

UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
DEPARTAMENTO DE FÍSICA
VALPARAÍSO – CHILE



ADSORCIÓN DE TRIPTÓFANO EN NANOMATERIALES A BASE DE CARBONO

SOFÍA ANTONIA FLORES BAHAMÓNDEZ

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS, MENCIÓN FÍSICA

PROFESOR GUÍA:

Dra. Valeria del Campo

COMITÉ DE TESIS:

Dra. Valeria del Campo

Dra. Natalia Hassan

Dr. Tomás Corrales

AGOSTO – 2024

Agradecimientos

Primero que todo le agradezco profundamente a la doctora Valeria del Campo por darme la oportunidad de trabajar con ella y por introducirme al área de la física experimental. Agradezco su apoyo, paciencia, su buena disposición y su orientación durante todo el proceso de esta investigación. Le agradezco también a la doctora Natalia Hassan por su ayuda, su asesoramiento y por recibirme en el laboratorio de Santiago. A ambas les agradezco todos los conocimientos que me traspasaron y que me serán de ayuda en el futuro. Espero algún día poder ser una excelente profesional como ustedes, y poder inspirar a otras mujeres a seguir el camino de la ciencia como ustedes lo hicieron conmigo.

También le agradezco al doctor Tomás Corrales y al doctor Eduardo Berríos por su ayuda y consejo durante las reuniones de tesis. En ellas aprendí la importancia de la ciencia multidisciplinaria. Le agradezco a Carla Arroyo por los conocimientos que me traspasó en el laboratorio, a Benjamín Schleyer por su gran ayuda con las mediciones de AFM y al profesor Cristián Ramírez por facilitarnos su laboratorio. También le agradezco a la doctora Delfina Muñoz y a Perrine Carroy por su guía durante la pasantía en INES, Francia.

Le agradezco a mis compañeros y profesores del laboratorio de síntesis de nanomateriales y del laboratorio de transporte eléctrico por todo su apoyo, motivación, amistad y los buenos momentos que compartimos durante este proceso. Le agradezco también a mis amigos, en especial a Amanda, Pablo, Camilo, María y Luciano, por apoyarme en los momentos difíciles de la investigación y por celebrar conmigo cuando tenía éxito. También le agradezco a Diego por acompañarme en todo este proceso y por motivarme siempre que lo necesité.

También le agradezco a mi familia por su apoyo y preocupación, en especial a mi hermana Paulina, mi papá René y mis abuelos Elisa y Julio. También le agradezco a mi mamá Marisol por educarme y por llevarme por el camino de las matemáticas que en un futuro se convirtió en amor por la física. Gracias por todos los valores y conocimientos que me enseñaste con tanto cariño y paciencia. Te llevo siempre en mi corazón.

Finalmente agradezco el apoyo financiero de los siguientes proyectos: “Graphene as transparent current spreading electrode in silicon heterojunction solar cells” proyecto ANID-ECOS210038 #C21E08; “Millennium Nucleus in NanoBioPhysics” proyecto ANID - Millennium Science Initiative Program NNBP # NCN2021_021, “Glass nanopatterning for self cleaning photovoltaic modules” proyecto Fondecyt # 1210490; y “Solar Energy Research Center” proyecto ANID/FONDAP # 1523A0006.

Resumen

La nanomedicina ha hecho aportes significativos para la salud de las personas, desarrollando implantes, terapias, medicamentos y reparación de tejidos entre otros. Para diseñar materiales implantables, que imiten las funciones biológicas requeridas, es importante comprender la respuesta del cuerpo humano a estos materiales. Por lo tanto, es fundamental comprender la interacción entre nanomateriales y biomoléculas como los aminoácidos, unidad principal de las proteínas. En este trabajo estudiamos experimentalmente la interacción de nanomateriales a base de carbono: grafeno y óxido de grafeno, con distintos tipos de triptófano. La síntesis de nanomateriales fue llevada a cabo mediante la técnica de PECVD (*Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition*) y utilizando una técnica libre de polímeros, transferimos nanomateriales de áreas grandes ($\sim 2,8 \text{ cm}^2$) a distintos tipos de sustratos. Estudiamos la estructura de los nanomateriales y de los distintos tipos de triptófano mediante espectroscopía Raman y microscopía óptica y analizamos la naturaleza de su interacción mediante mediciones de absorbancia ultravioleta. Los resultados muestran que en los casos en que el triptófano se adsorbe en el nanomaterial, el cambio de concentración no depende de la concentración inicial de la solución de triptófano ni del área del nanomaterial. A partir de mediciones AFM (*Atomic Force Microscopy*) inferimos que el triptófano se adsorbe en la superficie del nanomaterial en aglomeraciones, sugiriendo que las isothermas de adsorción obtenidas en cada experimento podrían ser ajustadas con modelos de adsorción en multicapas como el modelo BET (Brunauer-Emmett-Teller).

En esta tesis también presentamos el trabajo realizado durante una pasantía en el *Institut National de l'Énergie Solaire* (Francia). A través de la técnica de elipsometría espectroscópica, estudiamos los índices ópticos del grafeno, obteniendo valores menores a los reportados en la literatura.

Abstract

Nanomedicine has made significant contributions to human health, developing implants, therapies, drugs and tissue repair, among others. In order to design implantable materials that mimic the required biological functions, it is important to understand the response of the human body to these materials. To do so, it is essential to understand the interaction between the surfaces of these materials and biomolecules, such as amino acids, the main unit of proteins. In this work, we experimentally studied the interaction of carbon-based nanomaterials: graphene and graphene oxide, with different types of tryptophan. The synthesis of nanomaterials was carried out using the PECVD (Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition) technique and by means of a polymer-free technique, we transferred large-area nanomaterials ($\sim 2,8 \text{ cm}^2$) to different types of substrates. Raman spectroscopy and optical microscopy were used to study the structure of nanomaterials and different types of tryptophan. We have analyzed the nature of the interaction by absorbance measurements, and we observed that in cases where tryptophan is adsorbed on the nanomaterial, the concentration change does not depend on the initial concentration of the tryptophan solution or on the surface area of the nanomaterial. From AFM (Atomic Force Microscopy) measurements we infer that tryptophan is adsorbed on the surface of the nanomaterial in agglomerations, suggesting that the adsorption isotherms obtained in each experiment could be fitted with multilayer adsorption models such as the BET (Brunauer-Emmett-Teller) model.

In this thesis we also present the work carried out during an internship at the *Institut National de l'Énergie Solaire* (France). By means of the spectroscopic ellipsometry technique, we studied the optical indices of graphene, obtaining lower values than those reported in the literature.

Glosario

PL: fotoluminiscencia espectroscópica (*photoluminescence spectroscopy*).

CV: voltametría cíclica (*cyclic voltammetry*).

TEM: microscopio electrónico de transmisión (*Transmission Electron Microscopy*).

AFM: microscopía de fuerza atómica (*Atomic Force Microscopy*).

FM: frecuencia modulada (modo de medición en AFM).

AM: amplitud modulada (modo de medición en AFM).

SEM: microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscope*).

SE: elipsometría espectroscópica (*Spectroscopic Ellipsometry*).

EDX: espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (*Energy Dispersive X-Ray spectroscopic*)

CVD: deposición química en fase de vapor (*Chemical Vapor Deposition*).

PECVD: deposición química en fase de vapor mejorada con plasma (*Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition*).

FWHM: ancho a media altura (*full width at half maximum*).

2D: bidimensional.

UV: espectro ultravioleta.

vis: espectro visible.

GO: óxido de grafeno (*graphene oxide*).

rGO: óxido de grafeno reducido (*reduced graphene oxide*).

Gly, G: glicina

Tyr, Y: tirosina

Trp, W: triptófano

Phe, F: fenilalanina

His, H: histidina

Arg, R: arginina

Met, M: metionina

TRP1: triptófano de prueba

TRP2: triptófano "N'-FORMYL-L-TRYPTOPHAN HYDROCHLORIDE" ($C_{12}H_{12}N_2O_3 \cdot HCl$)

TRP3: triptófano "NALPHA-ACETYL-DL-TRYPTOPHAN METHYL ESTER" ($C_{14}H_{16}N_2O_3$)

BET: Brunauer-Emmett-Teller (autores del modelo de adsorción BET).

ΔA^{ads} : energía libre de Helmholtz de adsorción .

ΔA_{Graph}^{ads} : energía libre de adsorción sobre grafeno.

ΔA_{GO}^{ads} : energía libre de adsorción sobre óxido de grafeno.

$SASA^{ads}$: área superficial accesible al solvente.

V_{H_2O} : volumen de una molécula de agua.

SA_{H_2O} : área superficial de una molécula de agua.

C : concentración de soluto en fase líquida en equilibrio.

C_s : concentración de saturación de un soluto en fase líquida.

C^0 : concentración de soluto estándar.

C_{madre} : concentración de la solución madre

ΔC : cambio de concentración

$C_{inicial}$: concentración inicial

C_{final} : concentración final

$\% \Delta C$: porcentaje de cambio de concentración respecto a su valor inicial.

$q(C)$: cantidad de soluto adsorbido en una superficie por unidad de área para una cierta concentración C .

Q : cantidad de soluto adsorbido por unidad de área cuando todos los sitios de adsorción se encuentran ocupados (saturación de la superficie).

k_a : constantes de proporcionalidad para la tasa de adsorción en el modelo de Langmuir.

k_d : constantes de proporcionalidad para la tasa de desorción en el modelo de Langmuir.

K_{eq} : constante de equilibrio de adsorción.

K_{eq}^0 : constante de equilibrio de adsorción estándar.

K_1 : constante de equilibrio de adsorción de la primera capa en el modelo de BET.

K_L : constante de equilibrio de adsorción de las capas adsorbidas para $n > 1$ en el modelo de BET.

ΔG_{ads}^0 : energía libre de Gibbs estándar.

R : constante del gas ideal.

T : temperatura absoluta.

c : constante de BET.

N : número de capas de adsorbato en la adsorción de BET.

E_1 : energía de adsorción de la primera capa adsorbida en el modelo de BET.

E_L : energía de adsorción de las capas adsorbidas para $n > 1$ en el modelo de BET.

x : presión relativa del gas o concentración relativa del soluto en una solución en el modelo de BET.

p : presión de equilibrio del adsorbato.

p_s : presión de saturación del adsorbato.

A : absorbancia

$A_{inicial}$: absorbancia inicial

A_{final} : absorbancia final

$\% \Delta A$: porcentaje de cambio de absorbancia respecto a su valor inicial

I_0 : intensidad de la luz incidente en la Ley de Beer-Lambert

I : intensidad de la luz transmitida en la Ley de Beer-Lambert

V : volumen.

S : área de nanomaterial.

n : índice de refracción (parte real del índice de refracción complejo).

k : coeficiente de extinción (parte imaginaria del índice de refracción complejo).

Ψ : cambio de amplitud de la luz reflejada en SE.

Δ : diferencia de fase de la luz reflejada en SE.

r_p : coeficientes de reflexión de Fresnel de la luz de la polarización p de la luz reflejada.

r_s : coeficientes de reflexión de Fresnel de la luz de la polarización s de la luz reflejada.

ϵ : función dieléctrica.

