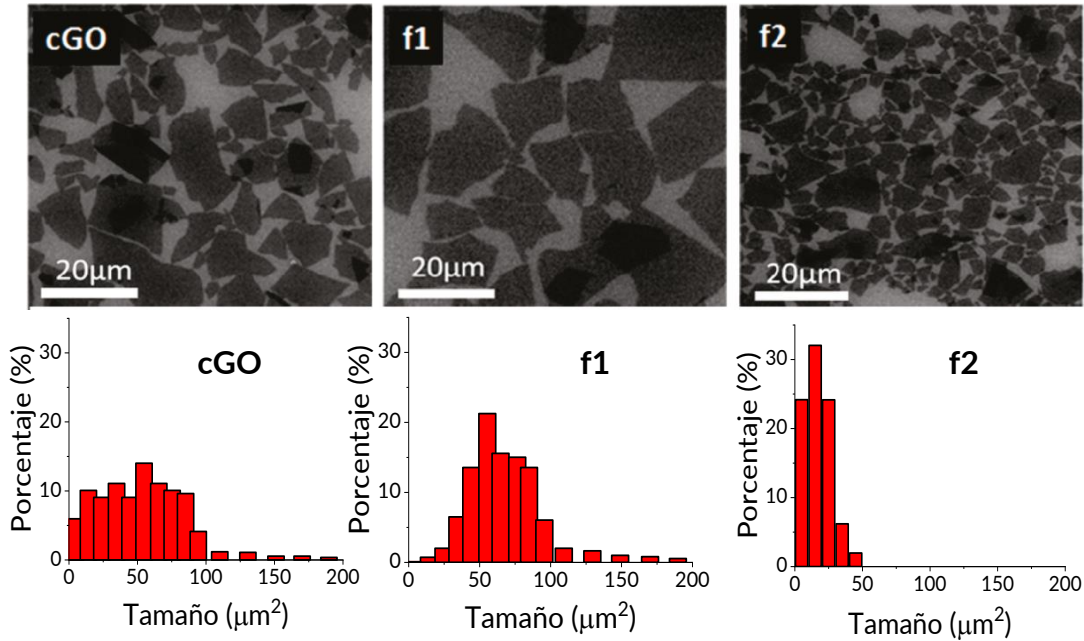


Figura 11. Imágenes SEM (por sus siglas en inglés, *scanning electron microscopy*) e histograma correspondiente de la distribución de tamaños de la dispersión original del GO (cGO), f1 y f2. Los histogramas se obtuvieron contando más de 1000 láminas de cada muestra.^[68]

3.2. Reducción del GO

En un principio la producción de GO se efectuaba con el objetivo de reducirlo para producir grafeno más económica y sencillamente a gran escala, sin embargo, se observó que la reducción del GO no llevaba a la síntesis del grafeno, por lo tanto, al material sintetizado se le empezó a llamar *rGO*, porque este material tiene características y propiedades distintas al grafeno y al GO. El *rGO* empezó a ganar popularidad entre los grupos de investigación una vez que se observó que sus propiedades dependen del grado de oxidación y el método de oxidación, es decir, ajustando la fracción de regiones

sp² a través de la remoción de grupos oxigenados específicos se pueden controlar las propiedades eléctricas, ópticas y químicas del rGO, dependiendo de la aplicación que se le quiera dar al material.^[21] Muchos métodos experimentales se han propuesto para reducir el GO a rGO, pero el más prometedor para producción a gran escala a bajo costo y poco tiempo sigue siendo la reducción química. Encontrar un agente reductor adecuado para remover los grupos oxigenados del GO es de gran importancia. La hidracina (N₂H₄·H₂O) ha sido el reductor que ha arrojado las mejores propiedades eléctricas y estructurales del rGO, no obstante, es una sustancia tóxica para el ambiente y los seres vivos.^[70] Es por esa razón que se han propuesto alternativas más amigables con el ambiente, una de esas alternativas es el citrato de sodio tribásico (C₆H₅Na₃O₇·2H₂O).^[30,64]

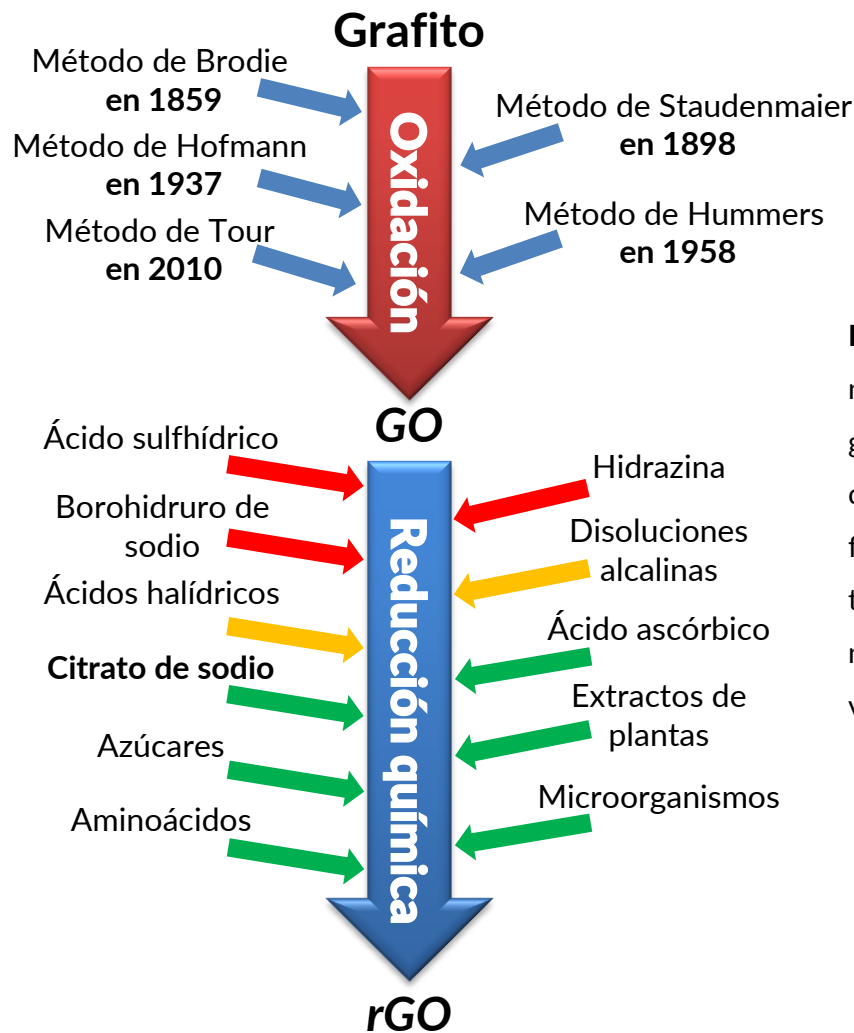


Figura 12. Principales métodos de oxidación del grafito a GO y de reducción del GO a rGO. El color de las flechas depende de la toxicidad del reductor, rojo, muy tóxico, amarillo, tóxico y verde, no tóxico.^[70]

Diferentes condiciones experimentales, tiempo, temperatura, concentración, cantidad de reductor, entre otras, producen *rGO* con distintas propiedades. La influencia de la cantidad de citrato de sodio utilizado en la reducción del *GO* al *rGO* fue monitoreada por Wan *et al.* (2013),^[30] ellos usaron 4 distintas proporciones de *GO* y citrato de sodio, 1:0, 1:6.66, 1:20 y 1:33.33, en una reacción a 95°C durante 18 horas.

Las monocapas de *rGO* son prácticamente transparentes en la región del visible del espectro electromagnético y se considera un semimetal por sus propiedades eléctricas, por lo tanto, ha sido ampliamente investigado para el desarrollo de conductores transparentes en aplicaciones como celdas solares orgánicas, diodos emisores de luz orgánicos y pantallas. Otra propiedad inesperada del *GO* y el *rGO*, que ha sido objeto de muchos trabajos científicos es su fluorescencia.^[21]

3.3. Fluorescencia del *GO* y el *rGO*

A diferencia del *GO* y el *rGO*, el grafeno no tiene fluorescencia, a causa de la ausencia de una brecha energética entre la banda de valencia y la de conducción. El *GO* no tiene un máximo de emisión característico, como lo tiene de absorción (230 nm), y existen diferentes teorías que pretenden explicar su fluorescencia. Una teoría plantea que la fluorescencia del *GO* se debe al confinamiento cuántico de los electrones que se encuentran en las regiones sp^2 en una matriz de carbonos sp^3 y la longitud de onda de la luz emitida depende del tamaño y forma de esas regiones. Básicamente, el diámetro de las regiones sp^2 es proporcional a la longitud de onda de la emisión, es decir, a menor tamaño, la brecha energética entre los niveles electrónicos involucrados es mayor. Así mismo, el tamaño de estas regiones de carbonos aromáticos depende del grado de oxidación, tamaño y forma de las láminas de *GO*. De acuerdo con esta teoría se han fabricado pequeñas láminas de grafeno (1 a 4 nm) que presentan luminiscencia dependiente del tamaño y se conocen como punto cuánticos de grafeno.^[26,71]

Otra propuesta, describe la fluorescencia como transiciones electrónicas entre niveles energéticos de los orbitales moleculares de los grupos funcionales oxigenados. De esta manera se explicaría la influencia del pH en la fluorescencia del *GO*, ya que la hipótesis

anterior no describe claramente ese fenómeno.^[72] Se han publicado trabajos que plantean que el GO es una mezcla de láminas de grafeno ligeramente oxidado (similar al rGO) y restos sumamente oxidados en disolución.^[73] Esto se basa en las diferentes propiedades luminiscentes de las fracciones separadas por centrifugación, sin embargo, eso también puede ser explicado por la otra hipótesis, considerando que las obleas de GO de menor tamaño son más dispersables que las más grandes y tienen mayor número de pequeñas regiones sp^2 fluorescentes.

La primera teoría es la más aceptada y es la que se empleó en la interpretación de los resultados experimentales de este proyecto. Básicamente propone que la absorción de un fotón genera la promoción de un electrón por encima de la brecha energética, dejando un hoyo cargado positivamente detrás. El par electrón-hoyo, se conoce como excitón. La creación del excitón es seguida por un decaimiento no radiativo al orbital LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*) y la promoción del hoyo al orbital HOMO (*highest occupied molecular orbital*).^[67] Posteriormente se da la recombinación del excitón en el borde de las regiones sp^2 y sp^3 , la cual resulta en la emisión de un fotón.^[74] La reducción del GO ha generado observaciones contradictorias en diferentes estudios. Pero la mayoría han observado una disminución en la intensidad de la fluorescencia y un corrimiento hacia el azul en el máximo de emisión. Chien y colaboradores (2012)^[75] redujeron gradualmente el GO con una lámpara de Xe y observaron que la emisión del GO (500-700 nm) disminuía, mientras que una señal de emisión más delgada centrada alrededor de 450 nm incrementaba conforme aumentaba el tiempo de exposición. Los autores asignaron la emisión en el rojo del GO a transiciones en estados localizados de desorden inducido y la emisión azul del rGO a pequeñas regiones sp^2 que aparecen aleatoriamente dentro de las regiones sp^3 a causa de la reducción (Figura 13).

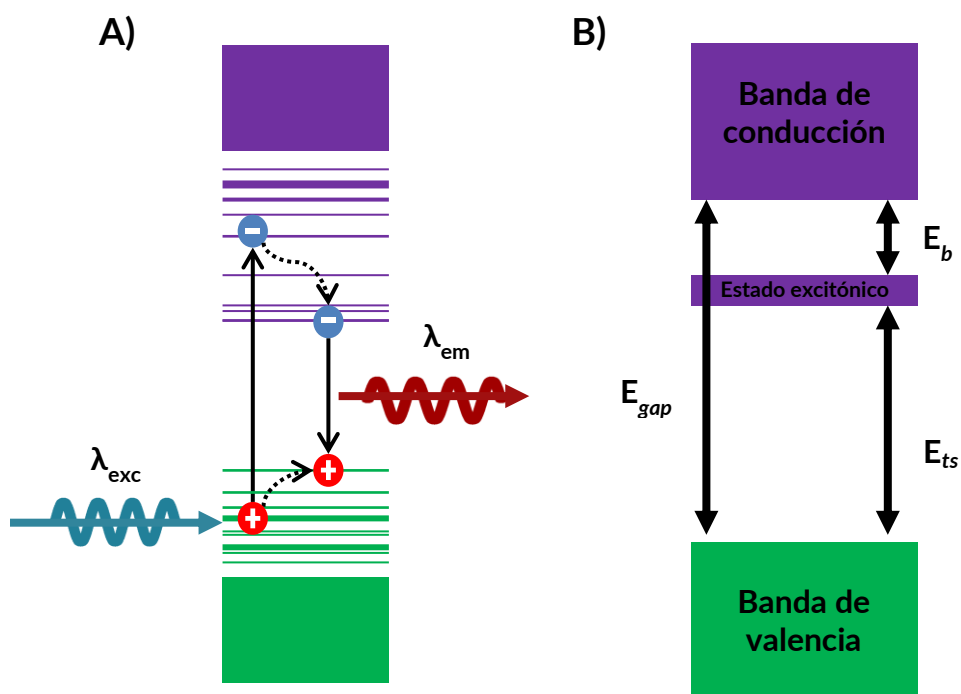


Figura 13. A) Esquema general del proceso de luminiscencia del GO. B) Esquema simplificado de las transiciones electrónicas considerando los efectos excitónicos, dónde E_{gap} es la energía del *bandgap* de un electrón, E_b es la energía de unión del excitón y E_{ts} es la primer transición óptica permitida.

3.4. Funcionalización del GO con NPAu

Las particulares propiedades del grafeno, el GO y el rGO, los han convertido en materiales sumamente prometedores en aplicaciones en el área de la salud, que van desde tratamientos para el cáncer hasta biosensores para detección de agentes nocivos o marcadores biológicos. No obstante, la utilización de estos materiales sin funcionalizar tiene ciertas limitante como aglomeración irreversible, poca selectividad, pobre estabilidad coloidal y escasa reproducibilidad. La adición de nanopartículas metálicas, principalmente de oro (NPAu), por su alta biocompatibilidad, síntesis sencilla por métodos en disolución, capacidad de unirse fácilmente a moléculas orgánicas de interés (funcionalización) y elevada estabilidad, ha solucionado algunos de estos problemas.

Además, se han informado numerosas ventajas de la utilización de estos nanomateriales híbridos comparados con los materiales por separado para aplicaciones biológicas. Algunas de ellas son: mayor estabilidad en dispersión acuosa, mayor área superficial, mayor eficiencia en la adsorción de moléculas aromáticas, mayor amplificación *SERS*, mejor apagamiento de la fluorescencia, mejores propiedades electroquímicas y actividad catalítica superior. (Figura 14).^[59,76,77,121,122]

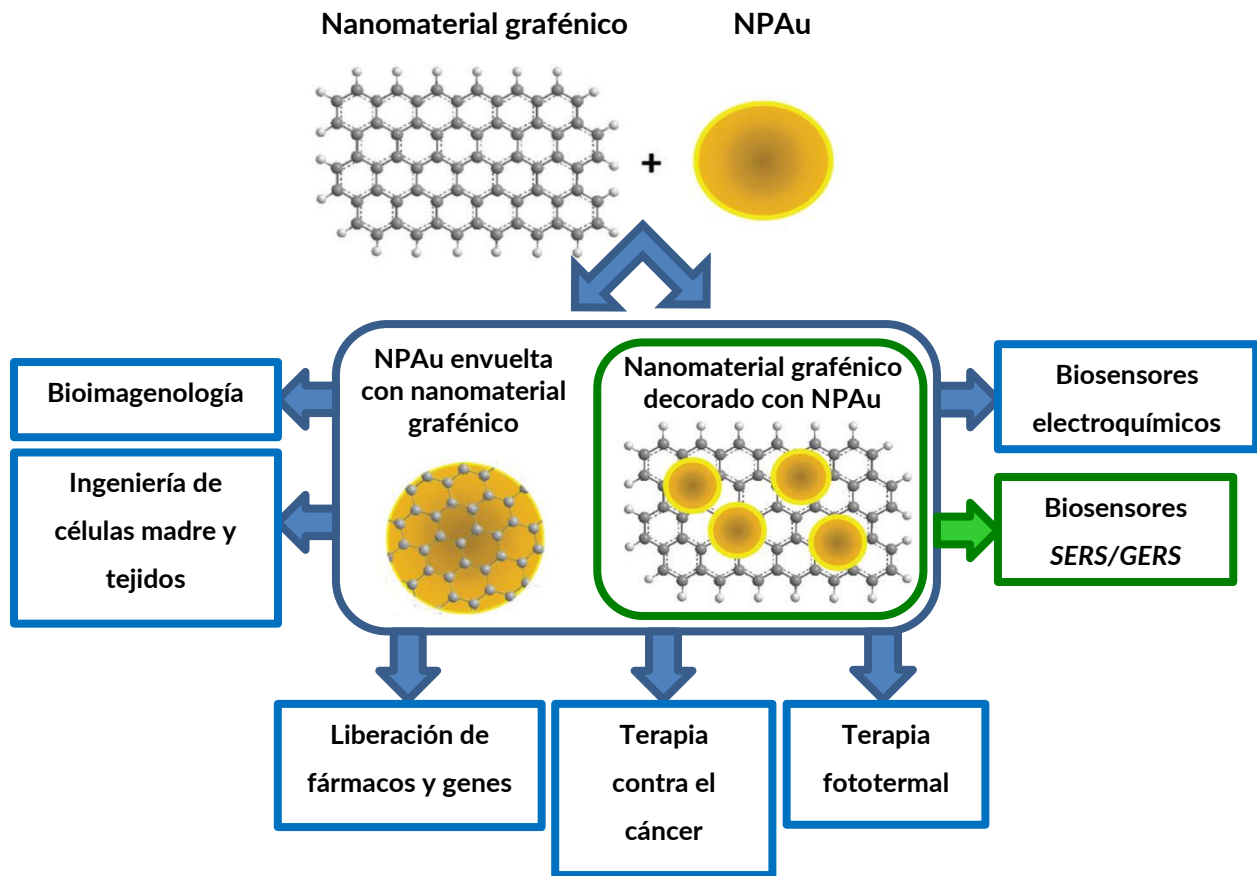


Figura 14. Aplicaciones biológicas de los nanomateriales híbridos de sustratos grafénicos y NPAu. Existen 2 tipos de estos nanocompuestos: nanomateriales grafénicos decorados con NPAu (sintetizados en este trabajo, recuadro verde) y NPAu envueltas con nanomateriales grafénicos. La aplicación para la cual se sintetizaron los nanocompuestos en este proyecto es biosensores *SERS/GERS* (flecha y recuadro verdes)^[76,77]

Múltiples trabajos se han realizado para la síntesis y caracterización de estos nanocompuestos híbridos de sustratos grafénicos y NPAu.^[62,64,78-80] Algunas de estas

publicaciones incluyen el decorado de NPAu sobre rGO por la reducción del ácido cloroáurico y el GO. En 2009, Goncalves^[81] y colaboradores publicaron la síntesis de un nanomaterial de grafeno (ellos lo llamaron grafeno, pero debieron haberlo llamarlo rGO) con NPAu en la superficie como sustrato SERS. Adicionalmente proponen un mecanismo de reacción entre los grupos oxigenados del GO y los cationes Au^{3+} para la nucleación y crecimiento de las NPAu (Figura 15).

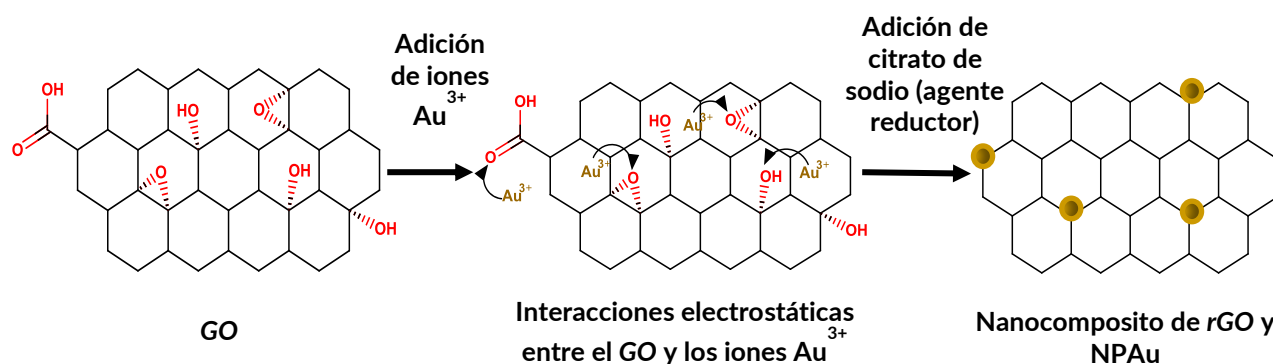


Figura 15. Mecanismo propuesto de formación de NPAu sobre GO. Descripción de la imagen de izquierda a derecha: GO, adición de iones de oro, interacciones electrostáticas entre el GO y Au^{3+} , adición del citrato de sodio (agente reductor) y nanocompuesto de grafeno y NPAu.^[81]

3.5. El ácido carmínico, la espectroscopía SERS, la comida y el arte

El diseño de metodologías sensibles, económicas, reproducibles, sencillas y rápidas para la detección del AC en distintos medios ha sido el objeto de estudio de muchos grupos de investigación. La presencia del AC y sus derivados en abundantes productos de consumo humano ha sido uno de los principales motores de estos trabajos. Por su alto poder de tinción el AC se puede encontrar en muy pequeñas cantidades en los alimentos junto con otros compuestos similares.^[11,13] La técnica más sensible en la actualidad es HPLC,^[82,83] se han encontrado límites de detección por debajo de 1 mg/kg (2×10^{-6} M) usando HPLC con UV-Vis o fluorescencia,^[14] no obstante, es complicada, cara, requiere pretratamiento y grandes cantidades de muestra.^[5,84] Las técnicas espectrofotométricas de detección son las más usadas en la actualidad por ser más sencillas pero no son tan

sensibles ni selectivas. La técnica *SERS* se ha propuesto como una opción con gran sensibilidad, flexibilidad, reproducibilidad y fiabilidad para la detección de colorantes en productos de consumo.^[85] Garrido *et al.* (2019)^[86] proponen un método de detección sensible, rápido y sin pretratamiento de la muestra del AC en dulces (gomitas) a través de la técnica *SERS* empleando dispersiones coloidales de NP de plata (NPAg). En este trabajo se obtuvieron límites de detección de la disolución estándar de AC de hasta 10^{-6} M, sin embargo, el límite de detección más bajo reportado es de 10^{-8} M y fue publicado por Wu y colaboradores en 2017,^[87] con NPAg en forma de flor.

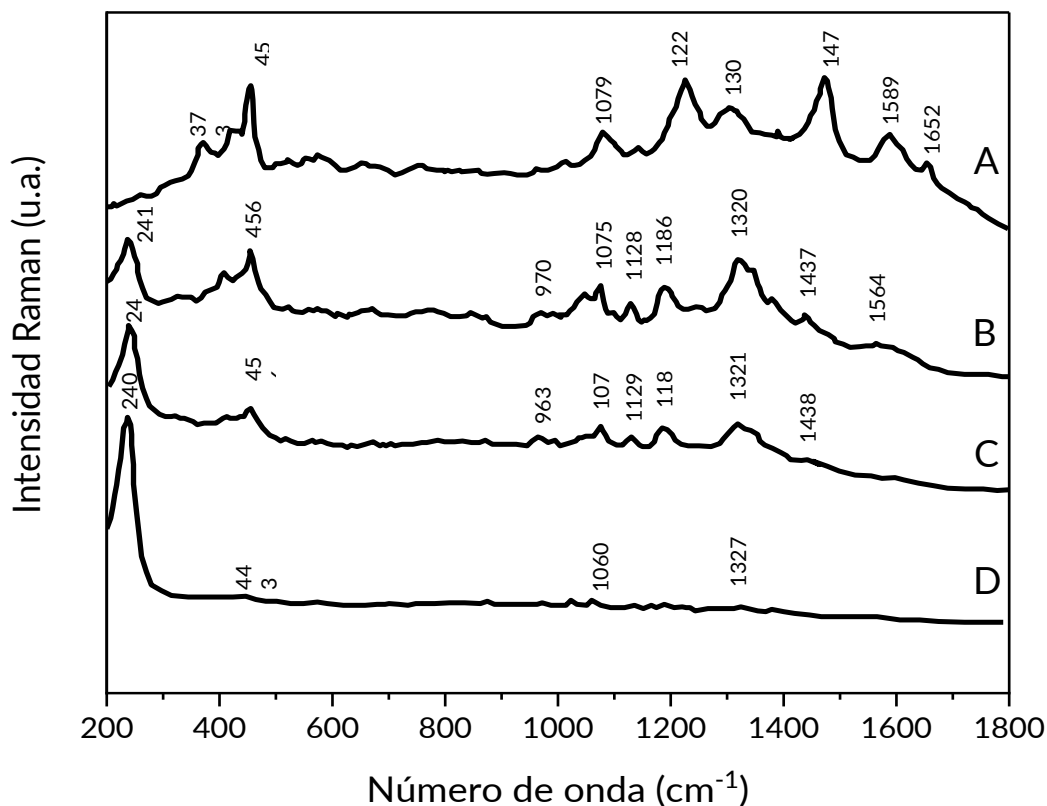


Figura 16. Espectro Raman con un láser de 785 nm de AC en sólido depositado sobre una superficie de cobre (A) y espectros *SERS* con láser de 633 nm del estándar de AC a 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} M (B, C y D), respectivamente.^[86]

No obstante, a causa de la enorme relevancia histórica y cultural de tintes y pinturas que contienen AC como principal fuente de color, la identificación de esta molécula en obras de arte y artefactos arqueológicos es uno de los principales objetivos de los trabajos de

investigación relacionados con el AC. La técnica SERS ha demostrado ser una vía prometedora para lograr este propósito por su alta sensibilidad, la posible identificación de distintos componentes en una mezcla y sobre todo porque es una técnica mínimamente invasiva. La toma de muestras para el análisis de obras de arte de alto valor artístico, cultural y monetario, debe de ser de la menor cantidad posible, en caso de que se permita. Métodos de detección comúnmente utilizados para el análisis de mezclas como el HPLC necesitan tamaños de muestra muy grandes, por lo tanto, su uso en el análisis de pinturas y textiles preservados está limitado.^[88-93]

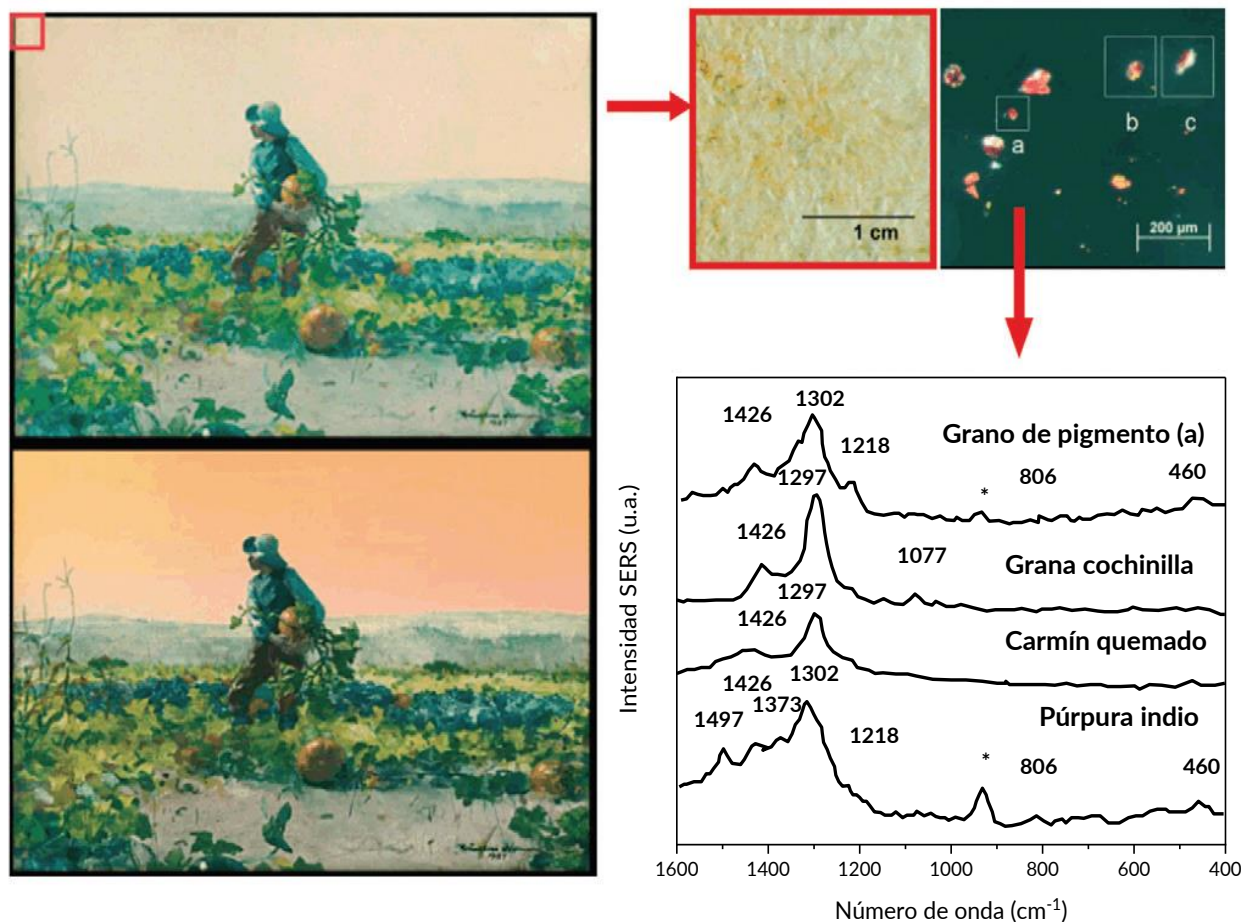


Figura 17. Identificación de un pigmento en la acuarela *For to be a farmer's boy* de Winlow Homer del instituto de arte de Chicago. (a) La pintura como se ve en la actualidad (arriba) y como se veía después de su realización (abajo), (b) pigmentos tomados de la esquina izquierda superior de la pintura y (c) comparación de los espectros SERS con muestras estándar de pigmentos que permiten identificar al púrpura indio como el pigmento más probablemente utilizado por el artista.^[1]

Conocer los materiales y colorantes presentes en obras de arte de manera exacta es muy relevante por el estudio de los pigmentos y la elucidación de la tecnología detrás de la producción del trabajo artístico, además, los colorantes pueden servir como marcadores cronológicos y geográficos para el trazado de rutas de comercio e intercambio cultural entre diferentes comunidades. Por ejemplo, distinguir entre la grana cochinilla y el quermes, ambos componentes principales en pinturas rojas, puede fungir como una herramienta clave en la identificación de falsificaciones, ya que la cochinilla desplazó al quermes como la pintura roja más utilizada en Europa hasta después del siglo XVI.^[6] Sin embargo, la determinación de políticas y procedimientos de conservación apropiados, parece ser la razón más relevante.^[94]

Además la grana cochinilla representa una parte primordial de la historia y tradición mexicana, siendo uno de los principales, más famosos y utilizados colorantes en la cultura prehispánica. Un artículo de Edgar Casanova-González del departamento de física experimental del Instituto de Física de la UNAM y colaboradores, publicado en 2012, muestra la caracterización con la técnica *SERS* de colorantes mexicanos como cochinilla, achiote, muitle, zacatlaxcalli, palo de brasil y cempazuchitl.^[94]

En la gran mayoría de los trabajos para la detección vía *SERS* de colorantes se utilizan dispersiones coloidales de NPAg, sin embargo, no se ha realizado ningún trabajo de detección de estos colorantes con sustratos grafénicos ni nanocompositos híbridos de grafeno, GO o rGO y NPM.

4. Planteamiento del problema

Desde las civilizaciones mesoamericanas hasta el resto del mundo a partir del siglo XVI, el uso del ácido carmínico continúa como la principal fuente de color en infinidad de tintes y pinturas, gracias al intenso color rojo del carmín. La identificación de este y otros pigmentos naturales en obras de arte y artefactos arqueológicos es fundamental para la implementación de políticas y procedimientos de conservación apropiados para cada pieza. Debido al alto valor artístico, cultural y monetario de las obras de arte y artefactos arqueológicos, que se pretende analizar, existen múltiples restricciones para la toma de muestras. Además, la producción de pinturas involucra la mezcla de muchas sustancias, por lo tanto, el AC se encuentra en matrices complejas, lo cual dificulta su análisis. Por estas razones es importante establecer un método de detección que sea sensible, selectivo, reproducible, sencillo, económico, rápido y mínimamente invasivo, para determinar cuantitativamente la presencia del AC.

En numerosos trabajos de investigación se ha concluido que la técnica *SERS*, es una opción prometedora para la estimación sensible y selectiva de la concentración de biomoléculas, debido a los altos factores de amplificación de las señales Raman que se pueden alcanzar. La última búsqueda realizada el 16 de noviembre de 2019 en *Google Scholar* de las palabras: *Surface enhanced Raman Spectroscopy*, arrojó aproximadamente 2060000 resultados. Sobre la misma línea de investigación se han publicado varios artículos científicos donde se pretende realizar la amplificación de las señales Raman del AC utilizando sustratos de NPM, principalmente Ag y Au. No obstante, los sustratos *SERS* de NPM probados no han sido capaces de apagar la fluorescencia ni amplificar las señales *SERS* del AC con la misma eficiencia que para otros colorantes, y se ha propuesto que se debe a una débil adsorción del AC sobre la superficie de las nanopartículas.

Este efecto no es exclusivo de las NPM, se ha observado que el grafeno y sus derivados también son capaces de apagar la fluorescencia y amplificar las señales Raman de moléculas orgánicas (efecto *GERS*). Aunque los factores de amplificación calculados para estos nanomateriales son menores a los de las NPM, se ha informado que los

nanocompositos que contienen sustratos grafénicos y NPM, exhiben múltiples ventajas comparados con los nanomateriales por separado. Por ejemplo: mayor estabilidad en dispersión acuosa, mayor área superficial, mayor eficiencia en la adsorción de moléculas aromáticas, mayor amplificación *SERS*, mejor apagamiento de la fluorescencia, mejores propiedades electroquímicas y actividad catalítica superior. Sin embargo, a la fecha no se ha realizado ningún trabajo de detección del AC con sustratos grafénicos ni nanocompositos de grafeno, GO o rGO, y NPM.

Por lo tanto, es probable que sustratos *SERS* de nanomateriales híbridos, compuestos de rGO y NPAu, puedan adsorber el AC, apagar su fluorescencia y amplificar sus señales Raman, más eficientemente que las NPAu y los sustratos grafénicos por separado.

5. Objetivos

5.1. Objetivos Generales

- Obtener los espectros Raman (láser de $\lambda = 532$ nm) del AC adsorbido sobre sustratos grafénicos (grafeno, GO y rGO) y nanocompositos de rGO con NPAu (rGONP), por primera vez.
- Realizar el seguimiento del apagamiento de la fluorescencia del AC en disolución acuosa, con concentración constante y valor de pH = 4, al aumentar paulatinamente la concentración de los sustratos (GO, rGO y rGONP) en dispersión.
- Con base en los resultados, determinar cuál de los sustratos nanoestructurados provoca la máxima amplificación de las señales Raman y el apagamiento más eficiente de la fluorescencia del AC. Además, realizar un análisis de la interacción del AC y dichos sustratos.

5.2. Objetivos Particulares

- Sintetizar y caracterizar rGO, a partir de la reducción de GO en dispersión con citrato de sodio tribásico como agente reductor. Utilizar dos proporciones de masa distintas de GO y citrato, 1:12 y 1:20.
- Reducir el GO y sintetizar NPAu sobre la superficie del rGO en una sola reacción en medio acuoso, empleando dos relaciones de masa distintas de GO y citrato de sodio, 1:12 y 1:20, y caracterizar ambos productos.
- Caracterizar el AC mediante las siguiente técnicas: absorción electrónica UV-Vis-NIR, emisión Vis-NIR, excitación UV-Vis, mapas 3D de fluorescencia, titulación volumétrica ácido-base, FTIR-ATR y Raman.
- Registrar la influencia del pH en la absorción electrónica y fluorescencia del ácido carmínico en disolución.

- Encontrar una metodología para dispersar óptimamente el GO en agua con una concentración final igual a 1 mg/mL, por medio de la sonicación del GO en polvo durante 1 hora.
- Separar y caracterizar 3 fracciones de distintos tamaños laterales de GO, a través del tratamiento de una dispersión acuosa de GO mediante ciclos centrifugación consecutivos a distintas velocidades.
- Caracterizar los diferentes sustratos grafénicos e híbridos mediante las siguientes técnicas: absorción electrónica UV-Vis-NIR, emisión Vis-NIR, mapas 3D de fluorescencia, DLS, potencial Zeta, FTIR-ATR y Raman.

6. Desarrollo Experimental

Para la realización de este proyecto se utilizaron los reactivos, materiales, técnicas de caracterización, equipos y métodos, descritos a continuación.

6.1. Reactivos y materiales

Los siguientes reactivos y materiales fueron empleados sin ningún tratamiento previo, con excepción del GO en polvo y las obleas de Si. En el caso del GO se realizó la dispersión en agua desionizada y la separación de tamaños por centrifugación de la dispersión (ambas metodologías se encuentran descritas en las secciones 6.3 y 6.4, con información adicional en el Anexo I). Además, las obleas de silicio fueron tratadas con disolución piraña (H_2SO_4/H_2O_2 ; Anexo III).

Cabe mencionar que, además de las técnicas de caracterización que se realizaron en este trabajo, el mismo lote de GO comprado a *Graphenea* ha sido utilizado y caracterizado previamente por otros miembros del grupo de investigación mediante las siguientes técnicas: XPS, RMN ^{13}C , SEM y AFM. En todos los casos, los resultados obtenidos han coincidido con los datos que comparte el proveedor y lo informado sobre el GO en la literatura.

Tabla 1. Reactivos utilizados durante la sección experimental del proyecto de investigación. Los datos del tamaño de partícula del GO en polvo fueron tomados por difracción láser, el proveedor reporta que la mayoría de las obleas poseen un tamaño aproximado de 15 μm y los datos del GO en dispersión fueron medidos por microscopía SEM.