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1. MOTIVACIÓN.....	7
1.2. ESTADO DEL ARTE.....	8
1.3. ANTECEDENTES.....	16
1.3.1. <i>Modelo de isoterma de Langmuir</i>	16
1.3.2. <i>Modelo de isoterma de BET</i>	18
1.4. OBJETIVO GENERAL.....	21
1.5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
1.6. TRABAJO REALIZADO.....	21
2. METODOLOGÍA.....	22
2.1. CRECIMIENTO DE GRAFENO.....	22
2.2. TRANSFERENCIA DE GRAFENO.....	23
2.3. ESPECTROSCOPIA RAMAN Y MICROSCOPIA ÓPTICA.....	25
2.4. EXPERIMENTO DE ADSORCIÓN.....	28
2.4.1. <i>Tipos de triptófano</i>	28
2.4.2. <i>Preparación soluciones de triptófano</i>	29
2.4.3. <i>Espectrofotometría</i>	30
2.4.4. <i>Experimento de adsorción con placas de cultivo</i>	32
2.4.5. <i>Experimento cinética de adsorción</i>	33
2.4.6. <i>Análisis de datos</i>	34
2.4.7. <i>Microscopía de Fuerza Atómica (AFM, Atomic Force Microscopy)</i>	36
3. RESULTADOS.....	37
3.1. SÍNTESIS DE NANOMATERIALES.....	37
3.2. CARACTERIZACIÓN TRIPTÓFANO.....	39
3.3. EXPERIMENTOS DE ADSORCIÓN.....	41
3.3.1. <i>TRP1</i>	41
3.3.2. <i>TRP2</i>	49
3.3.3. <i>TRP3</i>	56
4. PASANTÍA CEA INES.....	67
4.1. ESTADO DEL ARTE.....	67
4.2. METODOLOGÍA.....	74
4.2.1. <i>Muestras</i>	74
4.2.2. <i>Elipsometría Espectroscópica</i>	74
4.3. RESULTADOS.....	76
5. CONCLUSIONES.....	83
6. REFERENCIAS.....	85

1. Introducción

1.1. Motivación

El gran avance de la nanotecnología en el último tiempo ha despertado el interés por los materiales bidimensionales (2D) en el área de la nanomedicina. Los materiales 2D son buenos candidatos para aplicaciones biomédicas debido a su alta área superficial y su rápida respuesta a señales externas. Por ello se espera que tengan un gran potencial en aplicaciones médicas como administración de fármacos, tratamientos contra el cáncer, antisépticos, estimulación neuronal, recubrimientos resistentes a los coágulos para implantes, imagenología, terapias fototérmicas y fotodinámicas, entre otras [1,2].

Uno de los nanomateriales 2D que ha llamado la atención desde su síntesis en 2004 es el grafeno. El grafeno es una película bidimensional, de un átomo de grosor, compuesta por átomos de carbono con hibridación sp^2 , organizados en una red cristalina de patrón hexagonal. El grafeno es el constituyente más simple de los demás alótropos de carbono con hibridación sp^2 como el grafito, los nanotubos de carbono y el fullereno. Las propiedades ópticas, mecánicas, electrónicas y estructurales del grafeno lo hacen un material ideal para distintas aplicaciones en campos como la óptica, electrónica, sensores químicos y biológicos, electrodos transparentes conductores para celdas solares, fotodetectores, entre otros [3–5].

Hoy en día, el grafeno y otros nanomateriales a base carbono como el óxido de grafeno y los nanotubos de carbono, son materiales atractivos para aplicaciones biomédicas [6], sin embargo, aun se requieren estudios de la interacción de estos nanomateriales con sistemas biológicos para saber si son aptos para dichas aplicaciones o perjudiciales para la salud [7,8]. Si bien no es trivial comprender la respuesta fisiológica de los sistemas vivos a los nanomateriales a base de carbono, un buen comienzo es estudiar la interacción de éstos con pequeñas biomoléculas como lo son los aminoácidos, unidad principal de las proteínas [9]. Conocer las características del proceso de adsorción de aminoácidos podría ser útil para en un futuro comprender y predecir la interacción de los materiales a base de carbono con biomoléculas más grandes como péptidos o proteínas.

En este trabajo, estudiamos la interacción de distintos tipos de triptófano y nanomateriales a base de carbono como grafeno y óxido de grafeno. Elegimos el triptófano como objeto de estudio por dos razones: la primera es que, al ser un aminoácido aromático, tras la excitación UV exhibe un espectro característico de absorbancia, por lo cual es fácil detectarlo [10]. La segunda razón es que según el estudio de Barria *et al.* [2] el triptófano es uno de los aminoácidos que mejor se adsorbe en grafeno. Por otro lado, una de las ventajas de estudiar la adsorción en grafeno es que, al ser el constituyente más simple de los demás alótropos de carbono con hibridación sp^2 , este trabajo sirve como base para el estudio de la interacción entre triptófano y esos materiales más complejos.

1.2. Estado del Arte

Hasta la fecha, se han desarrollado algunas investigaciones tanto teóricas como experimentales sobre la interacción entre distintos tipos de aminoácidos con distintos tipos de nanomateriales 2D. En esta sección, discutimos los resultados del trabajo experimental de Mallineni *et al.* [1] y el trabajo teórico de Barria *et al.* [2] sobre la adsorción de aminoácidos en grafeno y óxido de grafeno, haciendo énfasis en los resultados correspondientes al triptófano.

Mallineni *et al.* estudiaron las interacciones electrónicas entre tres tipos de aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina y fenilalanina) y tres nanomateriales 2D: grafeno, óxido de grafeno (GO) y nitruro de boro (BN). Para ello utilizaron espectroscopía Raman, espectroscopía de fotoluminiscencia (PL, *photoluminescence spectroscopy*) y caracterización electroquímica a partir de mediciones de voltametría cíclica (CV, *cyclic voltammetry*).

Debido a que en el marco de esta tesis el aminoácido y los nanomateriales que usamos en nuestros experimentos corresponden a triptófano, y grafeno y óxido de grafeno, respectivamente, nos centraremos en los resultados del estudio de Mallineni *et al.* que conciernen a esa biomolécula y a esos nanomateriales.

El grafeno utilizado en esta investigación fue sintetizado usando la técnica de exfoliación química, mientras que el óxido de grafeno fue obtenido mediante el método de Hummer. Para estudiar la interacción de los materiales 2D con los aminoácidos, incubaron 100 μg de cada nanomaterial por 12 horas en una solución de 1 ml de aminoácidos (con concentraciones en un rango de 0 a 70 $\mu\text{M/L}$). Después de la incubación, las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante (*supernatant*) fue removido. Finalmente, las muestras se lavaron 3 veces para remover cualquier aminoácido no adsorbido en los nanomateriales.

A partir de mediciones TEM (*Transmission electron microscopy*), Raman y AFM (*Atomic Force Microscopy*), se mostró que el grafeno y el óxido de grafeno eran de pocas capas con $\sim 6\text{-}8$ nm de grosor y con un área promedio de $\sim 25 \mu\text{m}^2$. Los resultados de espectroscopía Raman para los materiales 2D usados en este experimento se muestran en la Figura 1. En el caso del óxido de grafeno (curva verde) se puede observar una banda D muy intensa y una banda G significativamente más ancha que la banda G del grafeno (rojo). Esto se debe a la presencia de defectos inducidos en el proceso de oxidación química en la preparación de la muestra. En el caso del grafeno la banda 2D presenta dos *peaks* las cuales sugieren que el grafeno tiene pocas capas.

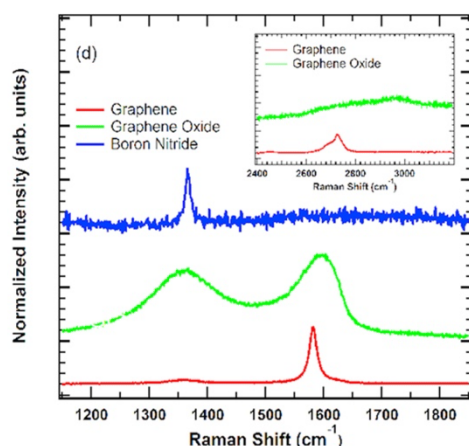


Figura 1. Espectro Raman para los nanomateriales prístinos: grafeno (rojo), óxido de grafeno (verde) y nitruro de boro (azul).

Los aminoácidos aromáticos usados en este experimento, presentan una intensa fotoluminiscencia cuando son excitados por luz ultravioleta. Por ello, para caracterizar la adsorción de aminoácidos en diferentes nanomateriales, se tomaron mediciones de fotoluminiscencia de los aminoácidos residuales en los nanomateriales después de 3 rondas de lavado, para distintas concentraciones de aminoácidos, obteniendo las isotermas de la Figura 2.

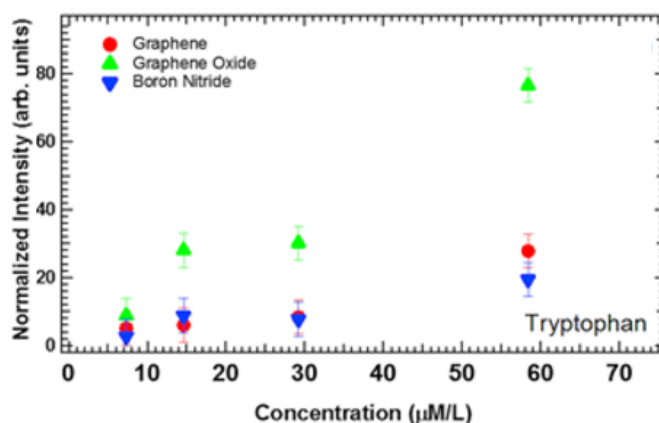


Figura 2. Isotermas de adsorción para triptófano en grafeno (rojo), óxido de grafeno (verde) y nitruro de boro (azul).

Aunque es posible ajustar las isotermas a modelos de Langmuir (explicado con detalle en la siguiente sección), no se derivaron conclusiones cuantitativas porque muchas suposiciones de las isotermas de Langmuir eran inválidas en este experimento. Sin embargo las isotermas de adsorción se pueden usar para obtener información cualitativa respecto a la afinidad relativa entre los materiales 2D y los aminoácidos.

Como se observa en la Figura 2, tanto el grafeno como el óxido de grafeno presentan una tendencia creciente para la adsorción de triptófano, sin embargo, la adsorción es mayor en el caso del GO. Esto último es un resultado esperable, pues se predice que los grupos hidroxilos del óxido de grafeno forman puentes de hidrógeno con el átomo de hidrógeno del anillo indol del triptófano (Figura 3). Además de los puentes de hidrógeno, el triptófano puede presentar interacciones $\pi - \pi$ con el óxido de grafeno, debido a la presencia de la nube π en el anillo indol.

Por otro lado, en el caso del grafeno, existe una nube de electrones π uniformemente deslocalizada, que induce un momento cuadripolar en la película de grafeno [11]. La tendencia creciente de la adsorción de triptófano en grafeno, se puede atribuir al apilamiento $\pi - \pi$ que surge de la interacción de los cuadrupolos inducidos por la nube de electrones π y el momento cuadripolar del anillo aromático del triptófano.

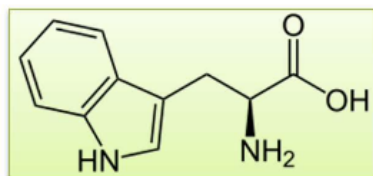


Figura 3. Estructura química del triptófano.

Posterior a las mediciones de PL, usaron las técnicas de voltametría cíclica y espectroscopía Raman para entender la naturaleza de los enlaces químicos y la influencia de la adsorción de aminoácidos en la estructura electrónica de los nanomateriales. Primero realizaron mediciones de CV para cuantificar la transferencia de carga electroquímica para distintas concentraciones de aminoácidos, y a partir de las curvas de corriente vs voltaje, calcularon isothermas de densidad de carga (Figura 4). Éstas muestran los efectos combinados de fisisorción y quimisorción y se observa una clara tendencia en función de la concentración para todos los nanomateriales. Se observó que el GO mostraba los mayores cambios en la densidad de carga, sugiriendo la interacción fuerte entre el GO y los aminoácidos, como se observó también en las mediciones de PL y previos estudios teóricos [12]. Por otro lado, los cambios en la densidad de carga en grafeno fueron significativos (recuadro Figura 4) pero mucho más pequeños comparados con los del GO.

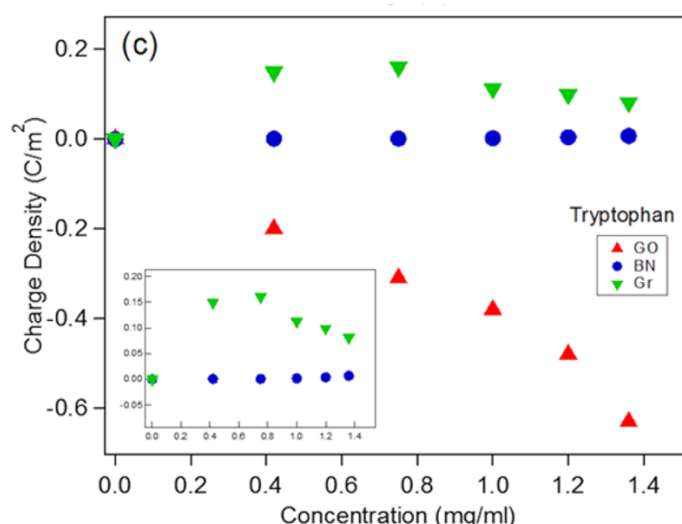


Figura 4. Isotherma de densidad de carga de triptófano en grafeno (verde), óxido de grafeno (rojo) y nitruro de boro (azul).