Compuesto	Marca	Especificaciones
Ácido carmínico ($\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{13}$)	<i>Sigma-Aldrich</i>	492.39 g/mol
Ácido clorhídrico	<i>Sigma-Aldrich</i>	37 %
Ácido cloroáurico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	<i>Sigma-Aldrich</i>	≥ 99.95 %
Ácido sulfúrico grado técnico	<i>Meyer</i>	52-100 %
Citrato de sodio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	<i>Sigma-Aldrich</i>	≥ 99.0 % 204.10 g/mol
Grafeno sobre SiO_2/Si	<i>Graphenea</i>	Monocapa de grafeno 10 mm x 10 mm
Hidróxido de sodio anhidro	<i>Sigma-Aldrich</i>	≥ 98.0 %
Oblea de silicio (Si)	<i>University Wafer</i>	Tipo: N D = 7.62 cm
GO en polvo	<i>Graphenea</i>	Tamaño de partículas: D90: 25-28 μm D50: 13-15 μm D10: 6-7 μm AE: C: 49-56%; H: 0-1%; N: 0-1%; S: 2-4%; O: 41-50%
GO en dispersión	<i>Graphenea</i>	Concentración: 4 mg/mL Tamaño de partículas: < 10 μm AE: C: 49-56%; H: 1-2%; N: 0-1%; S: 2-4%; O: 41-50%
Peróxido de hidrógeno	<i>Meyer</i>	29-32 %

6.2. Técnicas de caracterización

Las técnicas de caracterización que se utilizaron están listadas a continuación.

Tabla 2. Técnicas de caracterización, equipos y sus especificaciones.

Técnica	Equipo	Especificaciones
Absorción UV-Vis-NIR	<i>CARY 5000 UV-Vis-NIR Spectrophotometer, Agilent Technologies®</i>	Intervalo de 200 – 800 nm Celda de cuarzo Paso óptico (l) = 1 cm
Fluorescencia	<i>Fluorolog FL3-22, Horiba</i>	Intervalo de excitación: 220-600 nm Intervalo de emisión: 290-850 nm Filtros de 370 nm y 399 nm <i>Slit</i> : 5-10 nm
FTIR-ATR	<i>Nicolet iS50 FTIR Spectrometer</i>	Punta de diamante Intervalo: 10-25 000 cm ⁻¹ Resolución óptica: 0.09 cm ⁻¹
Microscopía óptica	<i>Microscopio Carl Zeiss</i>	Campo claro y campo oscuro Objetivos: 10X, 20X, 50X y 100X
pH	<i>pHmetro Bench 700 Series, Eutech Instruments, OAKTON. Electrodo InLab® Micro, Mettler Toledo</i>	pH: 0-14 T: 0-80 °C Puntos de calibración: 4.01, 7.00 y 10.01
Potencial Zeta y DLS	<i>Zetasizer Nano Series, Malvern Instruments</i>	<i>DLS</i> Intervalo de tamaño: 5 – 1000 nm

Espectroscopía Raman	Micro-Raman confocal <i>alpha300 Series Raman-AFM,</i> WITec	Láser de 532 nm Potencia: 0.26 μ W – 44.9 mW Objetivo 100x
---------------------------------	--	--

La preparación de las muestras fue muy similar para todas las técnicas de caracterización que se realizaron en dispersión o disolución acuosa: absorción electrónica en la región UV-Vis-NIR, emisión en la región Vis-NIR, excitación en la región UV-Vis, mapas de fluorescencia 3D, potencial Zeta y *DLS* (por sus siglas en inglés, *Dynamic Light Scattering*). Se utilizó agua desionizada a diferentes concentraciones de la sustancia y distintos valores de pH, dependiendo de la técnica y el analito. Todas las dispersiones se introdujeron durante 5 minutos en el baño ultrasónico antes de realizar cualquier medición de la muestra, con el objetivo de eliminar los posibles aglomerados formados durante su almacenamiento.

El potencial Zeta y el tamaño de partícula vía *DLS*, se midieron en dispersión en el equipo *Zetasizer Nano Series, Malvern Instruments*, para ambas técnicas se observó que se obtenían los mejores resultados a concentraciones de ~30 ppm de los sustratos, por lo tanto, todas las mediciones de esas técnicas de caracterización se realizaron a esa concentración. En el caso del potencial Zeta se fijó el valor del pH de la dispersión a 6, porque la carga superficial de estos nanomateriales es dependiente del pH y a menores valores de pH las dispersiones de *rGO* se precipitan a causa de la disminución de grupos oxigenados en la superficie de las hojuelas, lo cual reduce la calidad de los resultados. Para la medición del tamaño de partícula, no se modificó el pH de las dispersiones, ya que al fijar el valor del pH, también se contamina la dispersión con partículas suspendidas en el aire que afectan las mediciones. Además, con el fin de prevenir la presencia de partículas contaminantes más grandes suspendidas en las muestras, las dispersiones permanecieron en los viales cerrados y sin agitación durante al menos 30 minutos previos a la toma de la alícuota (de 1 mL aproximadamente) que se introdujo en la celda de plástico para *DLS*. La alícuota se tomó cuidadosamente con una pipeta Beral de la parte más alta de la dispersión, evitando los precipitados.

Las muestras de *FTIR-ATR* se tomaron en polvo o se centrifugaron las dispersiones de los sustratos 3 veces a 21000 rpm durante 20 minutos para concentrar los materiales en el fondo del microtubo, después de cada centrifugación se retiró el sobrenadante y se agregó más de la dispersión original. La pasta resultante al fondo del tubo *Eppendorf* se colocó sobre papel aluminio, previamente limpiado con isopropanol y se metió en el desecador hasta que se evaporó el agua por completo, no se aplicó calor.

La preparación de las muestras para la espectroscopía Raman se encuentra descrita en la sección 6.7.

El baño ultrasónico utilizado es un modelo M1800, de la marca *Branson*, EUA, con frecuencia de 40 kHz y voltaje de 120 V. La centrifugación de las dispersiones se realizó en una centrífuga de alta velocidad (hasta 30000 rpm) modelo Z 36 HK, *HERMLE*, Alemania, con capacidad para 12 tubos *Eppendorf* de 1.5 ó 2 mL, cada uno, 18 ó 24 mL por ciclo, respectivamente. La centrífuga se programó con las siguientes condiciones para todos los ciclos: aceleración de 5 y temperatura igual a 20 °C.

6.3. Dispersión acuosa del GO

Como ya se ha mencionado, la sonicación es la vía más utilizada para la dispersión del GO en agua, sin embargo, el tiempo y la frecuencia de la sonicación, entre otras cosas, alteran el tamaño y grado de oxidación de las obleas de GO. Con base en el protocolo de sonicación para la exfoliación del GO que actualmente se utiliza en el grupo de investigación, la revisión bibliográfica realizada y los resultados experimentales, se determinó que la dispersión óptima del GO en agua con una concentración de 1 mg/mL se logra de la siguiente manera:

- Pesar 10 mg de GO en polvo en una balanza analítica.
- Mezclar el GO en polvo con aproximadamente 7 mL de agua desionizada en un vaso de precipitados de 10 mL y agitar durante 20 minutos.
- Trasvasar la mezcla y diluir hasta el aforo en un matraz volumétrico de 10 mL.
- Trasvasar la suspensión de GO a un matraz bola de 25 mL.*

- Introducir el matraz dentro del baño sónico y sonicar durante una hora continua. El tiempo de sonicación óptimo es de 1 hora y este valor permaneció constante. Antes de empezar a sonicar verificar que el líquido dentro del matraz de bola quedara entre 1 y 2 cm por debajo del volumen del agua desionizada en el baño ultrasónico.

*Se observaron cambios significativos en la homogeneidad de las dispersiones al cambiar el recipiente en el cual se sonicaba. Se determinó que el mejor recipiente para sonicar la mezcla de GO y agua es el matraz de bola, porque los recipientes con una superficie curva concentran la energía ultrasónica en el centro de la dispersión.^[95]

Las dispersiones de GO, 1 mg/mL, se diluyeron para realizar curvas de calibración con concentraciones desde 0.01 mg/mL (10 ppm), hasta 0.1 mg/mL (100 ppm). Se emplearon 2 indicadores para saber el estado de las dispersiones de GO, el primero fue la intensidad del máximo de absorción del GO, a 230 nm, con respecto a la concentración. El segundo fue el porcentaje en masa de GO presente en la fracción GOPG, debido a que los aglomerados de las láminas no se encuentran en dispersión y se quedan en el precipitado después de la centrifugación, mientras que las monoláminas tienen más probabilidades de permanecer en el sobrenadante. Se midieron los espectros de absorción de dispersiones con diferentes concentraciones de GO preparadas a partir de la dispersión de 4 mg/mL del mismo proveedor y se compararon con los resultados de las dispersiones preparadas con el polvo de GO. Todas las dispersiones fueron sonicadas de nuevo durante 5 minutos previo a la medición de la absorción.

Este procedimiento no es escalable, porque el aumento en la cantidad del GO y el volumen de agua, disminuyen el porcentaje de GO propiamente exfoliado dentro de la dispersión. De hecho, cualquier cambio a la metodología ocasiona la pérdida de la reproducibilidad de la caracterización del GO y la repetibilidad de los porcentajes en masa obtenidos en cada fracción después de la centrifugación. Si se desean conocer más detalles sobre la forma en la que se diseñó esta metodología, consultar el Anexo I.

La caracterización del GO sonicado se realizó a través de las técnicas de potencial Zeta, DLS, microscopía óptica, absorción electrónica UV-Vis-NIR, emisión Vis-NIR, mapas 3D de fluorescencia, FTIR-ATR y Raman.

6.4. Metodología de separación del GO por tamaños

La distribución de tamaños de las obleas del GO es muy grande y la diferencia de tamaños de estas obleas tiene una fuerte influencia en las propiedades físicas y químicas del GO, es decir, la relación C:O, la dispersabilidad, el potencial Zeta, entre otras. Se ha publicado que el sonicado del óxido de grafeno en polvo, para la exfoliación de las láminas individuales provoca la fragmentación de las mismas a partir de los 2 minutos de sonicado.^[20] Por lo tanto, el tamaño de las láminas también depende de la metodología de dispersión y los datos de tamaño que comparte el proveedor del GO, no son representativos. El control en el tamaño de las obleas de GO presentes en la dispersión, así como la disminución del intervalo de tamaños es de suma importancia para poder optimizar las diferentes propiedades del GO, dependiendo de la aplicación para la cual se pretende usar.

Por lo tanto, se desarrolló una metodología para la separación de 3 fracciones de distintos tamaños del GO utilizando la centrifuga. Dispersiones de GO con concentraciones iniciales de 1000 y 500 ppm fueron centrifugadas durante 15 minutos a 10000 rpm, 1 mL del sobrenadante (GOPP) de cada tubo *Eppendorf*, 12 mL por ciclo, fue separado con micropipeta (capacidad de 100 a 1000 μ L) y se guardó para su caracterización. Cada tubo se rellenó con 1 mL de agua desionizada y el precipitado se redispersó, agitando y sonicando durante 5 minutos. El GO redispersado se centrifugó de nuevo, pero ahora con una velocidad menor, de 8000 rpm, durante 15 minutos. Luego de la segunda centrifugación se extrajo 1 mL del sobrenadante (GOPM) de cada tubo, 12 mL por ciclo, y el precipitado se redispersó nuevamente (GOPG). Las 3 fracciones se almacenaron para su caracterización. Dado que en la primera centrifugación se eliminan las obleas más pequeñas dispersas en el sobrenadante, mientras que después de la segunda centrifugación se eliminan las obleas más grandes y los aglomerados en el

precipitado, la dispersión de GOPM se usó para la síntesis de los demás sustratos grafénicos. Esto permite tener un mayor control sobre el tamaño del GO que se va a utilizar, además de una dispersión más estable. Para aumentar la cantidad de materia que obtenía de la fracción de GOPM se aumentó el volumen extraído del segundo sobrenadante de 1 a 1.5 mL de los tubos *Eppendorf* de 2 mL.

La metodología exacta que se utilizó para tener los mejores rendimientos y por lo tanto, el pretratamiento de las dispersiones de GOPM, que después se emplearon en la reducción y decorado con NPAu, está descrita en la Figura 18. Más detalles sobre el diseño de la presente metodología se pueden encontrar en el Anexo I.

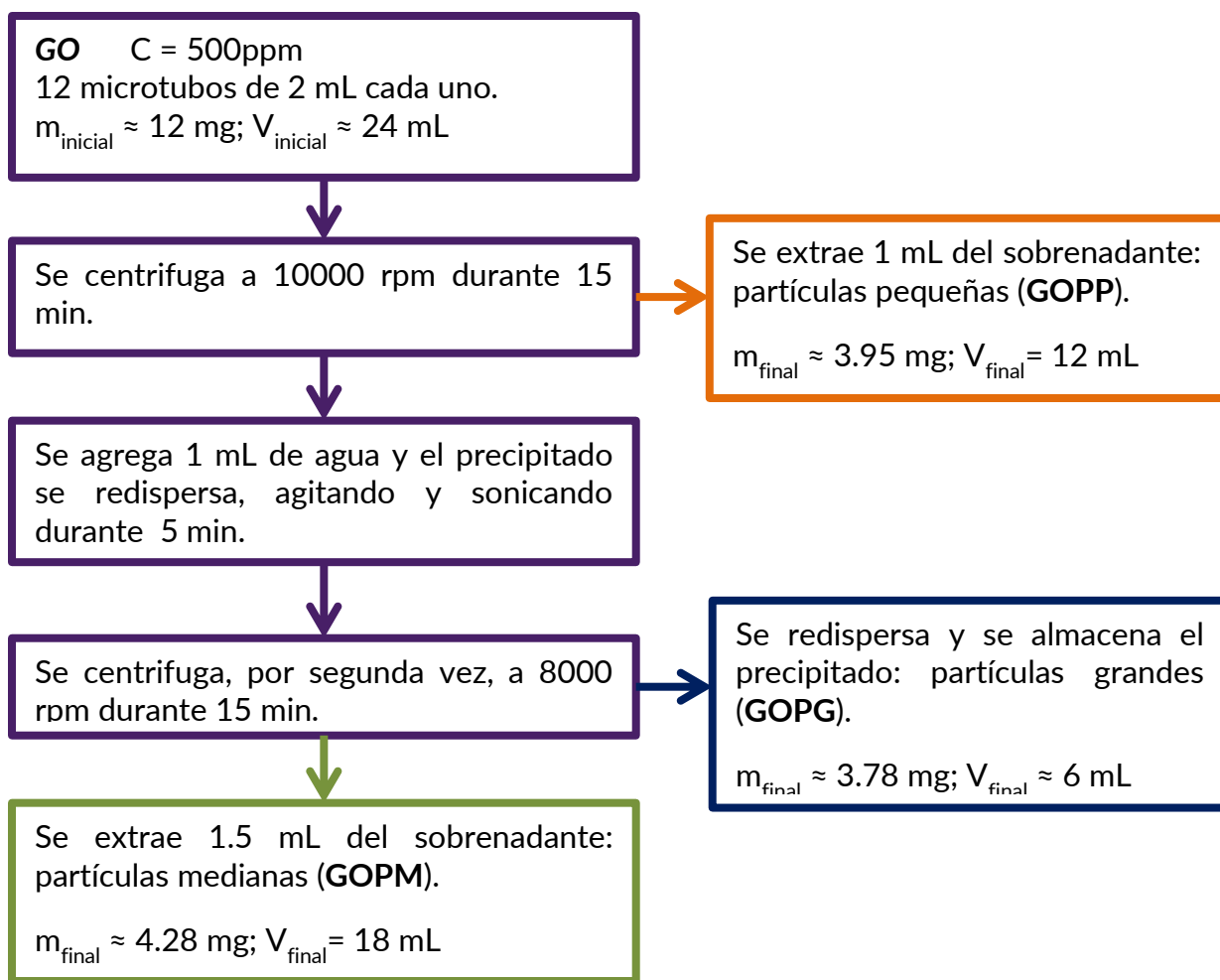


Figura 18. Diagrama de flujo de la metodología para la separación por tamaños de las obleas de GO por medio de la centrifugación de una dispersión de concentración 500 ppm. El GOPM se va a distinguir por el color verde olivo, GOPP por el color naranja y GOPG por el color azul marino.

La caracterización de las 3 fracciones se llevó a cabo a través de las técnicas de potencial Zeta, DLS, microscopía óptica, absorción electrónica UV-Vis-NIR, emisión Vis-NIR, mapas 3D de fluorescencia, FTIR-ATR y Raman.

6.5. Reducción del GO y síntesis de NPAu sobre rGO

La reducción del óxido de grafeno y el decorado del rGO con nanopartículas de oro se realizó con base en la metodología de otro miembro del grupo de investigación, Emmanuel de la O Cuevas.^[96] Este protocolo, a su vez, está basado en una publicación de Zhang *et al.* (2011),^[64] donde se presenta la reducción del GO y la síntesis de las NPAu en el rGO a 1, 2 y 3 horas, con una proporción en masa de 1:12 de GO y citrato de sodio, respectivamente. Las cantidades exactas que se publicaron en ambos trabajos se emplearon en la síntesis del rGO (rGO12) y del rGO con NPAu (rGONP12). Se agregó el número 12 a la clave, debido a la proporción en masa 1:12 de GO y citrato de sodio, respectivamente. Adicionalmente, en este proyecto se modificó la metodología con el objetivo de incrementar el grado de reducción, la proporción en masa del GO y el citrato de sodio se aumentó a 1:20 para la síntesis del rGO (rGO20) y del rGO con NPAu (rGONP20). Cada una de las reacciones se realizó por duplicado. Las cantidades que se usaron de cada reactivo en las 4 reacciones se encuentran en la Tabla 3.

Adicionalmente, se sintetizaron NPAu en dispersión por el mismo método, simplemente se omitió la adición del GO y se mantuvo la mezcla de reacción a reflujo durante 30 minutos. Se utilizaron 60 mg de citrato de sodio tribásico en 50 mL de agua desionizada y se agregaron 200 μ L de la disolución de al 1 % del ácido cloroáurico al empezar el reflujo. Sin embargo, solamente se realizó la caracterización de estas NPAu por absorción electrónica UV-Vis-NIR, donde se observa la señal de la absorción del plasmón superficial de las NPAu. Estas muestras se emplearon, sin ningún otro tratamiento, exclusivamente como sustratos SERS para comparar los resultados de los sustratos grafénicos y los nanocompositos.

Tabla 3. Materiales y reactivos empleados para la reducción del GO y la síntesis de NPAu sobre rGO. El ácido cloroáurico solamente se utilizó para la síntesis de NPAu.

Reactivos	Cantidad	
	rGO12/rGONP12*	rGO20/rGONP20*
GO en dispersión	50 mL C = 0.1 mg/mL o 100 ppm (5 mg)	25 mL C = 0.05 mg/mL o 50 ppm (1.25 mg)
Citrato de sodio (NaC ₆ H ₅ O ₇)	60 mg	25 mg
Ácido cloroáurico (HAuCl ₄)*	200 µL de una disolución acuosa al 1% (m/m)	50 µL de una disolución acuosa al 1% (m/m)

*Solamente se utilizó para la síntesis de las NPAu sobre la superficie del rGO.

El citrato de sodio es el agente reductor, este cumple tres propósitos, además de la reducción, sirve para incrementar la dispersibilidad del rGO y controlar el crecimiento y forma de las NPAu. El sistema de reflujo permite mantener la reacción a una temperatura de 96-97 °C constantemente durante tiempo prolongado sin el riesgo de perder el disolvente (agua desionizada) por evaporación (Figura 19).

A continuación se muestran los pasos que se siguieron para la reducción de rGO12:

- 1.- Se depositaron 60 mg de citrato de sodio en el matraz bola de 100 mL.
- 2.- Se agregaron 50 mL de GOPM, concentración de 0.1 mg/mL, al matraz (5 mg).
- 3.- Se llevó la dispersión a reflujo (con agitación constante) y se mantuvo así por 3 horas. Para calentar el matraz se utilizó una canastilla de calentamiento conectada a un reóstato al 60%.*
- 4.- Se dejó enfriar la dispersión a temperatura ambiente (25 °C).
- 5.- Se realizaron 3 lavados con agua desionizada, para los lavados se utilizó la centrifuga. Las condiciones de los ciclos de lavado cambian dependiendo del producto de la reacción, ya que la dispersabilidad es diferente. Para el rGO12, las condiciones óptimas

de lavados fueron: 22 000 rpm durante 15 minutos; y para el rGONP12: 18 000 rpm durante 12 minutos. En ambos casos a $T = 20^{\circ}\text{C}$ y aceleración de 5.

*Para preparar el decorado del rGONP12, pasadas 2.5 horas del reflujo se agregan 200 μL de HAuCl_4 al 1% en agua con una micropipeta de 100 a 1000 μL y se deja el sistema a reflujo por 30 minutos más.

Figura 19. Montaje del sistema de reflujo. En el caso de rGONP12 y rGONP20, se retiró el termómetro para adicionar la disolución de HAuCl_4 con micropipeta y se volvió a colocar. Se retiraron las mangueras del refrigerante para la foto.



Adicionalmente, se presentan los pasos que se siguieron para la reducción de rGO20:

- 1.- Se colocaron 25 mg de citrato de sodio en el matraz bola de 50 mL.
- 2.- Se agregaron 25 mL de GOPM, concentración de 0.05 mg/mL, al matraz (1.25 mg).
- 3.- Se llevó la dispersión a reflujo (con agitación constante) y se mantuvo así por 3 horas. Para calentar el matraz se utilizó una canastilla de calentamiento conectada a un reóstato al 60%.*
- 4.- Se permitió enfriar la dispersión a temperatura ambiente (25°C).

5.- Se realizaron 3 lavados con agua desionizada. Para el rGO20, las condiciones óptimas de lavados fueron: 16 000 rpm durante 15 minutos; y para el rGONP20: 15 000 rpm durante 15 minutos. En ambos casos a $T = 20^{\circ}\text{C}$ y aceleración de 5.

*Para preparar el decorado del rGONP20, pasadas 2.5 horas del reflujo se agregan $50\ \mu\text{L}$ de HAuCl_4 al 1% en agua con una micropipeta de 10 a $100\ \mu\text{L}$ y se deja el sistema a reflujo por 30 minutos más.

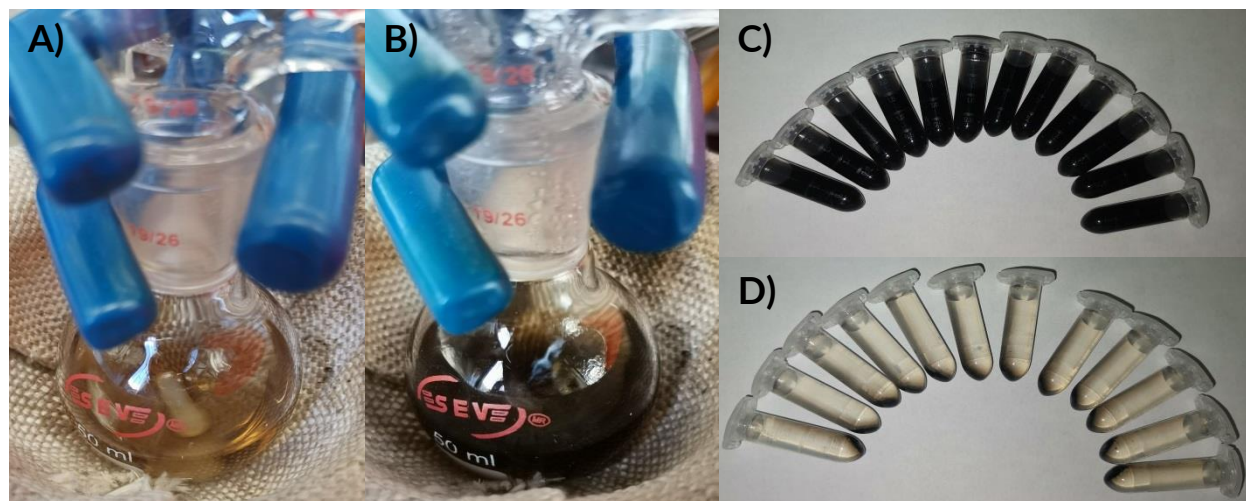


Figura 20. 25 mL de GO, $0.05\ \text{mg/mL}$, con 25 mg de citrato de sodio, antes de la reacción (A) y rGO20 después de 3 horas a reflujo (B). rGONP12 antes del primer lavado (C) y después de la centrifugación (D).

Se notó un cambio de coloración de café a negro luego de las 4 reacciones, típico en la reducción del GO. Además, durante los lavados se vio que el rGO no se precipitaba totalmente después de la centrifugación, el sobrenadante tenía un color café claro aún con las velocidades más altas, sin embargo, el rGONP si se concentraba en el fondo de los tubos *Eppendorf*. Lo que puede ser a causa del peso adicional de las NPAu sobre las obleas del rGO (Figura 20). Se notó durante los lavados que a velocidades de centrifugación mayores a 20000 rpm, el fondo de los microtubos de plástico se rayaba, en esos casos, se optó por desechar los tubos *Eppendorf* para evitar que se rompieran durante otro ciclo de centrifugación y la contaminación de la muestra con partículas de plástico de los mismos microtubos. La concentración de las dispersiones obtenidas de

los *rGO* y *rGONP*, se estimó midiendo por sextuplicado la masa en la balanza analítica de cada sustrato, después de la evaporación de 1 mL de la dispersión sobre papel aluminio en la parrilla de calentamiento a ~ 60 °C.

6.6. Apagamiento de la fluorescencia del AC

Para registrar el apagamiento de la fluorescencia del AC por el GOPM, *rGO12* y *rGONP12*, se siguió un protocolo adaptado de Li *et al.* (2012),^[63] que va aumentando la concentración del sustrato de 5 en 5 ppm, mientras se mantiene la concentración del AC y el volumen final de la disolución constante. La baja fluorescencia del *rGO12* y el *rGONP12*, frente a la intensa emisión del *rGO20* y el *rGONP20*, los convierte en mejores candidatos para el apagamiento de la fluorescencia del AC (sección 7.2.5). A razón de la influencia observada del pH en las propiedades ópticas del AC y del GO, fue muy importante fijar el pH a 4 en todas las muestras, a causa de que una disolución de AC a este valor de pH, presenta la fluorescencia más intensa. Si se quiere consultar la curva de titulación ácido-base del ácido carmínico y la influencia del pH en la absorción electrónica y emisión del AC, se puede consultar la sección 7.3., y para conocer el procedimiento experimental realizado para la obtención de esos resultados, consultar el Anexo II.

Se preparó una disolución de 10 mL de AC con concentración de 10^{-5} M y se fijó el valor del pH a 4 con una disolución 0.01 M de HCl. También se realizó una dispersión del adsorbente a concentración de ~ 60 ppm y se fijó el valor del pH a 4 con la misma disolución de HCl. Se prepararon las dispersiones en orden creciente de la concentración del sustrato grafénico, de 0 a ~ 30 ppm, para esto se fue aumentando el volumen agregado de la dispersión y se redujo el volumen del agua desionizada paulatinamente. El volumen final de las dispersiones se mantuvo constante en 2 mL. No se le realizó ningún tratamiento al agua desionizada antes de utilizarse. La concentración final del AC fue de 5×10^{-6} M, esta concentración se determinó para evitar el efecto del apagamiento de la fluorescencia por la reabsorción de la emisión de la misma molécula a mayores concentraciones de AC y la formación de dímeros de AC no fluorescentes (Anexo II).

Tabla 4. Volúmenes agregados de la disolución 10^{-5} M de AC, agua desionizada y dispersión del sustrato ~60 ppm. Volumen final de 2 mL.

	AC 10^{-5} M (μ L)	H ₂ O (μ L)	Sustrato ~60 ppm (μ L)	Concentración final del sustrato (ppm)
A	1000	1000	0	0
B	1000	833	167	~5
C	1000	666	334	~10
D	1000	500	500	~15
E	1000	333	667	~20
F	1000	166	834	~25
G	1000	0	1000	~30
H	0	1000	1000	~30

Otras consideraciones importantes fueron:

Todas las dispersiones del sustrato se sonicaron 5 minutos antes de utilizarse.

El orden de adición siempre fue: AC \rightarrow H₂O \rightarrow GOPM, rGO12 ó rGONP12.

Se utilizó la misma micropipeta de 100 a 1000 μ L para todas las adiciones.

Las mezclas se dejaron agitando durante 5 minutos antes de las mediciones.

Se registró el pH final de las mezclas durante la agitación.

Se realizaron las mediciones de la fluorescencia (espectros de emisión y mapas de fluorescencia 3D) inmediatamente después de la agitación de las mezclas.

Se empleó un filtro óptico de 399 nm y las condiciones del *Fluorolog FL3-22*, Horiba, permanecieron constantes para todas las muestras. Mapa de fluorescencia 3D: λ_{exc} = 260 – 540 nm con *slit* = 10 nm e incremento = 6 nm, y λ_{em} = 495 – 750 nm con *slit* = 10 nm e incremento = 5 nm. Espectros de emisión 2D: λ_{exc} = 275 nm con *slit* = 10 nm y λ_{em} = 450 – 750 nm con *slit* = 10 nm e incremento = 1 nm.

6.7. Depósito de los sustratos y el ácido carmínico sobre obleas de Si para la espectroscopía Raman

Para las mediciones Raman se utilizaron obleas de SiO₂/Si cortadas en pedazos de aproximadamente 10 mm x 10 mm con una punta de diamante. Con el objetivo de aumentar las propiedades hidrofílicas de la superficie de las obleas se realizó un tratamiento y limpieza con disolución piraña (H₂SO₄/H₂O₂), descrito en el Anexo III, para oxidar ligeramente la superficie del Si y fabricar una delgada película de SiO₂. El silicio es un sustrato muy utilizado en espectroscopía Raman por su alta reflexión de la luz, además sirve como referencia, porque tiene una señal intensa en el espectro alrededor 521 cm⁻¹.

Los depósitos que mostraron mejores resultados fueron elaborados por el secado de 2 gotas de 10 μL, la primera gota siempre fue la del sustrato (GOPM, rGO12, rGONP12, rGO20 y rGONP20) con diferentes concentraciones de ~10 a ~100 ppm, se colocó con una micropipeta de 0.1 a 20 μL y se introdujo en un desecador por lo menos durante 24 horas. Luego se depositó una segunda gota (10 μL) de una disolución de ácido carmínico con concentraciones entre 10⁻⁴ y 10⁻⁶ M y se colocó de nuevo en el desecador durante otras 24 horas. El pH de las disoluciones de AC se fijó a 4, antes del depósito de la gota, debido a que ese fue el pH que se utilizó en el seguimiento del apagamiento de la fluorescencia del AC.

Todos los espectros que se presentan en esta tesis se realizaron con el láser de longitud de onda de 532 nm (verde), con el objetivo de 100x, la potencia del láser se utilizó desde 2.85 μW hasta 3.4 mW, los tiempos de integración de 0.5 a 1 segundo y las acumulaciones por espectro fueron desde 10 hasta 50. Además, se tomaron fotografías de las superficies analizadas antes y después de cada medición y se vigiló que la fluorescencia del AC en los espectros Raman no disminuyera de intensidad durante las acumulaciones consecutivas de cada espectro, para asegurar que la muestra no se quemara con el láser, ya que el AC es una molécula fotosensible.

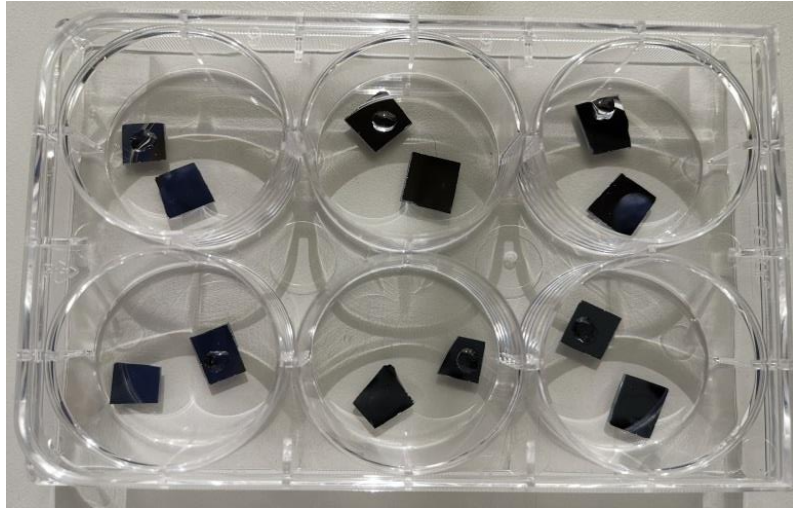


Figura 21. Obleas de SiO₂/Si con gotas de 10 μ L de AC, GOPM, rGO12, rGONP12, rGO20 y rGONP20 (arriba) y el microscopio acoplado al Raman WITec (abajo).

7. Resultados y discusión

7.1. Dispersiones de GO en agua y fracciones separadas por tamaños (GOPP, GOPM y GOPG)

7.1.1. Espectro de absorción del GO y relación de la absorbancia con la concentración

El espectro característico de absorción electrónica del GO tiene un máximo de absorción en 230 nm, el cual corresponde una transferencia electrónica $\pi \rightarrow \pi^*$ y es común para los enlaces C=C aromáticos. Además, muestra un hombro en aproximadamente 300 nm, el cual se asigna a la transferencia electrónica $n \rightarrow \pi^*$ en los enlaces C=O de los carbonilos presentes en el GO (Figura 22. A)).^[26]

Se ha documentado cómo se comporta el GO de acuerdo con la ley de Lambert-Beer, a mayor concentración, mayor absorbancia.^[30] Sin embargo, se observó que el tratamiento previo del GO puede cambiar de manera significativa la magnitud del coeficiente de absorción (ϵ) y hasta la forma del espectro. La concentración resultante de las 3 fracciones que se separaron con centrifugación, se calculó a partir de la señal de absorbancia, por lo tanto, es importante tener una curva de calibración confiable. Aún después de sonicar durante 1 hora, existen aglomerados de GO que no fueron exfoliados. Estas partículas más grandes son separadas del GOPM, durante la segunda centrifugación se quedan en el precipitado de los microtubos. Por lo tanto, en la dispersión de GOPG, el GO no está totalmente exfoliado y la concentración de esa fracción indica que tanto GO no se pudo dispersar propiamente. Se notó que las dispersiones más homogéneas y menos turbias, muestran una señal a 230 nm más intensa y una menor respuesta a mayores longitudes de onda (600-800 nm) (Figura 22). Este comportamiento se debe a que las partículas más grandes en suspensión dispersan más la luz, afectando la transmitancia a cualquier λ . Ajustando las variables experimentales para preparar la dispersión de GO en agua desionizada, a partir del GO en polvo, se logró aumentar la absorbancia de las muestras a menor concentración. Los

espectros de absorción de las muestras preparadas a partir del polvo de GO se compararon con el espectro del GO en solución (4 mg/mL) del mismo proveedor.

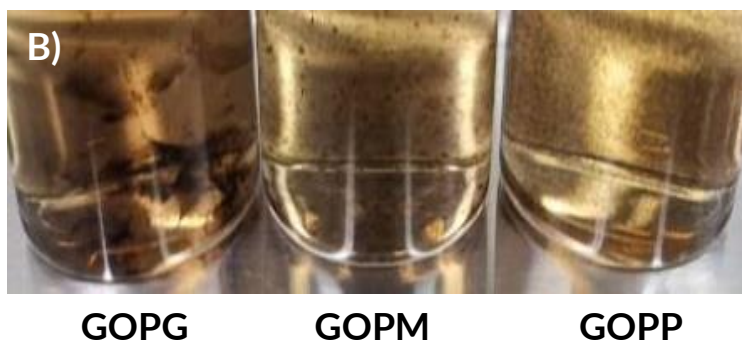
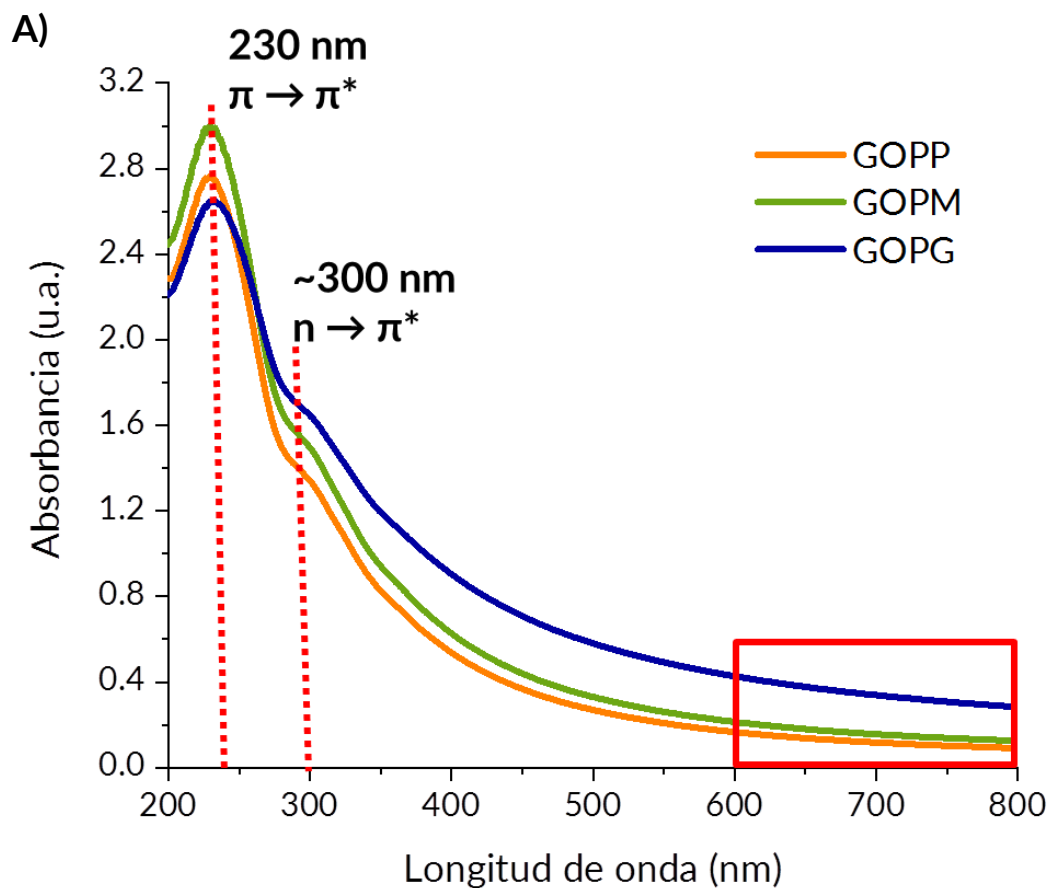


Figura 22. A) Espectros de absorción de las tres fracciones separadas del GO: GOPP (naranja), GOPM (verde olivo) y GOPG (azul marino). El GOPG exhibe mayor dispersión de la luz que las otras 2 fracciones, es decir, mayor absorción a 600-800 nm (recuadro rojo). B) Precipitados formados después de 3 meses de GOPG, GOPM y GOPP.

Con base en las respuestas de absorbancia se calculó una curva de calibración y se determinaron los datos de la Tabla 5, ahí se muestra el mayor rendimiento obtenido de GOPM, que es la fracción de GO que se continuará utilizando. Gracias al desarrollo de un protocolo de dispersión con el baño ultrasónico (sección 6.3) y uno de separación (sección 6.4), los rendimientos y las características del GOPM fueron repetibles y reproducibles, respectivamente. Si se quiere consultar más detalladamente el desarrollo de estos protocolos, ver el Anexo I.

Tabla 5. Cálculo de la masa de GO que resulta en cada una de las fracciones que se separaron por tamaños y su rendimiento con base en la masa inicial.

Muestra	Concentración (ppm)	Volumen (mL)	Masa (mg)	Rendimiento (%)
GO _{inicial}	500.00	24	12	100.00
GOPP	329.17	12	3.95	32.88
GOPM	237.78	18	4.28	35.64
GOPG	630.00	6	3.78	31.49

7.1.2. Espectroscopía FTIR-ATR del GO

La espectroscopía IR es una técnica que brinda información sobre los grupos funcionales y tipos de enlace presentes dentro de una molécula. Para el caso del GO las señales características y la forma del espectro dependen mucho de la preparación del tratamiento que haya sufrido el GO y la preparación de la muestra. Además, el espectro de IR del GO es probablemente la evidencia experimental que más comúnmente se malinterpreta en la bibliografía del GO.^[26] Se encontraron diferencias entre el espectro del GO en polvo y el espectro del GO después de ser sonicado (Figura 23), sin embargo, los espectros obtenidos del GOPP, GOPM y GOPG, no presentan cambios significativos entre ellos ni con el del GO sonicado (Anexo IV).

En un espectro IR de GO (Figura 23) la región de 3600 a 2400 cm^{-1} corresponde al estiramiento de los enlaces O-H del agua ($\nu_{\text{H}_2\text{O}}\text{O-H}$), aunque existe una pequeña contribución de los enlaces O-H presentes en la estructura del GO. La señal localizada en 1620 cm^{-1} normalmente se asigna de manera incorrecta al estiramiento de los dobles enlaces C=C aromáticos, se ha demostrado en experimentos donde se utiliza agua deuterada, que en realidad corresponde a una flexión (*scissoring*) de la molécula de H_2O ($\delta_{\text{H}_2\text{O}}\text{O-H}$).^[19] La señal intensa en 1724 cm^{-1} en el espectro del GO en polvo se asigna al estiramiento de los grupos carbonilos ($\nu\text{C=O}$), incluyendo ácidos carboxílicos, cetonas y aldehídos.^[26] Existe otra señal intensa situada en 1378 y 1395 cm^{-1} , para el GO sonicado y en polvo, respectivamente, la cual se asigna normalmente a la sobreposición de la flexión del enlace C-OH de grupos alcoholes terciarios ($\delta\text{C-OH}$) y a la deformación del enlace O-H en puentes de hidrógeno ($\delta\text{O-H}$), a causa de eso, su intensidad y ancho también depende de la cantidad agua en la muestra.^[97,98] La señal de 1224 cm^{-1} se asigna al estiramiento del anillo epóxido ($\nu\text{C-O-C}$) y el estiramiento del enlace alcóxido ($\nu\text{C-O}$) de grupos hidroxilos absorbe intensamente alrededor de 1060 cm^{-1} para el GO sonicado.^[26,27]

La inserción de moléculas de agua interplanar entre las hojuelas de GO y una ligera reducción del GO a causa de la sonicación, ocasionan corrimientos en las señales y que la intensidad de sus señales características, 1721 cm^{-1} ($\nu\text{C=O}$), 1224 cm^{-1} ($\nu\text{C-O-C}$) y 1060 cm^{-1} ($\nu\text{C-O}$), disminuya frente a las señales de estiramiento y deformación del agua, y puentes de hidrógeno en el GO sonicado, 3150 cm^{-1} ($\nu_{\text{H}_2\text{O}}\text{O-H}$), 1619 cm^{-1} ($\delta_{\text{H}_2\text{O}}\text{O-H}$) y 1378 cm^{-1} ($\delta\text{O-H}$). También por la misma razón algunas señales menos intensas de la zona de la “huella digital” (*fingerprint region*), de 1500 a 800 cm^{-1} , no se logran observar en el espectro del GO sonicado.

Tabla 6. Vibraciones asignadas a las principales señales de los espectros *FTIR-ATR* del GO en polvo y el GO después de una hora de sonicado.

GO en polvo (cm^{-1})	GO sonicado (cm^{-1})	Vibración asignada
3600-2400	3600-2400	$\nu_{\text{H}_2\text{O}}$ O-H
1724	1721	$\nu\text{C}=\text{O}$
1614	1619	$\delta_{\text{H}_2\text{O}}$ O-H
1394	1378	$\delta\text{C-OH}$ y $\delta\text{O-H}$
1217	1224	$\nu\text{C-O-C}$
1040	1060	$\nu\text{C-O}$

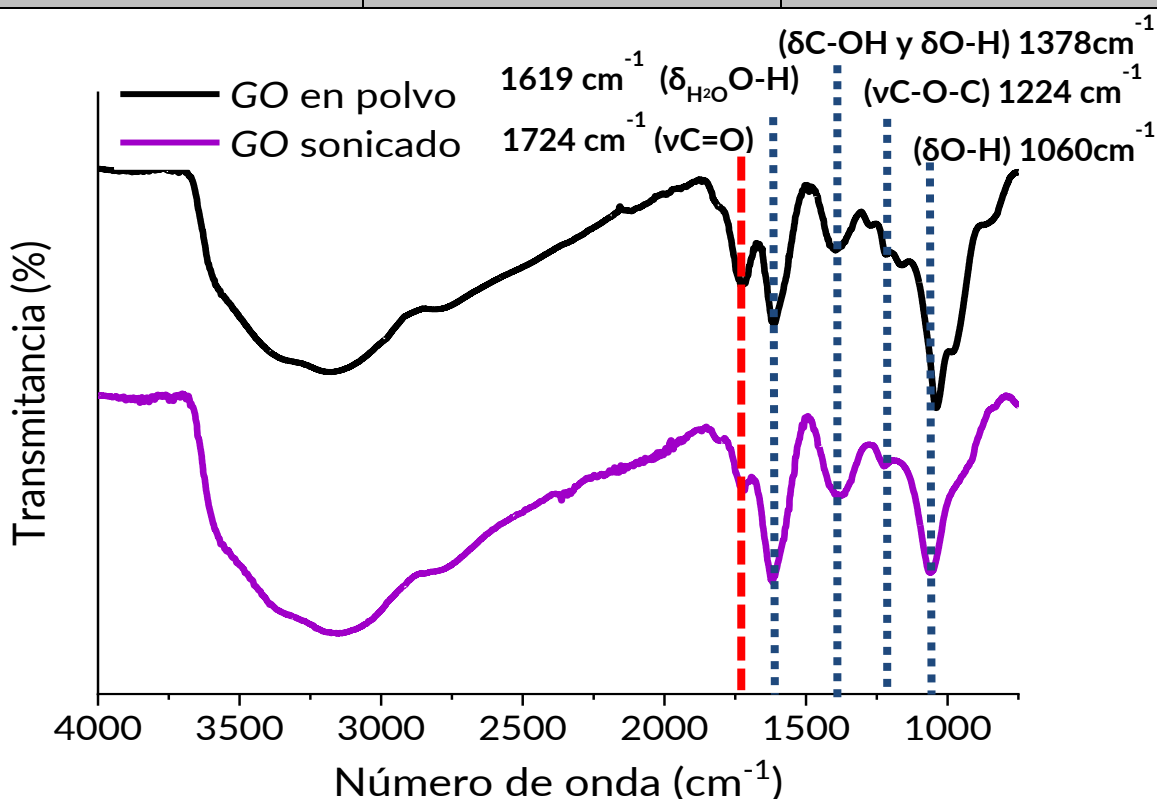


Figura 23. Espectroscopía *FTIR-ATR* del GO en polvo y el GO después de 1 hora en el baño ultrasónico. El incremento del número de moléculas de agua interplanar y la posible reducción de grupos oxigenados en el GO por el sonicado modifican el número de onda de las señales y la forma del espectro IR. La línea de guiones roja muestra la señal $\nu\text{C}=\text{O}$ del GO en polvo y las líneas punteadas azules las señales del GO sonicado. La vibración asignada y el número de onda de cada señal marcada también se muestran.

7.1.3. Tamaño de las obleas de GO

En el reporte del proveedor del GO en polvo, *Graphenea*, describe que la mayoría de las hojuelas de GO poseen un tamaño aproximado a 15 μm , sin embargo, la cavitación ultrasónica causa fragmentación y el tamaño del GO disminuye abruptamente.^[20] Para determinar el tamaño final del GO y el tamaño de las obleas presenten en el GOPP, GOPM y GOPG, se empleó la técnica de *DLS*. La técnica *DLS* mide el movimiento Browniano de las partículas en dispersión con un láser y analiza la fluctuación de la intensidad de la luz dispersada. El patrón de dispersión de luz con la misma λ , para diferentes partículas dependerá del tamaño de las mismas. Sin embargo, las partículas en dispersión se están moviendo constantemente por colisiones con las moléculas del disolvente (movimiento Browniano), las partículas más pequeñas se mueven más rápido y las grandes más lento. El sistema del *Zetasizer Nano* mide la velocidad de fluctuación del patrón de dispersión de la muestra para calcular el tamaño de las partículas dispersadas. El *DLS* mide los datos de tamaño a partir de la intensidad de la luz dispersada, no obstante las partículas grandes dispersan mucha más luz que las pequeñas, la intensidad de la dispersión de una partícula es proporcional a la sexta potencia de su diámetro (aproximación de Rayleigh). Por estas razones, en la Tabla 7 se presentan los datos en número (%), un cálculo que hace el equipo para dar un aproximado, en porcentaje, del número de partículas de determinado tamaño.^[99]

En la Tabla 7 se muestran los datos que presenta el *Zetasizer Nano* del diámetro promedio en nm, a partir de 3 mediciones consecutivas. Se observa que la desviación estándar del diámetro promedio del GOPM es la menor, tomando ese valor se calculó el intervalo de confianza de los diámetros ($\alpha = 0.05$). Esto sugiere que la distribución de tamaños de GOPM es menor y su tamaño promedio se encuentra entre el tamaño de GOPP y GOPG, aunque más cerca de GOPP, por las velocidades de centrifugación utilizadas para la separación y la presencia de aglomerados en el GOPG. Adicionalmente, se exponen histogramas de la distribución de tamaños de las 4 muestras medidas en número y el valor de la moda de cada una se encuentra junto a su nombre (Figura 24). Es importante mencionar que aunque los valores del diámetro de las obleas obtenidos por este método no son exactos, debido a que los cálculos del diámetro están diseñados para

partículas esféricas,^[23,100] es válido comparar los resultados entre diferentes muestras del mismo material y la distribución de tamaños obtenida del GO coincide con la publicada en artículos de investigación por otras técnicas, como AFM, para muestras que han sido sonicadas.^[20,60,65,101]

Tabla 7. Resultados del tamaño del GO, GOPP, GOPM y GOPG, obtenidos por medio de la técnica de DLS.

Muestra	GO	GOPP	GOPM	GOPG
Diámetro promedio (nm)	430.2 ± 25.8	240.1 ± 20.0	262.7 ± 11.6	540.4 ± 22.9
Desviación estándar	22.79	17.66	10.23	20.24
Intervalo de tamaño (nm)	122.4 - 712.4	91.3 - 458.7	105.7 - 531.2	190.1 - 825
Magnitud del intervalo (nm)	590	367.4	425.5	634.9

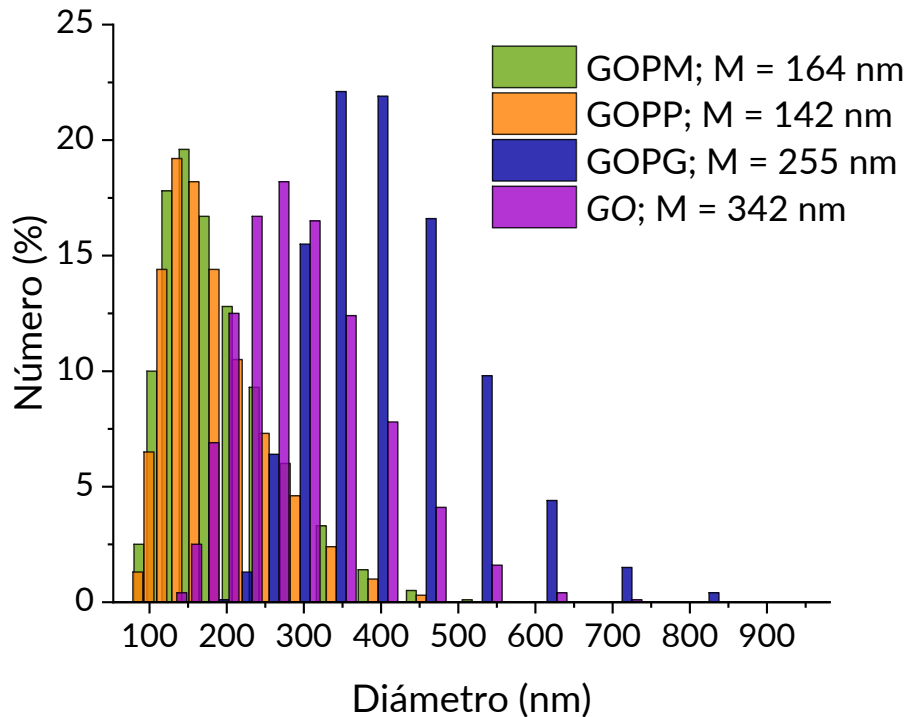


Figura 24. Distribución de tamaños por número (%) de partículas de cada tamaño en las muestras de GOPM, GOPP, GOPG y GO. La moda de la distribución (M) se encuentra a la derecha del nombre de cada muestra. La distribución de tamaños del GO es mayor que la del GOPP, GOPM y GOPG, porque es la suma de las 3.

El tamaño del GO va a determinar la dispersabilidad en agua y las propiedades físicas del GO en estado sólido. Por lo tanto, las imágenes obtenidas en el microscopio óptico *Carl Zeiss*, con los objetivos de 10x y 100x, confirman la separación de tamaños por centrifugación (Figura 25). Se depositó una gota de 10 μm de cada GO a la misma concentración, sobre una oblea de Si, se dejó secar el líquido en el desecador y se tomaron fotos en el microscopio. Cabe mencionar que en el GO y GOPG sobre el Si, la superficie que ocupa el material después del secado de la gota es menor que para GOPP y GOPM, es decir que las partículas más pequeñas tienen mayor dispersabilidad y se distribuyen mejor sobre el Si.

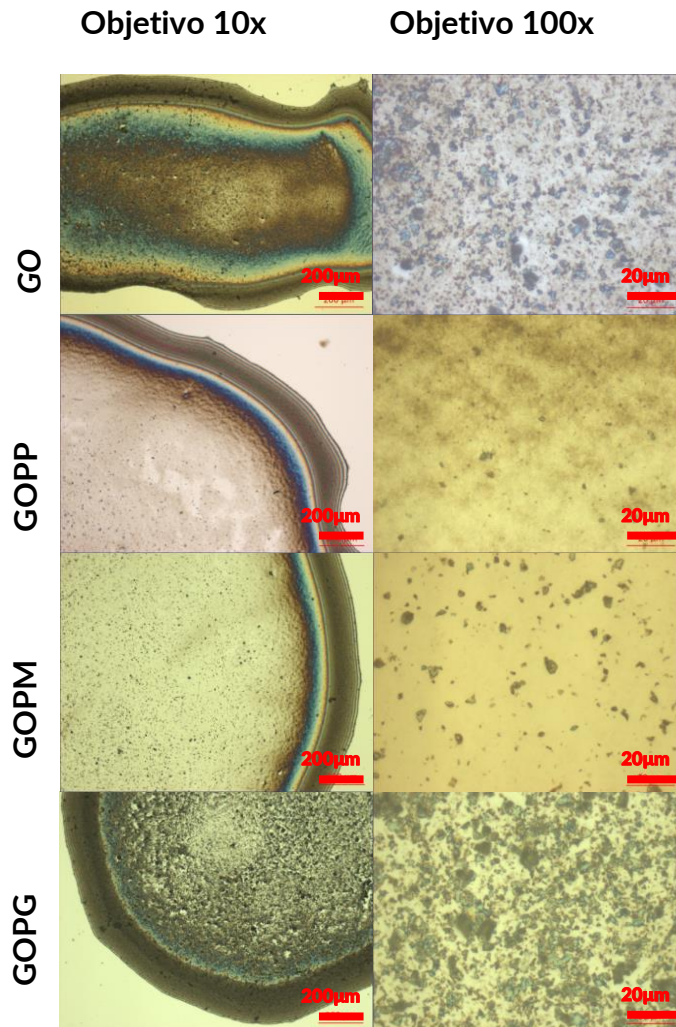


Figura 25. Fotografías de GO, GOPP, GOPM y GOPG, tomadas en el microscopio óptico con los objetivos de 10x (izquierda) y 100x (derecha), en campo claro. Gotas de 10 µL (C = 100 ppm) secadas sobre Si.

7.1.4. Potencial Zeta del GO

El potencial Zeta de las partículas en dispersión acuosa está determinado por la carga superficial de las mismas partículas. Si el potencial Zeta es cercano a cero, la dispersión no es estable y las partículas floculan, mientras el potencial Zeta sea más diferente a cero (positiva o negativamente), la aglomeración es menos probable y la dispersión es más estable.^[102]

Los resultados del potencial Zeta se muestran en la Tabla 8. Las muestras de GOPP y GOPM forman dispersiones más estables y su carga superficial es menor a la del GOPG. El potencial Zeta es dependiente del pH, sobre todo en el GO, debido a la protonación y

desprotonación de los átomos de oxígeno en la estructura.^[66] Las medidas de potencial Zeta se realizaron a pH = 6 y concentración de 30 ppm, para todos los casos (para saber más detalles sobre la preparación de las muestras, ver la sección 6.2). En la columna de la derecha se muestra el pH antes de fijarse a 6, se observa una tendencia similar a la del potencial Zeta, el GOPP tenía el pH más bajo y el GOPG el más alto. Tomando en cuenta que la carga superficial del GO está determinada por la cantidad de grupos oxigenados desprotonados, se ha observado que el GO a valores pH muy ácidos se precipita y en este trabajo se obtuvieron menores diferencias entre los potenciales Zeta de las muestras sin modificar el valor de pH. Se puede decir que el potencial Zeta, la movilidad y el pH de las dispersiones de GO dependen del tamaño de las láminas,^[68] asimismo, la presencia de aglomerados de GO no exfoliados en el GOPG decrece el número de -OH propensos a la desprotonación, por lo tanto, incrementa el pH y el potencial Zeta de la dispersión en equilibrio.

Tabla 8. Potencial Zeta del GO, GOPP, GOPM y GOPG. En todos los casos, se promediaron 3 medidas consecutivas, pH = 6 y C = 30 ppm. En la columna de la derecha se muestra el valor de pH antes de fijarlo a 6.

Muestra	Potencial Z (mV)	Movilidad ($\mu\text{mcm/Vs}$)	pH inicial
GO	-43.3	-3.392	4.82
GOPP	-49.2	-3.863	4.70
GOPM	-48.4	-3.796	4.86
GOPG	-42.7	-3.350	5.25

7.1.5. Espectroscopía Raman del GO

El espectro Raman típico del GO consta de dos señales intensas, con la forma que se observa en los espectros de la Figura 26. A la señal de menor energía, aproximadamente a 1350 cm^{-1} , se le conoce como la banda D, y está asociada proporcionalmente con los defectos en la red del grafeno. En un espectro Raman de grafeno pristino, esta señal no se observa. La segunda señal se encuentra alrededor de 1600 cm^{-1} y se le llama banda G. Esta señal está relacionada con vibraciones sp^2 doblemente degeneradas en el plano óptico. Debido a la naturaleza de las vibraciones responsables de las señales D y G, la relación entre la intensidad de ambas señales dentro del mismo espectro se puede utilizar como un indicador del número de defectos y proporción entre regiones de carbonos sp^2 y sp^3 en el GO. Para el GO, sintetizado por el método de Hummers, el cociente I_D/I_G normalmente es mayor a 1, ya que se pierde la aromaticidad en muchas partes de la red por la introducción de los grupos oxigenados.^[26,27]

En la Figura 26 se presentan los espectros promedio obtenidos para las 4 diferentes muestras de GO. Además, se calcularon los valores de I_D/I_G y se observan pequeños cambios en esta razón que coinciden con los tamaños de las obleas en cada caso. El cociente I_D/I_G para el GOPP es el más alto, 1.07 y para GOPG es el más bajo, 1.00; esto indica que en el GO más pequeño hay mayor número de defectos. La mayoría de los defectos en la red de carbonos sp^2 se encuentran en las orillas de las obleas de GO y la proporción de átomos de carbono en la orilla para GOPP es mayor, porque su diámetro es menor.

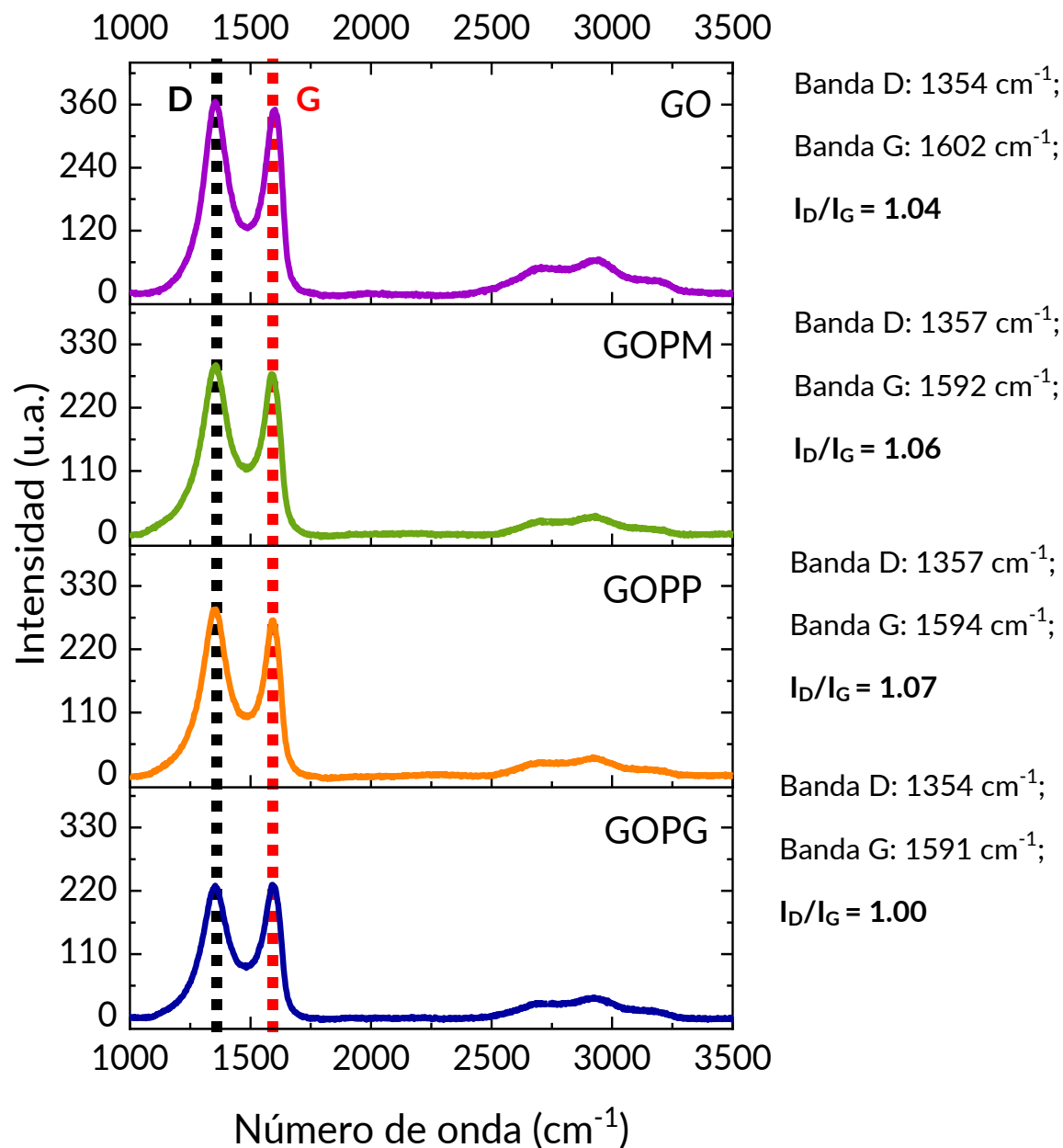


Figura 26. Espectros Raman promedio sobre Si del GO, GOPP, GOPM y GOPG, con el láser de 532 nm. La línea punteada negra indica la banda D y la roja la banda G. Se utilizaron 3 espectros Raman en diferentes partes de la misma muestra para calcular el espectro promedio y se corrigió la línea base. Se utilizaron las mismas condiciones en todos los espectros: potencia del láser de 3.4mW, tiempo de integración de 1s y 40 acumulaciones.

7.1.6. Fluorescencia del GO

En la Figura 28 se muestran los mapas de fluorescencia 3D del GO, GOPP, GOPM y GOPG, todas las mediciones se hicieron a pH = 4, misma concentración y volumen. Se eligió el pH = 4, debido a que a ese valor de pH el AC presenta la fluorescencia más intensa en disolución (sección 7.3.2), además, durante el trabajo se observó que la fluorescencia del GO también depende del pH. Los mapas mostrados fueron realizados en las mismas condiciones y tienen la misma escala de intensidad (escala de colores), por lo tanto, son comparables. Los resultados muestran que las obleas más pequeñas de GO son las que contribuyen de mayor manera a la fluorescencia observada en el mapa de GO sin separar y que las más grandes presentan una fluorescencia menos intensa pero en la misma región. El máximo de excitación se encuentra en 368 nm aproximadamente y el máximo de emisión alrededor de 550 nm. El máximo de emisión de las obleas más grandes presenta un ligero corrimiento hacia el azul y el de más las pequeñas hacia el rojo, comparándolas con el GO (Figura 27). Para los sustratos reducidos se observó un corrimiento al azul.

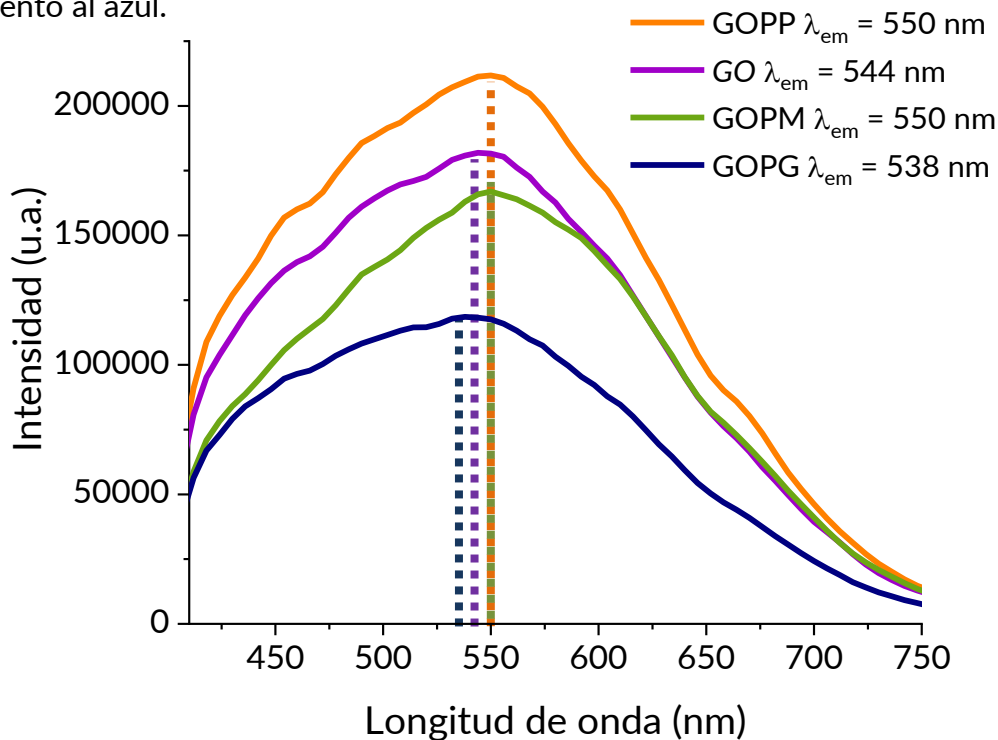


Figura 27. Espectros de emisión del GO, GOPP, GOPM y GOPG, extraídos de los mapas de fluorescencia 3D a $\lambda_{exc} = 302$ nm. A la derecha se observa el máximo de emisión (λ_{em}). Se empleó un filtro de 399 nm, *slit* = 10 nm, incremento de 6 nm, C = 60 ppm y pH = 4.

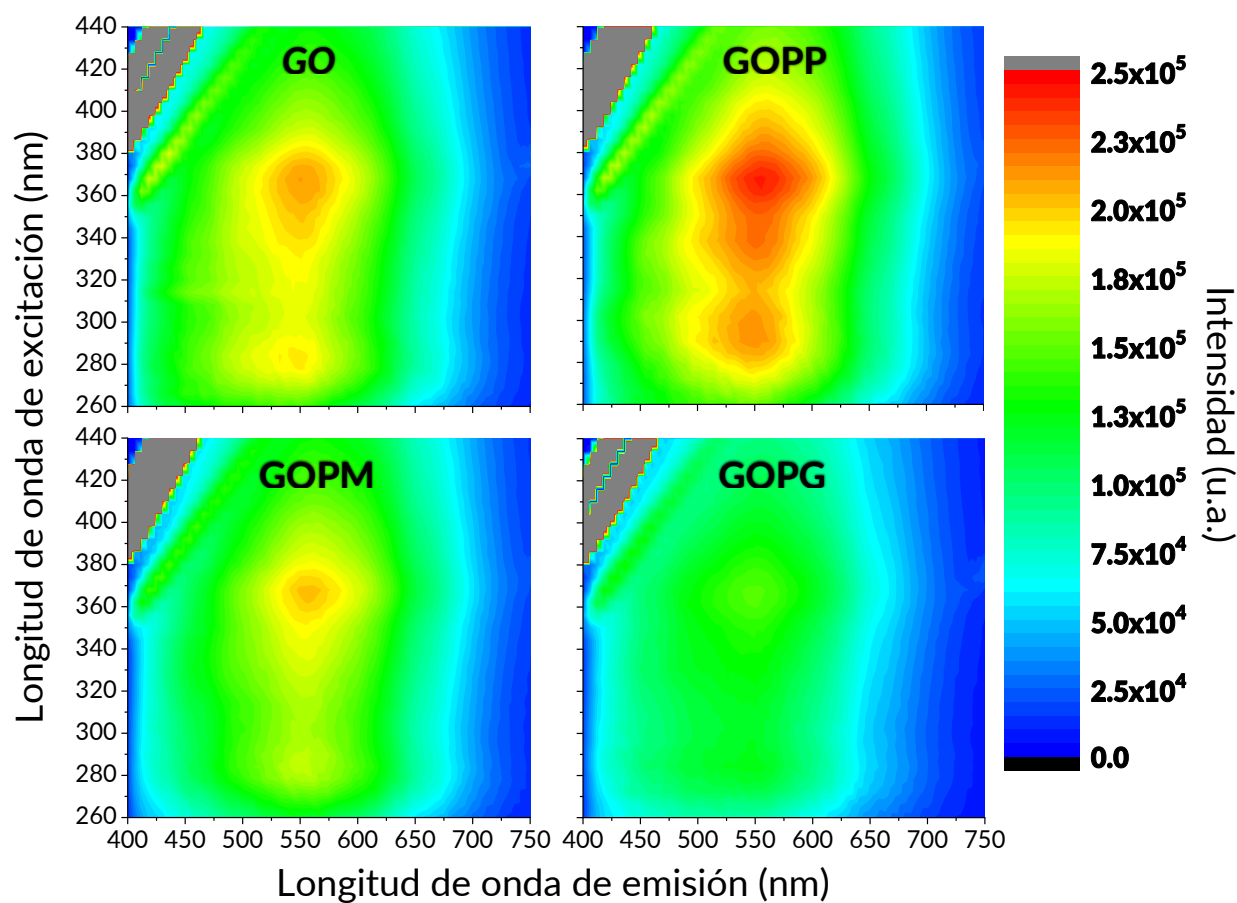


Figura 28. Mapas 3D de fluorescencia del GO, GOPP, GOPM y GOPG, la intensidad de la fluorescencia está representada por la escala de colores de la derecha. Se empleó un filtro de 399 nm, *slit* = 10 nm, incremento de 6 nm, C = 60 ppm y pH = 4.

La diferencia en la intensidad de la fluorescencia se puede observar a también simple vista, iluminando a las dispersiones con una lámpara de luz UV de onda larga (380 nm). Se tomaron las fotos de las dispersiones a la misma concentración de GO, GOPP, GOPM y GOPG, bajo luz blanca y luz UV de onda larga.



Figura 29. Fotografías de las dispersiones de GO, GOPP, GOPM y GOPG. Las fotos de arriba se tomaron bajo luz blanca y las de abajo bajo luz UV de 380 nm. GOPP presenta visiblemente la mayor fluorescencia. La concentración de todas las dispersiones es de 100 ppm (0.1 mg/mL).

De acuerdo con los resultados presentados en esta sección, es decir, la intensidad y desplazamiento de los máximos de emisión, la dispersabilidad, el potencial Zeta y la razón I_D/I_G de los espectros Raman, se puede decir que; las partículas pequeñas tienen regiones de carbono con hibridación sp^2 más pequeñas y mayor número de defectos en la red. Por lo tanto, la intensidad de la fluorescencia de GOPP es mayor que la de GOPM y GOPG, en donde hay regiones sp^2 más grandes y es más probable que la energía absorbida de los fotones irradiados al material decaiga no radiativamente e inhiba la fluorescencia.

7.2. Reducción del GO a rGO y decorado con NPAu a diferentes concentraciones de citrato de sodio

La reducción del GO al rGO con citrato de sodio tribásico es una reacción espontánea, ya que el potencial de reducción estándar del citrato de sodio es menor ($E^\circ = -0.180 \text{ V}$)^[125], que el del rGO ($E^\circ = +0.380 \text{ V}$).^[118] Además, el sistema a reflujo mantiene una temperatura de reacción de 96 – 97 °C, la cual favorece la reacción de reducción del GO. Sin embargo, la adición del ácido cloroáurico oxida al citrato remanente (después de 2.5 horas de reflujo) y al rGO, resultando en la síntesis de NPAu en la superficie del rGO, debido al gran potencial de reducción estándar del anión $[\text{AuCl}_4]^-$ ($E^\circ = -1.002 \text{ V}$).^[118]

7.2.1. Espectroscopía de absorción UV-Vis-NIR, seguimiento del grado de oxidación del rGO y plasmón superficial de las NPAu

En múltiples trabajos de investigación se ha concluido que existe un desplazamiento al rojo del máximo de absorción y una desaparición del hombro a 300 nm del espectro de absorción del GO a consecuencia de la reducción.^[23,30,64] En el trabajo actual se confirma esa tendencia, el máximo de absorción del GO en 230 nm se desplazó a 254 nm para el rGO12 (proporción en masa 1:12, del GO y citrato de sodio, respectivamente) y 263 nm para el rGO20 (proporción en masa 1:20). El hombro de absorción a 300 nm no se ve en ninguno de los dos espectros del rGO (Figura 30). No obstante, es posible observar un hombro del lado izquierdo del máximo de absorción del rGO12 a 230 nm, lo que sugiere que la reducción del GO no fue completa con la cantidad de citrato de sodio que se utilizó. Esto también explica la mayor estabilidad a lo largo del tiempo de las dispersiones de rGO12 en comparación con las de rGO20. Cabe mencionar que la longitud de onda de absorción del rGONP20 es menor, 260 nm, que la del rGO20, debido a que la reducción de los cationes Au^{3+} compite con la reducción del GO durante la última media hora de la reacción.

Debido a la naturaleza no estequiométrica del GO, las cantidades utilizadas de citrato de sodio tribásico, en estos protocolos de reducción y síntesis de NPAu en la superficie del GO, se encuentran en exceso. Esto se demostró por la obtención de los espectros de

absorción y de *FTIR-ATR*, de los residuos de los lavados en la centrifuga realizados después de las reacciones (Anexo IV), donde se observan las señales características del citrato de sodio. En caso del espectro de absorción electrónica, el citrato de sodio presenta una señal intensa localizada en 200 nm, esta señal se puede observar en los sustratos sintetizados y consecuentemente, es más intensa en las muestras donde se empleó una mayor relación de GO y citrato de sodio (1:20).