Las mediciones de CV por si solas, no permiten distinguir la diferencia entre interacciones físicas y químicas. Sin embargo, la espectroscopía Raman de nanomateriales a base de carbono es altamente sensible a la transferencia de carga y se puede usar para resolver la diferencia entre interacciones químicas y físicas. Los nanomateriales a base de carbono presentan *peaks* característicos en su espectro Raman como la banda G y 2D, cuya frecuencia y forma depende de la energía de Fermi de los nanomateriales y cambian su posición al haber transferencia de carga [13–16]. En un estudio teórico, Rajesh *et al.* [17] mostraron que la energía de Fermi del grafeno sufre un cambio general al interactuar con aminoácidos debido a la transferencia de carga.

En este estudio, al comparar visualmente los espectros Raman de los nanomateriales prístinos y post adsorción, la diferencia fue muy sutil (Figura 5), sin embargo el cambio se puede apreciar mejor a partir de los datos de posición y ancho a media altura (FWHM: *full width at half maximum*) de las bandas características de los nanomateriales (Tabla 1). El compuesto GO-triptófano mostró un cambio decreciente en la frecuencia (posición) de la banda G (Tabla 1), lo cual es un resultado esperable debido a la formación de enlaces químicos, como se comprueba en la reducción de la densidad de carga de las mediciones de CV. En cuanto a la banda 2D, ésta se encuentra ausente en el GO.

Tabla 1. Posiciones y ancho a media altura (FWHM: *full width at half maximum*) de los peaks de los espectros Raman de los nanomateriales prístinos y post adsorción con triptófano derivados de la Figura 5.

	Prístino		Triptófano	
	Posición (cm ⁻¹)	FWHM (cm ⁻¹)	Posición (cm ⁻¹)	FWHM (cm ⁻¹)
Óxido de Grafeno (Banda G)	1598,3	109,96	1596,7	105,8
Grafeno (Banda G)	1581,5	15,36	1581,1	18,27
Grafeno (Banda 2D deconvolucionada)	2689,1	40,12	2690,6	48,04
	2728,4	37,04	2729	49,45

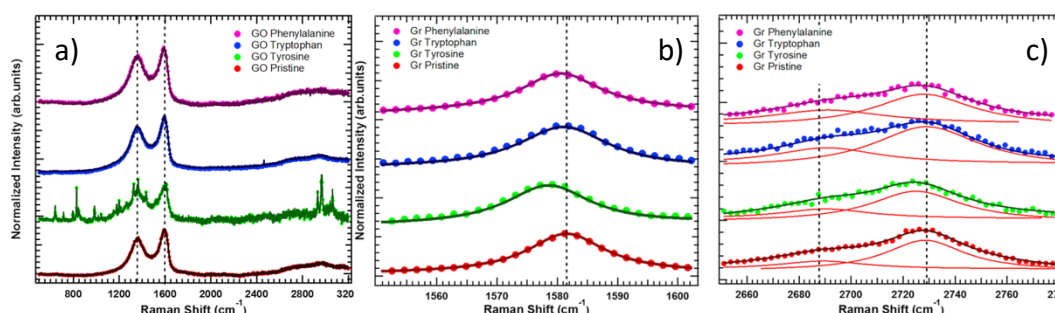


Figura 5. Espectro Raman de los nanomateriales prístinos (rojo) y post adsorción con tirosina (verde), triptófano (azul) y fenilalanina (magenta) para: (a) óxido de grafeno, (b) grafeno (banda G) y (c) grafeno (banda 2D deconvolucionada en las curvas rojas).

En el caso del grafeno, la adsorción con triptófano resultó en un incremento del ancho de las bandas G y 2D, mientras que el pequeño cambio en la frecuencia indicaría que no hubo transferencia de carga (Tabla 1 y Figura 5b y 5c). En base a estos resultados es probable que el triptófano presente fisorción de multicapas. Cabe mencionar que anteriormente el triptófano presentó un aumento en la densidad de carga debido a la presencia de un *peak* en las mediciones CV de corriente vs voltaje, sugiriendo que ambas fisorción y quimisorción están involucradas en la interacción.

En resumen, en el trabajo de Mallineni *et al.* observaron mediante mediciones de PV y CV que el óxido de grafeno interactúa fuertemente con el triptófano mediante puentes de hidrógeno en comparación con el grafeno que interactúa mediante enlaces $\pi - \pi$. Las mediciones de CV y de espectroscopía Raman mostraron una transferencia de carga significativa entre grafeno y óxido de grafeno con los aminoácidos aromáticos. Por último se concluye que la presencia de grupos funcionales y las interacciones $\pi - \pi$ juegan un rol importante en la adsorción de aminoácidos en los nanomateriales 2D.

Dentro de los estudios teóricos que se han hecho sobre la adsorción de aminoácidos en nanomateriales a base de carbono se encuentra el trabajo de Barria *et al.* en el que estudiaron la adsorción de los 20 aminoácidos proteínogénicos (en agua) en grafeno prístino mediante cálculos de energía libre y posteriormente, compararon con la energía libre de adsorción en óxido de grafeno para aminoácidos representativos.

Al calcular la energía libre de Helmholtz de adsorción (ΔA^{ads}) en una película de grafeno de cada aminoácido observaron que a pesar de su naturaleza química, todos los aminoácidos presentan ΔA^{ads} favorable hacia el grafeno prístino, lo cual concuerda con estudios previos [18–21]. En la Figura 6 se encuentran los resultados de la energía libre de adsorción reducida por la ΔA^{ads} de la Glicina (Gly), para los 20 aminoácidos proteínogénicos. Según estos resultados, los aminoácidos con grupos aromáticos (Tirosina (Tyr), Triptófano (Trp), Fenilalanina (Phe) e Histidina (His)) junto a la Arginina (Arg) y la Metionina (Met), son los que presentan las afinidades más fuertes con el grafeno.

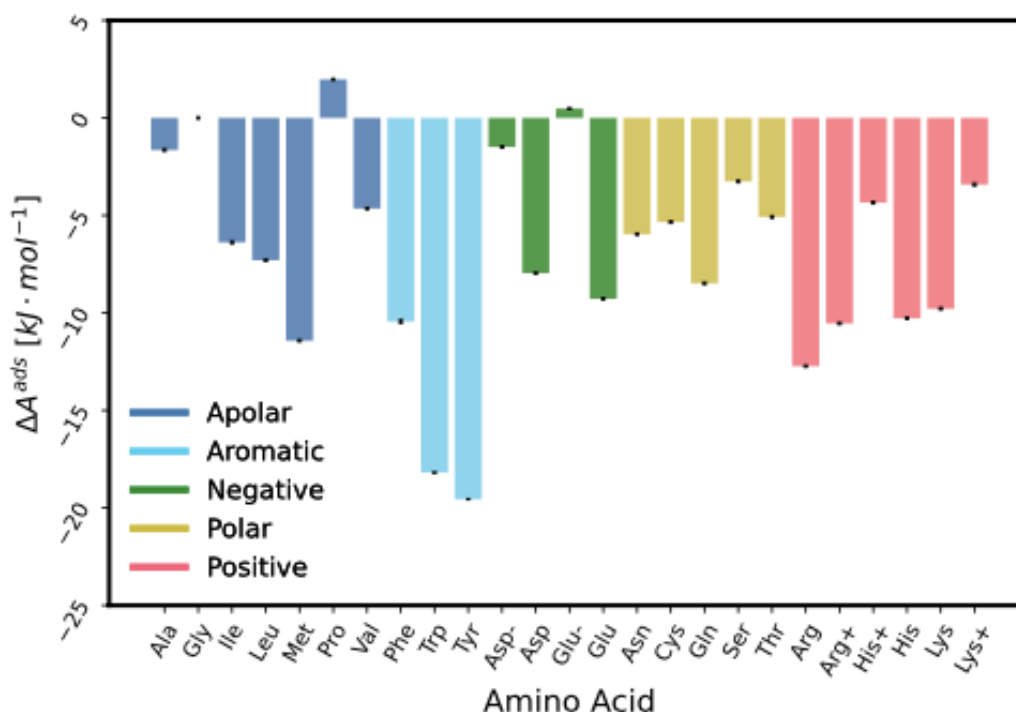


Figura 6. Energía libre de adsorción reducida (con ΔA^{ads} de Gly fijado en 0) ordenado según la naturaleza de la cadena lateral: apolar (azul), aromático (celeste), negativo (verde), polar (amarillo) y positivo (rojo).

Dado que los aminoácidos aromáticos y la Arg se encuentran entre los aminoácidos que presentan las más pesadas cadenas laterales, lo anterior sugiere una relación entre el tamaño y la ΔA^{ads} . Por ello graficaron la ΔA^{ads} reducida como función del peso molecular (Figura 7) y encontraron que hay una correlación notoria entre ambas magnitudes. Sin embargo los aminoácidos con carga, con excepción de Arg+, no siguen esta tendencia, por lo que la regresión lineal de la Figura 7 solo considera aminoácidos neutros, obteniendo una correlación lineal con un $r^2=0,85$.

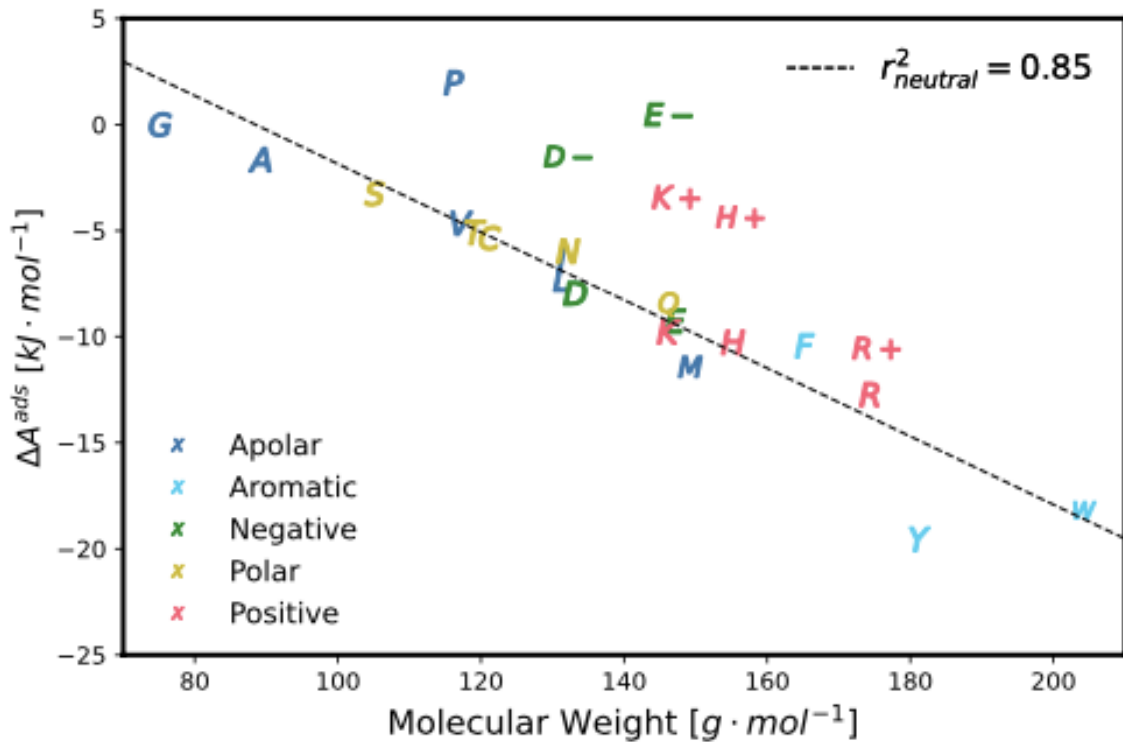


Figura 7. Energía libre de adsorción reducida (con ΔA^{ads} de Gly fijado en 0) como función del peso molecular. El ajuste lineal no incluye a los aminoácidos cargados.

Como el modelo para el grafeno de su trabajo solo incluye interacciones de van der Waals, esta fuerte correlación sugiere que está dominada por las interacciones de dispersión entre aminoácidos y grafeno, ya que este último es proporcional al tamaño molecular. Sin embargo, la eliminación de agua de la superficie, también podría desempeñar un papel importante en el proceso de adsorción. Por ello, investigaron si la correlación también estaba presente para las diferencias en el área superficial accesible al solvente ($\Delta SASA^{ads}$). Con ese objetivo, graficaron la ΔA^{ads} reducida en función de $\Delta SASA^{ads}$ (Figura 8) encontrando una correlación lineal de $r^2=0,83$, similar a la de la Figura 7, para los aminoácidos sin carga.

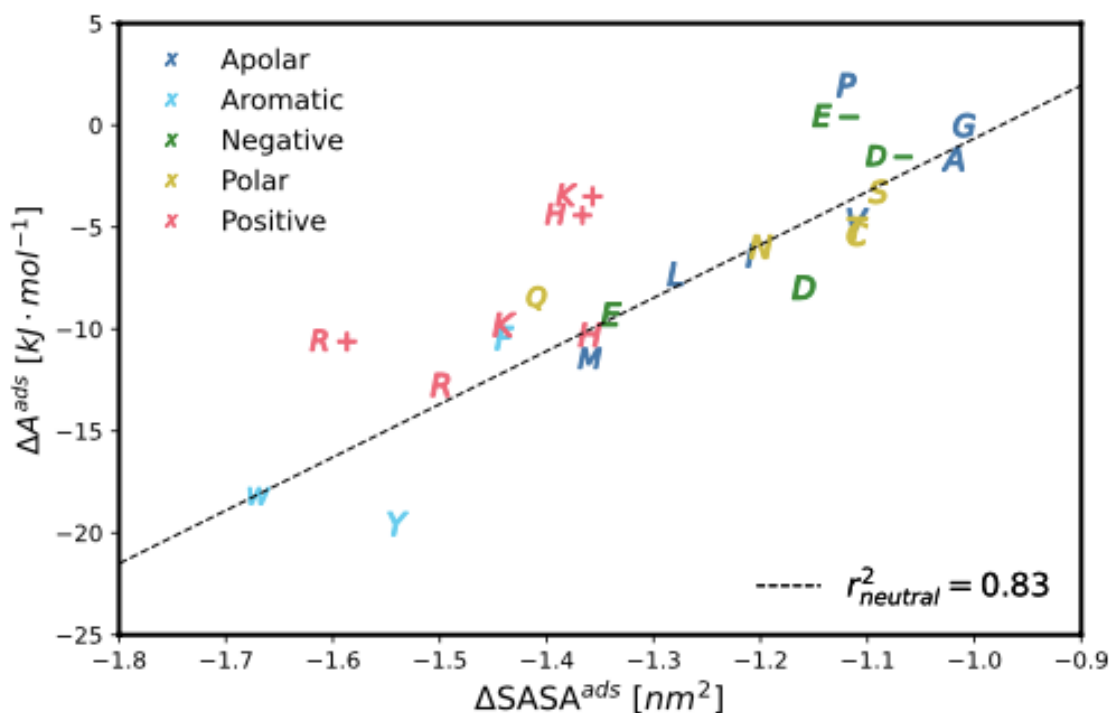


Figura 8. Energía libre de adsorción reducida (con ΔA^{ads} de Gly fijado en 0) como función de $\Delta SASA^{ads}$. El ajuste lineal no incluye a los aminoácidos cargados.

El negativo de $\Delta SASA^{ads}$ es una medida de la superficie de interacción efectiva entre el aminoácido y el grafeno. A partir del volumen de una molécula de agua ($V_{H_2O} \sim 0,03 \text{ nm}^3$) y suponiendo una geometría esférica perfecta, el área superficial de una sola molécula de agua (SA_{H_2O}) es cercana a $0,5 \text{ nm}^2$. El triptófano (Trp, W), al ser el aminoácido más pesado, exhibe la mayor superficie de interacción, que es aproximadamente 4 veces SA_{H_2O} , mientras que, para la Glicina (Gly, G), la superficie de interacción, es aproximadamente 2 veces SA_{H_2O} . Por lo tanto, de acuerdo a lo anterior y a la Figura 8, el proceso de adsorción elimina aproximadamente un rango de 2 a 4 moléculas de agua de la superficie del grafeno. En otras palabras, el proceso de adsorción en grafeno prístino requiere de un fenómeno de *dewetting* de la superficie.

Para el caso del óxido de grafeno llevaron a cabo cálculos para un subconjunto de aminoácidos sobre óxido de grafeno con un 25% de oxidación, eligiendo una muestra de cada grupo de cadena lateral: positivo, negativo, polar, apolar y aromático. En la Tabla 2 comparan los valores de la energía libre de adsorción sobre grafeno prístino ΔA_{Graph}^{ads} y sobre óxido de grafeno ΔA_{GO}^{ads} . Observaron que la adsorción sobre óxido de grafeno es mucho menos favorable que sobre grafeno prístino, lo cual difiere de los resultados del estudio de Mallineni *et al.*. Además, los resultados de la Tabla 2 sugieren que la correlación con el tamaño solo es válida para grafeno prístino y que en este caso la naturaleza química del aminoácido sí sirve para explicar estos resultados, a diferencia de lo observado para el grafeno prístino.

Los cambios en la ΔA^{ads} indican que las propiedades de adsorción en grafeno son sensibles a pequeños cambios en la superficie. La general cercanía de ΔA_{GO}^{ads} a 0

[kJ mol⁻¹] sugiere que incluso un 25% de oxidación es suficiente para hacer la superficie similar al solvente con respecto a la adsorción desde la solución acuosa. Esto es consistente con descripciones del óxido de grafeno como un material mucho más hidrofílico que el grafeno.

Tabla 2. Comparación de las energías libres de adsorción sobre grafeno prístino ΔA_{Graph}^{ads} y sobre grafeno oxidado ΔA_{GO}^{ads} para una selección de aminoácidos.

Nombre	ΔA_{Graph}^{ads} [kJ mol ⁻¹]	ΔA_{GO}^{ads} [kJ mol ⁻¹]
Arginina (+)	-18,5 ± 0,0	-1,9 ± 0,1
Asparagina	-13,9 ± 0,0	-4,1 ± 0,1
Glutamato (-)	-7,5 ± 0,0	-2,9 ± 0,1
Glicina	-8,0 ± 0,0	-2,2 ± 0,1
Isoleucina	-14,3 ± 0,1	-0,5 ± 0,1
Fenilalanina	-18,4 ± 0,1	-1,9 ± 0,1

En conclusión, todos los aminoácidos presentan ΔA^{ads} favorable hacia el grafeno prístino y la naturaleza química de los aminoácidos no explica esta afinidad. Encontraron que la ΔA^{ads} está dominada por interacciones de dispersión y que el tamaño molecular, expresado como $\Delta SASA^{ads}$ es un buen predictor de ΔA^{ads} , para aminoácidos sin carga y grafeno prístino. Aunque la interacción entre grafeno y aminoácidos es la principal causa del proceso de adsorción, éste requiere también un *dewetting* de la superficie y desolvatación de aminoácidos. Además, estimaron que la adsorción de aminoácidos remueve un rango de 2 a 4 moléculas de agua de la superficie del grafeno. Tras la oxidación parcial de la capa de grafeno, la ΔA^{ads} se redujo bastante, y la naturaleza química de las especies explica estos resultados.

1.3. Antecedentes

Para caracterizar un proceso de adsorción de moléculas en una superficie es común generar isotermas de adsorción que cuantifiquen la cantidad de moléculas adsorbidas en cierto material. Una isoterma de adsorción se obtiene graficando la cantidad de adsorbato (moléculas) adsorbido en una superficie (por unidad de área) en función de la concentración inicial de la solución desde la que la molécula es adsorbida. Idealmente la forma de la isoterma de adsorción puede proveer información sobre la termodinámica del proceso de adsorción al ajustar un modelo apropiado al gráfico de la isoterma, del cual se pueden obtener parámetros de ajuste [22]. Existen varios modelos que pueden ser usados para describir procesos de adsorción de biomoléculas. A continuación nos centramos en dos: el modelo de Langmuir [23] y el modelo de Brunauer-Emmett-Teller (BET) [24,25].

1.3.1. Modelo de isoterma de Langmuir

El modelo de Langmuir se basa en la suposición de que solo una monocapa de solutos no interactuantes se forma dinámicamente en la superficie absorbente, donde todos los sitios de adsorción tienen la misma energía de adsorción (Figura 9). Existen 4 condiciones que un sistema de adsorción debe satisfacer para poder caracterizar el proceso de adsorción mediante el modelo de Langmuir:

1. Todos los sitios de adsorción son equivalentes, distinguibles e independientes, en otras palabras, la superficie es homogénea.
2. Cada sitio de adsorción puede adsorber solo una molécula de soluto.
3. Los solutos adsorbidos no interactúan entre ellos en un modo que influya en el comportamiento de adsorción.
4. El proceso de adsorción debe representar un proceso dinámico, reversible y en equilibrio.

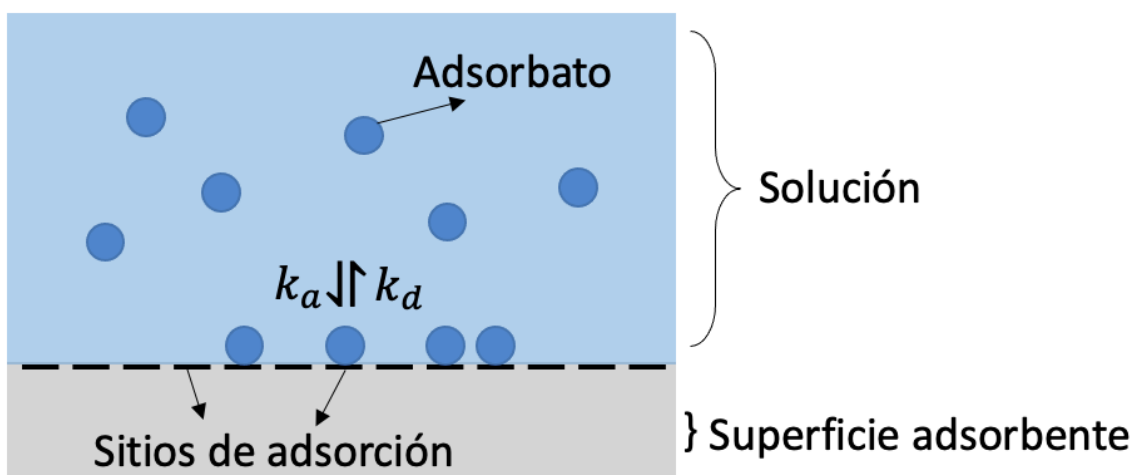


Figura 9. Esquema representativo de la adsorción según el modelo de Langmuir. El sistema se encuentra en equilibrio dinámico: las tasas de adsorción y desorción son iguales. Las moléculas de adsorbato son adsorbidas por sitios de adsorción equivalentes de la superficie, formando una monocapa de soluto.