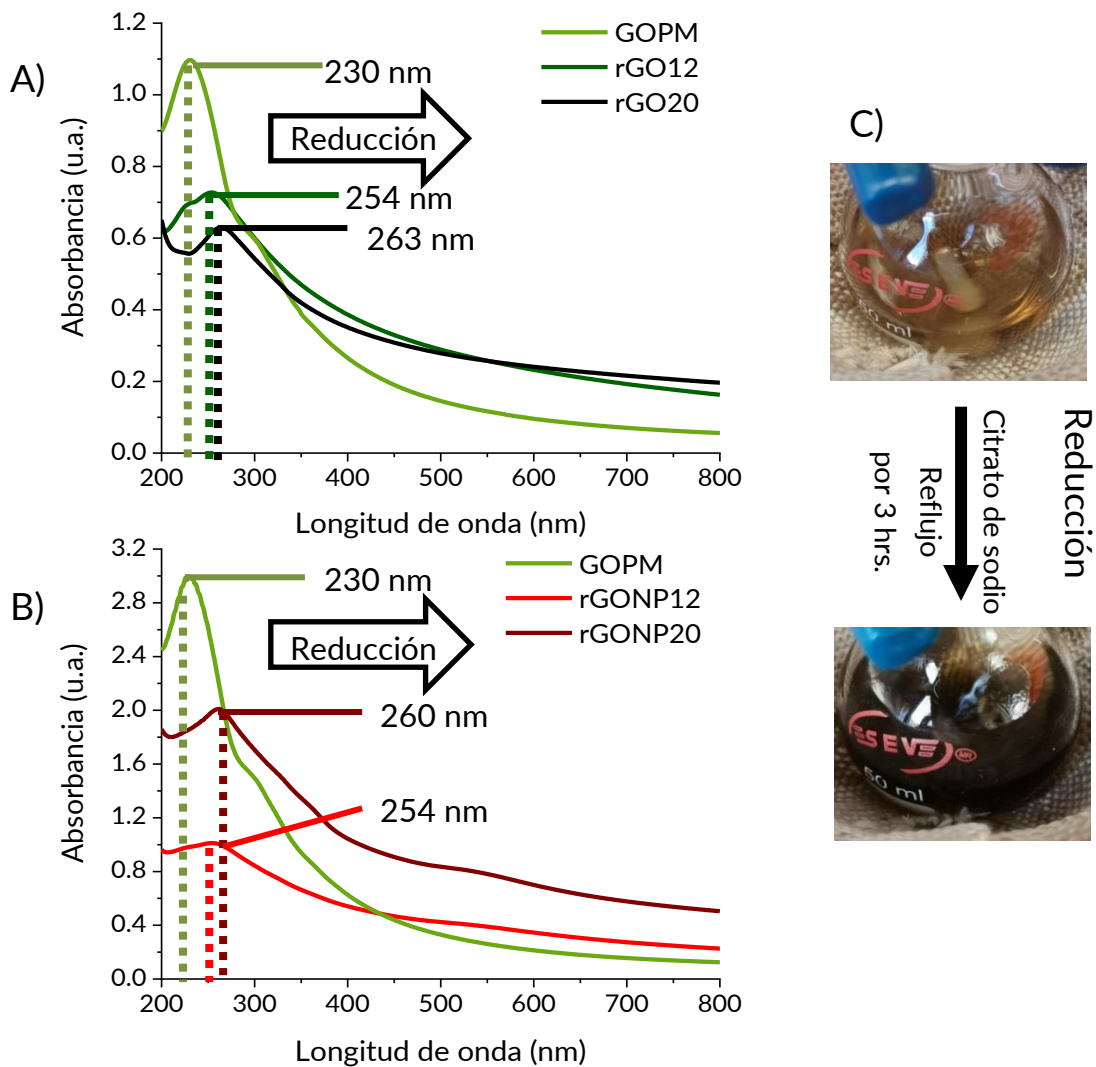


Figura 30. Comparación de espectros de absorción electrónica UV-Vis-NIR: A) GOPM (verde olivo), rGO12 (verde oscuro) y rGO20 (negro), y B) GOPM, rGONP12 (rojo) y rGONP20 (vino), lado derecho. Están marcadas las longitudes de onda de los máximos de cada espectro. La flecha señala el corrimiento del máximo de absorción provocado por la reducción del GO. C) Cambio de la coloración de la dispersión observado antes (arriba) y después de la reducción (abajo).

Esta técnica permite confirmar la presencia de las NPAu sobre la superficie del rGO por una señal ancha y poco intensa en la región de 500 a 600 nm, a causa de la absorción de la resonancia del plasmón superficial localizado de las NPAu.^[96,103] Debido al valor del potencial de reducción estándar del anión $[\text{AuCl}_4]^-$ (aq) (+1.002 V),^[118] es enormemente improbable que el oro permanezca en disolución sin reaccionar. Adicionalmente, el máximo de absorción del HAuCl_4 es de 212.5 nm^[119] y en ninguno de los espectros de los nanocompositos se observa una señal de a esa longitud de onda. En la Figura 31 se muestran estas señales en el espectro de absorción electrónica de las NPAu y las restas de los espectros de los nanocompositos menos los espectros de su respectivo rGO. A simple vista se alcanza a observar una pequeña curva en la región de 500 a 600 nm en los espectros de rGONP12 y rGONP20, sin embargo, después de restar los espectros normalizados de los nanomateriales híbridos a los del rGO, el plasmón superficial localizado se observa claramente en ambos casos. El máximo de absorción de la señal provocada por el plasmón en el espectro de las NPAu se localiza en 583 nm, el del rGONP12 es de 542 nm y el del rGONP20 es de 544 nm, estas longitudes de onda coinciden con las reportadas en la literatura.^[64,76,119] La longitud de onda del máximo de absorción de las NPAu depende su tamaño, forma y el ambiente químico en que se encuentren.^[120] A causa del agente reductor utilizado (citrato de sodio), y de acuerdo con la publicación de Zhang *et al.* (2011), donde se describe la síntesis y caracterización del sustrato rGONP12 por primera vez, lo más probable es que las nanopartículas tengan forma esférica y un diámetro aproximado de 7 nm.^[64]

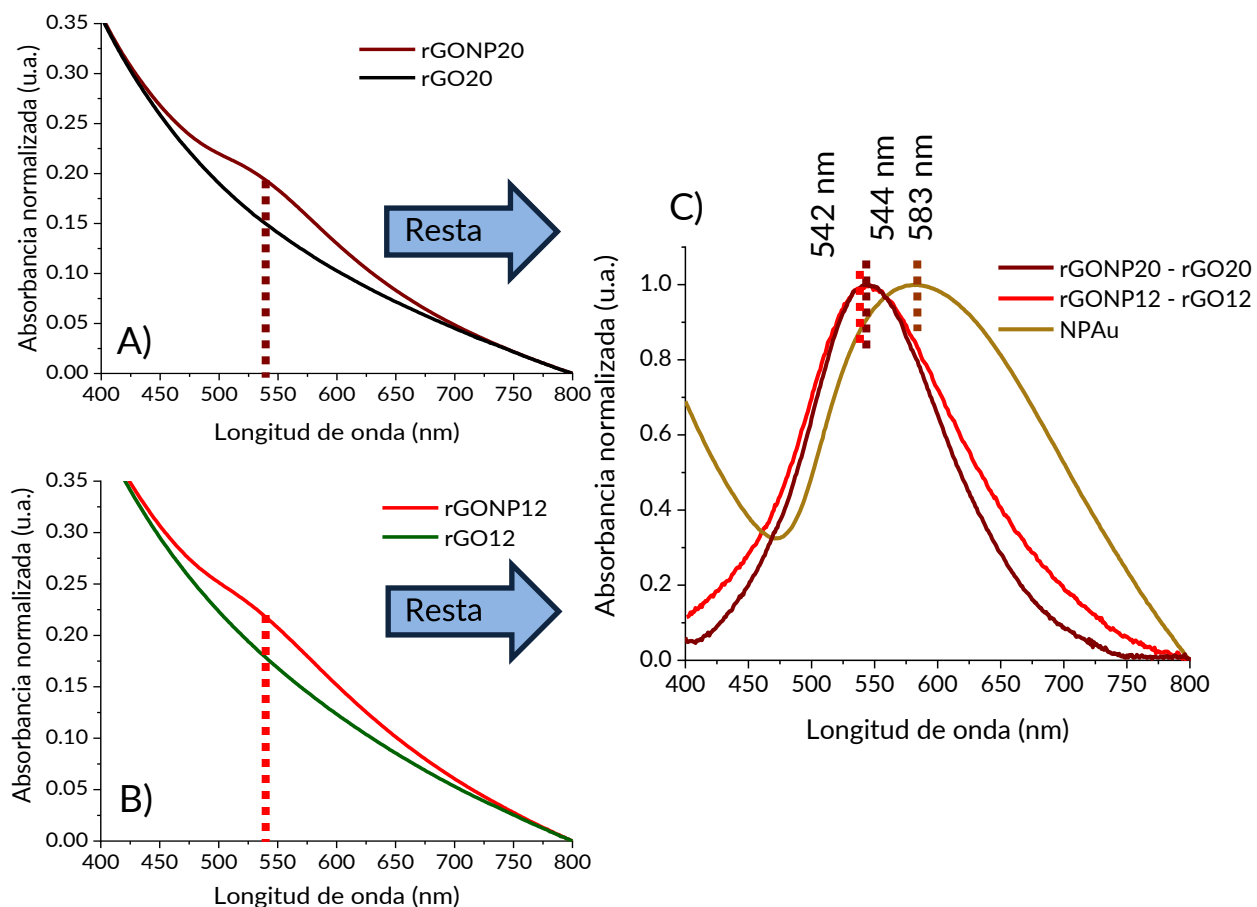


Figura 31. Espectros de absorción electrónica normalizados, en el intervalo de 400 a 800 nm, del rGONP20 y el rGO20 (A), y del rGONP12 y el rGO12 (B). A la derecha se ve la absorción del plasmón superficial localizado de las NPAu y los resultados de las restas de los espectros del rGONP20 - rGO20 y del rGONP12 - rGO12 (C).

Adicionalmente, se ha informado que el ancho de la señal depende de la distribución de tamaños de las NPAu, por lo tanto, se puede decir que debido a la mayor concentración de citratos en la reacción del rGONP20, el intervalo de la distribución de tamaños de NPAu sobre la superficie del rGO es menor.^[123]

La presencia de las NPAu en el rGONP12 y rGONP20 también fue corroborada por microscopía óptica de campo oscuro, ya que funcionan como centro de dispersión de la luz (Figura 32).^[100] Las siluetas iluminadas más grandes son aglomerados del material y las NPAu son los pequeños puntos de luz que se encuentran entre los aglomerados.

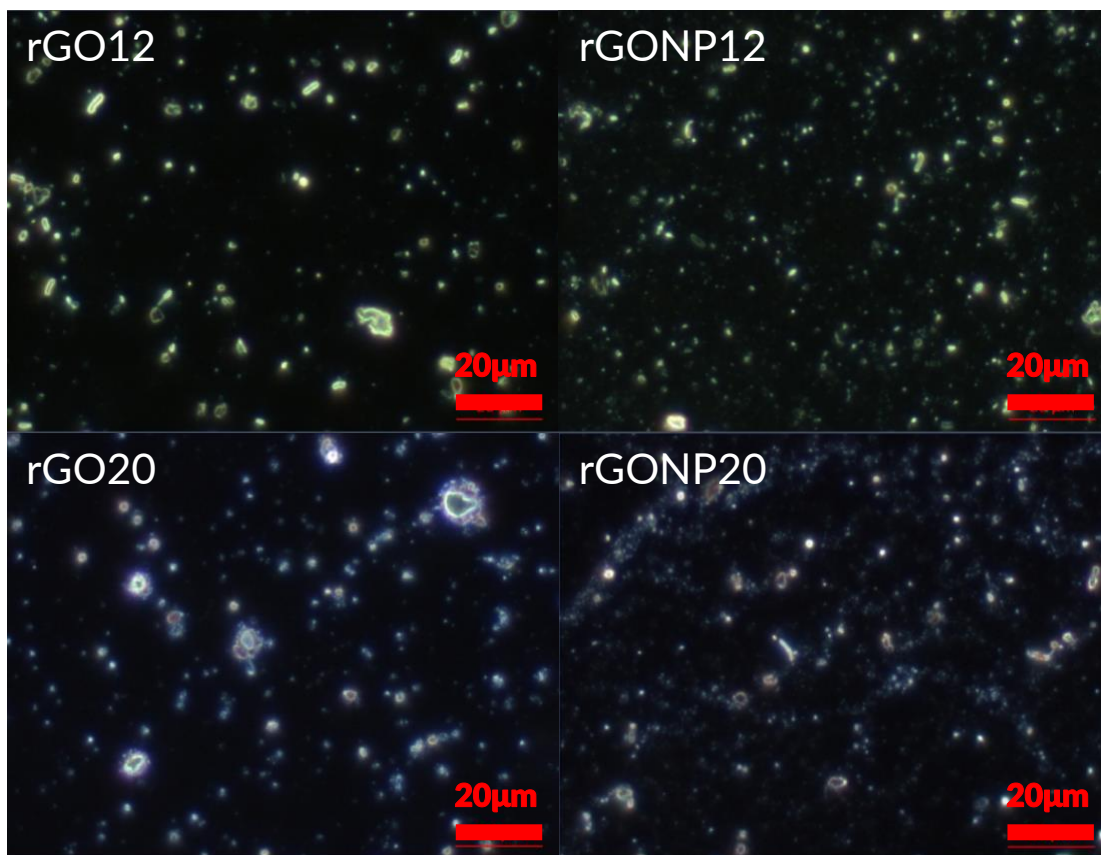


Figura 32. Fotografías de rGO12, rGONP12, rGO20 y rGONP20, tomadas en el microscopio óptico con el objetivo de 100x en campo oscuro. Gotas de 10 μL ($C \approx 50 \text{ ppm}$) secadas sobre Si.

7.2.2. Espectroscopía FTIR-ATR del rGO y rGONP

Mediante la técnica *FTIR-ATR* es posible realizar un seguimiento cualitativo del grado de oxidación del rGO. Mientras el GO se reduce a rGO, se genera la pérdida de los grupos funcionales oxigenados presentes en la superficie del GO, esto genera la disminución de la intensidad de las señales de esos grupos. Adicionalmente, la pérdida de los átomos de oxígeno en la estructura del GO causa que el material sea más hidrofóbico, por esta razón la dispersabilidad del rGO es menor y retiene una menor cantidad de moléculas de agua después de evaporar el disolvente. Por lo tanto, también las señales asignadas al estiramiento y flexión del H_2O disminuyen y permiten ver nuevas señales que estaban enmascaradas en el espectro del GO.^[64,80,104]

En la Figura 33, se puede observar que la intensidad de las señales asignadas al agua disminuye al aumentar el grado de reducción del material. La señal del estiramiento $\nu_{\text{H}_2\text{O}}\text{O-H}$, ubicada en la región de 3600 a 2400 cm^{-1} baja en intensidad y permite observar otras dos señales en 2920 y 2849 cm^{-1} , las cuales son asignadas al estiramiento asimétrico y simétrico del enlace C-H en grupos $-\text{CH}_2$ ($\nu_{\text{a/s}}\text{C-H}$) del rGO y de residuos del citrato de sodio.^[64,105] La señal $\nu\text{C=O}$ situada en 1724 cm^{-1} disminuye hasta desaparecer en el espectro del rGO20, por la reducción del sustrato. Para todos los sustratos reducidos se observa una señal intensa en aproximadamente 1585 cm^{-1} , parecería que esta señal resulta del desplazamiento de la flexión del agua $\delta_{\text{H}_2\text{O}}\text{O-H}$ en 1619 cm^{-1} . No obstante, sería un desplazamiento enorme y la disminución de $\nu_{\text{H}_2\text{O}}\text{O-H}$, confirman que la señal situada en 1585 cm^{-1} sí corresponde a la vibración de los enlaces aromático C=C ($\nu\text{C=C}$).^[19] La señal en 1378 cm^{-1} , sufre un desplazamiento paulatino a mayor energía, en 1401 cm^{-1} para rGO12 y a 1410 cm^{-1} para rGO20, esto se puede deber a una menor contribución de la flexión $\delta\text{O-H}$ y mayor contribución de $\delta\text{C-OH}$ y otras flexiones de los grupos metilenos ($-\text{CH}_2-$), ubicadas en la región 1405-1450 cm^{-1} ($\delta\text{C-H}$), del rGO y el citrato de sodio residual.^[7] Estos cambios se pueden observar gradualmente comparando los espectros IR del GOPM, rGO12 y rGO20 (Figura 33). La técnica *FTIR-ATR* rectifica que la mayor proporción de citrato de sodio en la reacción provoca que el rGO20 esté más reducido que el rGO12.

Tabla 9. Vibraciones asignadas a las principales señales de los espectros *FTIR-ATR* del GOPM, rGO12 y el rGO20.

GOPM (cm ⁻¹)	rGO12 (cm ⁻¹)	rGO20 (cm ⁻¹)	Vibración asignada
-	2922 y 2851	2920 y 2849	$\nu_{a/s}\text{C-H}$
1720	1724 (hombro)	-	$\nu\text{C=O}$
1618	-	-	$\delta_{\text{H}_2\text{O}}\text{O-H}$
-	1586	1585	$\nu\text{C=C}$
-	1401	1410	$\delta\text{C-OH} / \delta\text{C-H}$
1378	-	-	$\delta\text{O-H}$

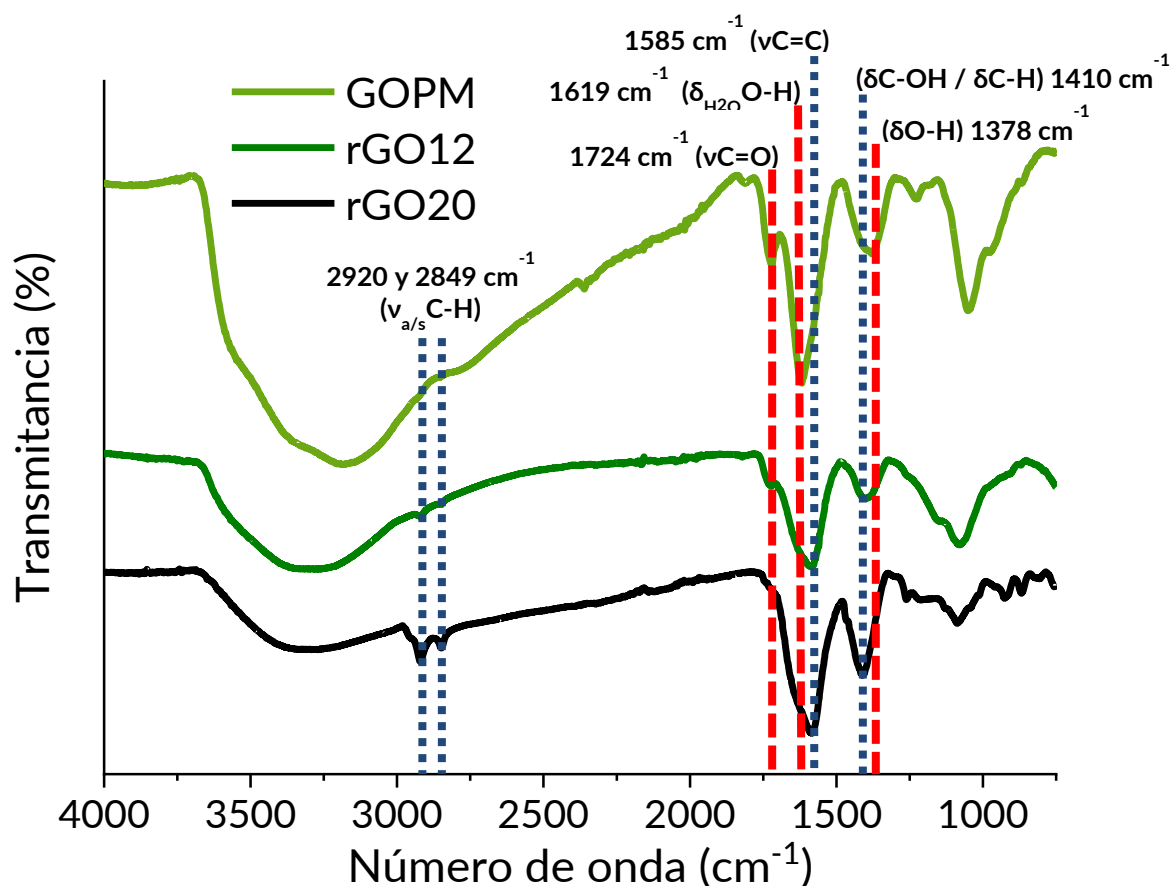


Figura 33. Comparación de los espectros *FTIR-ATR* de GOPM, rGO12 y rGO20. Las líneas de guiones rojas marcan las señales del GOPM y las líneas punteadas azules marcan las señales del rGO20 (el sustrato más reducido) en los espectros. La vibración asignada y el número de onda de cada señal marcada también se muestran.

Los espectros de *FTIR* de los sustratos con NPAu, no presentan cambios significativos en la forma del espectro ni las señales presentes, sin embargo, la intensidad de todas las señales del rGO aumentó, en ambos casos. Este efecto se conoce como *surface-enhanced infrared absorption* o SEIRA, y se ha observado en películas y nanopartículas metálicas de oro, plata y cobre.^[106] El efecto SEIRA que causan las nanopartículas de oro del rGONP12 y rGONP20 en el espectro del rGO12 y rGO20 se observa en la Figura 34.

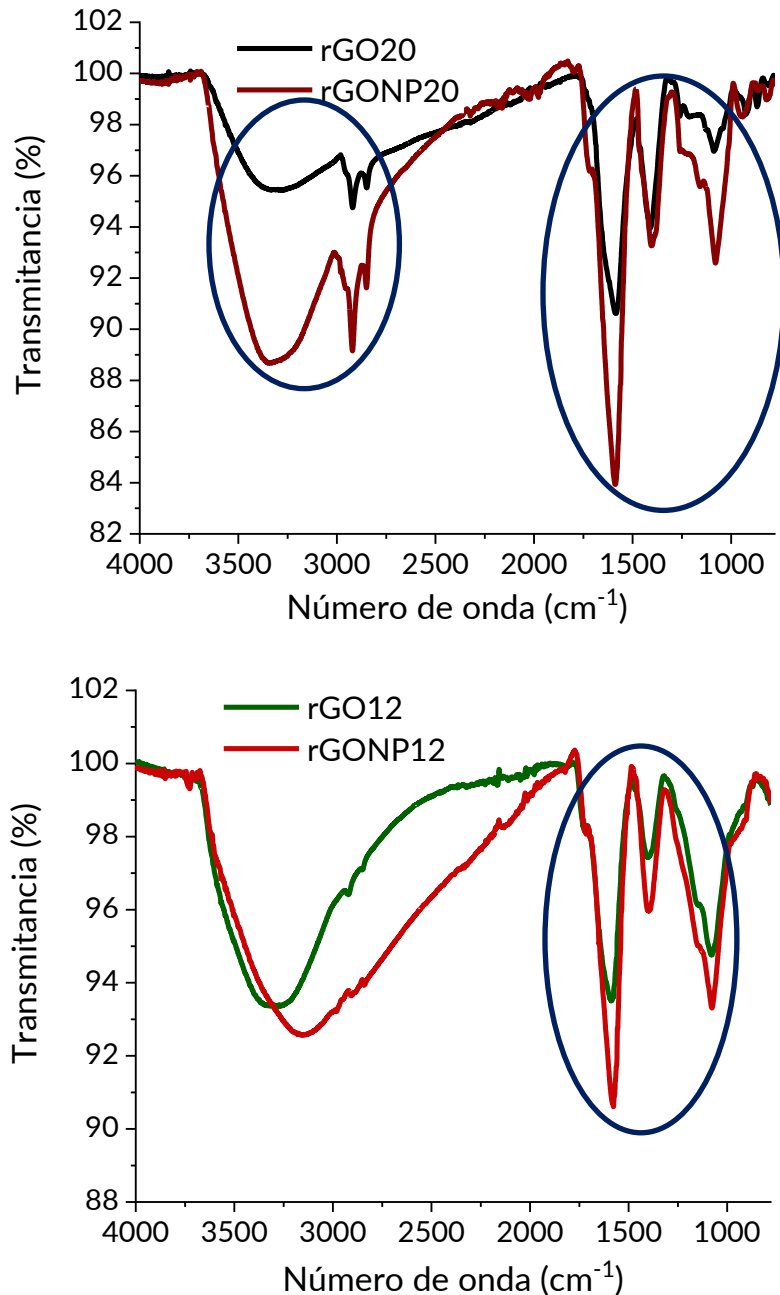


Figura 34. Efecto SEIRA en los espectros *FTIR-ATR* (óvalos azules) del rGO20 (arriba) y rGO12 (abajo) originado por la presencia de NPAu en la superficie del rGO.

7.2.3. Potencial Zeta y medidas *DLS* del *rGO* y *rGONP*

Los resultados del potencial Zeta, rectifican que hay una menor cantidad de grupos oxigenados en el *rGO20* y *rGONP20*. A causa de la menor cantidad de citrato de sodio en la reducción de *rGO12* y *rGONP12*, la carga superficial de ambos sustratos es muy similar a la del *GOPM*. El valor absoluto del potencial Zeta de los sustratos que tienen nanopartículas de oro es mayor que el de sus contrapartes sin nanopartículas, como ya se mencionó antes, la adición del ácido cloroáurico provoca una competencia entre la reducción de los cationes Au^{3+} y los grupos oxigenados del *GO*. Además, se ha informado que las *NPAu* sintetizadas usando citrato de sodio presentan carga negativa por la presencia de grupos carboxilatos del citrato de sodio y otros subproductos de la reducción en la superficie de las *NPAu*,^[107] estos dos fenómenos explican esa diferencia de potencial Zeta (Tabla 10).

Tabla 10. Potencial Zeta de las dispersiones a concentración de ~30 ppm y pH = 6.

Muestra	Potencial Zeta (mV)	Mobilidad ($\mu\text{mcm/Vs}$)
<i>GOPM</i>	-48.4	-3.796
<i>rGO12</i>	-47.4	-3.715
<i>rGONP12</i>	-47.7	-3.744
<i>rGO20</i>	-24.7	-1.937
<i>rGONP20</i>	-30.7	-2.407

En el caso de la técnica *DLS*, se observó una disminución en el diámetro promedio de los sustratos sintetizados en comparación con el *GOPM*, con excepción del *rGO20* (Tabla 11). Esto se puede explicar porque la reducción puede provocar la fractura de las obleas de *GO* al eliminar los grupos oxigenados, además de la probable presencia de pequeños aglomerados de *NPAu* que no se fijaron sobre el *rGO*. El diámetro promedio del *rGO20* es mayor debido a que el *rGO* reducido en esas condiciones tiene mayor carácter hidrofóbico, lo que compromete la estabilidad de la dispersión y se forman aglomerados del *rGO* mucho más rápido, que aumentan el promedio del diámetro considerablemente.

El rGONP12 y rGONP20, poseen una mayor dispersabilidad porque la presencia de nanopartículas metálicas cargadas negativamente en la superficie dificulta que las interacciones $\pi - \pi$ entre láminas de rGO formen aglomerados.^[59] Esto se puede observar en la Figura 35, el rGO12 presentan visiblemente partículas grandes en suspensión, a diferencia del rGONP12.

Tabla 11. Diámetros promedio de las partículas en dispersión del GOPM y los sustratos reducidos. El equipo promedia 3 mediciones consecutivas.

Muestra	GOPM	rGO20	rGONP20	rGO12	rGONP12
Diámetro promedio (nm)	262.7	335.7	225.5	231.3	254.6

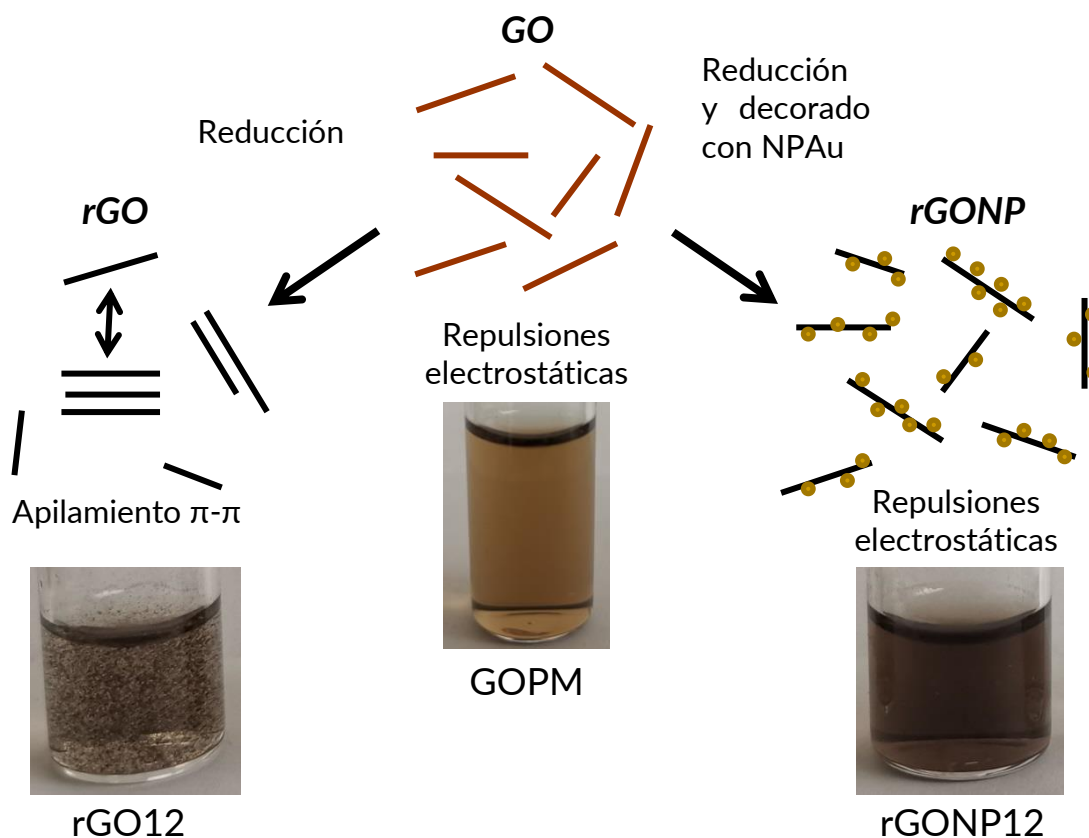


Figura 35. Ilustración y descripción de las interacciones predominantes entre las obleas del GO, el rGO y el rGONP (arriba). Fotografías de las dispersiones sin sonicar, durante el mismo tiempo, de los sustratos, GOPM, rGO12 y rGONP12. Las dispersiones estaban a valor de pH = 4 y con concentración de ~30 ppm para el rGO12 y el rGONP12, y de 100 ppm para el GOPM.

7.2.4. Espectroscopía Raman del rGO y rGONP

Los espectros Raman del rGO12, rGONP12, rGO20 y rGONP20 se presentan en la Figura 36, junto con el producto de la división de las intensidades de las bandas D y G. Se observa un corrimiento hacia el rojo en el máximo de la señal D para el rGO12, rGONP20 y rGO20, sin embargo, para el rGONP12 la señal permanece en 1357 cm^{-1} , igual que en el espectro del GOPM. El máximo de la banda G en el espectro del GOPM está en 1592 cm^{-1} y sólo se desplaza a menores valores de energía para el rGO12 en 1589 cm^{-1} . La magnitud de la razón I_D/I_G disminuyó para rGO12 y rGONP12, sobre todo para el rGONP12, y aumentó significativamente para el rGO20 y el rGONP20 con relación al GOPM.

La espectroscopía Raman es una herramienta común en el seguimiento de la reducción del GO. Existen discrepancias en las interpretaciones del cambio en el cociente I_D/I_G con respecto a la reducción del GO. Anteriormente se relacionaba ese valor con el grado de oxidación en experimentos donde se monitoreaba la oxidación del grafito con la espectroscopía Raman, en esos casos el resultado de I_D/I_G es proporcional al grado de oxidación. No obstante, los últimos trabajos y revisiones indican que una reducción moderada del GO puede aumentar el tamaño y recombinar las regiones sp^2 preexistentes, pero el crecimiento de estas regiones está limitado a 2 nm .^[26] Por lo cual una reducción intensa favorece la formación aleatoria de nuevas y pequeñas regiones sp^2 , donde solo había átomos de carbono con hibridación sp^3 . Es decir, que la reducción leve del GO disminuye el valor de I_D/I_G , mientras que una reducción más fuerte aumenta el cociente por el mayor número de defectos en los alrededores de las nuevas regiones sp^2 .^[108] Esto se debe a que la naturaleza de la vibración que origina la banda D solamente está relacionada con defectos en la red, independientemente de la presencia de grupos oxigenados.

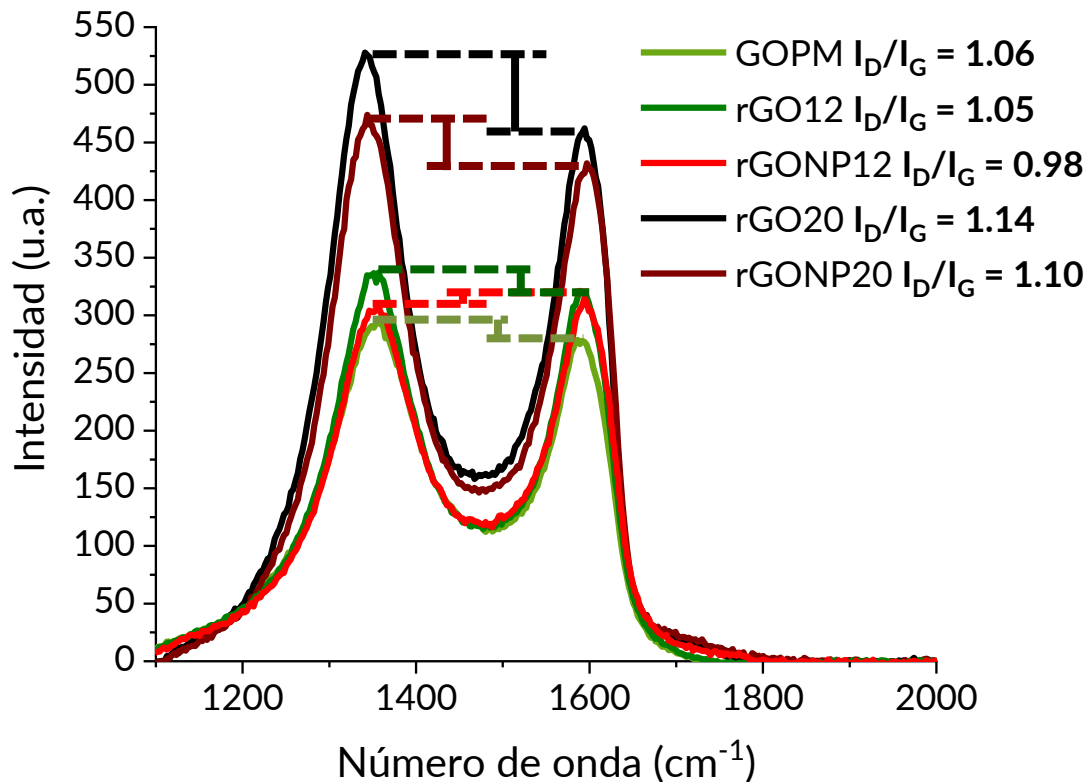


Figura 36. Espectros Raman de GOPM, rGO12, rGO20, rGONP12 y rGONP20, con el valor del cociente I_D/I_G . Estos espectros son el producto del promedio de 3 espectros medidos en diferentes lugares de la misma muestra y corrección de línea base. No se observa efecto SERS de las bandas D y G.

Tabla 12. Valores de número de onda e intensidad de las bandas D y G en los espectros Raman de la Figura 36, de los sustratos GOPM, rGO12, rGONP12, rGO20 y rGONP20.

Muestra	Banda D		Banda G	
	Máximo (cm^{-1})	Intensidad (u.a.)	Máximo (cm^{-1})	Intensidad (u.a.)
GOPM	1357	294	1592	278
rGO12	1351	337	1589	321
rGONP12	1357	308	1594	315
rGO20	1341	528	1594	462
rGONP20	1344	474	1597	432

El rGO12 y rGONP12 se redujeron levemente, por lo que las regiones sp^2 preexistentes aumentaron su tamaño, ocasionando el incremento de la intensidad de la banda G frente a la intensidad de la banda D. En cambio, la reducción intensa del rGO20 y rGONP20, generó nuevas regiones sp^2 rodeadas de defectos, incrementando la intensidad de la banda D y por lo tanto, el valor del cociente I_D/I_G . El rGONP12 y rGONP20, experimentan una menor reducción que sus contrapartes sin nanopartículas, por lo tanto, I_D/I_G es menor para esos sustratos.

7.2.5. Fluorescencia del rGO y rGONP

Los espectros de emisión del rGO12 y rGO20, muestran un comportamiento similar que los espectros Raman, en la Figura 37 se puede observar como la fluorescencia del GOPM se apaga para el rGO12 y se incrementa significativamente para el rGO20. Las intensidades de los máximos de emisión son 165697, 18364 y 805742 u.a., para el GOPM (60 ppm), rGO12 (~60 ppm) y rGO20 (~30 ppm), respectivamente, a una longitud de onda excitación de 300 nm para el rGO20 y de 302 nm para las otras dos dispersiones. La concentración del rGO20 se redujo a la mitad, porque la intensidad de la emisión era demasiado alta. A diferencia de las variaciones en la intensidad, el máximo de emisión sí presenta una tendencia clara hacia longitudes de onda menores mientras más reducido este el GO. Los máximos de emisión fueron de 550 nm para el GOPM, 436 nm para el rGO12 y 410 nm para el rGO20.

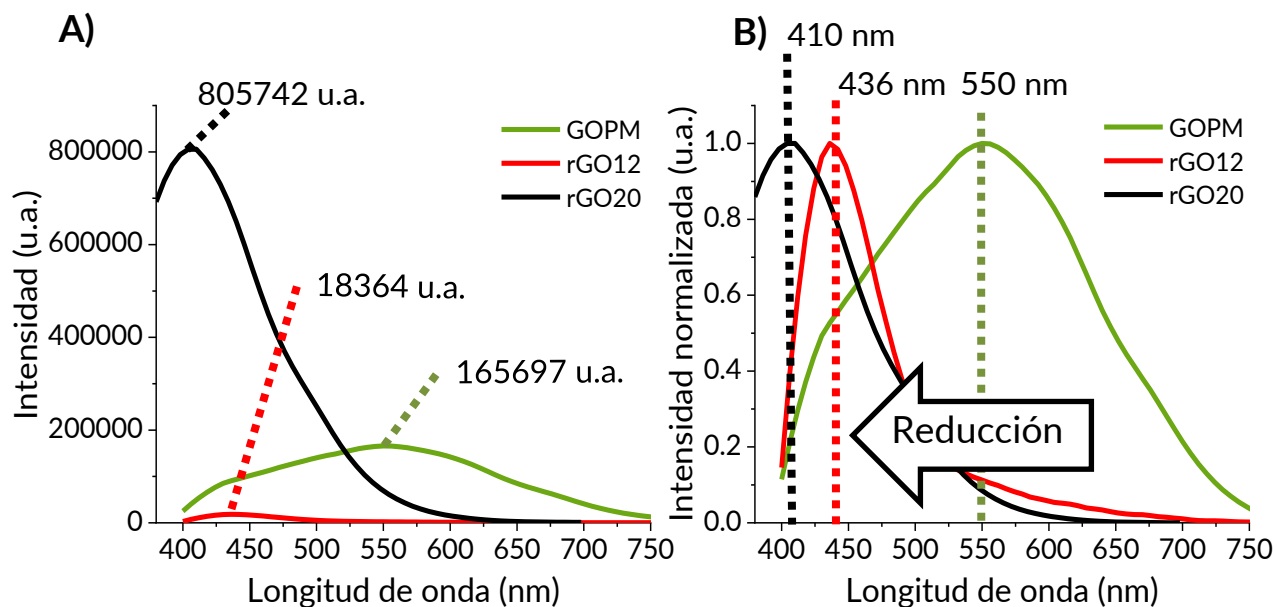


Figura 37. Espectros de emisión del GOPM, rGO12 y rGO20. A) Se observan los espectros con un suavizado Savitzky-Golay con una ventana de 10 puntos, junto con las intensidades de los máximos de emisión. B) Los espectros normalizados con las longitudes de onda de los máximos de fluorescencia, la flecha evidencia el corrimiento del máximo de emisión hacia mayores valores de energía dependiendo del grado reducción del sustrato.

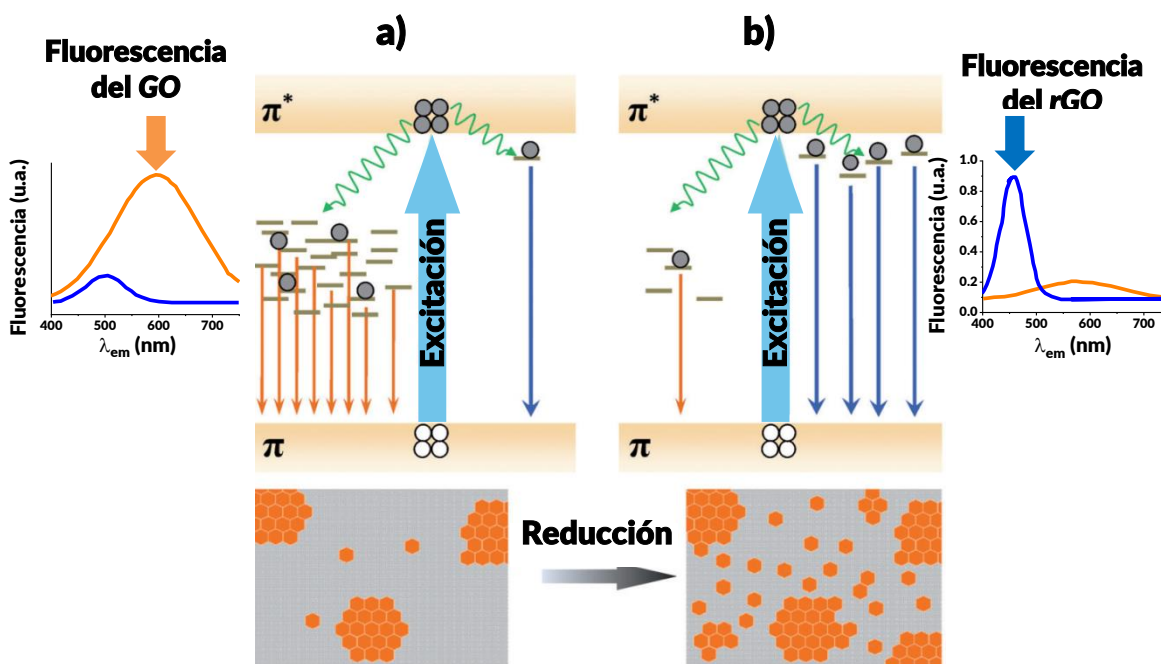


Figura 38. Mecanismo de la fluorescencia del GO (a) (naranja) y rGO (b) (azul), propuesto por Chien y colaboradores en 2012.^[75]

La fluorescencia observada para los sustratos reducidos coincide y reafirma la interpretación de sus espectros Raman, de acuerdo con la teoría del origen de la fluorescencia del GO que propone un efecto de confinamiento cuántico en las regiones de carbonos con hibridación sp^2 inmersas en una matriz de carbonos sp^3 . Las nuevas regiones sp^2 son más pequeñas que las preexistentes, a causa de eso su brecha energética es más grande al haber mayor efecto de confinamiento cuántico. El apagamiento de la emisión del GOPM a 550 nm es consecuencia del crecimiento y restauración de la red de carbonos sp^2 anteriores a la reducción, que favorece la migración de los excitones y el decaimiento no radiativo de la energía por medio de los modos vibracionales del rGO.^[26,67,75] Asimismo, las NPAu presentes en el rGONP12 y rGONP20 apagan la fluorescencia del rGO12 y rGO20, respectivamente (Figura 39).

El corrimiento hacia el azul del máximo de emisión y el aumento de la intensidad de la fluorescencia del rGO, se debe a las nuevas, pequeñas y numerosas regiones de átomos de carbono sp^2 que se forman durante la reducción. Cada una de estas nuevas regiones sp^2 emite fotones de mayor energía que las regiones preexistentes, a causa del confinamiento cuántico (Figura 38). Este comportamiento se explica con la ecuación (1), la cual describe el cálculo de la energía del problema de una partícula en una caja bidimensional de potencial. En donde la brecha de energía entre los estados de la partícula dentro de la caja (*bandgap*) es inversamente proporcional a las dimensiones de la caja.

$$E = E_x + E_y = \frac{h^2}{8m} \left(\frac{n_x^2}{a^2} + \frac{n_y^2}{b^2} \right) \quad (1)$$

En la ecuación (1), E , es la energía total, E_x y E_y , son los valores independientes de la energía en cada eje, h es la constante de Plank (6.626×10^{-34} Js), n_x y n_y , son los número cuánticos de los ejes x y y , respectivamente, m es la masa de la partícula y a y b , son el tamaño de los lados de la caja en los ejes x y y , respectivamente.

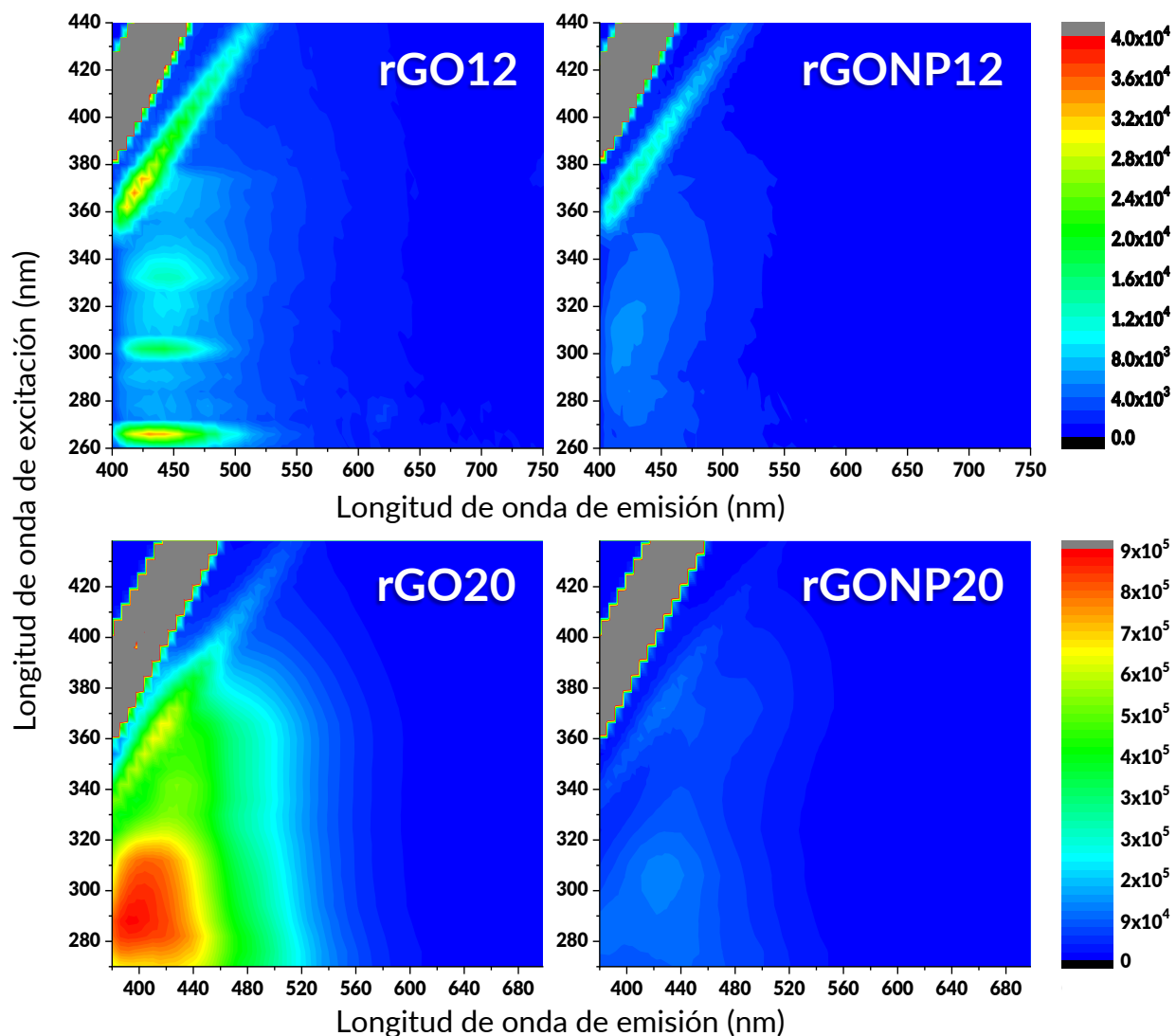


Figura 39. Apagamiento de la fluorescencia del rGO por la presencia de NPAu. A) rGO12, B) rGONP12, C) rGO20 y D) rGONP20. A) y B) $C \approx 60$ ppm, pH = 4, filtro de 399 nm y máximo de intensidad (rojo) de 40000 u.a.; C) y D) $C \approx 30$ ppm, pH = 4, filtro de 370 nm y máximo de intensidad (rojo) de 850000 u.a.

Estos resultados determinan que los mejores sustratos para apagar la fluorescencia del ácido carmínico son el rGO12 y rGONP12, ya que prácticamente no tienen fluorescencia propia y, por lo tanto, estos dos materiales (junto con el GOPM) se continuarán utilizando para estudiar la interacción de las moléculas de AC con sustratos grafénicos.

7.3. Caracterización y propiedades ópticas del AC

El ácido carmínico (Figura 40) es un polvo rojo intenso muy higroscópico, soluble en agua y fotosensible, por lo tanto, se debe almacenar en viales color ámbar. También se observó que a concentraciones mayores de 10^{-3} M puede presentar crecimiento de hongos en la disolución por la presencia de la molécula de glucosa unida a uno de los anillos aromáticos de antraquinona, razón por la cual las dispersiones de AC se almacenaron en un refrigerador después de prepararse.

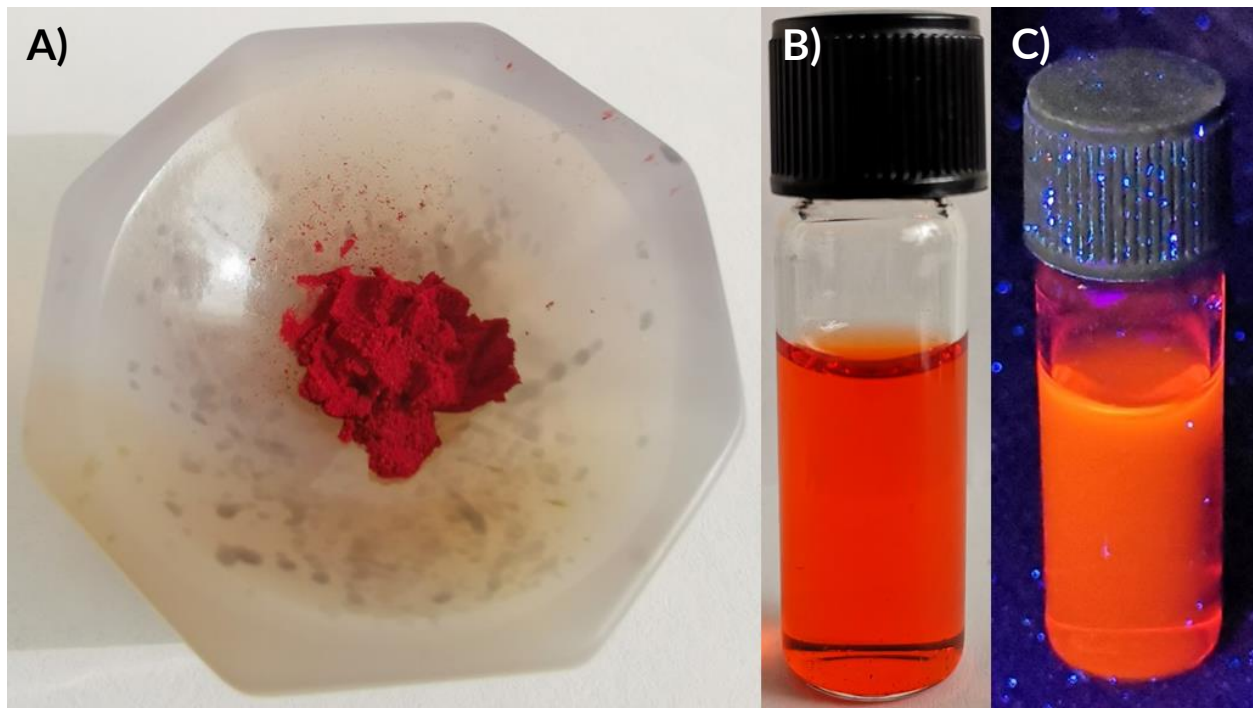


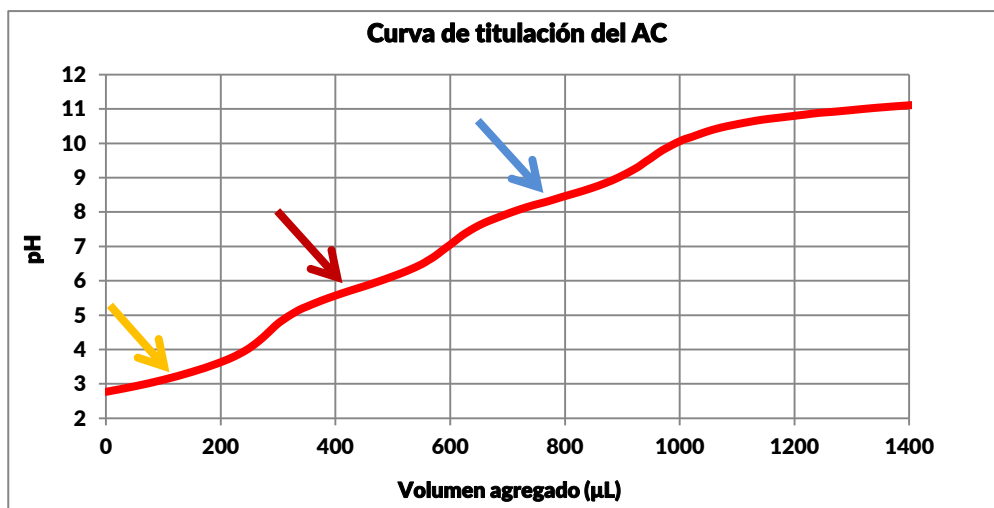
Figura 40. A) Ácido carmínico en polvo, B) AC a 10^{-3} M, pH = 4 y C) AC a 10^{-3} M, pH = 4, bajo luz UV de onda larga (380 nm).

7.3.1. Propiedades ácido-base del AC

Se realizó la titulación volumétrica ácido-base del AC, se prepararon dos disoluciones de 10 mL: una de AC a 0.01 M, $\text{pH}_{\text{inicial}} = 2.77$, y una de NaOH a 0.2452 M. El volumen agregado de la base varió desde 100 μL en las zonas tampón, hasta 10 μL , cerca de los puntos de inflexión. Se obtuvo la siguiente curva de titulación (Figura 41. A) y empleando la primera derivada se calcularon 3 valores de pK_a : $\text{pK}_{a1} = 3.35$, $\text{pK}_{a2} = 5.87$ y $\text{pK}_{a3} = 8.39$; los cuales coinciden con los publicados en la bibliografía (Tabla 13).

En la Figura 41 se presentan los átomos de hidrógenos que se separan de la molécula de AC conforme se va aumentando el pH. Los dos últimos valores de pK_a , pK_{a4} y pK_{a5} , publicados por Atabey, Sira y Al-Obaidi (2012),^[35] no se observan en la curva de titulación realizada ni en las referencias de años anteriores. Para este trabajo de investigación son irrelevantes, dado que se trabajó en medio ácido. El orden de los átomos de hidrógeno que pierde el AC de pH ácido a básico fue determinado por un cálculo de las cargas de Hückel de los átomos de oxígeno aledaños en el mismo artículo. Cada átomo de hidrógeno ácido en la estructura está indicado con un color y los números asignados a los átomos de carbono de la antraquinona también fueron obtenidos de la bibliografía.

A)



B)

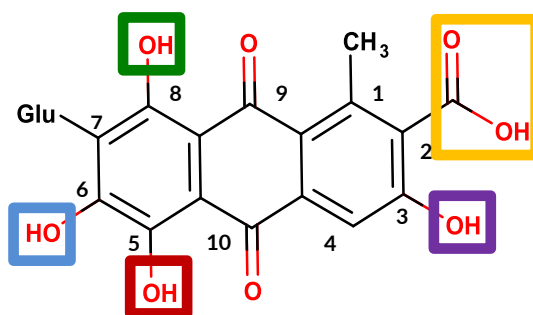


Figura 41. A) Curva de titulación ácido base obtenida y B) estructura química del AC (Glu = glucosa). La primer desprotonación está indicada en color amarillo, la segunda en rojo y la tercera en morado.

Tabla 13. Valores de pK_a calculados en este trabajo y en la bibliografía correspondiente.

pK_a	1	2	3	4	5
Grupo funcional	C ₂ -COO-H	C ₅ -O-H	C ₆ -O-H	C ₈ -O-H	C ₃ -O-H
Este trabajo	3.35	5.87	8.39	-	-
Jørgensen y Skibsted (1991) ^[41]	2.81	5.43	8.10	-	-
Reyes-Salas et al. (2011) ^[109]	3.42	5.55	8.25	-	-
Atabey, Sari y Al-Obaidi (2012) ^[35]	3.39	5.78	8.35	10.27	11.51

El AC puede ser utilizado como indicador ácido-base en titulaciones por los cambios de color que presenta a diferentes valores de pH (Figura 44). Estos cambios se deben a la modificación del espectro de absorción electrónica que ocasionan las diferentes especies químicas desprotonadas presentes en la disolución. El color de la disolución es el color complementario del color absorbido. A continuación se presenta el seguimiento de la absorción electrónica del AC a diferentes valores de pH.

7.3.2. Espectroscopía de absorción electrónica en la región UV-Vis-NIR y fluorescencia del AC y el pH

Para conocer el comportamiento de las propiedades ópticas del AC y su relación con el pH, se prepararon 8 disoluciones a valores de pH = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 10; a concentración 0.005 mM (5×10^{-6} M) y volumen de 10 mL. El procedimiento experimental para la elaboración de estas disoluciones se basó en la información suplementaria de un artículo de Liu *et al.* (2017)^[110] y se encuentra descrito en el Anexo II. Los resultados de la absorción electrónica en la región UV-Vis-NIR se exhiben en la Figura 42, también la estructura del AC y un diagrama modificado de las curvas de distribución de las especies químicas desprotonadas del AC publicado por Atabey, Sari y Al-Obaidi (2012) se muestra en la Figura 43,^[35] las líneas de guiones marcan los valores de pH 4 y 5, con los colores naranja y rojo, respectivamente. En los espectros de absorción se nota que el mayor cambio al espectro sucede entre los valores de pH, 4 y 5. Para entender lo que sucede entre los valores de pH = 4 y 5, se debe analizar las especies que se encuentran en disolución en ambos valores de pH. Según las curvas de distribución de especies en un valor de pH = 4, la especie predominante es $(LH_4)^-$ en un 80 - 90 %, junto con el AC totalmente protonado, LH_5 , en un 10-20 %. La diferencia en la forma del espectro de absorción del AC a valor de pH ≤ 4 no es significativa, por lo tanto, se prueba que la pérdida del ion H^+ del ácido carboxílico no ocasiona ningún cambio espectroscópico. No obstante, la pérdida del segundo ion hidronio sí genera una modificación significativa en el espectro, ya que en valor de pH = 5, aunque la especie

$(LH_4)^-$ se encuentra en mayor proporción, ~ 90 %, la contribución de $(LH_3)^{2-}$, ~ 10 %, desplaza el máximo de absorción (λ_{abs}) hacia menor energía, de 496 nm a 532 nm.

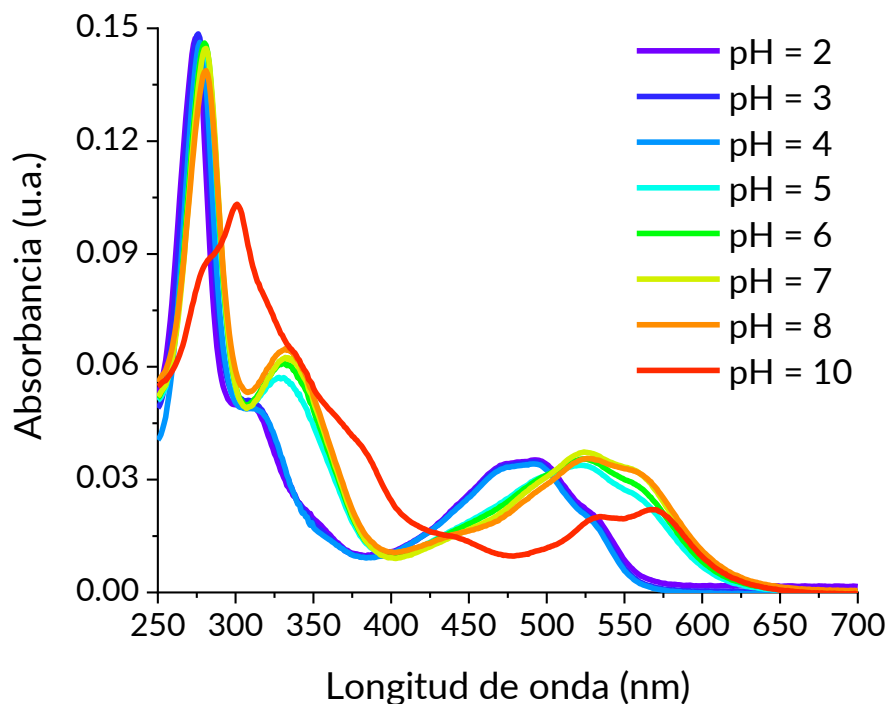


Figura 42. Espectros de absorción electrónica en la región UV-Vis-NIR de disoluciones de AC con $C = 0.005 \text{ mM}$ y $\text{pH} = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8$ y 10 .

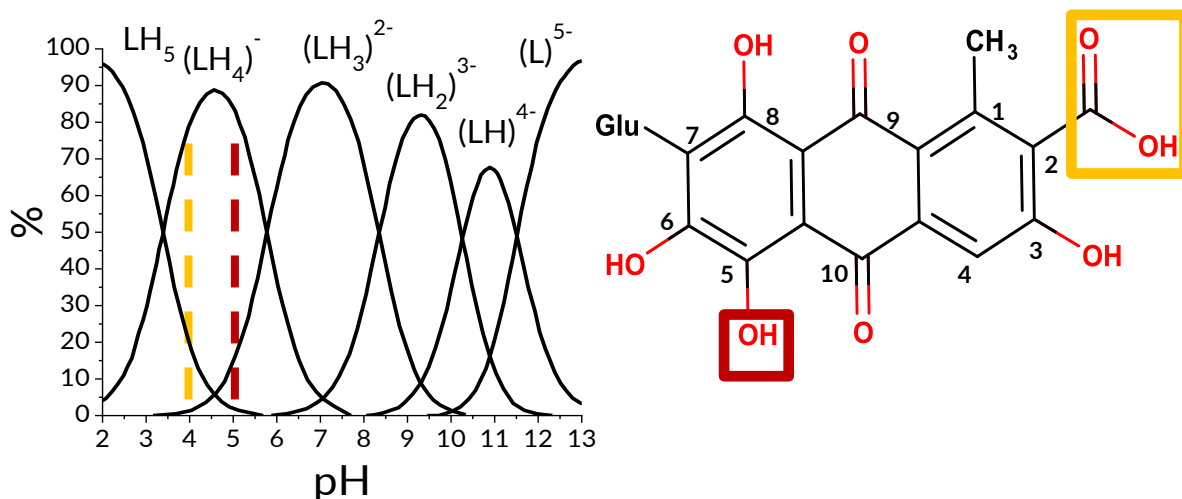


Figura 43. Curvas de distribución de especies publicadas por Atabey, Sari y Al-Obaidi (2012),^[35] la línea de guiones naranja marca el valor de $\text{pH} = 4$, y la roja el valor de $\text{pH} = 5$. A la derecha se presenta la estructura del AC, el recuadro amarillo indica el primer grupo en desprotonarse y el rojo el segundo, especies $(LH_4)^-$ y $(LH_3)^{2-}$.

En un valor de pH = 4, el espectro de absorción electrónica en la región UV-Vis-NIR, presenta seis señales de absorción características del ácido completamente protonado y la especie monodesprotonada, la primera desprotonación no puede ser detectada por métodos espectroscópicos.^[39] La transición más energética $S_0 \rightarrow S_4$ se observó a 226 nm (44248 cm^{-1}), la segunda transición $S_0 \rightarrow S_3$ es la más intensa a 278 nm (35971 cm^{-1}), la transición al estado excitado S_2 se ve como un hombro a 319 nm (31348 cm^{-1}) y por último, la transición de menor energía $S_0 \rightarrow S_1$, tiene su máximo localizado en 496 nm (20121 cm^{-1}), pero presenta 2 contribuciones en 470 y 532 nm, todas son del tipo $\pi \rightarrow \pi^*$.^[111,112] Esta señal es la que ha atraído mayor interés durante las últimas 3 décadas por su alta sensibilidad al microambiente químico en el que se encuentre el AC. Esta transición es atribuida a los dobles enlaces conjugados de los 3 anillos de la antraquinona, pero la presencia de grupos donadores de densidad electrónica (-OH) y una contribución sustancial de una transferencia de carga (TC), provocan el corrimiento de esta señal hasta la región del visible en el espectro electromagnético y le otorga el color al AC. La TC acoplada con esta transición electrónica involucra la donación de un electrón de los grupos fenólicos 5 y 8 a los carbonilos quinoideos 9 y 10, respectivamente.^[112-114]

El corrimiento que se obtiene de la transición $S_0 \rightarrow S_1$ al aumentar el valor de pH de 4 a 5, se debe a que la desprotonación del $C_5\text{-OH}$ favorece la TC, decreciendo la brecha energética entre los niveles *HOMO* y *LUMO*. De hecho, se ha corroborado que los potenciales redox de la quinona y el catecol son altamente dependientes al estado de protonación del AC.^[110] Además, la coordinación con distintos cationes metálicos causa el mismo efecto en el espectro porque M^+ atrae densidad electrónica del grupo cetónico unido al metal y aumenta su carácter de aceptor de electrones.^[112] Las desprotonaciones subsecuentes incrementan el desplazamiento al rojo del máximo de absorción (de 492 nm en valor de pH = 2 hasta 567 nm en valor de pH = 10) y la intensidad de la absorción por las mismas razones. Sin embargo, existe una reacción de fotodegradación del anillo catalizada en medio básico, por lo tanto, toda la absorbancia disminuye a valores de pH altos. El punto isobéptico se encontró localizado en 503 nm en el intervalo de valores de pH de 2 - 8 (Figura 44).^[110]

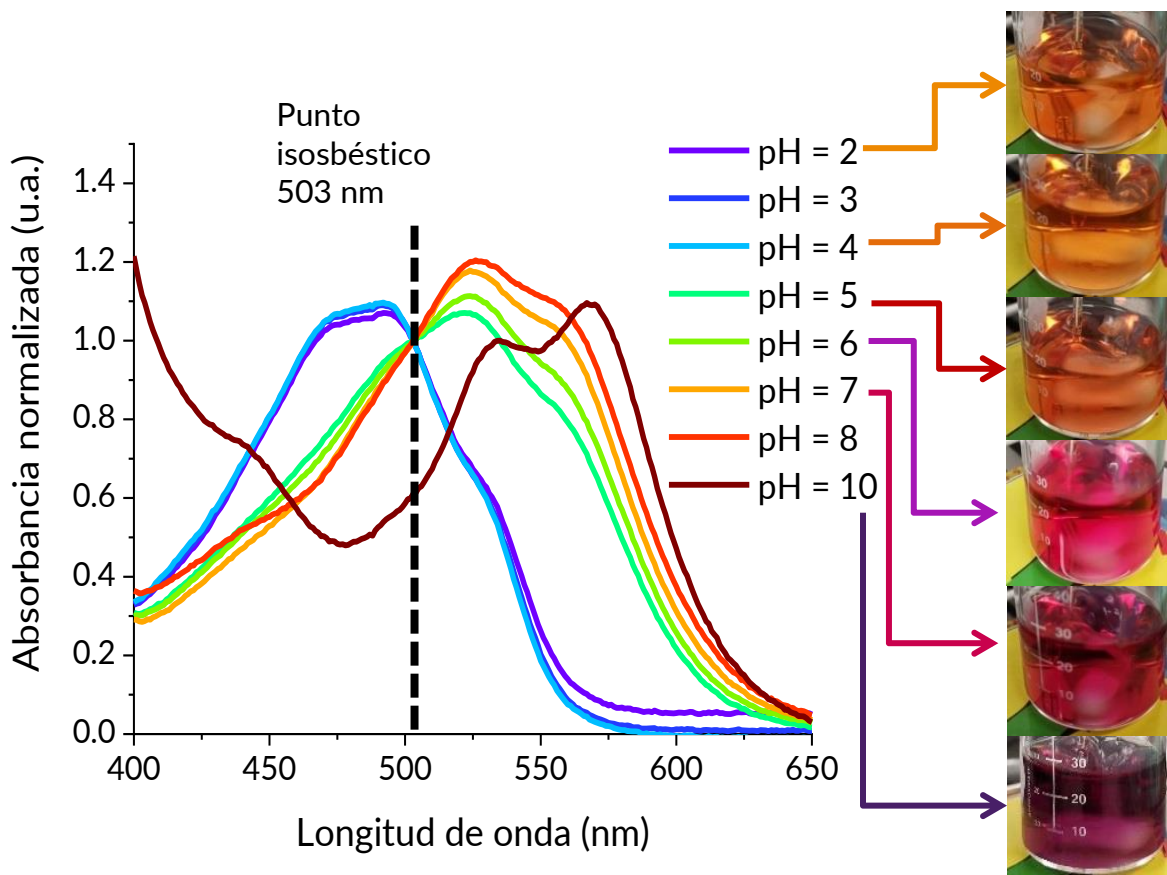


Figura 44. Transición $S_0 \rightarrow S_1$ en el espectro de absorción del AC. Los espectros de absorción electrónica tomados en valores de pH = 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 se normalizaron en el punto isobéptico (503 nm) por cuestiones de presentación. Adicionalmente, se presentan los colores observados de las disoluciones al valor de pH correspondiente.

El AC, presenta un valor intenso de luminiscencia en 586 nm (17064 cm^{-1}), este máximo de emisión (λ_{em}) no es tan dependiente del pH como la señal $\lambda_{abs} = 496 \text{ nm}$, aunque existe un corrimiento al azul de alrededor de 5 nm para el AC a pH = 8. A pH = 10, la emisión se desplaza a mayor energía (428 nm, 23364 cm^{-1}) por la cuarta desprotonación del AC (C_8-OH). La emisión del AC, $\lambda_{em} = 585 \text{ nm}$, se debe a la fluorescencia asignada a $S_1 \rightarrow S_0$, esto se sabe por el traslape de la señal de emisión con la de absorción en aproximadamente 540 nm (18519 cm^{-1}).^[112] Se ha propuesto un mecanismo que involucra una transferencia de protón intramolecular en el estado excitado (*ESIPT*, por sus siglas en inglés *excited state intramolecular proton transfer*).^[46] Cho et al. (2004)^[114]

observaron este fenómeno para la 1-hidroxi-9,10-antraquinona, sin embargo, Palik *et al.* (1990)^[113] ya habían publicado que para la 1,4-dihidroxi-9,10-antraquinona este fenómeno no se presenta, porque los dos anillos semiaromáticos que se forman a través de los puentes de hidrógeno entre los hidróxidos fenólicos y las cetonas quinoides disminuyen aún más la energía del estado basal del AC en comparación con el tautómero ceto-enólico, inhibiendo la *ESIPT*. La estructura del AC es de tipo 1,4, ya que tiene dos fenoles en las posiciones inmediatas a los C=O (5,8 en el AC) y los hidróxidos se encuentran en posición *para*-, uno respecto al otro, además, la *ESIPT* se caracteriza por una emisión doble en el espectro porque el estado basal del tautómero ceto-enólico que se forma después es mayor en energía y acorta la energía de la transición electrónica radiativa, sin embargo, no se observa en valor de pH = 4.

La magnitud de la intensidad del máximo de fluorescencia cambia con respecto al pH. La disminución de la intensidad de la fluorescencia en valores de pH neutros y alcalinos se explica porque la reducción de la brecha energética, *HOMO* - *LUMO*, favorece el decaimiento de la energía por conversión interna, principalmente por vibraciones de los puentes de hidrógeno intramoleculares. Pero se ha propuesto que para la especie (LH)⁴⁻ la falta de puentes de hidrógeno intramoleculares causa la población del triplete T₁ que provoca la oxidación del AC y el rompimiento del anillo de antraquinona.^[41,110]

La intensidad máxima se observa en un valor de pH = 4 y $\lambda_{exc} = 275$ nm (Figura 45), por esa razón se eligió ese valor de pH y esa longitud de onda de excitación para los experimentos de apagamiento de la fluorescencia. La concentración 5×10^{-6} M se eligió a partir de comparar el espectro de excitación con el espectro de absorción a diferentes concentraciones. Se ha visto que a concentraciones altas los fragmentos hidrofóbicos del AC se aglomeran en dímeros por interacciones $\pi - \pi$ que apagan la fluorescencia de la molécula. La especie LH₅ es la más propensa a dimerizarse, por lo tanto, se explica el apagamiento de la fluorescencia en las muestras más ácidas (pH = 2 y 3).^[111]

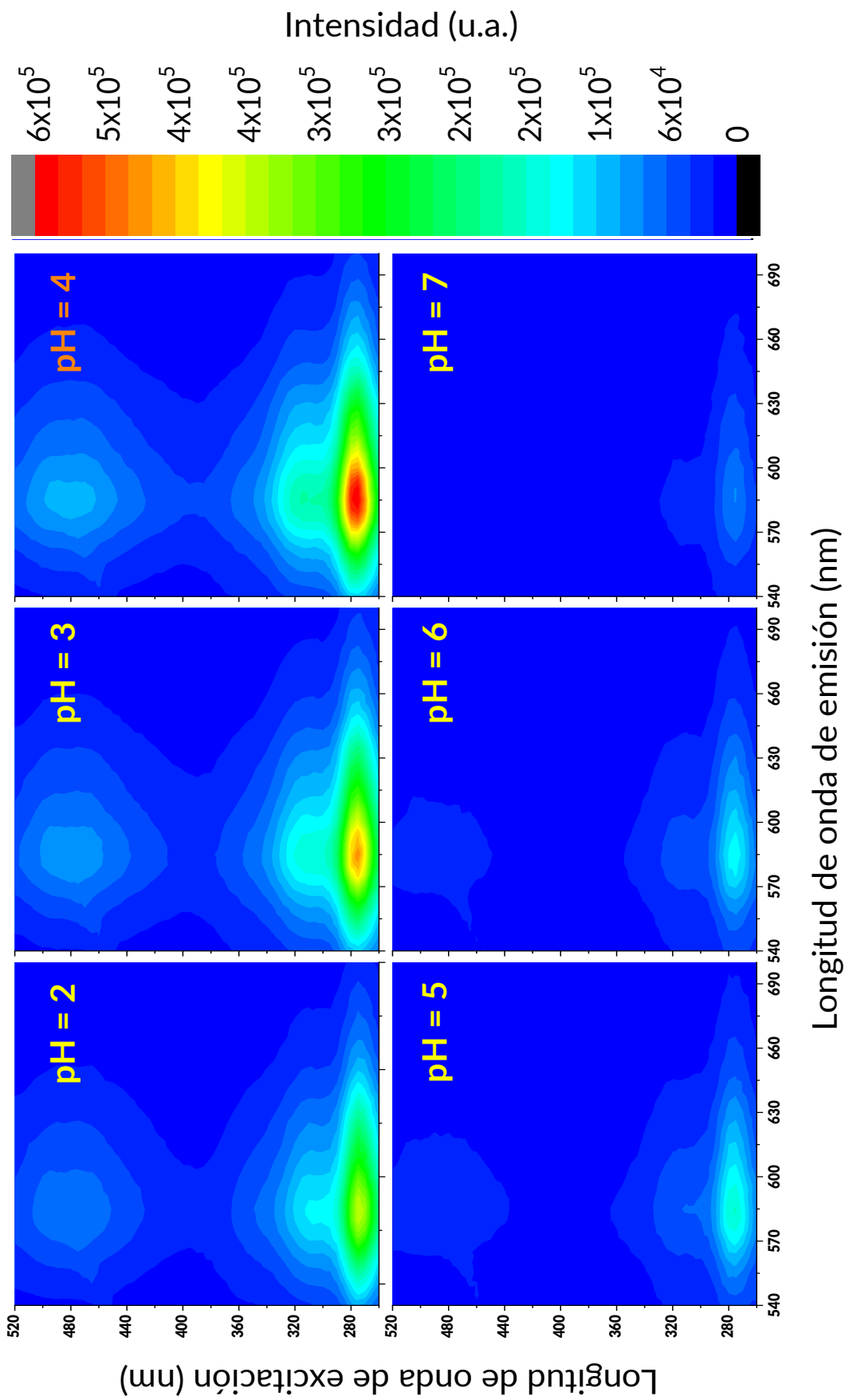


Figura 45. Mapas de fluorescencia 3D del AC, con una concentración de 5×10^{-6} M y valores de pH = 2, 3, 4, 5, 6 y 7.

7.3.3. Espectroscopía Raman del AC

La intensa fluorescencia del AC interfiere con las señales Raman, ya que se ve como una señal intensa y muy ancha en el espectro. La energía del láser de 532 nm es absorbido de manera considerable por las muestras de AC y a esa λ_{exc} la emisión se detecta en 586 nm, el desplazamiento de Stokes en este caso es de 1732 cm^{-1} , por lo tanto, la fluorescencia cubre la región donde se encuentran las señales características del AC (Figura 46).