A continuación explicamos la derivación y el significado físico de la ecuación de Langmuir (Ecuación 4). Definiendo como $q(C)$ la cantidad de soluto adsorbido en una superficie por unidad de área para una cierta concentración C , podemos deducir que el cambio en el tiempo de $q(C)$, equivale a la diferencia entre la tasa de adsorción y la tasa de desorción del soluto en la superficie. Por un lado, la tasa de adsorción debe ser proporcional a la concentración de la solución del soluto, C , y además debe ser proporcional a la cantidad de sitios de adsorción libres (desocupados) de la superficie, $(Q - q)$, donde Q es la cantidad de soluto adsorbido por unidad de área cuando todos los sitios de adsorción se encuentran ocupados (saturación de la superficie). En otras palabras, Q corresponde al número total de sitios de adsorción de la superficie y q corresponde al número de sitios ocupados. Por otro lado, la tasa de desorción debe ser proporcional a la cantidad de soluto adsorbido en la superficie para una cierta concentración $q(C)$. Las constantes de proporcionalidad para las tasas de adsorción y desorción, se conocen como k_a y k_d , respectivamente. Lo anterior se puede expresar en forma matemática como se describe en la Ecuación 1:

$$\frac{dq}{dt} = k_a \cdot C(Q - q) - k_d \cdot q \quad (1)$$

Si el sistema se encuentra en condiciones de equilibrio dinámico, como propone el modelo de Langmuir, la tasa de adsorción y la tasa de desorción son iguales, y la cantidad de soluto adsorbido en la superficie por unidad de área se mantiene constante en el tiempo ($dq/dt = 0$) (Ecuación 2). Ahora, definiendo la constante de equilibrio de adsorción, K_{eq} , como el cociente entre la constante de tasa de adsorción y la constante de tasa de desorción (Ecuación 3), al despejar q de la Ecuación 2, obtenemos la ecuación de la isoterma de Langmuir (Ecuación 4).

$$k_a \cdot C(Q - q) = k_d \cdot q \quad (2)$$

$$K_{eq} = \frac{k_a}{k_d} \quad (3)$$

$$q = \frac{QC}{C + K_{eq}^{-1}} \quad (4)$$

La isoterma de adsorción de Langmuir $q(C)$ toma la forma de la Figura 10a. Por lo tanto ajustando la Ecuación 4 a una isoterma de adsorción que tenga la forma de la isoterma de Langmuir, se obtienen los parámetros termodinámicos Q y K_{eq} del proceso de adsorción.

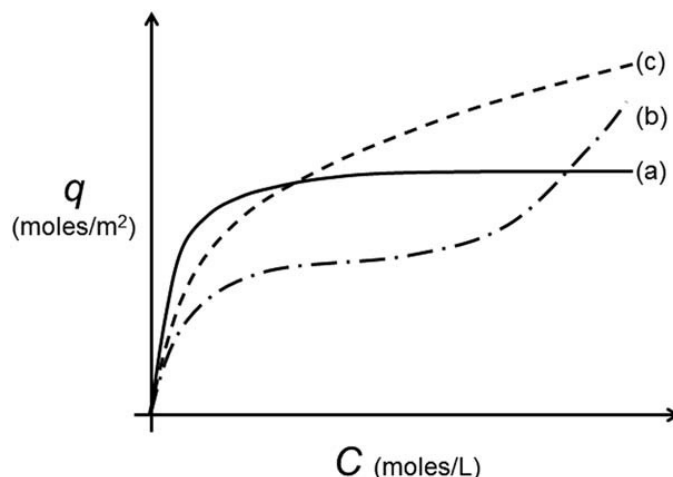


Figura 10. Forma característica de las isoterma de adsorción para los modelos de: (a) Langmuir, (b) BET, (c) Freundlich [26].

Otro parámetro que se puede obtener del ajuste de curva es la energía libre de Gibbs estándar ΔG_{ads}^0 , dada por la Ecuación 5, donde K_{eq}^0 es la constante de equilibrio estándar, R es la constante del gas ideal y T es la temperatura absoluta. La constante de equilibrio estándar K_{eq}^0 , se puede obtener de la K_{eq} , normalizando la concentración de soluto C por la concentración de soluto estándar convencional ($C^0 = 1,0 M$).

$$\Delta G_{ads}^0 = -RT \ln K_{eq}^0 \quad (5)$$

A pesar de que algunas de las condiciones del modelo de Langmuir casi nunca se cumplen en la práctica, la capacidad del modelo de expresar de manera precisa y matemáticamente simple el proceso de adsorción, lo convierten en un modelo base para los estudios de adsorción. Sin embargo, hay autores que sugieren que si no se cumplen las condiciones del modelo, a pesar de que la isoterma se asemeje a la isoterma de Langmuir, no es correcto aplicar este modelo, pues, algunos parámetros obtenidos del ajuste, podrían no ser representativos del sistema de adsorción [26].

1.3.2. Modelo de isoterma de BET

En muchos casos, el modelo de Langmuir es poco realista porque se limita a la adsorción de monocapa. Solo es esperable que el modelo de Langmuir se cumpla cuando las interacciones entre las moléculas de adsorbato son mucho más débiles que las interacciones entre adsorbato y adsorbente [27].

En 1938, Brunauer *et al.* [24] modificaron el modelo de Langmuir para desarrollar un modelo que describa la adsorción física en multicapas de moléculas de gas en una superficie sólida (modelo BET). Este modelo de adsorción de multicapas, asume que las superficies adsorbentes son perfectamente planas y que las moléculas de gas pueden adsorber en esa superficie o apilarse encima de otra molécula ya adsorbida, en donde no es necesario que una capa esté completa antes de que otra capa comience a formarse encima (Figura 11) [26,28].

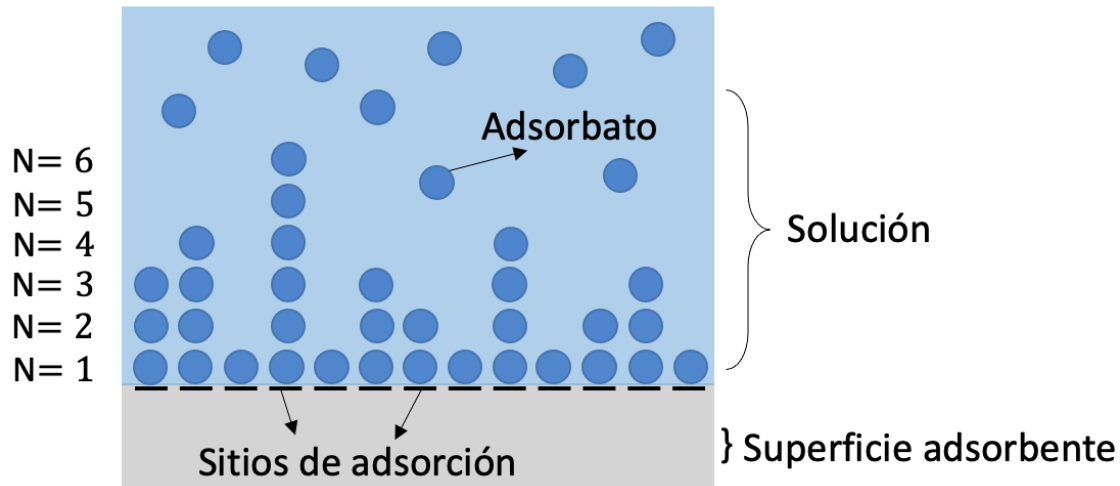


Figura 11. Esquema representativo de la adsorción según el modelo BET. Existe un equilibrio dinámico entre capas sucesivas. Las moléculas de adsorbato se pueden adsorber en la superficie o apilarse encima de otra molécula ya adsorbida. Esto resulta en una adsorción de multicapas (N capas).

En el modelo BET usaron un razonamiento similar al del modelo de Langmuir para balancear las tasas de adsorción y desorción, pero teniendo en cuenta que el sistema se conforma de multicapas. Consideraron que existe un equilibrio dinámico entre capas sucesivas, y que la tasa de adsorción de una capa en particular es igual a la tasa de desorción de la capa consecutiva. Otra de las suposiciones en las que se basaron para desarrollar el modelo BET fue considerar que la primera capa adsorbida tiene una energía de adsorción característica (E_1); mientras que la energía de adsorción de la tercera capa (E_3) y las capas sucesivas ($E_4, E_5, E_6, \dots, E_i$) son iguales a la energía de adsorción de la segunda capa (E_2). A esta energía la llamaron E_L [29].

La ecuación de BET, considerando un número de capas infinito ($N \rightarrow \infty$) corresponde a la Ecuación 6, donde q corresponde a la cantidad de adsorbato adsorbido en la superficie, Q corresponde a la cantidad de adsorbato correspondiente a la adsorción de una monocapa completa, x es la presión relativa del gas (razón entre la presión de equilibrio del adsorbato y la presión de saturación del adsorbato) y c es la constante de BET (que equivale a la razón entre las constantes de equilibrio de adsorción de la primera capa K_1 y de capas superiores K_L (Ecuación 7)).

$$q = \frac{Q \cdot c \cdot x}{(1 - x)(1 - x + c \cdot x)}, \quad (6)$$

$$x = \frac{p}{p_s}, c = \frac{K_1}{K_L} \approx \exp\left(\frac{E_1 - E_L}{RT}\right) \quad (7)$$

La Ecuación 6 corresponde a la forma más común de la ecuación de BET, sin embargo si se considera que el número de capas es un número finito N (existe un límite de cuántas capas se pueden adsorber), la ecuación de BET toma la forma de la Ecuación (8). Luego si se toma $N \rightarrow \infty$ y $x < 1$, se recupera la Ecuación 6.

$$q = \frac{Q \cdot c \cdot x (1 - (N + 1)x^N + n \cdot x^{N+1})}{(1 - x)(1 - x + c \cdot x - c \cdot x^{N+1})} \quad (8)$$

Si bien el modelo de BET describe la adsorción de gases, se ha demostrado que se puede extender a sistemas más complejos [30]. En el caso de adsorción en fase líquida, la presión relativa del gas $x = \frac{p}{p_s}$, puede expresarse como la concentración relativa del soluto dada por la Ecuación 9, donde C corresponde a la concentración de equilibrio en fase líquida y C_s corresponde a la concentración de saturación en fase líquida [30].

$$x = \frac{C}{C_s} \quad (9)$$

Luego, al construir una isoterma de adsorción graficando q en función de x , es decir la cantidad de adsorbato adsorbido en la superficie en función de la concentración relativa del soluto, y ajustar la Ecuación 8 a la isoterma de adsorción, se pueden obtener los parámetros Q , c y N . No obstante, es importante destacar que hay autores que proclaman que la aplicación de la isoterma de BET a la adsorción en fase líquida puede resultar en una estimación errónea de los parámetros de la ecuación de BET [29].

Un aspecto interesante de la ecuación de BET es que en el caso en que sólo se adsorbe una capa de adsorbato, $N = 1$, la Ecuación 8 se convierte en la Ecuación 10. Y considerando la Ecuación 9 y que la constante de BET equivale al producto entre la constante de equilibrio de adsorción de la primera capa y la concentración de saturación ($c = K_1 \cdot C_s$) [29], la Ecuación 10 se convierte en la Ecuación 11 que corresponde a la ecuación de Langmuir (considerando que $K_1(BET) = K_{eq}(Langmuir)$ = constante de equilibrio de adsorción de la primera capa).

$$q = \frac{Q \cdot c \cdot x}{(1 + c \cdot x)} \quad (10)$$

$$q = \frac{Q \cdot K_1 \cdot C}{(1 + K_1 \cdot C)} \quad (11)$$

En resumen tanto el modelo de Langmuir como el modelo de BET describen un proceso de adsorción en condiciones de equilibrio dinámico. Si la adsorción de moléculas resulta en la formación de multicapas de adsorbato, el proceso de adsorción podría modelarse según la isoterma de BET descrita por la Ecuación 8, que toma la forma de la Figura 10b. Y en el caso particular en que la adsorción de moléculas forma una monocapa de adsorbato, el modelo de BET se reduce al caso especial del modelo de Langmuir en donde es esperable obtener una isoterma descrita por la Ecuación 4, que toma la forma de la Figura 10a.

1.4. Objetivo General

El objetivo de esta investigación es estudiar la adsorción y la cinética de adsorción de triptófano en grafeno y óxido de grafeno sintetizados mediante depósito químico en fase de vapor de áreas grandes.

1.5. Objetivos Específicos

1. Estudiar las propiedades estructurales de grafeno y óxido de grafeno sintetizados por PECVD mediante espectroscopía Raman y caracterizar distintos tipos de triptófano mediante espectroscopía Raman, microscopía óptica y espectrofotometría UV-vis.
2. Comparar la adsorción de triptófano entre grafeno y óxido de grafeno mediante el cambio de concentración de las soluciones de aminoácidos en contacto con los materiales a base de carbono.
3. Analizar la cinética de adsorción de triptófano en grafeno y óxido de grafeno y encontrar un modelo que concuerde con las isotermas de adsorción.