No se encontraron espectros Raman de AC en estado sólido o disolución con láseres con valores de $\lambda = 514.5, 532$ y 632.8 nm .^[115] Diferentes sustratos y longitudes de onda del láser (785 y 1064 nm) se han utilizado para observar las señales del AC.^[5,6,16,36,86-94,116]

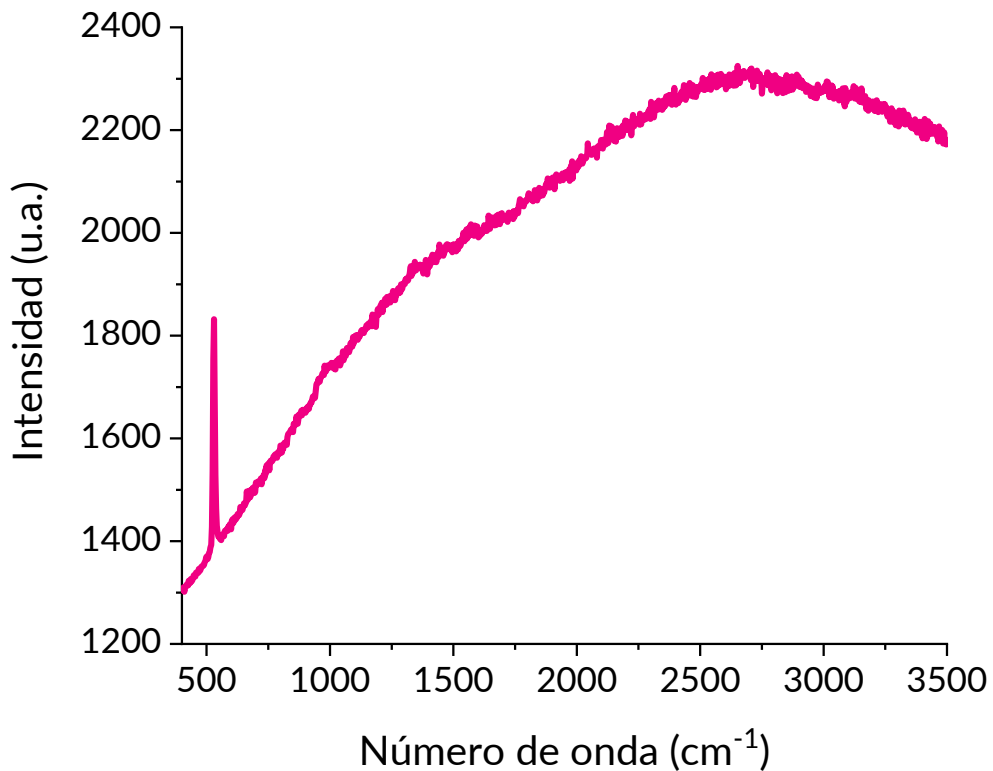


Figura 46. Espectro Raman del AC a 10^{-5} M depositado sobre Si, se utilizó el láser de 532 nm con potencia de $118\text{ }\mu\text{W}$, tiempo de integración de 1 s y entre 25 acumulaciones.

7.4. Interacción del AC y los sustratos grafénicos

Las interacciones del AC con los sustratos grafénicos sintetizados se estudiaron a través de las técnicas espectroscópicas de fluorescencia y Raman. A continuación se presentan los resultados obtenidos.

7.4.1. Apagamiento de la fluorescencia del AC en dispersiones acuosas de sustratos grafénicos

Con base en los resultados de fluorescencia de los sustratos grafénicos y el AC, se decidió realizar el seguimiento del apagamiento de la fluorescencia con el GOPM, rGO12 y rGONP12. Las condiciones con las que se realizaron estas pruebas se encuentran descritas en la sección 6.6.

Se observó que estos 3 sustratos apagan la fluorescencia eficientemente, el mayor apagamiento se observó para rGONP12 (Figura 47), seguido de rGO12 y GOPM, estos resultados coinciden con la fluorescencia intrínseca de los sustratos, el GOPM presenta la mayor fluorescencia y el rGONP12 la menor. En los espectros de absorción electrónica en la región del UV de cada muestra, no se exhiben desplazamientos en las señales del AC, ni de los sustratos. Por esta razón se propone que el apagamiento del AC con GOPM y rGO12 se debe al apilamiento $\pi - \pi$ del anillo de antraquinona en las regiones con hibridación sp^2 de estos sustratos, ya que una TC entre el GO o el rGO y el AC ocasionaría un desplazamiento en las señales de absorción. La interacción $\pi - \pi$ del AC y los sustratos favorece caminos no radiativos de decaimiento de los estados excitados por vibraciones de los anillos aromáticos, similarmente a lo que sucede con el dímero no fluorescente del AC en agua.^[111] Los grupos oxigenados del GO interactúan con la molécula a través de puentes de hidrógeno, esta interacción no provoca el apagamiento de la fluorescencia, por lo que el GOPM no apaga la fluorescencia tan eficientemente como el rGO12. Las NPAu de oro también apagan eficientemente la fluorescencia de las moléculas AC adsorbidas en su superficie, ya que se encontró un mayor apagamiento de la fluorescencia para el rGONP12 que para el rGO12. Esto sucede porque existen procesos de transferencia de energía no radiativos del cromóforo (donador) a las NPAu

(aceptor), debido al acoplamiento electromagnético entre un dipolo emisor donador (AC) y una superficie dipolar aceptora (NPAu).^[124] Los cuales son favorecidos por el traslape de las señales de emisión del donado ($\lambda_{em} = 586 \text{ nm}$) y la señal de absorción del aceptor ($\lambda_{abs} = 542 \text{ nm}$). Además, la adición de las nanopartículas previene el apilamiento de las láminas de rGO, por lo tanto, el área superficial del rGONP12, es mayor que la del rGO12, en esas condiciones.

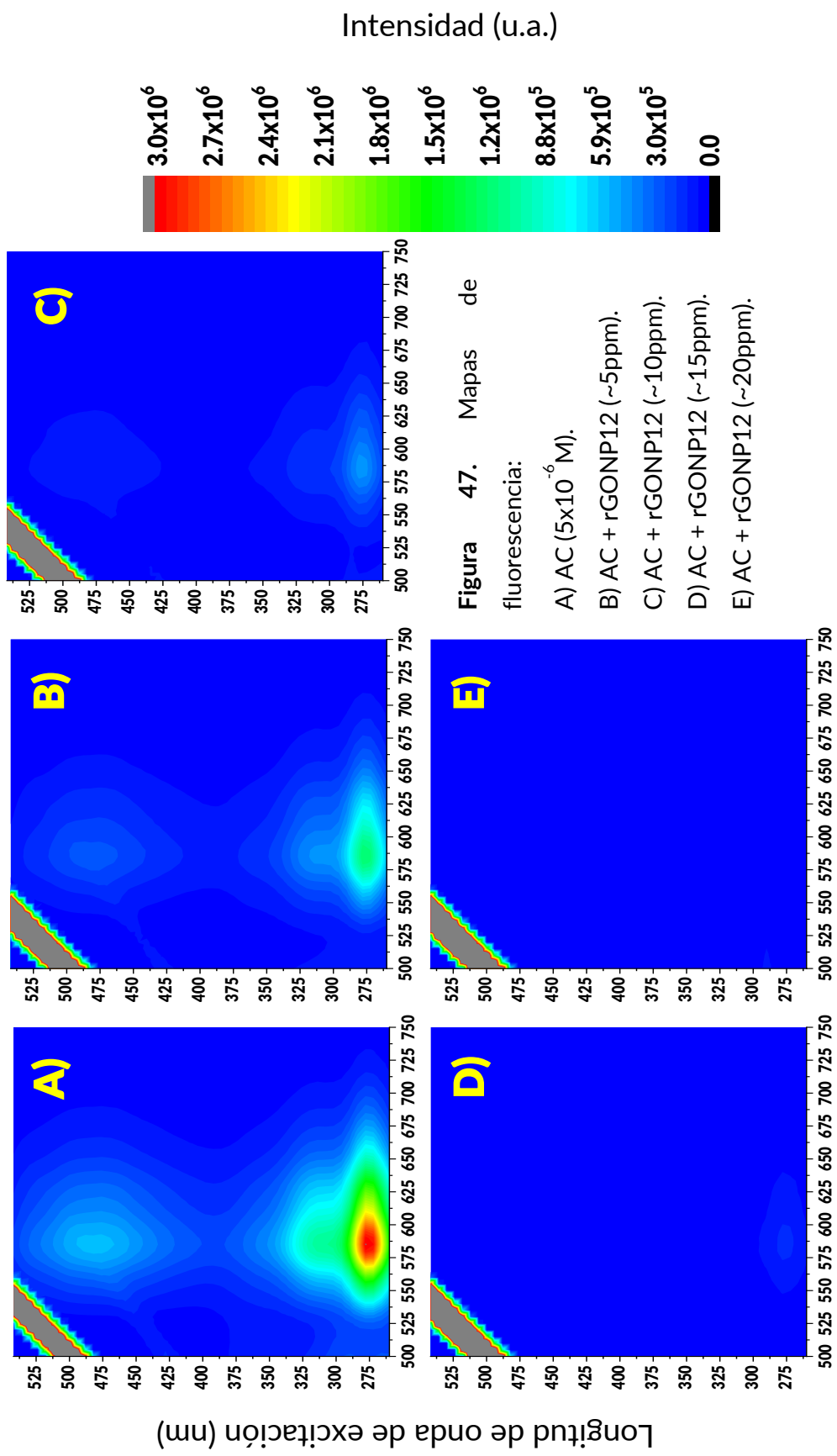
Para evaluar cuantitativamente el apagamiento de la fluorescencia por los 3 sustratos se realizó una corrección a la intensidad en el máximo de fluorescencia por el efecto del filtro interno, es decir, la absorción de los fotones de excitación y los fotones emitidos por el AC en la dispersión. Para este cálculo se tomó la ecuación (2) de una publicación de Li *et al.* (2012),^[63] en donde ellos miden el apagamiento de la fluorescencia de diferentes aminoácidos por el GO.

$$F_{obs} = F_{corr} \times 10^{-\frac{A_{exc} \times d_{exc}}{2} - \frac{A_{em} \times d_{em}}{2}} \quad (2)$$

Donde F_{obs} es la intensidad de fluorescencia observada, A_{exc} y A_{em} son las absorbancias del sustrato a la concentración de la muestra en λ_{exc} y λ_{em} , respectivamente, y $d_{exc} = d_{em} = 0.5 \text{ cm}$, son el paso óptico de la luz en un modelo sencillo con la configuración del equipo a 90° . Las respuestas de la absorbancia en los valores de $\lambda_{exc} = 275 \text{ nm}$ y $\lambda_{em} = 586 \text{ nm}$, a las concentraciones de ~ 5 , ~ 10 , ~ 15 , ~ 20 , ~ 25 y $\sim 30 \text{ ppm}$, se calcularon a partir del espectro de absorción de cada sustrato solo en dispersión con base en la ley de Lambert y Beer, ya que la absorción del AC con concentración de $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ es despreciable frente a la absorción de los sustratos a esas concentraciones (~ 5 a $\sim 30 \text{ ppm}$). Despejando F_{corr} de la ecuación (2) se obtiene la ecuación (3):

$$F_{corr} = F_{obs} \times 10^{\frac{A_{exc} + A_{em}}{4}} \quad (2)$$

De esta manera, se puede asegurar que el AC sufre un apagamiento con el GOPM, rGO12 y rGONP12, y no solamente se debe al efecto del filtro interno. En la Figura 48, se muestran los espectros de fluorescencia sin corregir de las diferentes muestras. Con los resultados de F_{corr} se trazaron las gráficas de la Figura 49, en porcentaje, tomando el máximo de emisión del AC sin sustrato como el 100 %.



Longitud de onda de emisión (nm)

Longitud de onda de excitación (nm)

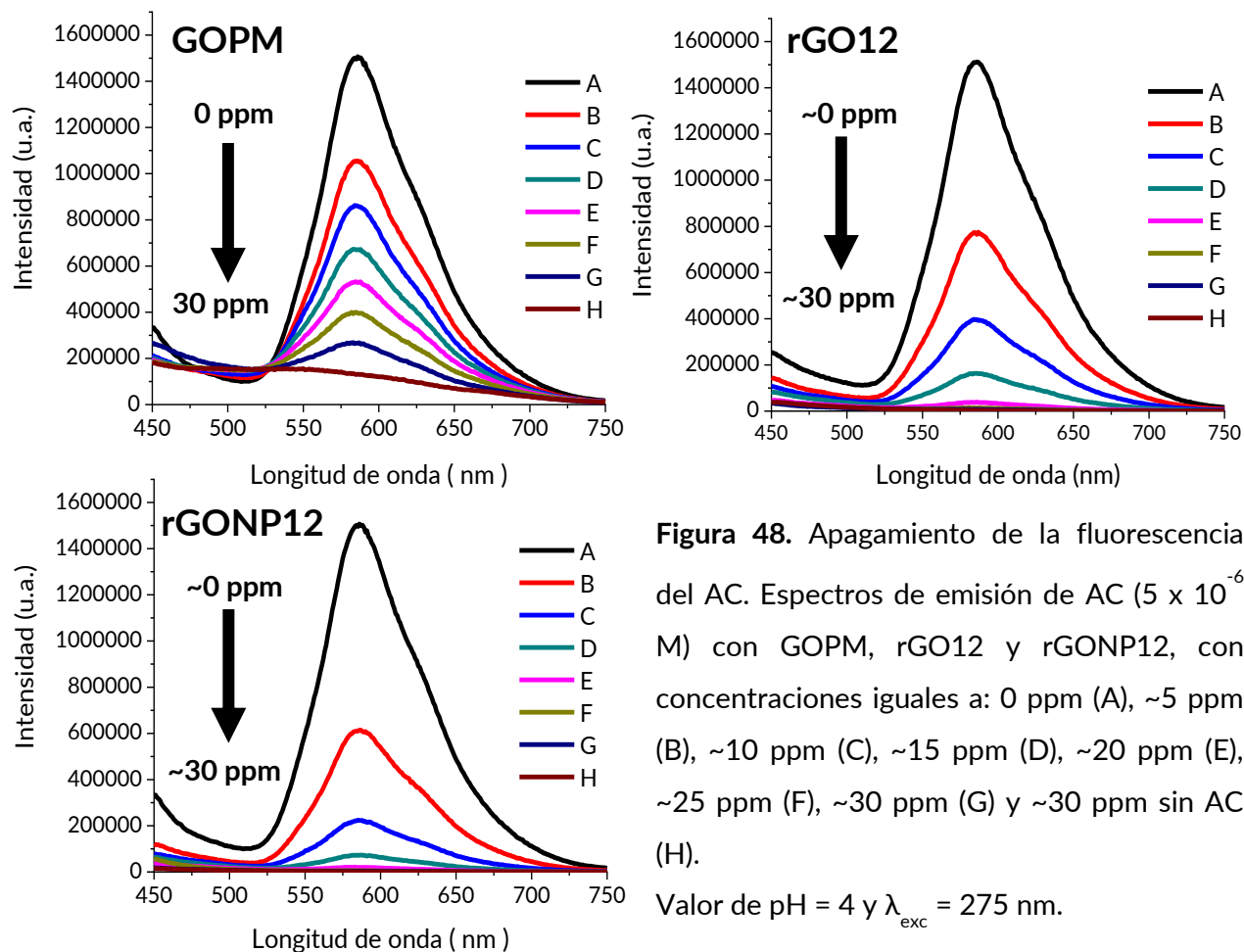


Figura 48. Apagamiento de la fluorescencia del AC. Espectros de emisión de AC (5×10^{-6} M) con GOPM, rGO12 y rGONP12, con concentraciones iguales a: 0 ppm (A), ~5 ppm (B), ~10 ppm (C), ~15 ppm (D), ~20 ppm (E), ~25 ppm (F), ~30 ppm (G) y ~30 ppm sin AC (H). Valor de pH = 4 y $\lambda_{exc} = 275$ nm.

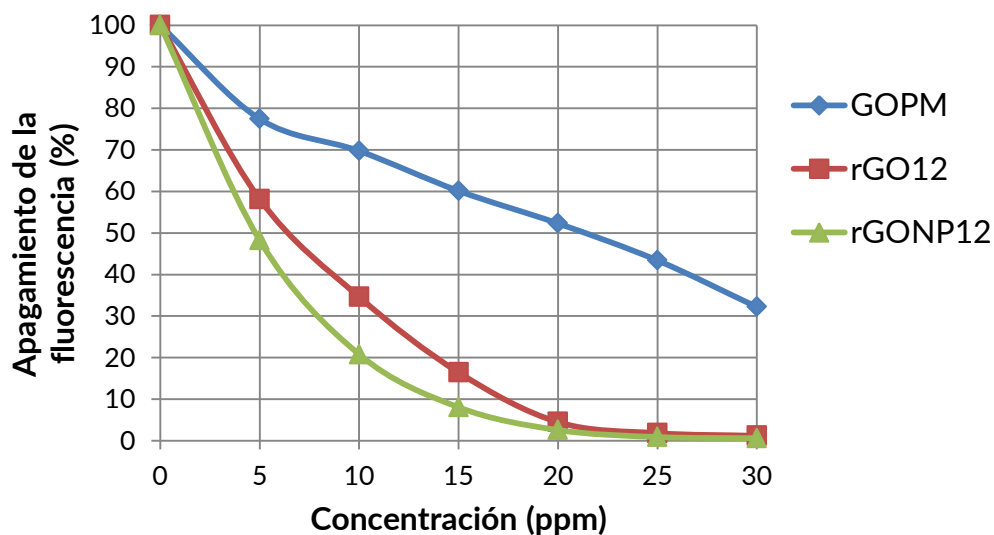


Figura 49. Apagamiento de la fluorescencia corregida (F_{corr}) del AC con los 3 diferentes sustratos (GOPM, rGO12 y rGONP12), en porcentaje.

7.4.2. Espectroscopía Raman del AC sobre sustratos grafénicos

Se midieron los espectros Raman con el láser con $\lambda = 532$ nm del AC sobre los sustratos: rGONP20, rGO20, NPAu, rGONP12, rGO12 y GOPM. Como se mencionó previamente, las moléculas de AC pueden absorber la luz del láser y emitirla a mayores longitudes de onda, por eso en todos los casos se observa fluorescencia (Figura 50). No obstante, la interacción del AC con los sustratos permite ver las señales Raman del AC. Los espectros Raman fueron tomados de 2 gotas de $10 \mu\text{L}$ sobre una oblea de SiO_2/Si , la primera de los sustratos: rGONP20 (~ 30 ppm), rGO20 (~ 10 ppm), NPAu (~ 23 ppm), rGONP12 (~ 10 ppm), rGO12 (~ 20 ppm) y GOPM (70 ppm), y la segunda de ácido carmínico a 10^{-5} M depositadas sobre Si. Para ninguno de estos sustratos fue posible observar las señales del AC a menores concentraciones.

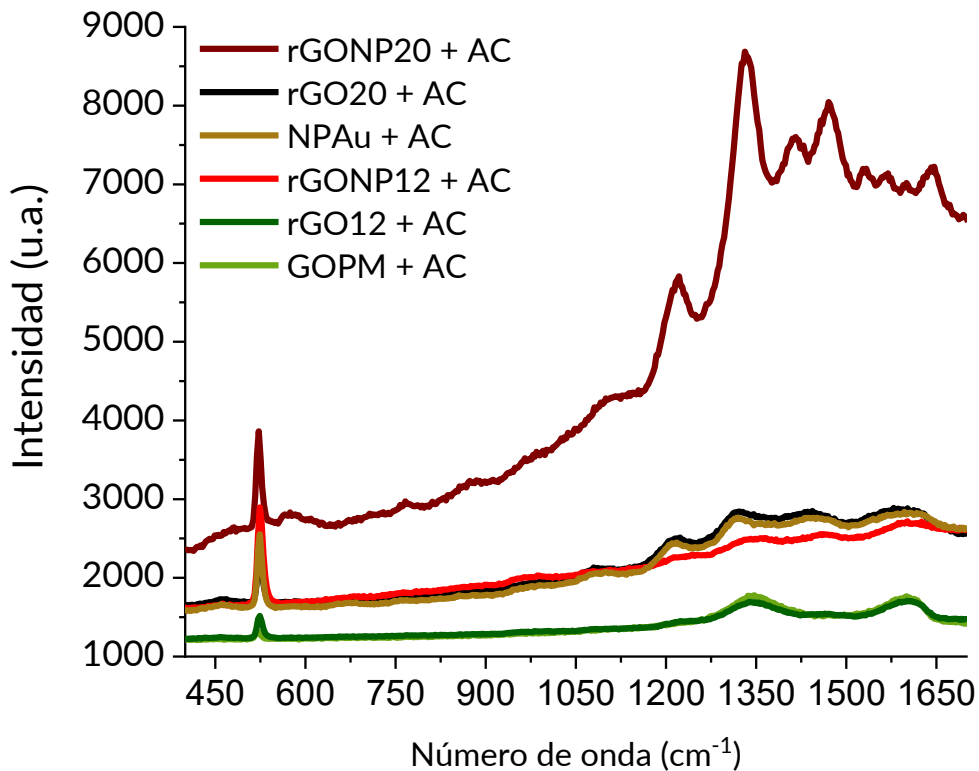


Figura 50. Espectros Raman de los sustratos + AC (10^{-5} M) sin ningún tratamiento de datos. Todas las muestras fueron depositadas en obleas de Si, se utilizó el láser con $\lambda = 532$ nm con potencia de $118 \mu\text{W}$, tiempos de integración de 1 s y entre 10 y 25 acumulaciones.

Para realizar un mejor análisis de los espectros Raman se hizo una corrección de línea base y un suavizado Savitzky-Golay (ventana de 9 puntos) a los 6 espectros (Figura 51). El rGONP20 es el sustrato que ocasionó una mayor amplificación *SERS* de las señales Raman del AC y menor interferencia de las bandas D y G del GO y rGO (Figura 51). Además, se dividieron los espectros Raman en 2 regiones, la intensidad de las señales en la región de menor energía (400-1200 cm^{-1}) es inferior a la intensidad de las señales en la región de mayor energía (1200-1700 cm^{-1}). Este fenómeno fue observado primero por Lofrumento *et al.* (2012),^[92] ellos compararon los espectros obtenidos con láseres con $\lambda = 785$ y 514.5 nm, y concluyeron que la excitación con el láser de menor longitud de onda intensifica las señales de mayor número de onda en el espectro *SERS* del AC, a causa del efecto RR por la similitud en energía del láser y los estados excitados del AC. Es importante mencionar que debido a la estructura del ácido carmínico y el sustituyente de glucosa, muchas de las señales en el espectro Raman son el resultado de la adición de múltiples modos vibracionales.

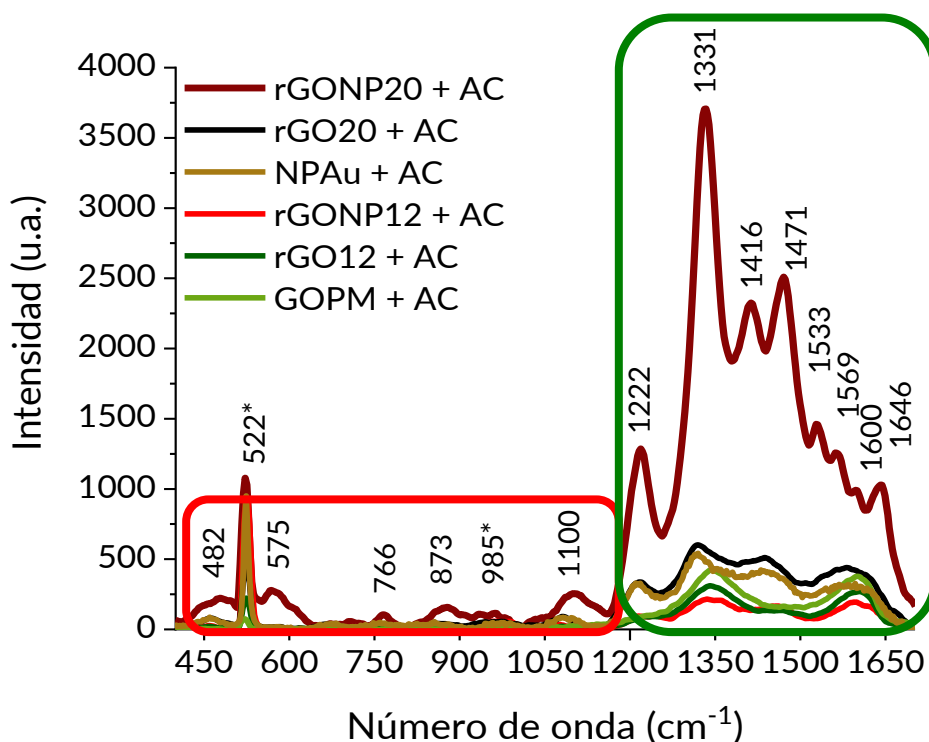


Figura 51. Número de onda de las señales del espectro SERS (láser de 532 nm) del AC (10^{-5} M) depositado sobre rGONP20 (~30 ppm) en Si. También se muestran los espectros obtenidos para el AC sobre Si y sobre los otros 5 sustratos. La región de menor energía (400 – 1200 cm^{-1}) se muestra con el recuadro rojo y la de mayor energía (1200 – 1700 cm^{-1}) con el verde. Se realizó una corrección de línea base y un suavizado Savitzky-Golay con una ventana de 9 puntos y orden polinomial de 2. *Señales del Si.

En este espectro las señales de menor energía se encuentran en 482, 522 y 575 cm^{-1} , la segunda señal es característica del Si y las otras dos se asignan a las vibraciones del esqueleto de C del AC (Figura 52).^[36,86] Una señal muy débil a 766 cm^{-1} es asignada a deformaciones fuera del plano de los enlaces C-H y O-H de los sustituyentes del anillo de antraquinona ($\gamma\text{C-H}$ y $\gamma\text{O-H}$).^[117] A 873 cm^{-1} se presenta una señal de intensidad baja asociada a la deformación en el plano de los enlaces C-C-C ($\delta\text{C-C-C}$) del cromóforo,^[36,86] también se ha asignado la señal a 985 cm^{-1} a esta vibración, sin embargo, a ese número de onda se presenta otra señal característica del Si (978 cm^{-1}) y a causa de la baja intensidad reportada para esta señal del AC, se asignó al Si en todos los casos. A 1100

cm^{-1} se presentan las vibraciones de estiramiento de los enlaces C-C y C-O de la glucosa ($\nu_{\text{GluC-C}}$ y $\nu_{\text{GluC-O}}$) (Tabla 14).^[93,94]

Tabla 14. Asignaciones principales de las señales encontradas en la región de menor energía de los espectros Raman (láser de 532 nm) de AC 10^{-5} M con rGONP20, rGO20, NPAu, rGONP12, rGO12 y GOPM. Los números están en unidades de cm^{-1} .

rGONP20	rGO20	NPAu	rGONP12	rGO12	GOPM	Asignación
482	469	460	463	460	-	Esqueleto de C ^[36,86]
522	524	524	524	524	520	Si
575	582	-	-	-	-	Esqueleto de C ^[36,86]
-	666	682	680	-	-	γ (C-C-C), γ_{Glu} (C-H) y γ_{Glu} (COH)
766	765	760	762	-	-	γ C-H y γ O-H ^[117]
873	861	856	-	-	-	δ C-C-C ^[36,86]
1100	1080	1099	1080	1082	-	$\nu_{\text{GluC-C}}$ y $\nu_{\text{GluC-O}}$ ^[93,94]

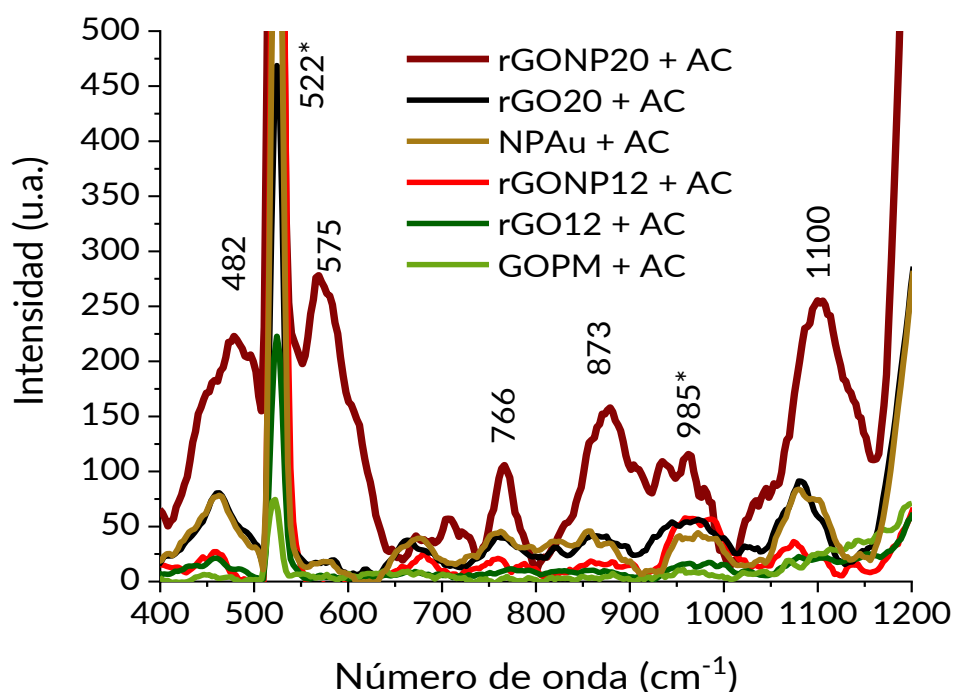


Figura 52. Región del espectro de menor energía y menor amplificación de las señales Raman del AC con los sustratos nanoestructurados. Número de onda de las señales del rGONP20 + AC.
*Señales del Si.

La primera señal en la región de mayor intensidad y energía (1200-1700 cm^{-1}) se observa en la Figura 53, localizada en 1222 cm^{-1} , y se debe a la adición de las vibraciones en el plano del C_5OH y C_4H ($\delta\text{C}_5\text{-OH}$ y $\delta\text{C}_4\text{-H}$), así como al estiramiento de los enlaces de los anillos C-C (ν_{anillo}).^[36,117] La señal a 1331 cm^{-1} es la más intensa, existen diversas vibraciones relacionadas con esta señal. Cañamares *et al.* (2005)^[36] y Garrido *et al.* (2019)^[86] reportaron una señal muy intensa a 1321 y 1320 cm^{-1} , respectivamente, sobre nanopartículas de plata y la asignaron a la flexión del C-OH y al estiramiento C-C, ambas del ácido carboxílico ($\delta_{\text{ácido}}\text{C-OH}$ y $\nu_{\text{ácido}}\text{C-C}$). Esta señal intensa se suma con la banda D del GOPM, rGONP12 y rGO12, desplazándola a 1347, 1341 y 1338 cm^{-1} , respectivamente. No obstante, para rGO20 se observa a 1322 cm^{-1} y para las NPAu a 1320 cm^{-1} . Comparando los espectros normalizados del rGONP20 + AC y el GOPM + AC (Figura 53), se nota que en la región de 1300 a 1600 cm^{-1} se pueden observar más señales del AC sobre el rGONP20 y una forma distinta del perfil del espectro por la ausencia de la interferencia de la banda G entre 1580 y 1600 cm^{-1} . Por lo tanto, se puede decir que la gran intensidad de la señal localizada en 1331 cm^{-1} tiene poca contribución del sustrato y su amplificación se debe al efecto SERS de las NPAu. La mayoría de los espectros SERS publicados del AC solo muestran una señal localizada entre 1400 y 1500 cm^{-1} , en este trabajo se muestran dos señales en el sustrato rGONP20, únicamente. La señal intensa ubicada en 1471 cm^{-1} se asigna a la deformación en el plano del metilo unido a C_1 (δCH_3)^[117] y para la localizada en 1416 cm^{-1} no se encontró una asignación clara, pero coincide con vibraciones de flexión de la glucosa, así como $\delta\text{C}_5\text{-OH}$ y $\delta\text{C}_6\text{-OH}$ en espectros calculados del AC.^[36] Las siguientes 4 señales, 1533, 1569, 1600 y 1646 cm^{-1} , tampoco se pueden observar en ningún otro espectro obtenido en este trabajo. Las primeras 3, se asignan a distintos modos de estiramiento de los anillos aromáticos (ν_{anillo}) y flexiones en el plano de la antraquinona de O-H y C-H ($\delta\text{O-H}$ y $\delta\text{C-H}$)^[36,117]. Mientras que la de mayor energía se provoca por el estiramiento del C=O de los carbonos quinoides 9 y 10 ($\nu\text{C=O}$).^[86] La asignación de las señales del AC en la región de mayor energía se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15. Asignaciones de las señales encontradas en la región de mayor energía de los espectros Raman (láser con $\lambda = 532 \text{ nm}$) de AC, 10^{-5} M , con rGONP20, rGO20, NPAu, rGONP12, rGO12 y GOPM. Los números están en unidades de cm^{-1} . Las señales correspondientes a las bandas D y G del GO y rGO están marcados con una D y G a la derecha del número de onda, respectivamente.

rGONP20	rGO20	NPAu	rGONP12	rGO12	GOPM	Asignación
1222	1223	1218	1212	1223	-	$\delta\text{C}_5\text{OH}$, $\delta\text{C}_4\text{H}$ y ν_{anillo} ^[36,117]
1331	1322	1320	1341 D	1338 D	1347 D	$\delta_{\text{ácido}}\text{C-OH}$ y $\nu_{\text{ácido}}\text{C-C}$ ^[36,86]
1416	-	-	-	-	-	$\delta\text{C}_5\text{-OH}$ y $\delta\text{C}_6\text{-OH}$ ^[36]
1471	1444	1444	1457	1465	-	δCH_3 , $\delta\text{C-OH}$ y ν_{anillo} ^[117]
1533	-	-	-	-	-	ν_{anillo} , $\delta\text{O-H}$ y $\delta\text{C-H}$ ^[36,117]
1569	1579	-	-	-	-	
1600	-	1597	1602 G	1602 G	1600 G	
1646	-	-	-	-	-	$\nu\text{C=O}$ ^[86]

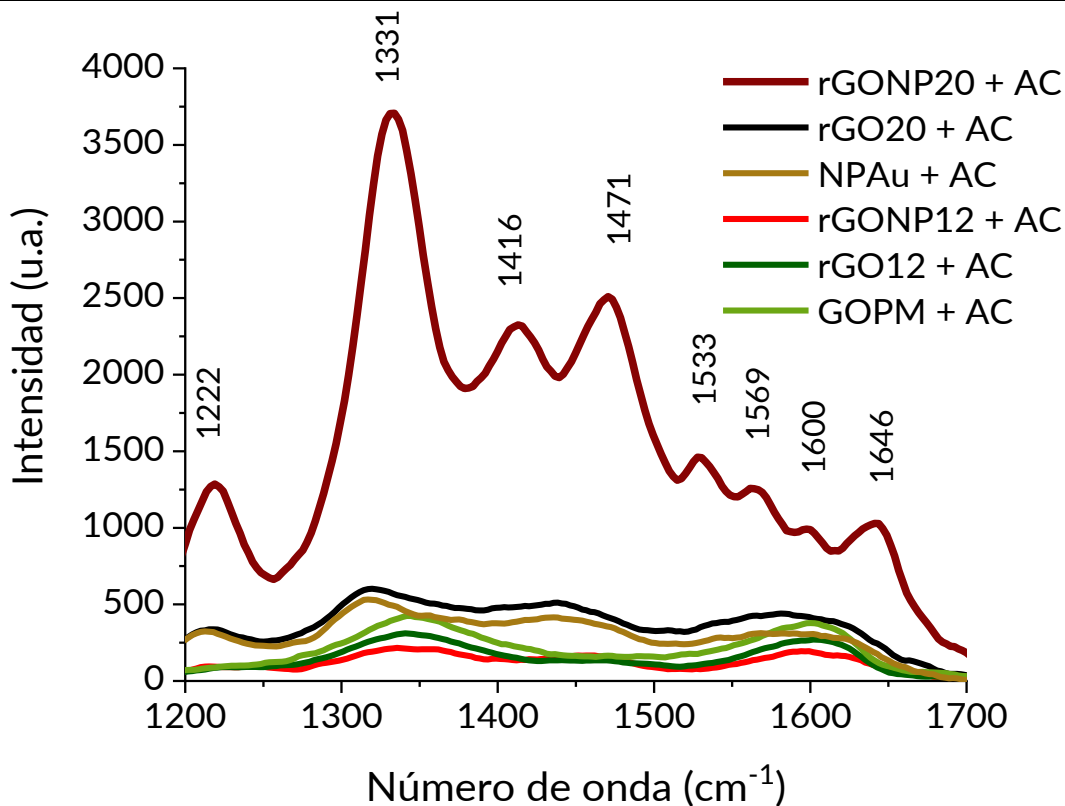


Figura 53. Región del espectro de mayor energía y mayor amplificación de las señales Raman del AC con los sustratos nanoestructurados. Número de onda de las señales del rGONP20 + AC.

Las señales más intensas del AC se encuentran en la región del espectro donde también se localizan las bandas D y G, 1300 a 1600 cm^{-1} , del GO y del rGO. Las señales del AC en los sustratos rGONP12, rGO12 y GOPM, tienen una fuerte contribución de ambas bandas. La interferencia de estas bandas es más pronunciada para el GOPM y el rGO12, en el primer caso no se observan las señales del AC (Figura 53) y en el segundo solamente se ven dos hombros de la banda D a 1239 y 1462 cm^{-1} . A mayores números de onda no se distinguen señales en ninguno de los espectros por la fluorescencia del AC.

Además de estas muestras se depositaron 2 gotas de 5 μL de AC en concentraciones de 10^{-5} y 10^{-6} M, sobre una monocapa de grafeno en SiO_2/Si de *Graphenea* y una monocapa de GO en SiO_2/Si (GOmono) fabricada a través del método Langmuir-Blodgett por otro miembro del grupo de investigación, M en C. Emanuel de la O, y se midieron los espectros Raman. En ambos sustratos homogéneos fue posible distinguir señales del AC hasta una concentración de 10^{-6} M (Figura 54). A causa del número tan reducido de defectos en la red de grafeno desaparece la banda D del espectro, por lo tanto, la señal intensa localizada en 1320 cm^{-1} en el espectro del AC sobre grafeno no tiene ninguna interferencia del sustrato. Adicionalmente, este espectro no presenta la intensa y delgada banda G del grafeno (1586 cm^{-1}), por lo que la forma del espectro de 1500 a 1600 cm^{-1} se asemeja mucho a la del rGONP20 + AC pero la resolución de las señales frente al ruido es muy baja como para asignarlas. Por otra parte, las bandas D y G predominan en el espectro de la monocapa de GO, aunque las señales ubicadas en 1221 y 1462 cm^{-1} , se distinguen claramente y las señales localizadas entre 400 y 1100 cm^{-1} se resuelven mejor que en el espectro del grafeno + AC.