1.6. Trabajo realizado

Para contribuir al estudio y conocimiento de la interacción de nanomateriales 2D a base de carbono con biomoléculas, en el presente proyecto de tesis decidimos estudiar de manera experimental la interacción entre distintos tipos de triptófano con nanomateriales 2D a base de carbono: grafeno y óxido de grafeno, sintetizados mediante la técnica de deposición química en fase de vapor mejorada con plasma (PECVD, *Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition*).

A continuación describimos en la sección de Metodología los equipos y protocolos utilizados para llevar a cabo la investigación y luego continuamos en la sección de Resultados con la discusión y análisis de los datos obtenidos de los experimentos realizados.

2. Metodología

2.1. Crecimiento de grafeno

Para llevar a cabo la síntesis de grafeno usamos la técnica de deposición química en fase de vapor mejorada con plasma (PECVD, *Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition*). Este es un proceso mediante el cual una película delgada de un material sólido se deposita sobre un sustrato calentado, debido a la descomposición química de un gas precursor. En este trabajo el gas precursor utilizado corresponde al metano CH_4 . Debido a las altas temperaturas del proceso, y a la presencia del sustrato de cobre que actúa como catalizador, el metano experimenta la reacción química descrita en la Ecuación 12.



Los átomos de carbono que surgen de la descomposición química se depositan sobre el sustrato de cobre formando una película de grafeno de alta calidad. El proceso de crecimiento de grafeno recién descrito, ocurre en un horno con tubo de cuarzo cuyo montaje se muestra en la Figura 12.

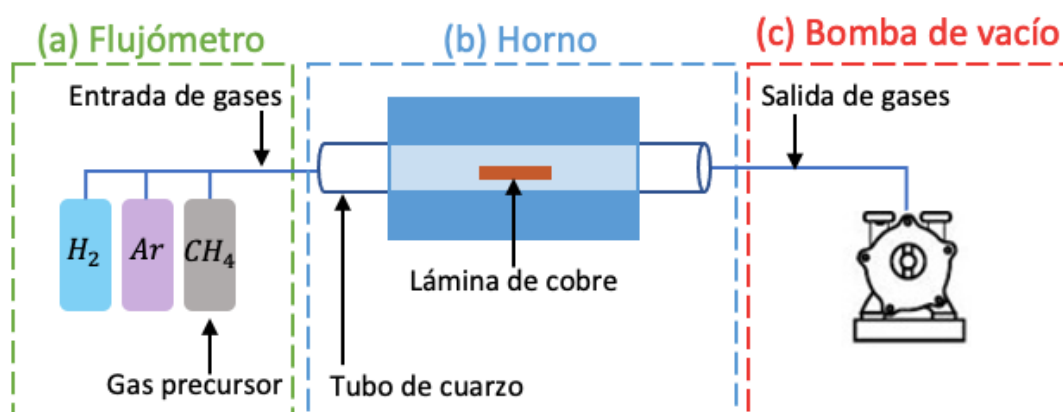


Figura 12. Montaje equipo PECVD. (a) Flujo de gases y suministro de gases. (b) Horno con tubo de cuarzo. (c) Bomba de vacío turbomolecular.

El procedimiento usado en este trabajo se describe a continuación. Primero colocamos una lámina de cobre en el tubo de cuarzo, dentro del horno (Figura 12b), cerramos el tubo y extraemos el aire con la bomba turbomolecular (Figura 12c). Una vez que conseguimos alto vacío dentro del tubo, calentamos el horno hasta una temperatura de 970°C con un flujo constante de hidrógeno. Cuando alcanzamos dicha temperatura, continuamos suministrando un flujo de hidrógeno y a ciertos intervalos de tiempo suministramos metano o plasma de hidrógeno: el primero para que se depositen los átomos de carbono en el cobre y el segundo para remover el material que no quede bien depositado. Finalmente, dejamos enfriar la muestra con un flujo constante de hidrógeno y purgamos con argón para igualar la presión dentro y afuera del tubo y así poder sacar la muestra del horno.

2.2. Transferencia de grafeno

Para realizar el experimento de adsorción de aminoácidos sobre grafeno, es necesario conocer el área de este nanomaterial. Una vez que hemos depositado grafeno sobre una lámina de cobre mediante PECVD, no es posible medir el área del grafeno. Si bien es posible distinguir mediante espectroscopía Raman (técnica que será descrita en la siguiente sección de la Metodología) la existencia de grafeno sobre algún punto específico de la lámina de cobre, no es visualmente distinguible. Es por ello que usamos un método libre de polímeros para transferir el grafeno sobre cobre a otro sustrato que sea útil para el experimento de adsorción. En nuestro caso usamos placas de cultivo de 6 pocillos y sustratos de óxido de silicio (285 nm) sobre silicio cristalino, Si(100), dopado tipo p, de 500 μm de espesor comprados en Graphene Supermarket.

El proceso de transferencia de grafeno es el siguiente (Figura 13): comenzamos poniendo la lámina de cobre con grafeno en una solución con 20 ml de agua destilada y 4 ml de ácido nítrico (HNO_3) al 70% en un vidrio reloj y dejamos que la muestra flote, con el lado del grafeno mirando hacia arriba, por 5 minutos. Esto es para eliminar residuos de carbono de la parte posterior del cobre. Luego con una cuchara de vidrio trasparamos la lámina de cobre a una placa Petri con una solución de nitrato férrico ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$), con una concentración de 50 gr de nitrato férrico sólido en 100 ml de agua destilada. Dejamos reposar aproximadamente una hora hasta que el cobre se disuelve en el nitrato férrico y el grafeno queda flotando en la solución. A esta altura del proceso ya es posible distinguir visualmente la lámina de grafeno. Luego con una cuchara de vidrio pasamos el grafeno flotante a un vidrio reloj con agua destilada. Al hacer esto, los restos de nitrato férrico decantan hacia el fondo del vidrio reloj, lo cual nos facilita su remoción mediante una pipeta de vidrio. Cada vez que sacamos nitrato férrico con la pipeta, agregamos agua destilada con otra pipeta para que la cantidad de líquido se mantenga constante, y el grafeno pueda flotar. Repetimos este procedimiento hasta que el líquido se vea transparente (si se ve amarillo significa que aún queda nitrato férrico). A continuación, con una cuchara de vidrio pasamos el grafeno a una placa Petri con agua destilada para asegurarnos de que no queden restos de nitrato férrico.

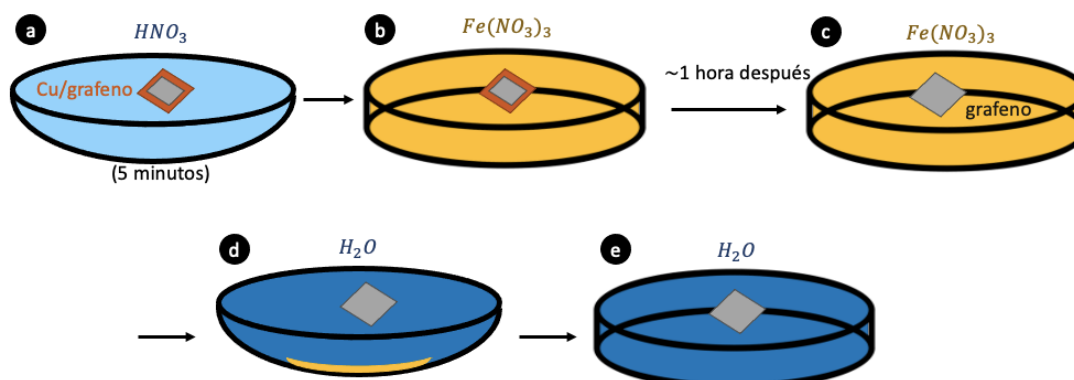


Figura 13. Procedimiento para la transferencia de grafeno sintetizado mediante PECVD.

Como mencionamos anteriormente para la presente investigación hemos usado dos tipos de sustrato: placas de cultivo y obleas de dióxido de silicio. Para cada uno, el proceso de transferencia es diferente. En el caso de las placas de cultivo (Figura 14a)

ponemos agua destilada en los pocillos de ésta y traspasamos los pedazos de grafeno de la placa Petri a los pocillos usando una cuchara plástica de un diámetro cercano al del pocillo. Luego sacamos el agua con una micropipeta, de modo que el grafeno baje hasta el fondo del pocillo y dejamos la muestra en un desecador para que las gotas de agua remanentes que no se pudieron sacar con la micropipeta se evaporen.

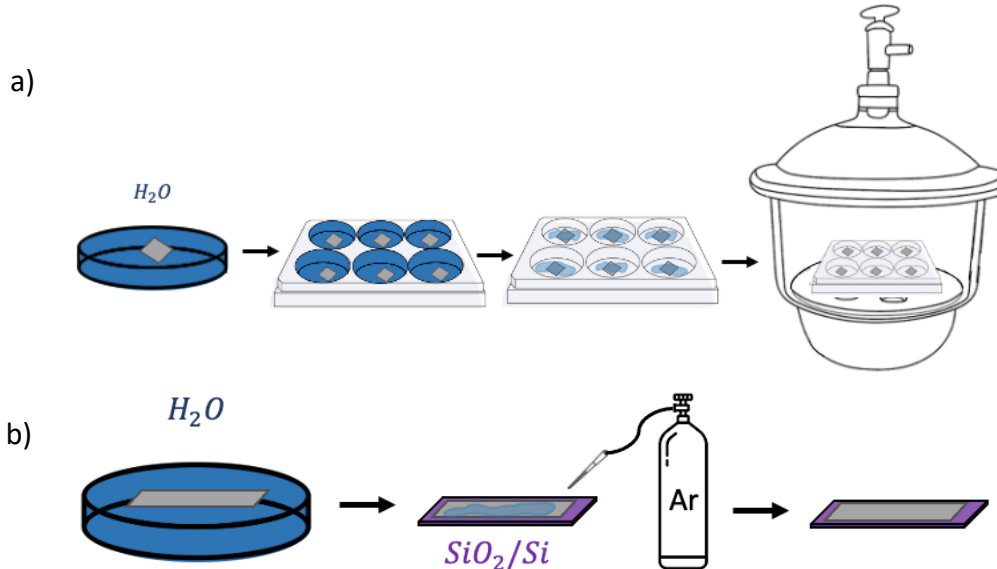


Figura 14. Etapa final del procedimiento de transferencia de grafeno para a) las placas de cultivo de 6 pocillos y b) los sustratos de dióxido de silicio.

En el caso del dióxido de silicio, antes de transferir el grafeno, cortamos la oblea con una punta de diamante en sustratos rectangulares con dimensiones de 0,8 cm x 4 cm y los sometemos a un procedimiento de limpieza (Figura 15). Este procedimiento consiste en poner las muestras en un baño ultrasónico: primero en isopropanol por 5 minutos, y luego en etanol por 5 minutos y finalmente soplar los sustratos con argón. Una vez que los sustratos se encuentran limpios, continuamos con el procedimiento de transferencia (Figura 14b), en el cual tomamos los sustratos de silicio con una pinza de teflón y los colocamos encima de la película de grafeno que se encuentra flotando en agua en la placa Petri. El grafeno se adhiere al sustrato de silicio y finalmente, soplamos la muestra con argón para remover las gotas de agua que quedan después de la transferencia y así poder secar la muestra.

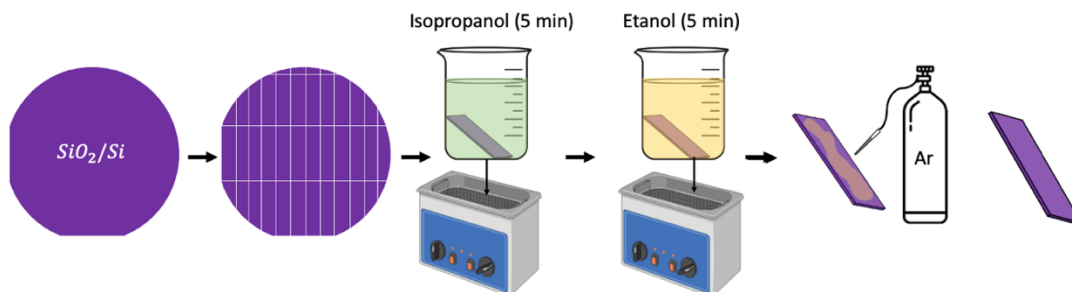


Figura 15. Procedimiento de corte y limpieza de los sustratos de dióxido de silicio.