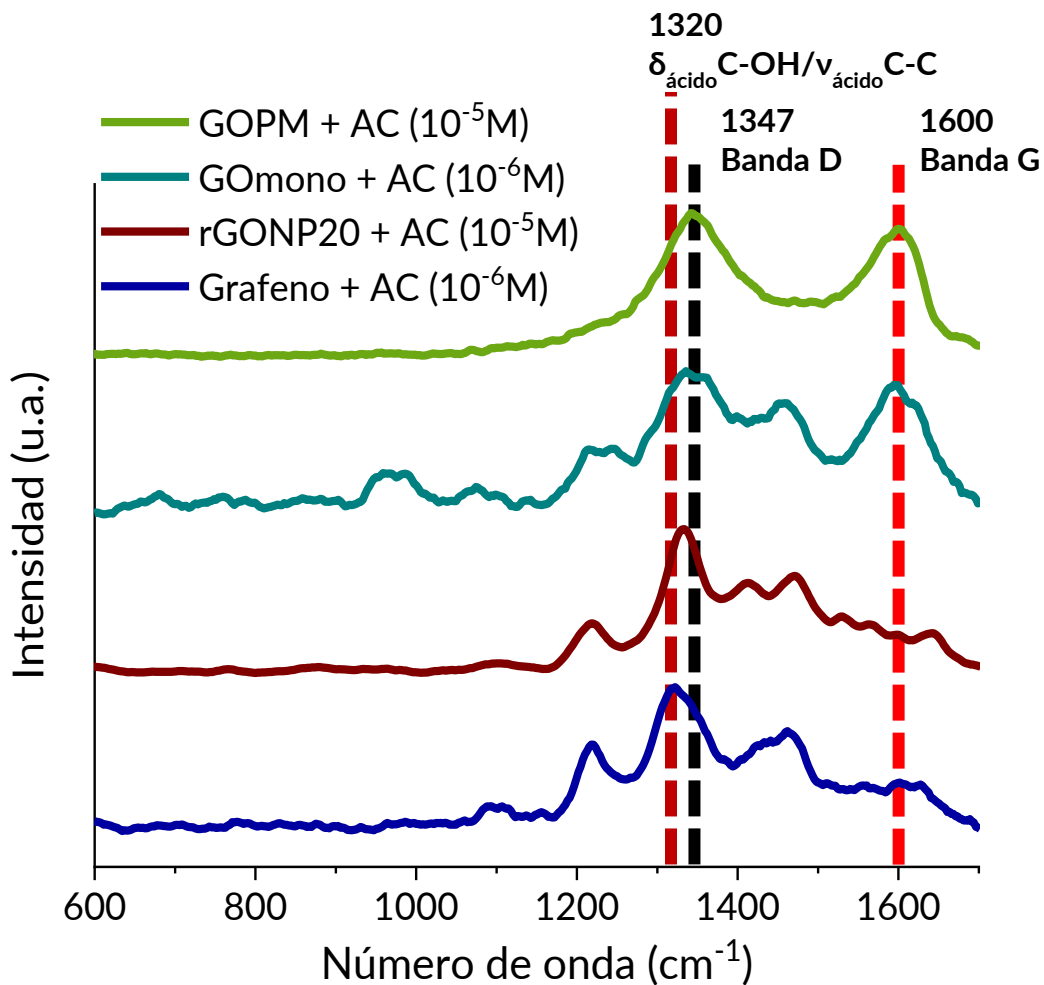


Figura 54. Espectros Raman del AC con concentración de 10^{-6} M sobre monocapas de grafeno y de GO, junto con los espectros del AC con concentración de 10^{-5} M en rGONP20 y GOPM. El depósito homogéneo del sustrato facilita la detección del AC. Láser con $\lambda = 532$ nm, potencia de $118 \mu\text{W}$ y tiempo de integración de 1 s. Corrección de línea base y suavizado.

Con estos resultados se confirma que optimizando la homogeneidad del depósito de los sustratos de rGONP20 y rGO20, es posible mejorar la amplificación de las señales del AC por SERS y GERS, respectivamente, y disminuir la interferencia originada por el rGO con un láser verde de $\lambda = 532$ nm. Adicionalmente, encontrar las señales del AC en la muestra es más sencillo en sustratos más homogéneos.

La intensidad de la señal principal para los sustratos rGONP20, rGO20 y NPAu, es de 3707, 602 y 532 u.a., respectivamente. Por lo tanto, el nanocomposito genera una amplificación más de 6 veces mayor, que sus partes por separado. La interacción entre el sustrato y el AC se ve limitada por la carga negativa de ambos, en un valor de pH = 4 predomina la especie monodesprotonada del AC, por esa razón, los sustratos más reducidos (potencial Zeta más cercano a cero) disminuyen la repulsión entre la molécula orgánica y la superficie de los materiales nanoestructurados, favoreciendo las interacciones $\pi - \pi$ entre los 3 anillos aromáticos de la antraquinona y las regiones sp^2 del rGO. La amplificación SERS se da principalmente por la cercanía de las NPAu y las moléculas de AC adsorbidas sobre el rGO. Además, la proximidad del máximo de absorción de la resonancia del plasmón superficial localizado de las NPAu ($\lambda_{abs} = 544$ nm) y la absorción $S_0 \rightarrow S_1$ del AC ($\lambda_{abs} = 496$ nm), a la longitud de onda del láser (532 nm), aumenta el efecto SERS del AC adsorbido sobre el rGONP20 por el efecto RR.

Un análisis de los resultados obtenidos basado la teoría de ácidos y bases, duros y blandos, propuesta por Ralph G. Pearson, en 1968,^[126] puede ayudar a entender la naturaleza de las interacciones entre las especies químicas que contienen las muestras, es decir, el AC monodesprotonado (en un valor de pH = 4), el GO, el rGO y las NPAu. El Au^0 de las NPAu, así como la mayoría de los metales con estado de oxidación igual a cero, se clasifica como un ácido blando. El GO se puede considerar como una base dura, debido que tiene una de gran cantidad de grupos oxigenados, pero las regiones sp^2 remanentes después de la oxidación del grafito pueden fungir como ácidos o bases blandas. Los orbitales moleculares π son donadores de densidad electrónica, bases blandas, y los orbitales π^* son aceptores de densidad electrónica, ácidos duros. La brecha energética entre la banda de valencia y la banda de conducción (E_{gap}) del GO se puede estimar a partir del máximo de absorción electrónica (λ_{abs}), localizado en 230 nm, es decir, $E_{gap} \approx 5.39$ eV. Consecuentemente, la reducción del GO disminuye esta brecha energética aumentando la conjugación de dobles enlaces entre átomos de carbono, ocasionando en el corrimiento hacia el rojo del λ_{abs} , hasta 263 nm para el rGO20, $E_{gap} \approx 4.71$ eV. Por lo tanto, la reducción del GO al rGO, aumenta el carácter blando del nanomaterial y la covalencia de las interacciones entre las NPAu y la superficie del rGO.

El AC, al igual que el GO, tiene grupos oxigenados (-COOH, -OH) que al ser desprotonados se comportan como bases duras (-COO⁻, -O⁻). Por esa razón, el incremento del valor de pH de una disolución de AC, produce el aumento de la carga negativa y la dureza del anión del AC. Sin embargo, el centro de antraquinona donde se encuentran los 3 anillos aromáticos (cromóforo), se puede considerar como ácido o base blanda por su mayor polarizabilidad y la pequeña brecha energética entre los orbitales *HOMO* y *LUMO*, aproximadamente 2.50 eV, estimada del $\lambda_{\text{abs}} = 496$ nm, del AC (transición $S_0 \rightarrow S_1$).

Con base en estos datos, se puede decir que las interacciones iónicas y de tipo puente de hidrógeno, predominan entre los grupos oxigenados de mayor dureza del GO y del AC. Sin embargo, la exclusión del cromóforo del AC en la interacción sustrato-analito y la poca polarizabilidad estos grupos funcionales, no genera el apagamiento de la fluorescencia ni la amplificación de las señales Raman del AC. Por otra parte, debido a su dureza, los grupos oxigenados del AC no forman enlaces con los átomos de oro cero valentes en la superficie de las NPAu (ácidos blandos), de tal manera que, el efecto SERS de las NPAu sobre el AC es limitado por la distancia entre las dos especies.

En resumen, el aumento del carácter blando del rGO, por la eliminación de grupos oxigenados en la superficie, la recombinación de regiones de átomos de carbono sp^2 y la disminución de la E_{gap} , genera interacciones más fuertes (blando-blando) entre el rGO y las NPAu, y el rGO y el cromóforo del AC. Las cuales producen un mejor apagamiento de la fluorescencia y una mayor amplificación de las señales SERS del AC adsorbido sobre el nanocomposito con mayor grado de reducción.

8. Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo se concluye lo siguiente:

- Se cumplió cabalmente con los objetivos establecidos para este proyecto de investigación.
- El depósito de estos sustratos, junto con el AC sobre obleas de SiO₂/Si, a través del secado de gotas, permite observar algunas señales características en espectroscopía Raman de la molécula de AC hasta una concentración inicial igual a 10⁻⁵ M, con un láser de $\lambda = 532$ nm.
- El nanocomposito de *rGO* y NPAu, con mayor grado de reducción (*rGONP20*), produce la mayor amplificación de las señales Raman del AC, por encima de los demás sustratos utilizados en este trabajo. La intensidad de las señales *SERS* del AC sobre este nanocomposito es aproximadamente 6 veces mayor que la del AC sobre el *rGO* sin NPAu (*rGO20*). Además, en los espectros Raman de dicho sustrato con AC no se observa la interferencia de las bandas D y G del *rGO*.
- Los sustratos grafénicos y los nanocompositos de *rGO* con NPAu tienen la capacidad de apagar eficientemente la fluorescencia del AC en disolución acuosa.
- La reducción del GO con citrato de sodio tribásico, con distintas proporciones de GO y agente reductor, permite modificar drásticamente las propiedades luminiscentes y disminuye la dispersabilidad en agua del *rGO* resultante.
- La adición de NPAu en la superficie del *rGO* apaga su fluorescencia e incrementa la dispersabilidad de los nanocompositos en agua.
- La caracterización de los sustratos grafénicos y nanocompositos realizada en este proyecto es consistente entre las diversas técnicas empleadas y con lo informado en la literatura.
- La monocapa de grafeno, es el sustrato con el que se obtuvo el menor límite de detección, sin interferencia, del AC por espectroscopía Raman (10⁻⁶ M). El cual tiene un valor igual al publicado, este mismo año (2019), por Garrido y

colaboradores,^[86] utilizando una coloide de NPAg. Sin embargo, el menor límite de detección encontrado en la literatura es de 10^{-8} M.^[87]

- Se separaron 3 fracciones con diferentes distribuciones de tamaños, medidas por *DLS*, de GO disperso en agua mediante centrifugación y se observó que la intensidad de la fluorescencia y la dispersabilidad del GO en agua son inversamente proporcionales a las dimensiones laterales de las obleas, mientras que el pH inicial de las dispersiones de GO es proporcional al tamaño de las mismas.
- Se encontró una metodología para dispersar el GO en agua con una concentración igual a 1 mg/mL, por medio de la sonicación del GO en polvo durante 1 hora.

9. Perspectivas

A continuación se presentan las perspectivas para la realización de futuros trabajos sobre la misma línea de investigación:

- Mejorar sustancialmente el depósito de películas delgadas y homogéneas de los nanocompositos sintetizados en este proyecto. Esto con el objetivo de disminuir el límite de detección de 10^{-5} M y encontrar las señales Raman del AC con mayor facilidad sobre los sustratos *SERS*.
- Realizar mayor caracterización estructural de los nanomateriales empleados en este trabajo por medio de técnicas como *XPS* y microscopías: *SEM*, *TEM* y *AFM*.
- Medir los espectros *SERS* del AC sobre los sustratos que se usaron en este trabajo con láseres de diferentes longitudes de onda y determinar el límite de detección para cada uno.
- Sintetizar NPAg sobre sustratos grafénicos, caracterizarlos y medir el apagamiento de la fluorescencia y la amplificación de las señales Raman del AC. Comparar los resultados obtenidos con los resultados de los nanocompositos sintetizados en este trabajo, y determinar que nanocomposito es mejor para la detección del AC a bajas concentraciones por medio de la técnica *SERS*.
- Realizar estudios de la interacción y medir los espectros *SERS* de los sustratos grafénicos y nanocompositos, con otros colorantes que también se encuentren presentes comúnmente en obras de arte y objetos antiguos.

10. Referencias

- [1] Sharma, B., Frontiera, R. R., Henry, A.-I., Ringe, E., & Duyne, R. P. V. (2012). SERS: Materials, applications, and the future. *Materials Today*, 15(1-2), 16–25. doi: 10.1016/s1369-7021(12)70017-2
- [2] Lombardi, J. R., & Birke, R. L. (2009). A Unified View of Surface-Enhanced Raman Scattering. *Accounts of Chemical Research*, 42(6), 734–742. doi: 10.1021/ar800249y
- [3] Smith, E., & Dent, G. (2006). *Modern Raman spectroscopy: a practical approach*. New York: Wiley.
- [4] Kneipp, K., *et al.* (1997). Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). *Physical Review Letters*, 78(9), 1667–1670. doi: 10.1103/physrevlett.78.1667
- [5] Leona, M., Stenger, J., & Ferloni, E. (2006). Application of surface-enhanced Raman scattering techniques to the ultrasensitive identification of natural dyes in works of art. *Journal of Raman Spectroscopy: An International Journal for Original Work in all Aspects of Raman Spectroscopy, Including Higher Order Processes, and also Brillouin and Rayleigh Scattering*, 37(10), 981-992.
- [6] Casadio, F., Leona, M., Lombardi, J. R., & Van Duyne, R. (2010). Identification of organic colorants in fibers, paints, and glazes by surface enhanced Raman spectroscopy. *Accounts of Chemical Research*, 43(6), 782-791.
- [7] Larkin, P. (2011). *IR and Raman Spectroscopy: Principles and Spectral Interpretation*. Oxford: Elsevier.
- [8] Kneipp, K., Moskovits, M., & Kneipp, H. (2006). *Surface-Enhanced Raman Scattering physics and applications*. Berlin: Springer.
- [9] Xu, W., Mao, N., & Zhang, J. (2013). Graphene: A Platform for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Small*, 9(8), 1206–1224. doi: 10.1002/smll.201203097

- [10] Sil, S., Kuhar, N., Acharya, S., & Umapathy, S. (2013). Is Chemically Synthesized Graphene 'Really' a Unique Substrate for SERS and Fluorescence Quenching? *Scientific Reports*, 3(1). doi: 10.1038/srep03336
- [11] Singh, H. B., & Kumar, A. B. (2014). *Handbook of natural dyes and pigments*. New Delhi: Woodhead Publishing India Pvt Ltd.
- [12] Lloyd, A. (1980). Extraction and chemistry of cochineal. *Food Chemistry*, 5(1), 91-107. doi:10.1016/0308-8146(80)90067-9
- [13] Carle, R., & Schweiggert, R. M. (2016). *Handbook on natural pigments in food and beverages: industrial applications for improving food color*. Duxford, UK: Woodhead Publishing is an imprint of Elsevier.
- [14] Scotter, M. (2011). Methods for the determination of European Union-permitted added natural colours in foods: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28(5), 527–596. doi: 10.1080/19440049.2011.555844
- [15] Chávez Moreno, C.K. (2002) *Extracción con disolvente del colorante rojo de la cochinilla (Dactylopius coccus): Caracterización de la separación y la transferencia de masa*. Tesis de maestría. Facultad de Química, UNAM, Ciudad de México, México.
- [16] Pozzi, F., Zaleski, S., Casadio, F., & Dwyne, R. P. V. (2016). SERS Discrimination of Closely Related Molecules: A Systematic Study of Natural Red Dyes in Binary Mixtures. *The Journal of Physical Chemistry C*, 120(37), 21017–21026. doi: 10.1021/acs.jpcc.6b03317
- [17] Jussila, H., Yang, H., Granqvist, N., & Sun, Z. (2016). Surface plasmon resonance for characterization of large-area atomic-layer graphene film. *Optica*, 3(2), 151-158.
- [18] Ray, S.C. (2015). *Applications of Graphene and Graphene-Oxide Based Nanomaterials*. Oxford, U.K.: Elsevier Inc.
- [19] Gao, W. (Ed.) (2015). *Graphene Oxide: Reduction Recipes, Spectroscopy, and Applications*. Switzerland: Springer International Publishing.

- [20] Ye, S., & Feng, J. (2016). The effect of sonication treatment of graphene oxide on the mechanical properties of the assembled films. *RSC Advances*, 6(46), 39681-39687. doi: 10.1039/c6ra03996k
- [21] Loh, K. P., Bao, Q., Eda, G., & Chhowalla, M. (2010). Graphene oxide as a chemically tunable platform for optical applications. *Nature Chemistry*, 2(12), 1015-1024. doi: 10.1038/nchem.907
- [22] Gao, W., Alemany, L. B., Ci, L., & Ajayan, P. M. (2009). New insights into the structure and reduction of graphite oxide. *Nature Chemistry*, 1(5), 403-408. doi: 10.1038/nchem.281
- [23] Li, D., Müller, M. B., Gilje, S., Kaner, R. B., & Wallace, G. G. (2008). Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets. *Nature Nanotechnology*, 3(2), 101-105. doi: 10.1038/nnano.2007.451
- [24] Khan, M. S., Shakoor, A., Khan, G. T., Sultana, S., & Zia, A. (2015). A Study of Stable Graphene Oxide Dispersions in Various Solvents. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 37(1).
- [25] Zhu, S., Tang, S., Zhang, J., & Yang, B. (2012). Control the size and surface chemistry of graphene for the rising fluorescent materials. *Chemical Communications*, 48(38), 4527. doi: 10.1039/c2cc31201h
- [26] Dimiev, A. M., & Eigler, S. (Eds.). (2016). *Graphene oxide: fundamentals and applications*. John Wiley & Sons.
- [27] Zhao, J., Liu, L., & Li, F. (2015). *Graphene oxide: physics and applications*. Heidelberg: Springer.
- [28] Lu, C., Yang, H., Zhu, C., Chen, X., & Chen, G. (2009). A Graphene Platform for Sensing Biomolecules. *Angewandte Chemie*, 121(26), 4879-4881. doi: 10.1002/ange.200901479
- [29] Perreault, F., Fonseca de Faria, A., & Elimelech, M. (2015). Environmental applications of graphene-based nanomaterials. *Chemical Society Reviews*, 44(16), 5861-5896. doi: 10.1039/c5cs00021a

- [30] Wan, W., Zhao, Z., Hu, H., Gogotsi, Y., & Qiu, J. (2013). Highly controllable and green reduction of graphene oxide to flexible graphene film with high strength. *Materials Research Bulletin*, 48(11), 4797–4803. doi: 10.1016/j.materresbull.2013.08.031
- [31] Malkin, E. (28 de noviembre, 2017). *El insecto que tiñó el poder y el arte europeos de 'rojo mexicano'*. *The New York Times* en español. Recuperado de <https://www.nytimes.com/es/2017/11/28/rojo-mexicano-cochinilla-bellas-artes/>
- [32] Cabrera, R. B. (2005). *Downstream processing of natural products: Carminic acid*. Doctoral thesis, International University of Bremen, Germany.
- [33] Eisner, T., Nowicki, S., Goetz, M., & Meinwald, J. (1980). Red Cochineal Dye (Carminic Acid): Its Role in Nature. *Science*, 208(4447), 1039-1042. doi:10.1126/science.208.4447.1039
- [34] Alzate y Ramírez J.A. (1981). *La Grana Cochinilla*. Ed. facsimilar. Archivo General de la Nación, México.
- [35] Atabey, H., Sari, H., & Al-Obaidi, F. N. (2012). Protonation Equilibria of Carminic Acid and Stability Constants of Its Complexes with Some Divalent Metal Ions in Aqueous Solution. *J. of Solution Chemistry*, 41(5), 793–803. doi: 10.1007/s10953-012-9830-7
- [36] Cañamares, M., Garcia-Ramos, J., Domingo, C., & Sanchez-Cortes, S. (2006). Surface-enhanced Raman scattering study of the anthraquinone red pigment carminic acid. *Vibrational Spectroscopy*, 40(2), 161-167. doi:10.1016/j.vibspec.2005.08.002
- [37] Scientific Opinion on the re-evaluation of cochineal, carminic acid, carmines (E 120) as a food additive. (2015). *EFSA Journal*, 13(11). doi: 10.2903/j.efsa.2015.4288
- [38] Rasimas, J. P., Berglund, K. A., & Blanchard, G. J. (1996). A Molecular Lock-and-Key Approach To Detecting Solution Phase Self-Assembly. A Fluorescence and Absorption Study of Carminic Acid in Aqueous Glucose Solutions. *The Journal of Physical Chemistry*, 100(17), 7220–7229. doi: 10.1021/jp953743t
- [39] Samari, F., Hemmateenejad, B., & Shamsipur, M. (2010). Spectrophotometric determination of carminic acid in human plasma and fruit juices by second order

calibration of the absorbance spectra–pH data matrices coupled with standard addition method. *Analytica Chimica Acta*, 667(1-2), 49–56. doi: 10.1016/j.aca.2010.04.007

[40] Periasamy, A. P., Ho, Y.-H., & Chen, S.-M. (2011). Multiwalled carbon nanotubes dispersed in carminic acid for the development of catalase based biosensor for selective amperometric determination of H₂O₂ and iodate. *Biosensors and Bioelectronics*, 29(1), 151–158. doi: 10.1016/j.bios.2011.08.010

[41] Jørgensen, K., & Skibsted, L. (1991). Light sensitivity of cochineal. Quantum yields for photodegradation of carminic acid and conjugate bases in aqueous solution. *Food Chemistry*, 40(1), 25–34. doi: 10.1016/0308-8146(91)90016-h

[42] Antonio-Cisneros, C. M., Dávila-Jiménez, M. M., Elizalde-González, M. P., & García-Díaz, E. (2015). Photoproducts of carminic acid formed by a composite from *Manihot dulcis* waste. *Food Chemistry*, 173, 725–732. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.10.085

[43] Lown, J., Chen, H.-H., Sim, S.-K., & Plambeck, J. A. (1979). Reactions of the antitumor agent carminic acid and derivatives with DNA. *Bioorganic Chemistry*, 8(1), 17–24. doi: 10.1016/0045-2068(79)90032-4

[44] Li, G.-X., Liu, Z.-Q., & Wu, D. (2009). Carminic acid: an antioxidant to protect erythrocytes and DNA against radical-induced oxidation. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 22(9), 883–887. doi: 10.1002/poc.1536

[45] Capitán, F., Gracia, J. P. D., Navalón, A., Capitán-Vallvey, L. F., & Vilchez, J. L. (1990). Determination of trace amounts of tungsten with carminic acid by ion-exchange spectrofluorimetry. *The Analyst*, 115(6), 849–854. doi: 10.1039/an9901500849

[46] Comanici, R., *et al.* (2006). Femtosecond spectroscopic study of carminic acid–DNA interactions. *Chemical Physics*, 325(2-3), 509–518. doi: 10.1016/j.chemphys.2006.01.026

[47] Shahzad, N., *et al.* (2015). Charge-Transfer Complexation at Carminic Acid–CdS Interface and Its Impact on the Efficiency of Dye-Sensitized Solar Cells. *Journal of Electronic Materials*, 44(4), 1167–1174. doi: 10.1007/s11664-015-3648-1

- [48] Sun, C., Li, Y., Song, P., & Ma, F. (2016). An Experimental and Theoretical Investigation of the Electronic Structures and Photoelectrical Properties of Ethyl Red and Carminic Acid for DSSC Application. *Materials*, 9(10), 813. doi: 10.3390/ma9100813
- [49] Dieing, T., Hollricher, O., & Toporski, J. (2018). *Confocal Raman microscopy*. Cham, Switzerland.
- [50] Butler, H. J., et al. (2016). Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. *Nature protocols*, 11(4), 664.
- [51] Hirakawa, A. Y., & Tsuboi, M. (1975). Molecular Geometry in an Excited Electronic State and a Preresonance Raman Effect. *Science*, 188(4186), 359–361. doi: 10.1126/science.188.4186.359
- [52] Clark, R. J., & Dines, T. J. (1986). Resonance Raman spectroscopy, and its application to inorganic chemistry. New analytical methods (27). *Angewandte Chemie International Edition in English*, 25(2), 131-158
- [53] Xie, L., Ling, X., Fang, Y., Zhang, J., & Liu, Z. (2009). Graphene as a substrate to suppress fluorescence in resonance Raman spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 131(29), 9890-9891.
- [54] Swierczewska, M., Lee, S., & Chen, X. (2011). The design and application of fluorophore–gold nanoparticle activatable probes. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13(21), 9929-9941.
- [55] Dulkeith, E., Ringler, M., Klar, T. A., Feldmann, J., Munoz Javier, A., & Parak, W. J. (2005). Gold nanoparticles quench fluorescence by phase induced radiative rate suppression. *Nano letters*, 5(4), 585-589.
- [56] (2019) *Raman Resonance Spectroscopy*. United States: Teledyne Princeton Instruments. Recuperado de <https://www.princetoninstruments.com/applications/resonance-raman>
- [57] Beltramo, G. L., Shubina, T. E., & Koper, M. T. (2005). Oxidation of formic acid and carbon monoxide on gold electrodes studied by surface-enhanced Raman spectroscopy and DFT. *ChemPhysChem*, 6(12), 2597-2606.

- [58] Ling, X., Moura, L. G., Pimenta, M. A., & Zhang, J. (2012). Charge-transfer mechanism in graphene-enhanced Raman scattering. *The Journal of Physical Chemistry C*, 116(47), 25112-25118.
- [59] Xu, C., Wang, X., & Zhu, J. (2008). Graphene– metal particle nanocomposites. *The Journal of Physical Chemistry C*, 112(50), 19841-19845.
- [60] Paredes, J. I., Villar-Rodil, S., Martínez-Alonso, A., & Tascon, J. M. D. (2008). Graphene oxide dispersions in organic solvents. *Langmuir*, 24(19), 10560-10564.
- [61] Muhamad, K. S. S. K., et al. (2016, November). Synthesis and characterization of exfoliated graphene oxide. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 1784, No. 1, p. 040013). AIP Publishing.
- [62] Li, J., & Liu, C. Y. (2010). Ag/graphene heterostructures: synthesis, characterization and optical properties. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2010(8), 1244-1248.
- [63] Li, S., Aphale, A. N., Macwan, I. G., Patra, P. K., Gonzalez, W. G., Miksovská, J., & Leblanc, R. M. (2012). Graphene oxide as a quencher for fluorescent assay of amino acids, peptides, and proteins. *ACS applied materials & interfaces*, 4(12), 7069-7075.
- [64] Zhang, Z., et al. (2011). Sodium citrate: a universal reducing agent for reduction/decoration of graphene oxide with Au nanoparticles. *Nano Research*, 4(6), 599-611.
- [65] Botas, C., Pérez-Mas, A. M., Álvarez, P., Santamaría, R., Granda, M., Blanco, C., & Menéndez, R. (2013). Optimization of the size and yield of graphene oxide sheets in the exfoliation step. *Carbon*, 63, 576-578.
- [66] Nam, S. W., et al. (2015). Adsorption characteristics of diclofenac and sulfamethoxazole to graphene oxide in aqueous solution. *Chemosphere*, 136, 20-26.
- [67] Eda, G., et al. (2010). Blue photoluminescence from chemically derived graphene oxide. *Advanced materials*, 22(4), 505-509.
- [68] Wang, X., Bai, H., & Shi, G. (2011). Size fractionation of graphene oxide sheets by pH-assisted selective sedimentation. *Journal of the American Chemical Society*, 133(16), 6338-6342.

- [69] Khan, U., O'Neill, A., Porwal, H., May, P., Nawaz, K., & Coleman, J. N. (2012). Size selection of dispersed, exfoliated graphene flakes by controlled centrifugation. *Carbon*, 50(2), 470–475. doi: 10.1016/j.carbon.2011.09.001
- [70] De Silva, K. K. H., Huang, H. H., Joshi, R. K., & Yoshimura, M. (2017). Chemical reduction of graphene oxide using green reductants. *Carbon*, 119, 190-199.
- [71] Peng, J., *et al.* (2012). Graphene quantum dots derived from carbon fibers. *Nano letters*, 12(2), 844-849.
- [72] Galande, C., *et al.* (2011). Quasi-molecular fluorescence from graphene oxide. *Scientific reports*, 1, 85.
- [73] Thomas, H. R., Vallés, C., Young, R. J., Kinloch, I. A., Wilson, N. R., & Rourke, J. P. (2013). Identifying the fluorescence of graphene oxide. *Journal of Materials Chemistry C*, 1(2), 338-342.
- [74] Shang, J., Ma, L., Li, J., Ai, W., Yu, T., & Gurzadyan, G. G. (2012). The origin of fluorescence from graphene oxide. *Scientific reports*, 2, 792.
- [75] Chien, C. T., *et al.* (2012). Tunable photoluminescence from graphene oxide. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(27), 6662-6666.
- [76] Turcheniuk, K., Boukherroub, R., & Szunerits, S. (2015). Gold–graphene nanocomposites for sensing and biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(21), 4301-4324.
- [77] Yin, P. T., Shah, S., Chhowalla, M., & Lee, K. B. (2015). Design, synthesis, and characterization of graphene–nanoparticle hybrid materials for bioapplications. *Chemical reviews*, 115(7), 2483-2531.
- [78] Lu, G., Li, H., Liusman, C., Yin, Z., Wu, S., & Zhang, H. (2011). Surface enhanced Raman scattering of Ag or Au nanoparticle-decorated reduced graphene oxide for detection of aromatic molecules. *Chemical Science*, 2(9), 1817-1821.
- [79] Cittadini, M., Bersani, M., Perrozzi, F., Ottaviano, L., Wlodarski, W., & Martucci, A. (2014). Graphene oxide coupled with gold nanoparticles for localized surface plasmon resonance based gas sensor. *Carbon*, 69, 452-459.

- [80] Zhang, H., Hines, D., & Akins, D. L. (2014). Synthesis of a nanocomposite composed of reduced graphene oxide and gold nanoparticles. *Dalton Transactions*, 43(6), 2670-2675.
- [81] Goncalves, G., Marques, P. A., Granadeiro, C. M., Nogueira, H. I., Singh, M. K., & Gracio, J. (2009). Surface modification of graphene nanosheets with gold nanoparticles: the role of oxygen moieties at graphene surface on gold nucleation and growth. *Chemistry of Materials*, 21(20), 4796-4802.
- [82] Carvalho, P. R. N., & Collins, C. H. (1997). HPLC determination of carminic acid in foodstuffs and beverages using diode array and fluorescence detection. *Chromatographia*, 45(1), 63-66.
- [83] Lim, H. S., Choi, J. C., Song, S. B., & Kim, M. (2014). Quantitative determination of carmine in foods by high-performance liquid chromatography. *Food chemistry*, 158, 521-526.
- [84] Rubio, L., Sanllorente, S., Sarabia, L. A., & Ortiz, M. C. (2019). Fluorescence determination of cochineal in strawberry jam in the presence of carmoisine as a quencher by means of four-way PARAFAC decomposition. *Food chemistry*, 290, 178-186.
- [85] Ai, Y. J., *et al.* (2018). Rapid qualitative and quantitative determination of food colorants by both Raman spectra and Surface-enhanced Raman Scattering (SERS). *Food chemistry*, 241, 427-433.
- [86] Garrido, C., Clavijo, E., Copaja, S., Gómez-Jeria, J., & Campos-Valette, M. (2019). Vibrational and electronic spectroscopic detection and quantification of carminic acid in candies. *Food chemistry*, 283, 164-169.
- [87] Wu, Y. X., Liang, P., Dong, Q. M., Bai, Y., Yu, Z., Huang, J., ... & Pittman Jr, C. U. (2017). Design of a silver nanoparticle for sensitive surface enhanced Raman spectroscopy detection of carmine dye. *Food chemistry*, 237, 974-980.
- [88] Chen, K., Leona, M., Vo-Dinh, K. C., Yan, F., Wabuyele, M. B., & Vo-Dinh, T. (2006). Application of surface-enhanced Raman scattering (SERS) for the identification of

anthraquinone dyes used in works of art. *Journal of Raman Spectroscopy: An International Journal for Original Work in all Aspects of Raman Spectroscopy, Including Higher Order Processes, and also Brillouin and Rayleigh Scattering*, 37(4), 520-527.

[89] Svobodová, E., Bosáková, Z., Ohlídalová, M., Novotná, M., & Němec, I. (2012). The use of infrared and Raman microspectroscopy for identification of selected red organic dyes in model colour layers of works of art. *Vibrational Spectroscopy*, 63, 380-389.

[90] Nevin, A., Osticioli, I., & Comelli, D. (2011). ADVANCES IN THE ANALYSIS OF RED LAKE PIGMENTS FROM 15 TH AND 16 TH C. PAINTINGS USING FLUORESCENCE AND RAMAN SPECTROSCOPY. In *10th International Conference on non-destructive investigations and microanalysis for the diagnostics and conservation of cultural and environmental heritage* (pp. 1-6).

[91] Whitney, A. V., Van Duyne, R. P., & Casadio, F. (2006). An innovative surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) method for the identification of six historical red lakes and dyestuffs. *Journal of Raman Spectroscopy: An International Journal for Original Work in all Aspects of Raman Spectroscopy, Including Higher Order Processes, and also Brillouin and Rayleigh Scattering*, 37(10), 993-1002.

[92] Lofrumento, C., Ricci, M., Platania, E., Becucci, M., & Castellucci, E. (2012). SERS detection of red organic dyes in Ag-agar gel. *Journal of Raman Spectroscopy*, 44(1), 47-54. doi: 10.1002/jrs.4162

[93] Daher, C., Drieu, L., Bellot-Gurlet, L., Percot, A., Paris, C., & Hô, A.-S. L. (2014). Combined approach of FT-Raman, SERS and IR micro-ATR spectroscopies to enlighten ancient technologies of painted and varnished works of art. *Journal of Raman Spectroscopy*, 45(11-12), 1207-1214. doi: 10.1002/jrs.4565

[94] Casanova-González, E., et al. (2012). Surface-enhanced Raman spectroscopy spectra of Mexican dyestuffs. *Journal of Raman Spectroscopy*, 43(11), 1551-1559.

[95] Snehota, M., Vachutka, J., Dolezal, L., Kolarova, H., Mala, Z., & Zarska, L. (2017). ANALYSIS OF ULTRASOUND FIELD PARAMETERS DURING SONICATION EXPERIMENTS IN VITRO—INFLUENCE OF LABORATORY GLASS AND PLASTICS. *Lékař a technika-Clinician and Technology*, 47(4), 113-121.

- [96] de la O Cuevas, E. (2016) *Detección de interleucina-6 utilizando espectroscopía molecular en sistemas híbridos de grafeno decorado con nanopartículas de oro*. Tesis de maestría. Unidad Académica de Física, Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas, México.
- [97] Szabó, T., Berkesi, O., Forgó, P., Josepovits, K., Sanakis, Y., Petridis, D., & Dékány, I. (2006). Evolution of surface functional groups in a series of progressively oxidized graphite oxides. *Chemistry of materials*, 18(11), 2740-2749.
- [98] Mungse, H. P., & Khatri, O. P. (2014). Chemically functionalized reduced graphene oxide as a novel material for reduction of friction and wear. *The Journal of Physical Chemistry C*, 118(26), 14394-14402.
- [99] Instruments, M. (2013). Zetasizer Nano User Manual (English). MANO485, 1.1. Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK.
- [100] Wang, Y., Zhen, S. J., Zhang, Y., Li, Y. F., & Huang, C. Z. (2011). Facile fabrication of metal nanoparticle/graphene oxide hybrids: a new strategy to directly illuminate graphene for optical imaging. *The Journal of Physical Chemistry C*, 115(26), 12815-12821.
- [101] Becerril, H. A., Mao, J., Liu, Z., Stoltenberg, R. M., Bao, Z., & Chen, Y. (2008). Evaluation of solution-processed reduced graphene oxide films as transparent conductors. *ACS nano*, 2(3), 463-470.
- [102] Potential, Z. (2012). A complete course in 5 minutes. *Zeta-Meter Inc*, 5.
- [103] Tabrizi, M. A., & Varkani, J. N. (2014). Green synthesis of reduced graphene oxide decorated with gold nanoparticles and its glucose sensing application. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 202, 475-482. doi: 10.1016/j.snb.2014.05.099
- [104] Hontoria-Lucas, C., López-Peinado, A. J., López-González, J. D. D., Rojas-Cervantes, M. L., & Martín-Aranda, R. M. (1995). Study of oxygen-containing groups in a series of graphite oxides: physical and chemical characterization. *Carbon*, 33(11), 1585-1592.

- [105] Emiru, T. F., & Ayele, D. W. (2017). Controlled synthesis, characterization and reduction of graphene oxide: A convenient method for large scale production. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(1), 74-79.
- [106] Ghosh, H., & Bürgi, T. (2017). Mapping Infrared Enhancement around Gold Nanoparticles Using Polyelectrolytes. *The Journal of Physical Chemistry C*, 121(4), 2355-2363.
- [107] Maiorano, G., Sabella, S., Sorce, B., Brunetti, V., Malvindi, M. A., Cingolani, R., & Pompa, P. P. (2010). Effects of cell culture media on the dynamic formation of protein-nanoparticle complexes and influence on the cellular response. *ACS nano*, 4(12), 7481-7491.
- [108] Fan, Z., Wang, K., Wei, T., Yan, J., Song, L., & Shao, B. (2010). An environmentally friendly and efficient route for the reduction of graphene oxide by aluminum powder. *Carbon*, 48(5), 1686-1689.
- [109] Reyes-Salas, O., Juárez-Espino, M., Manzanilla-Cano, J., Barceló-Quintal, M., Reyes-Salas, A., & Rendón-Osorio, R. (2011). Titrimetric and polarographic determination of carminic acid and its quantification in cochineal (*Dactylopius coccus*) extracts. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 55(2), 88-93.
- [110] Liu, S., *et al.* (2016). An advanced spectroscopy lab that integrates art, commerce, and science as students determine the electronic structure of the common pigment carminic acid. *Journal of Chemical Education*, 94(2), 216-220.
- [111] Stapelfeldt, H., Jun, H., & Skibsted, L. H. (1993). Fluorescence properties of carminic acid in relation to aggregation, complex formation and oxygen activation in aqueous food models. *Food chemistry*, 48(1), 1-11.
- [112] Kunkely, H., & Vogler, A. (2011). Absorption and luminescence spectra of cochineal. *Inorganic Chemistry Communications*, 14(7), 1153-1155.
- [113] Palit, D. K., Pal, H., Mukherjee, T., & Mittal, J. P. (1990). Photodynamics of the S1 state of some hydroxy-and amino-substituted naphthoquinones and anthraquinones. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 86(23), 3861-3869.

- [114] Cho, S. H., Huh, H., Kim, H. M., Kim, C. I., Kim, N. J., & Kim, S. K. (2005). Laser induced fluorescence and resonant two-photon ionization spectroscopy of jet-cooled 1-hydroxy-9, 10-anthraquinone. *The Journal of chemical physics*, 122(3), 034304.
- [115] Bell, I. M., Clark, R. J., & Gibbs, P. J. (1997). Raman spectroscopic library of natural and synthetic pigments (pre- \approx 1850 AD). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 53(12), 2159-2179.
- [116] Burgio, L., & Clark, R. J. (2001). Library of FT-Raman spectra of pigments, minerals, pigment media and varnishes, and supplement to existing library of Raman spectra of pigments with visible excitation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 57(7), 1491-1521.
- [117] Pagliai, M., Osticioli, I., Nevin, A., Siano, S., Cardini, G., & Schettino, V. (2018). DFT calculations of the IR and Raman spectra of anthraquinone dyes and lakes. *Journal of Raman Spectroscopy*, 49(4), 668-683.
- [118] Darabdhara, G., Das, M. R., Singh, S. P., Rengan, A. K., Szunerits, S., & Boukherroub, R. (2019). Ag and Au nanoparticles/reduced graphene oxide composite materials: Synthesis and application in diagnostics and therapeutics. *Advances in colloid and interface science*, 101991.
- [119] Chakraborty, A., Chakraborty, S., Chaudhuri, B., & Bhattacharjee, S. (2012). Spectroscopic estimation of chloroauric acid during synthesis of gold nanoparticles by citrate reduction method. *Advanced Science, Engineering and Medicine*, 4(2), 128-131.
- [120] Maiorano, G., Sabella, S., Sorce, B., Brunetti, V., Malvindi, M. A., Cingolani, R., & Pompa, P. P. (2010). Effects of cell culture media on the dynamic formation of protein-nanoparticle complexes and influence on the cellular response. *ACS nano*, 4(12), 7481-7491.
- [121] Bei, F., Hou, X., Chang, S. L., Simon, G. P., & Li, D. (2011). Interfacing colloidal graphene oxide sheets with gold nanoparticles. *Chemistry-A European Journal*, 17(21), 5958-5964.

- [122] Huang, J., Zhang, L., Chen, B., Ji, N., Chen, F., Zhang, Y., & Zhang, Z. (2010). Nanocomposites of size-controlled gold nanoparticles and graphene oxide: formation and applications in SERS and catalysis. *Nanoscale*, 2(12), 2733-2738.
- [123] Patungwasa, W., & Hodak, J. H. (2008). pH tunable morphology of the gold nanoparticles produced by citrate reduction. *Materials Chemistry and Physics*, 108(1), 45-54.
- [124] Rakshit, S., Moulik, S. P., & Bhattacharya, S. C. (2017). Understanding the effect of size and shape of gold nanomaterials on nanometal surface energy transfer. *Journal of colloid and interface science*, 491, 349-357.
- [125] Van Hoonacker, A., & Englebienne, P. (2006). Revisiting silver nanoparticle chemical synthesis and stability by optical spectroscopy. *Current Nanoscience*, 2(4), 359-371.
- [126] Pearson, R. G. (1968). Hard and soft acids and bases, HSAB, part 1: Fundamental principles. *Journal of Chemical Education*, 45(9), 581.

Anexo I: Desarrollo de los protocolos de dispersión del GO en agua y separación por centrifugación.

Con base en el protocolo de sonicación para la exfoliación del GO que actualmente se utiliza en el grupo de investigación y la revisión bibliográfica realizada, los siguientes parámetros permanecieron constantes: el tiempo de sonicación de 1 hora y la concentración del GO sonicado en agua con la que se trabaja normalmente en el laboratorio es de 1 mg/mL (1000 ppm).

Las variables que se modificaron para definir el mejor método de dispersión de GO fueron las siguientes:

- Masa de GO y volumen de agua, 10 mg en 10 mL o 50 mg en 50 mL, respectivamente.
- Vial de plástico o matraz de bola de vidrio.
- Agitación previa.
- Concentración inicial para la separación.

Primero se notó que el tratamiento previo del GO puede cambiar de manera significativa la magnitud del ϵ y hasta la forma del espectro. Ajustando las variables experimentales para preparar la dispersión de GO en agua desionizada, a partir del GO en polvo, se logró aumentar la absorbancia de las muestras a menor concentración. Los espectros de absorbancia de las muestras preparadas a partir del polvo de GO se compararon con el espectro del GO en solución (4 mg/mL) del mismo proveedor. En la Figura 55 se muestran los espectros de absorción de 3 muestras de GO a 40 ppm con las cuales se realizó una curva de calibración. El GO en dispersión se sonicó durante 10 minutos previo a la preparación de las dispersiones para hacer la curva de calibración. Se realizó la división entre la intensidad de la absorción en el máximo (I_{230}) y la absorción a 700 nm (I_{700}) y se calcularon los siguientes valores:

GO a 40 ppm a partir de la dispersión, $I_{230}/I_{700} = 29.01$

GO a 40 ppm, 50 mg en 50 mL, $I_{230}/I_{700} = 11.74$

GO a 40 ppm, 10 mg en 10 mL, $I_{230}/I_{700} = 19.81$

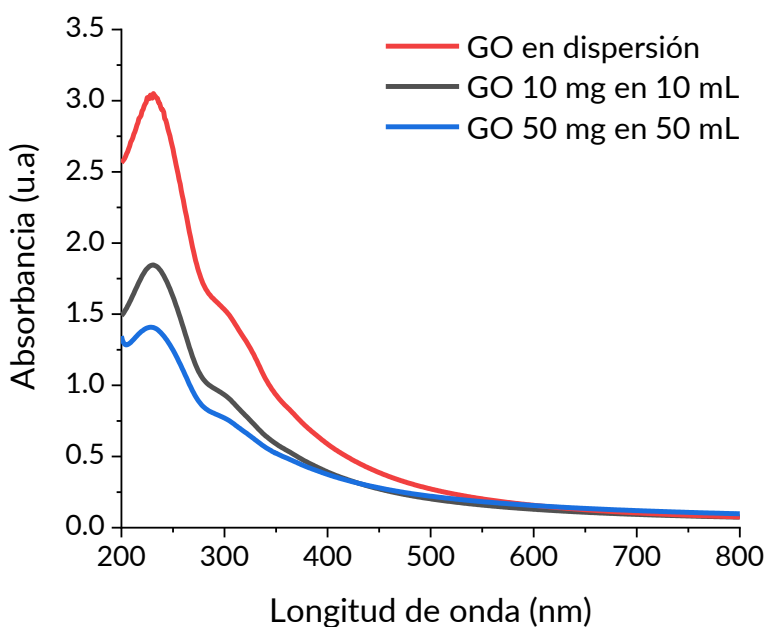


Figura 55. Espectros de absorción del GO a 40 ppm del GO en dispersión (rojo), GO en condiciones óptimas de sonicado (negro) y dispersión de 50 mg de GO en 50 mL de agua.

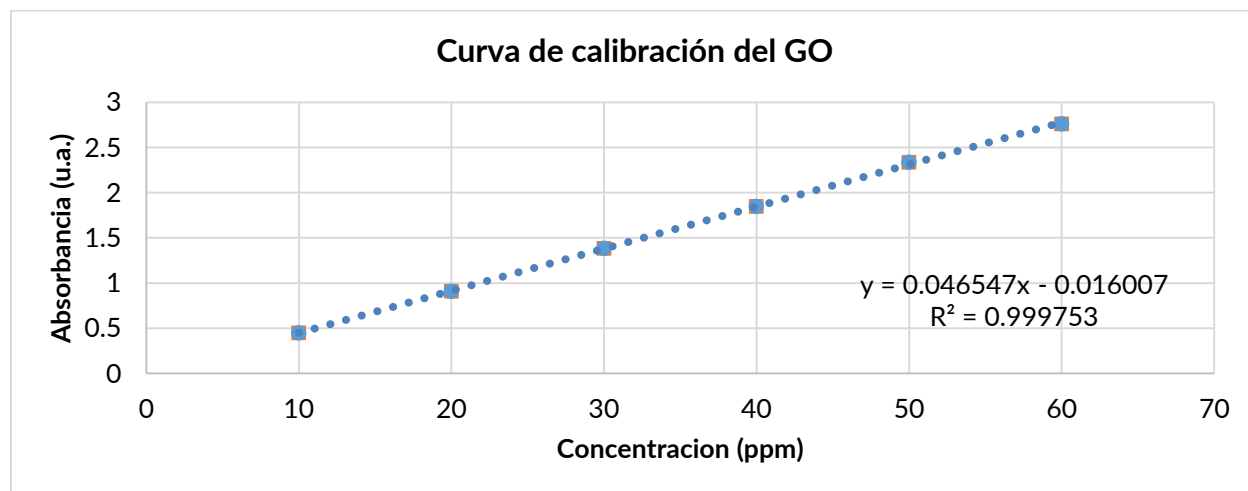


Figura 56. Curva de calibración final para el GO en agua.

Además de la respuesta del máximo de absorción, las condiciones de sonicación pueden afectar el porcentaje de cada fracción después de la separación. En la Tabla 16 se muestran los porcentajes de cada fracción (GOPP, GOPM y GOPG) resultante de la centrifugación con distintas condiciones de sonicación y separación:

Tabla 16. Separación por fracciones de distintos tamaños del GO. Se muestra el porcentaje de masa que se obtuvo en cada separación a partir de los datos de volumen y concentración de la dispersión, calculada con la curva de calibración del GO. En las especificaciones se muestra: la masa de GO que se sonicó en el volumen de agua desionizada, el recipiente en el que se sonicó, si realizó agitación previa a la sonicación (20 min aprox.), la concentración inicial de la dispersión que se metió a la centrifuga y el volumen extraído de la fracción GOPM, respectivamente.

#	GO (ppm)	GO (mg)	GO (ppm)	Especificaciones
1	4.88	21.70	73.41	50 mg de GO en 50 mL de agua, vial de vidrio, sin agitación previa, C = 1000 ppm y extracción de 1 mL de GOPM
2	17.63	19.34	63.03	50 mg de GO en 50 mL de agua, vial de vidrio, sin agitación previa, C = 500 ppm y extracción de 1 mL de GOPM
3	15.37	18.81	65.83	50 mg de GO en 50 mL de agua, vial de plástico, con agitación previa, C = 500 ppm y extracción de 1 mL de GOPM
4	19.86	23.98	56.16	50 mg de GO en 50 mL de agua, matraz de bola, con agitación previa, C = 500 ppm extracción de 1 mL de GOPM
5	52.26	19.78	27.96	10 mg de GO en 10 mL de agua, matraz de bola, sin agitación previa, C = 500 ppm y extracción de 1 mL de GOPM
6	60.54	20.04	19.43	10 mg de GO en 10 mL de agua, matraz de bola, con agitación previa, C = 500 ppm y extracción de 1 mL de GOPM
7	61.08	25.10	13.82	10 mg de GO en 10 mL de agua, matraz de bola, con agitación previa, C = 500 ppm y extracción de 1 mL de GOPM

8	32.67	33.24	34.09	10 mg de GO en 10 mL de agua, matraz de bola, con agitación previa, C = 500 ppm y extracción de 1.5 mL de GOPM
9	32.88	35.64	31.49	10 mg de GO en 10 mL de agua, matraz de bola, con agitación previa, C = 500 ppm y extracción de 1.5 mL de GOPM

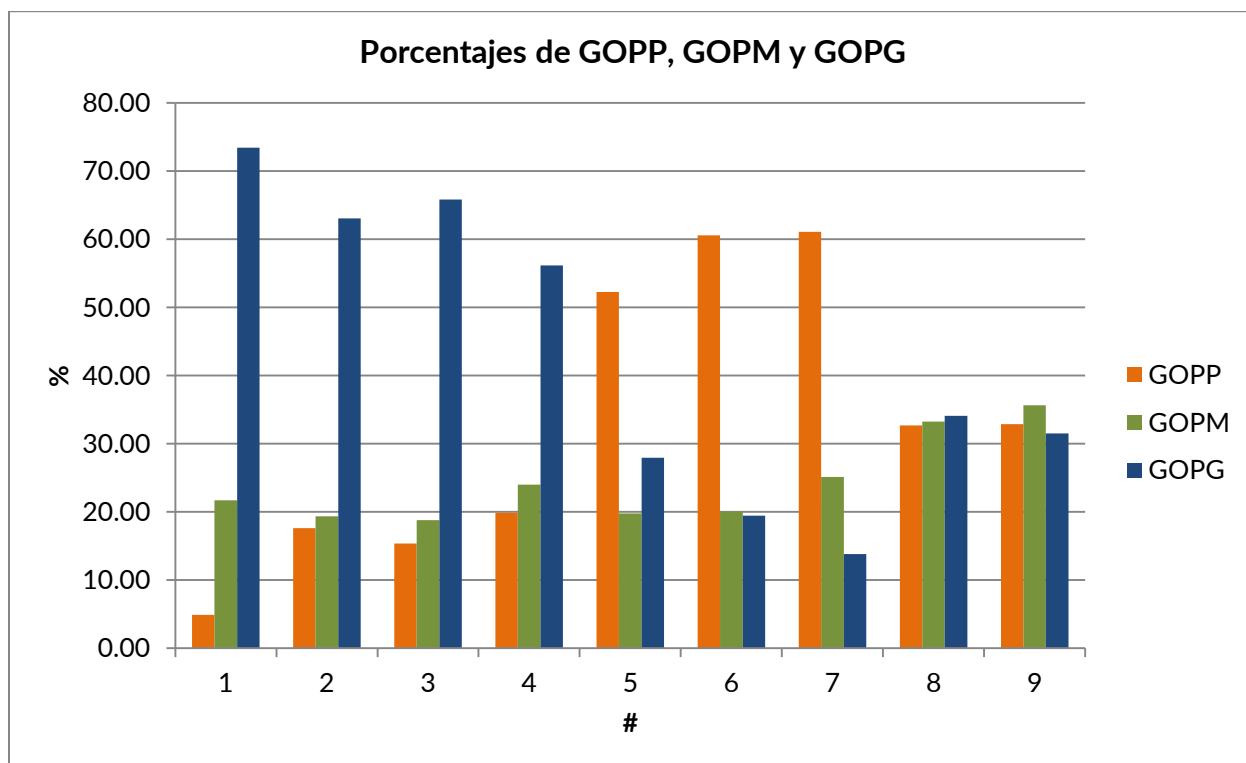


Figura 57. Gráfica de barras con los porcentajes de cada fracción de la Tabla 16.

De esta manera se pudieron realizar dispersiones estables de GOPM y aumentar el porcentaje de masa de esa fracción, frente a las otras dos.

Anexo II: Concentración del AC para medidas de fluorescencia y preparación de disoluciones de AC en agua a distintos pHs.

Para determinar la concentración ideal para tomar las medidas de fluorescencia en dispersión se compararon los espectros de absorción UV-Vis y excitación del AC a diferentes concentraciones. Cuando la emisión es originada solamente por una sustancia, el espectro de excitación debe tener la misma forma que el de absorción.

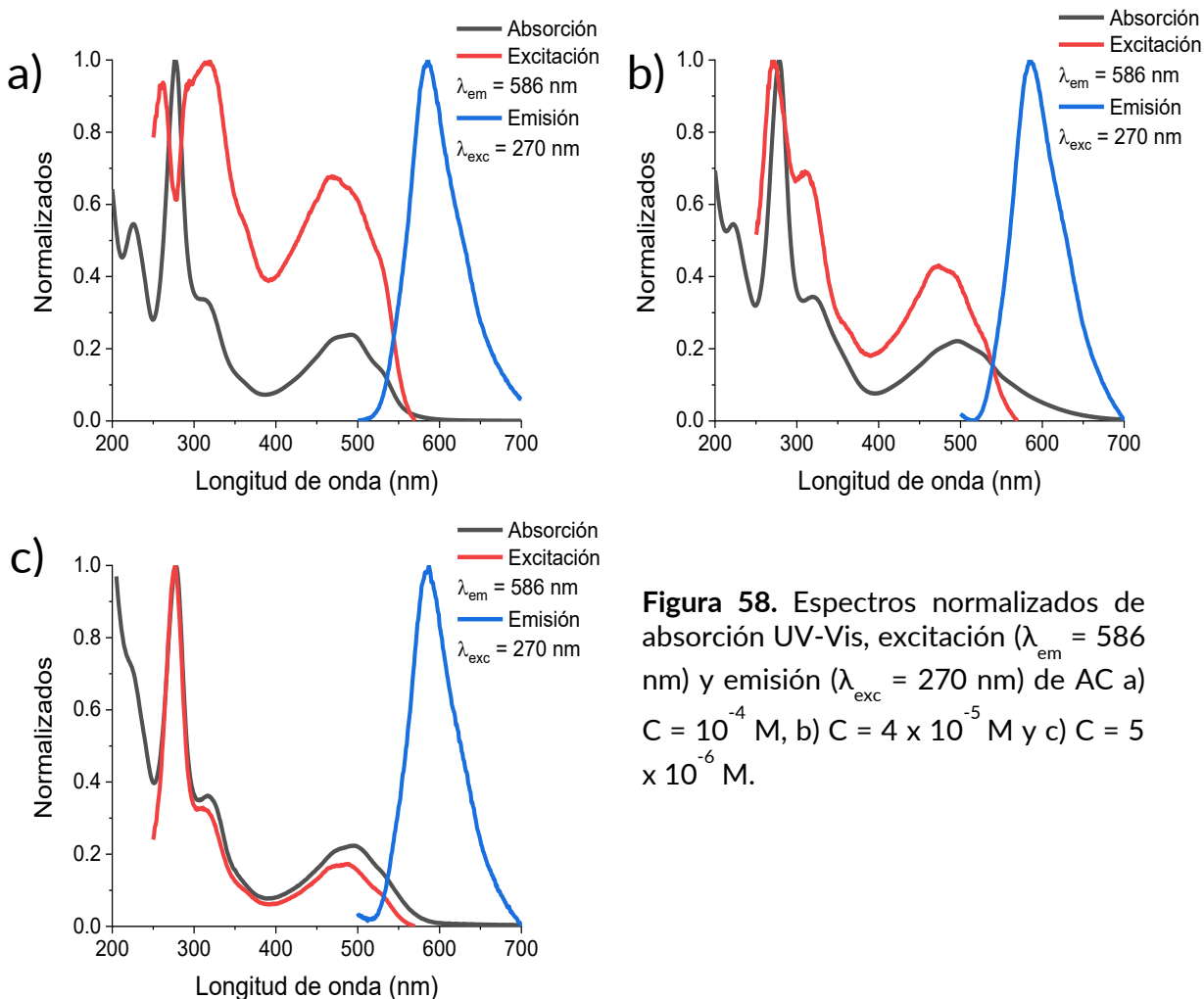


Figura 58. Espectros normalizados de absorción UV-Vis, excitación ($\lambda_{em} = 586$ nm) y emisión ($\lambda_{exc} = 270$ nm) de AC a) $C = 10^{-4}$ M, b) $C = 4 \times 10^{-5}$ M y c) $C = 5 \times 10^{-6}$ M.

Debido al alto coeficiente de extinción molar y al traslape de la emisión y la absorción del AC, cuando se trabaja a altas concentraciones existe una reabsorción de la emisión por otras moléculas de AC en disolución, además, de la formación de dímeros no fluorescentes.^[111] Por lo tanto, la fluorescencia no se comporta linealmente frente a la concentración y puede afectar las medidas del apagamiento de la fluorescencia y la forma de los espectros de emisión y excitación.

Para medir la influencia del pH en las propiedades luminiscentes del AC se diseñó un protocolo con base en la información suplementaria del artículo escrito por Liu *et al.* (2017)^[110]. Para la preparación de 9 disoluciones de AC a 5×10^{-6} M a pH = inicial, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 10. Se utilizó una disolución madre de 10^{-4} M, de la cual se tomaron alícuotas de 500 μ L y cada una se vertió en un vaso de precipitados de 10 mL junto con 8 mL de agua desionizada. Luego se fijó el pH agregando distintos volúmenes de HCl a 0.01 M y 0.1 M, y NaOH a 0.01 M y 0.1 M. Una vez que se alcanzó el pH deseado se trasvasó la disolución a un matraz volumétrico de 10 mL y se diluyó hasta el aforo.

Anexo III: Tratamiento de las obleas de SiO₂/Si con disolución piraña.

Con el objetivo de lavar las obleas de Si cortadas (10 mm x 10 mm) y aumentar el tamaño de la capa de SiO₂ en la superficie, se preparó una disolución piraña. La solución piraña consiste en una mezcla 3:1 de ácido sulfúrico grado técnico (H₂SO₄; 52-100 %) y peróxido de hidrógeno al 29-32 % (H₂O₂), respectivamente. Se hicieron 40 mL de la solución, 30 mL de H₂SO₄ y 10 mL de H₂O₂, el peróxido de hidrógeno se agregó lentamente al ácido sulfúrico en agitación e inmediatamente después eso se trasvasó la solución a un vaso de precipitados con las obleas acomodadas en el fondo. Se dejó reaccionar a la solución piraña durante 3 horas sin agitación. El lavado posterior se

efectuó en 3 vasos de precipitados con aproximadamente 50 mL de agua desionizada, en donde se sumergió cada oblea en cada uno de los tres vasos, siempre en el mismo orden. Por último, para evitar que quedaran manchas en las obleas de SiO_2/Si por el secado de las gotas de agua se sopló aire a presión con una manguera y se colocaron en el desecador.



Figura 59. Tratamiento de las obleas de Si con la disolución piraña.

Anexo IV: Espectros Raman, FTIR-ATR, fluorescencia y absorción UV-Vis-NIR

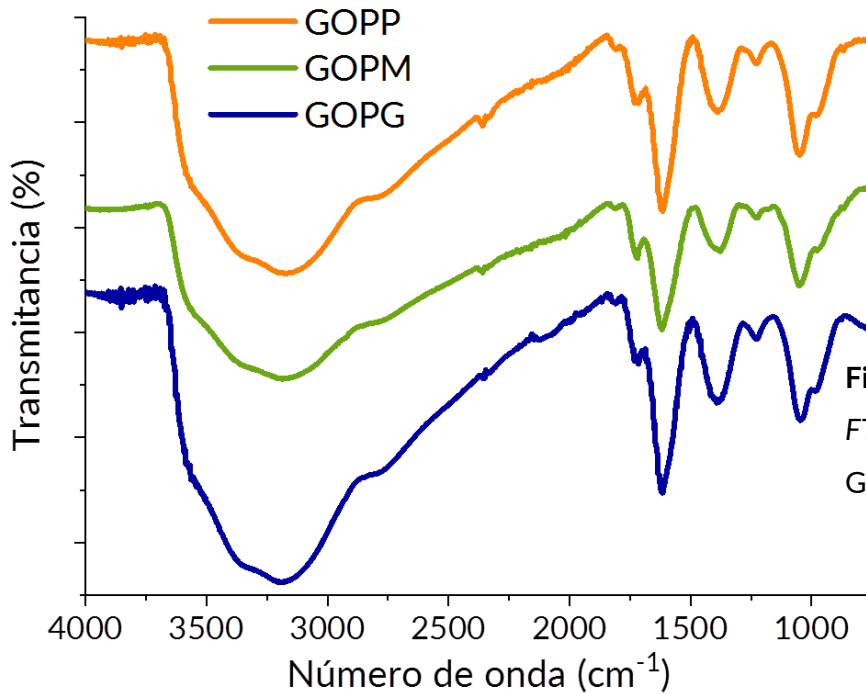


Figura 60. Espectros FTIR-ATR del GOPP, GOPM y GOPG.

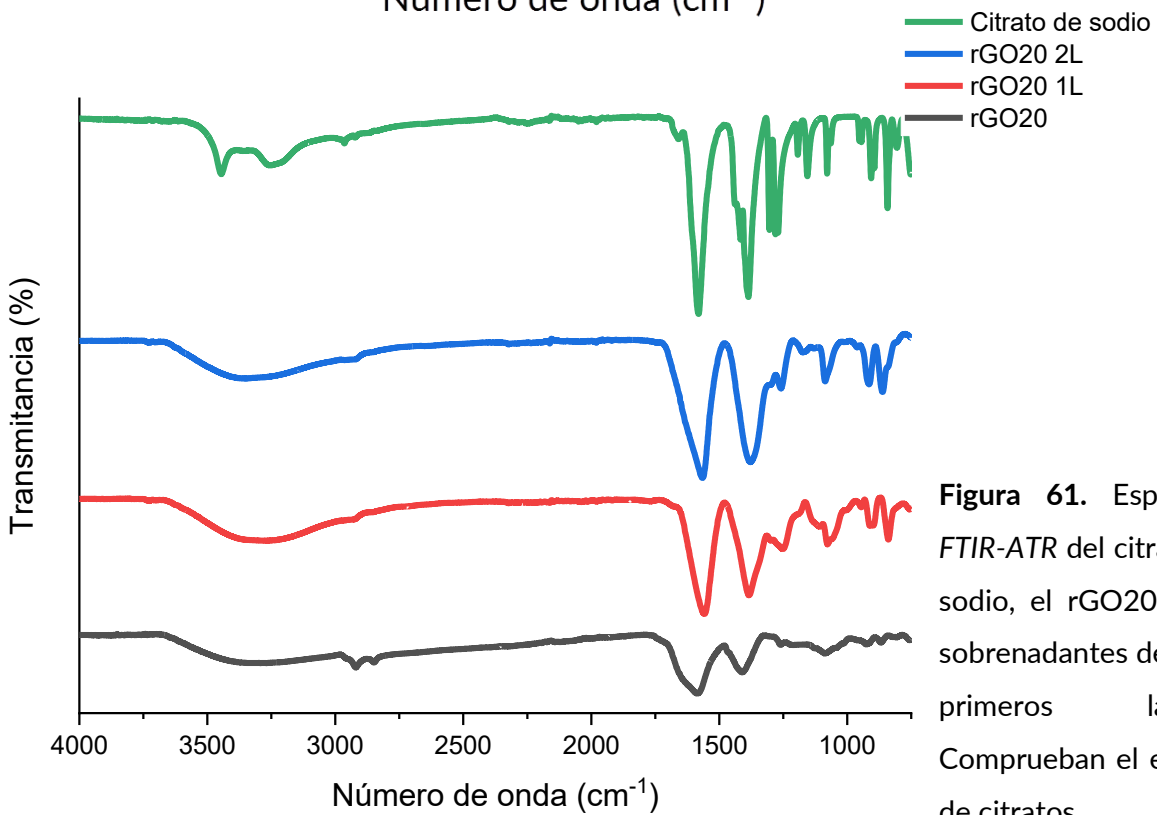


Figura 61. Espectros FTIR-ATR del citrato de sodio, el rGO20 y los sobrenadantes de los 2 primeros lavado. Comprueban el exceso de citratos.

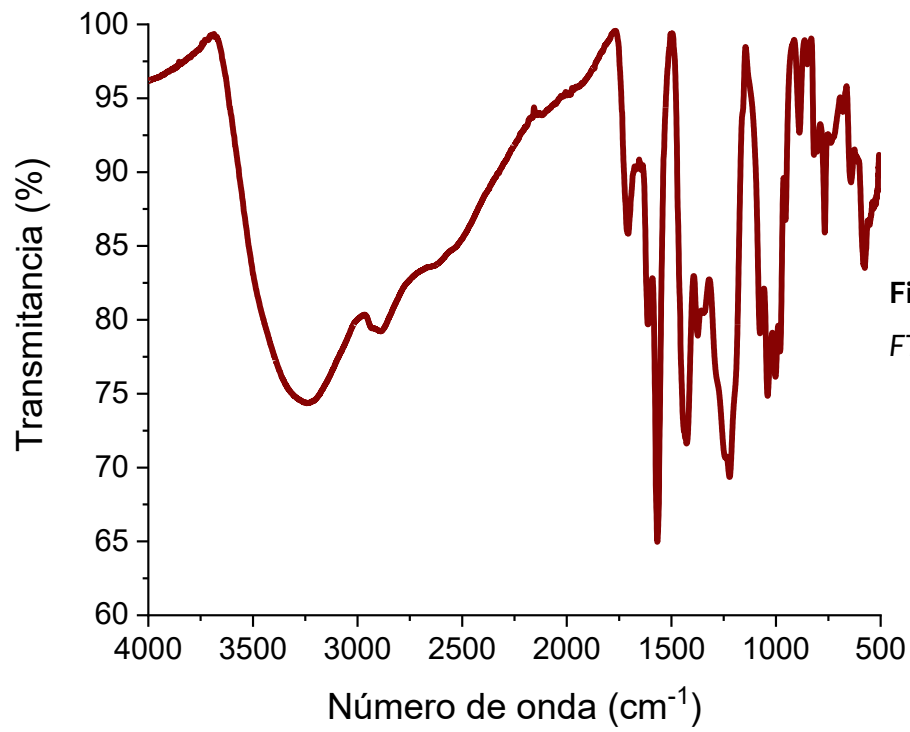


Figura 62. Espectro FTIR-ATR del AC.

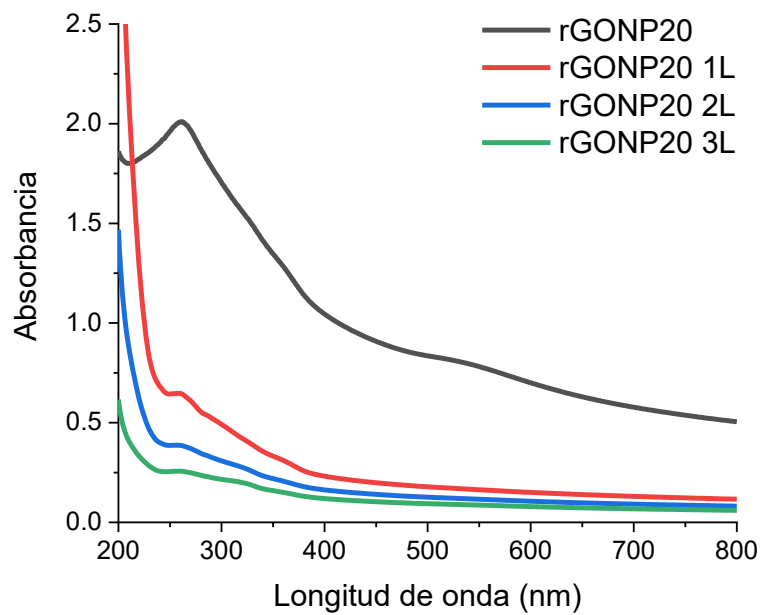


Figura 63. Espectros de absorción electrónica del rGONP20 y los sobrenadantes de los 3 lavado. Comprueban el exceso de citratos.

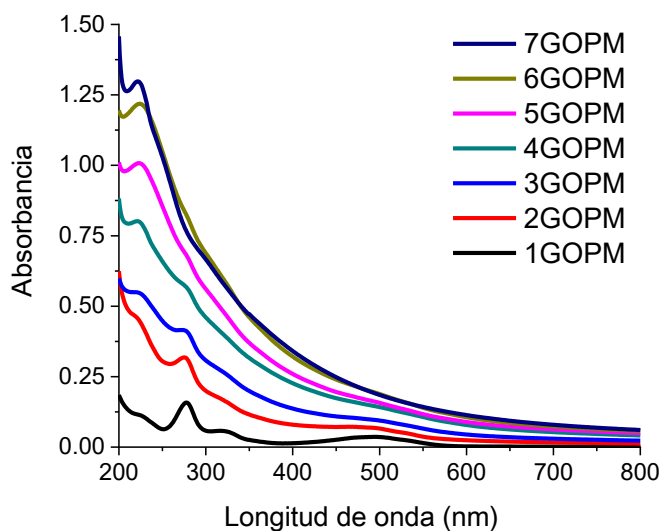
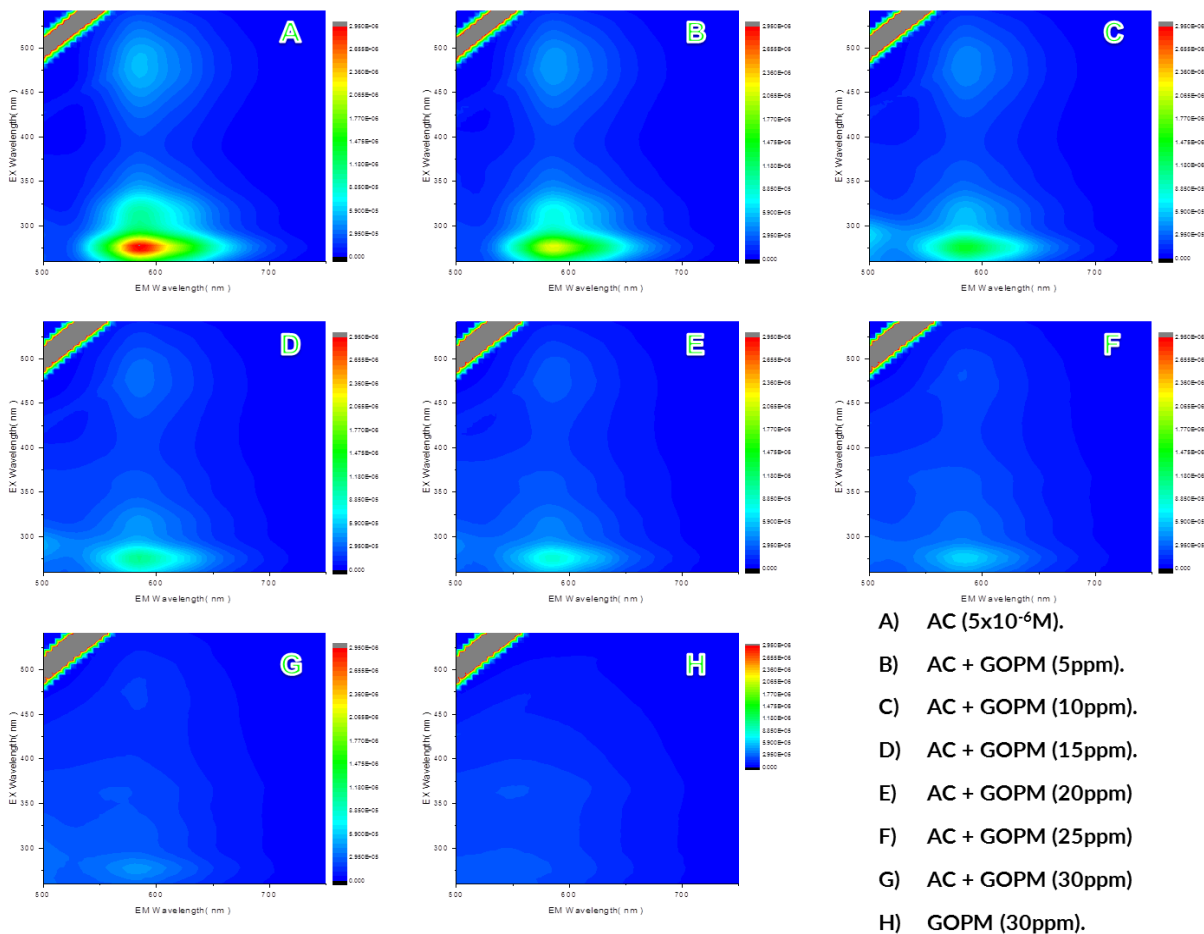


Figura 64. Espectros de absorción electrónica del apagamiento de la fluorescencia del AC (5×10^{-6} M) con GOPM. Concentración de GOPM = 0 ppm (1), 5 ppm (2), 10 ppm (3), 15 ppm (4), 20 ppm (5), 25 ppm (6) y 25 ppm sin AC (7)



- A) AC (5×10^{-6} M).
- B) AC + GOPM (5ppm).
- C) AC + GOPM (10ppm).
- D) AC + GOPM (15ppm).
- E) AC + GOPM (20ppm)
- F) AC + GOPM (25ppm)
- G) AC + GOPM (30ppm)
- H) GOPM (30ppm).

Figura 65. Mapas 3D del apagamiento de la fluorescencia del AC con diferentes concentraciones de GOPM (A-H).

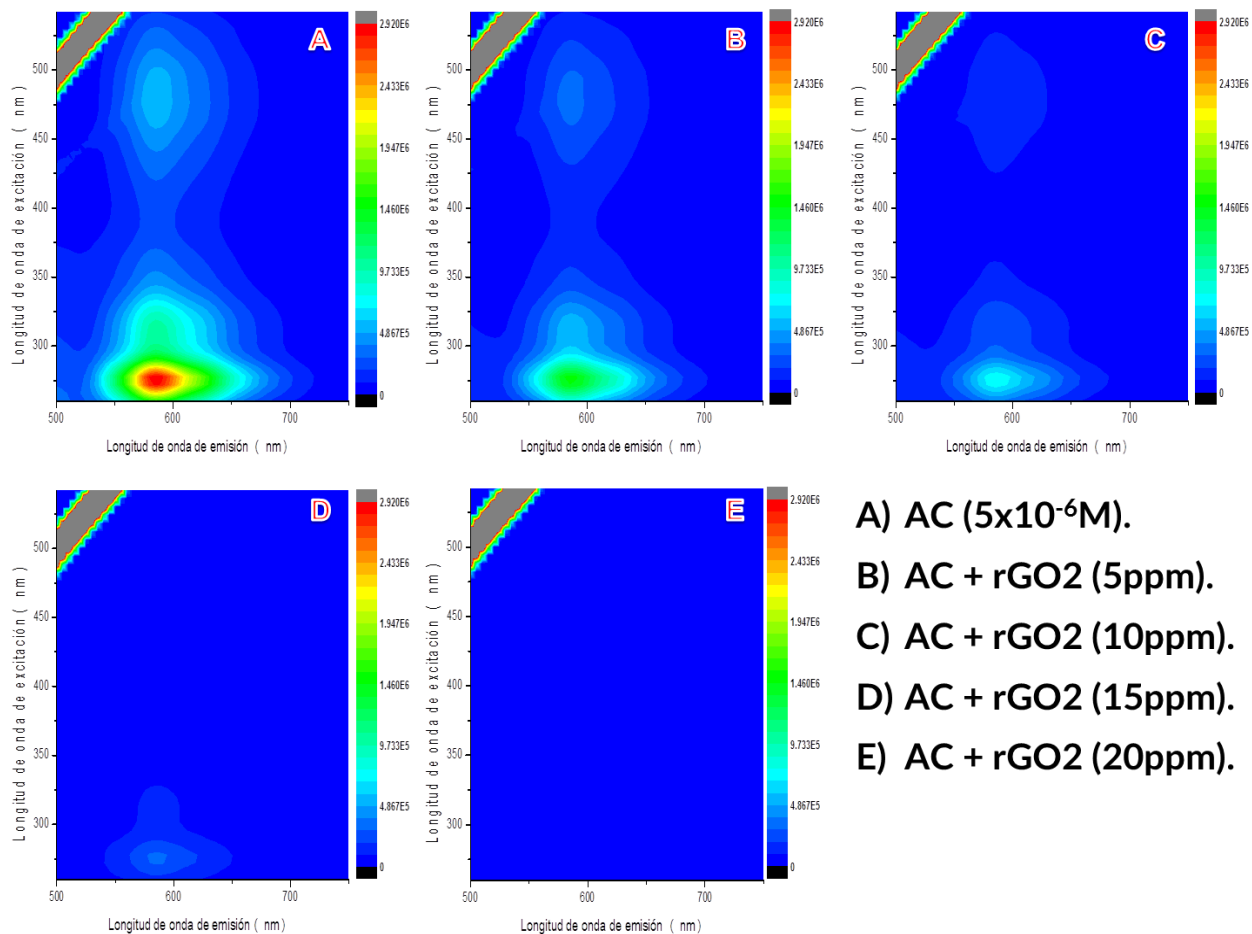


Figura 66. Mapas 3D del apagamiento de la fluorescencia del AC con diferentes concentraciones de rGO12 (A-E).