Después del procedimiento de transferencia, le tomamos una foto a la muestra con una regla al lado (para usarla como una escala de longitud de referencia) y analizamos el área de grafeno en el procesador de imágenes *Fiji (Image J)*.

2.3. Espectroscopía Raman y Microscopía Óptica

La espectroscopía Raman es una técnica no destructiva que sirve para identificar y caracterizar una sustancia, a partir de los modos vibracionales del material, al ser excitado por un láser [31]. Esta técnica es útil para medir las propiedades estructurales y electrónicas de materiales a base de carbono (por ejemplo: grafeno, grafito, nanotubos de carbono, fullereno, etc). Las formas, intensidades y posiciones de los *peaks* del espectro Raman de estos materiales nos dan información relevante respecto a cada uno de ellos [32]. Por ejemplo, en el caso del grafeno (Figura 16), éste presenta tres bandas características: la banda D ubicada en $\sim 1350\text{ cm}^{-1}$ asociada a los defectos de la muestra, la banda G localizada en $\sim 1580\text{ cm}^{-1}$ y la banda 2D situada en $\sim 2700\text{ cm}^{-1}$.

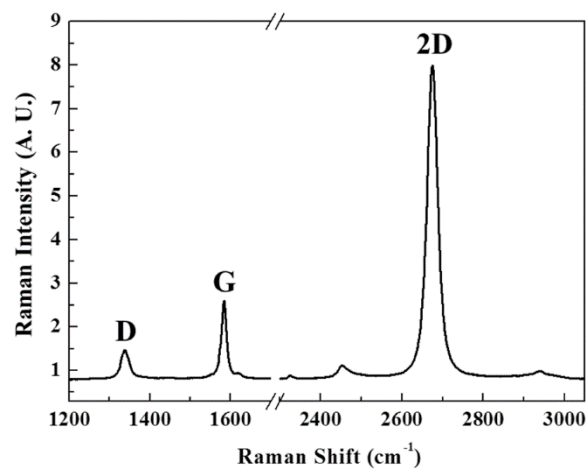


Figura 16. Bandas características del espectro Raman del grafeno [33].

Una de las ventajas del espectro Raman del grafeno, es que a partir de las intensidades de las bandas G y 2D es posible estimar el número de capas del material (Figura 17) [5,34–37]. Mientras menos sean las capas de grafeno, mayor es la razón entre la intensidad de la banda 2D y la intensidad de la banda G.

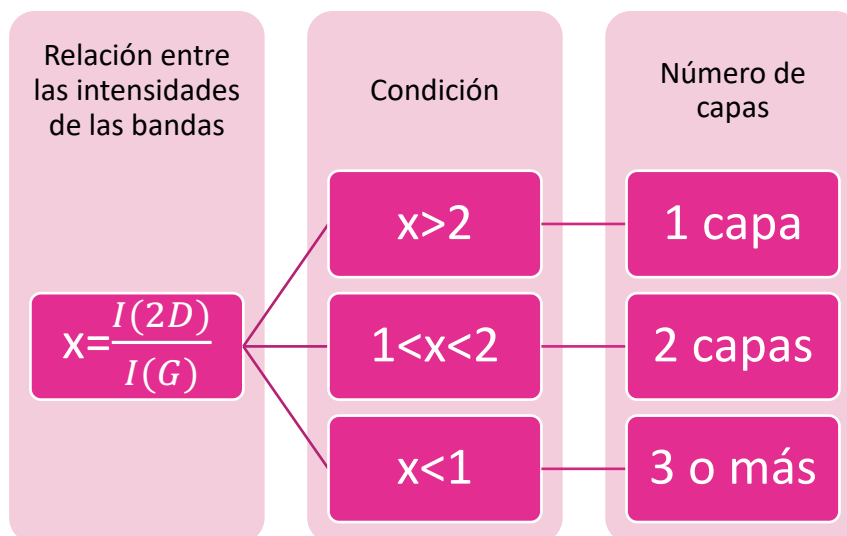


Figura 17. Cálculo del número de capas según el cociente entre la intensidad de la banda 2D y la banda G.

La espectroscopía Raman también nos permite distinguir la presencia de óxido de grafeno en una muestra [38–40] En la Figura 18 observamos un ejemplo del espectro Raman del óxido de grafeno a distintos niveles de oxidación (S1 el menos oxidado y S6 el más oxidado). En el caso del óxido de grafeno, las bandas D y G tienen una intensidad mucho mayor que la banda 2D y suelen ser más anchas que en el caso del grafeno.

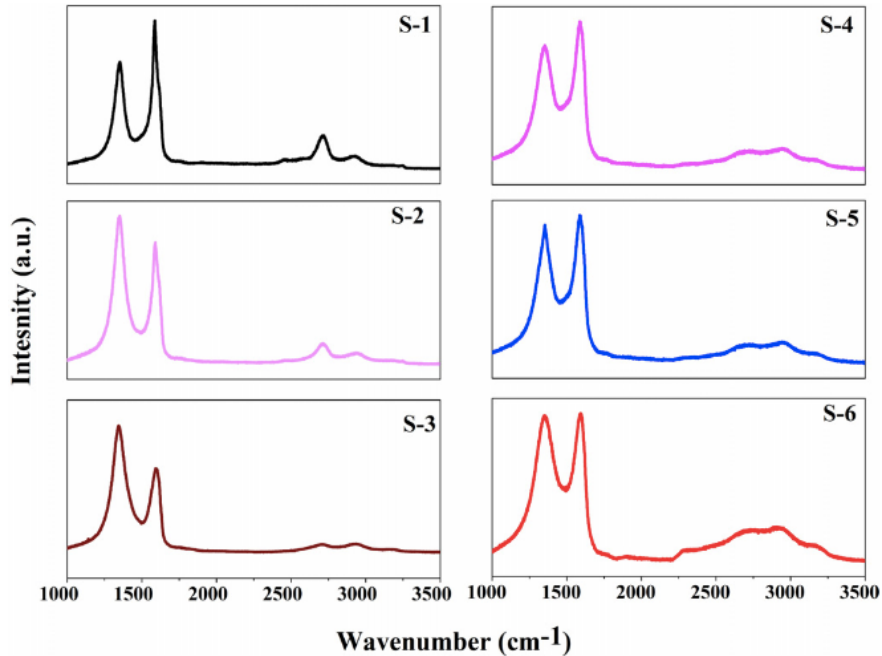


Figura 18. Espectro Raman del óxido de grafeno [39].

En esta investigación usamos un espectrómetro Renishaw, equipado con un microscopio óptico Leica y un láser de onda continua con longitud de onda de 532 nm y máxima potencia de 500 mW (Figura 19), ubicado en el departamento de física de la Universidad Técnica Federico Santa María, en Valparaíso. Para realizar las mediciones de los espectros Raman de los nanomateriales utilizamos un rango de Raman Shift entre 1000 y 3200 cm^{-1} , un objetivo de ampliación x50 y una potencia del láser del 5%.



Figura 19. Microscopio Raman utilizado en esta investigación.

El primer objetivo de estudiar el espectro Raman de nuestras muestras es distinguir si la síntesis de grafeno fue o no exitosa. Mediante la espectroscopía Raman podemos observar si se depositó el nanomaterial sobre la lámina de cobre y además podemos inferir propiedades del material sintetizado, a partir de la posición, forma e intensidad de las bandas.

En general, el espectro Raman del grafeno sobre cobre tiene una forma similar a la de la Figura 20. Si bien, el espectro Raman sobre cobre nos permite identificar, a partir de las bandas características, la presencia de un material a base de carbono, la fluorescencia del cobre que se observa en el espectro Raman nos impide obtener mayor información respecto al material, como por ejemplo el número de capas. Otra consecuencia de la presencia de fluorescencia del cobre en el espectro Raman es que no es posible saber a ciencia cierta la relación exacta entre las bandas del espectro. Sin embargo, a partir de la intensidad y anchura de las bandas es posible hacer suposiciones respecto a qué material está presente en la muestra, ya sea, grafeno, óxido de grafeno o grafito (muchas capas de grafeno).

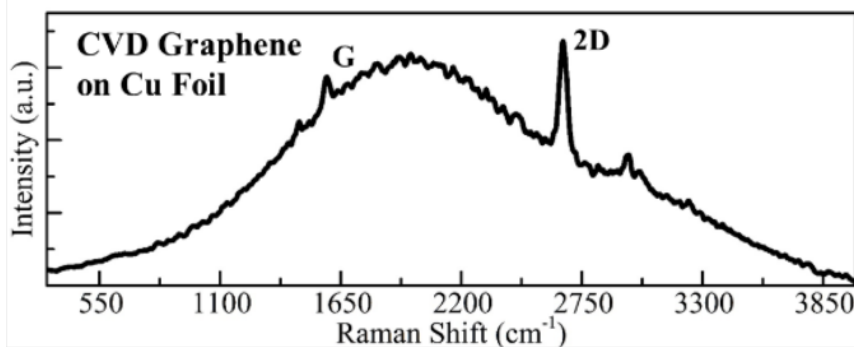


Figura 20. Espectro Raman de grafeno sobre lámina de cobre [41].

El segundo objetivo de estudiar el espectro Raman de nuestras muestras es estudiar la calidad del material. Para ello, después del proceso de transferencia, medimos el espectro Raman de las muestras de grafeno transferidas sobre sustratos de dióxido de silicio. En este caso, el espectro es de la forma de la Figura 20, y dado que la fluorescencia del cobre ya no influye en la medición, el espectro nos permite observar con mejor claridad la relación entre las bandas D, G y 2D y sacar conclusiones respecto a la calidad y número de capas del material.

Además de medir los nanomateriales a base de carbono, también medimos el espectro Raman de los tres tipos de triptófano que usamos en este trabajo (serán descritos en la siguiente sección), para comparar las estructuras en base a los *peaks* de sus espectros.

Además de las mediciones de espectroscopía Raman, utilizamos el microscopio óptico del mismo equipo para obtener imágenes ópticas de las muestras de triptófano. La técnica de microscopía óptica sirve para estudiar la microestructura de un material. La medición que llevamos a cabo consistió en depositar una pequeña cantidad de triptófano en estado sólido sobre sustratos de dióxido de silicio y observar su estructura con el microscopio óptico.

2.4. Experimento de adsorción

La idea general de nuestros experimentos de adsorción es poner en contacto un área conocida de nanomaterial con una solución de aminoácido, de una concentración conocida y estudiar si éste se adsorbe o no en la superficie del nanomaterial a partir de mediciones de espectrofotometría UV y de microscopía de fuerza atómica (*Atomic Force Microscopy* AFM). Los nanomateriales usados en este experimento corresponden a grafeno y óxido de grafeno, y el aminoácido escogido para el estudio de adsorción corresponde a distintos tipos de triptófano. A continuación explicamos en detalle las características de los aminoácidos, el procedimiento y los equipos utilizados en este experimento.

2.4.1. Tipos de triptófano

En el marco de esta investigación, utilizamos tres tipos de triptófano (trp) para realizar los experimentos de interacción aminoácido-nanomaterial. Primero trabajamos con un triptófano de prueba (de ahora en adelante TRP1), cuya información química no conocemos, el cual estaba disponible en el laboratorio y utilizamos para diseñar el experimento. Luego utilizamos 2 tipos de triptófano, cuya información está reportada en la Tabla 3.

Tabla 3. Información de los tipos de triptófano utilizados en este experimento.

Nombre muestra	TRP2	TRP3
Fórmula Química	$C_{12}H_{12}N_2O_3 \cdot HCl$	$C_{14}H_{16}N_2O_3$
Masa molar (g/mol)	268,7	260,3
Nombre químico	N'-FORMYL-L-TRYPTOPHAN HYDROCHLORIDE	NALPHA-ACETYL-DL-TRYPTOPHAN METHYL ESTER
Estructura química		
Marca	Iris Biotech	Sigma Aldrich

2.4.2. Preparación soluciones de triptófano

En cada experimento, para preparar la solución madre de aminoácido, masamos cierta cantidad de triptófano en una microbalanza y lo diluimos con agua MQ en un matraz aforado de 100 ml. Al comenzar la investigación, cuando trabajamos con el triptófano de prueba TRP1, debido a la cantidad limitada de reactivo que poseíamos, preparamos una solución madre de 10 μM . Para ello, asumiendo una masa molar de 204,23 g/mol y haciendo la transformación de la Ecuación 13 calculamos que para preparar una solución de 10 μM en un matraz aforado de 100 ml, necesitábamos una masa de 0,2 mg de TRP1.

$$C_{\text{madre}} = 10\mu\text{M} = 10 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \cdot 204,23 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{mol}} = 0,0020423 \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right] \approx \frac{0,2 \text{ mg de Trp}}{100 \text{ ml de agua MQ}} \quad (13)$$

Dicha solución madre solo fue utilizada para el primer experimento de adsorción, luego, debido a la dificultad de medir una masa tan pequeña con la balanza, decidimos preparar la solución madre de cada experimento diluyendo 2 mg de TRP1 con agua MQ en el matraz aforado de 100 ml, resultando en una solución madre de 100 μM de TRP1.

Posteriormente, al trabajar con los triptófanos TRP2 y TRP3, para preparar la solución madre mantuvimos constante la cantidad de masa de triptófano y la cantidad de agua MQ, es decir, 2 mg de triptófano en 100 ml de agua MQ. Sin embargo, debido a las distintas masas molares de los tipos de triptófano, las concentraciones de las soluciones madre varían entre un trp y otro en cada experimento.

Al principio de la investigación trabajamos con concentraciones pequeñas de triptófano entre 1 y 10 μM , para después continuar nuestro estudio con concentraciones mayores entre 10 y 70 μM . Para calcular cómo preparar dichas soluciones usamos la Ecuación 14. Básicamente, esta ecuación indica que para preparar una solución de concentración C_2 , hay que agregar un volumen V_1 de la solución de mayor concentración C_1 y un volumen $V_2 - V_1$ de solvente (en este caso agua MQ), pues, V_2 corresponde al volumen final de la solución de concentración C_2 .

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \quad (14)$$

Cabe destacar que para todos los triptófanos y para ambos rangos de concentración (ya sea entre 1-10 μM o 10-70 μM), la manera de preparar las soluciones menos concentradas fue la misma. Utilizamos la Ecuación 13 para calcular cómo preparar una solución de menor concentración a partir de la solución anterior de mayor concentración. Es decir, no preparamos todas las soluciones a partir de la solución madre, sino solo la primera solución de mayor concentración. Y a partir de esta preparamos la siguiente solución de mayor concentración y así sucesivamente.

Una vez preparadas las soluciones de distinta concentración de triptófano, comenzamos los experimentos de adsorción con las muestras de grafeno como se describe a continuación.

2.4.3. Espectrofotometría

El razonamiento del experimento de adsorción es que si los aminoácidos se adsorben en el grafeno, deberíamos observar una disminución en la concentración de la solución de triptófano posterior a la interacción, debido a que los aminoácidos estarían sobre la película de grafeno, y no presentes en el solvente. Lo que nos interesa medir entonces, es el cambio en la concentración de la solución de triptófano después de la interacción con grafeno. Sin embargo, la concentración post adsorción no es una cantidad que podamos medir directamente en el laboratorio. Lo que realmente medimos es la absorbancia de las soluciones de triptófano, la cual es proporcional a la concentración de la solución (esta relación será explicada en la siguiente sección).

El equipo de medición que se usa para medir la absorbancia de una solución es un espectrofotómetro, el cual está compuesto por una fuente de luz (lámpara), un monocromador, un compartimento para poner la muestra y un fotodetector (Figura 21). La manera en que funciona es la siguiente: una lámpara emite haces de luz blanca en distintas direcciones que pasan a través de un colimador. El monocromador está compuesto por un colimador, el cual cambia la dirección de estos haces de luz para obtener haces paralelos, un prisma, que refracta el haz de luz y la separa en distintas longitudes de onda, y una ranura, que actúa como selector de la longitud de onda que incidirá en la muestra. En el compartimento para poner la muestra, se coloca una cubeta o una placa de cultivo con la solución que se quiera medir y se hace pasar un haz de luz de longitud de onda conocida que sale del monocromador, con intensidad I_0 . Luego, se utiliza un fotodetector para medir la intensidad I del haz de luz que llega después de haber pasado por la muestra. Finalmente, usando la Ley de Beer-Lambert (Ecuación 15), el equipo calcula la absorbancia de la solución a partir de la relación entre la intensidad de la luz incidente (I_0) y transmitida (I) por la muestra.

$$A = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (15)$$

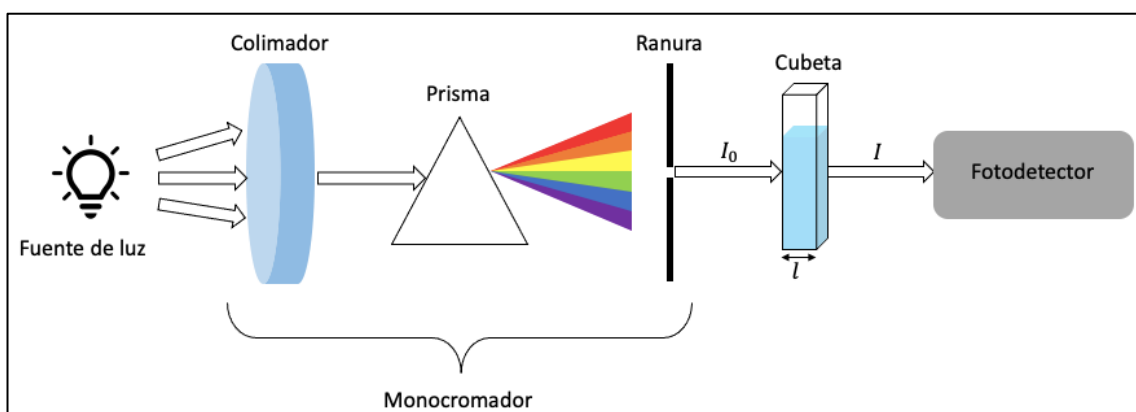


Figura 21. Funcionamiento de un espectrofotómetro.

Para realizar las mediciones de absorbancia de este estudio, utilizamos cuatro equipos de medición: un espectrofotómetro Lambda 750 de marca PerkinElmer (Figura 22a), un espectrofotómetro Spectroquant Prove 300 de marca Merck (Figura 22b), un lector de placas Synergy HTX (BioTek) (Figura 22c), los tres ubicados en los laboratorios del Edificio de Ciencia y Tecnología de la Universidad Tecnológica Metropolitana (UTEM) en la ciudad de Santiago, y un espectrofotómetro Spectronic Genesys 5 (Figura 22d) ubicado en el laboratorio de alimentos del Departamento de Ingeniería Ambiental y Química de la Universidad Técnica Federico Santa María en Valparaíso.

Con los equipos Lambda 750 y Spectroquant Prove 300, los espectros de absorbancia de las soluciones de triptófano fueron medidos en un espectro de longitud de onda entre 190 nm y 400 nm, a intervalos de 1 nm. Al contrario, con los equipos Synergy HTX y Spectronic Genesys 5, las mediciones de absorbancia fueron realizadas para un valor específico de longitud de onda. Con el lector de placas Synergy HTX, sólo medimos soluciones de triptófano TRP2. La longitud de onda que escogimos medir con el equipo fue de 298 nm. La razón de escoger esta longitud de onda es que al medir previamente su espectro de absorbancia en el equipo Lambda 750, observamos un *peak* característico del TRP2 a los 298 nm. Por otro lado, con el espectrofotómetro Genesys 5, sólo medimos soluciones de triptófano TRP3. Para ello escogimos una longitud de onda de 280 nm porque al medir previamente el espectro de absorbancia del TRP3 en el espectrofotómetro Spectroquant Prove 300, observamos que su *peak* característico se encontraba en los 280 nm.

Para el equipo Synergy HTX utilizamos placas de cultivo de 6 pocillos para medir las muestras. Para los otros tres equipos usamos cubetas de cuarzo con *path length* de 1 cm para medir las muestras. En todos los espectrofotómetros utilizamos agua MQ como blanco para las mediciones.



Figura 22. Espectrofotómetros usados en esta investigación: a) Lamda 750 PerkinElmer, b) Spectroquant Prove 300 Merck, c) lector de placas Synergy HTX (BioTek) y d) Spectronic Genesys 5.

2.4.4. Experimento de adsorción con placas de cultivo

Una vez que tenemos preparadas las soluciones de triptófano de distinta concentración, usamos una parte de ellas para realizar una curva de calibración que relacione la absorbancia de las muestras con su concentración y otra parte para el experimento de adsorción.

Para obtener la curva de calibración, lo primero que hicimos fue medir el espectro de absorbancia de las soluciones de triptófano en el espectrofotómetro y a partir de los resultados escoger una longitud de onda donde se observara un *peak* característico. Luego, al graficar la absorbancia, a dicha longitud de onda específica, en función de la concentración (ya conocida) de la solución, se obtiene una recta como la de la Figura 23, cuya ecuación determina la relación entre la absorbancia y la concentración.

El experimento que diseñamos para estudiar la adsorción de aminoácidos en nanomateriales consiste en poner 3 ml de solución de triptófano de concentración conocida en cada pocillo con grafeno de una placa de cultivo y dejar interactuar a cierto tiempo, ya sea 3 o 24 horas, y a cierta temperatura conocida, ya sea 4°C o temperatura ambiente. Una vez completado el tiempo de interacción, retiramos las soluciones de triptófano de los pocillos, y medimos su absorbancia en el espectrofotómetro. Luego comparamos las mediciones de absorbancia antes y después de la interacción para observar si los aminoácidos se adsorbían en el grafeno. Además, a partir de la curva de calibración y las mediciones de absorbancia después de la interacción, calculamos la concentración de la solución post adsorción. Los equipos que usamos en este tipo de experimento, corresponden a los espectrofotómetros Lambda 750 y Spectroquant Prove 300. En este experimento sólo utilizamos grafeno como material adsorbente y TRP1 y TRP2 como adsorbato.

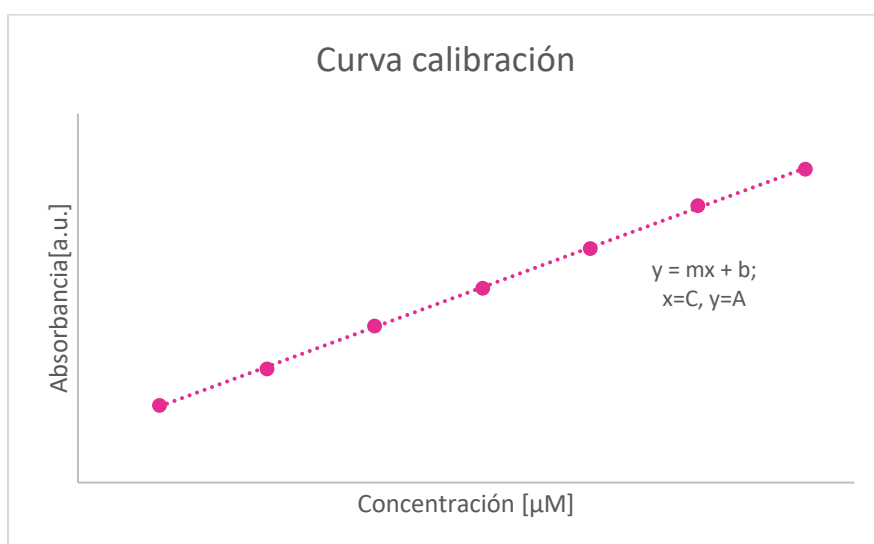


Figura 23. Ejemplo de curva de calibración que relaciona la absorbancia de una solución con su concentración.

2.4.5. Experimento cinética de adsorción

La idea del experimento de cinética de adsorción es estudiar la tasa de adsorción y desorción del triptófano sobre el nanomaterial. En este experimento usamos el mismo razonamiento del experimento de adsorción anterior: si los aminoácidos se adsorben en el nanomaterial, deberíamos observar una disminución en la concentración de la solución de triptófano posterior a la interacción y por consiguiente una disminución en la absorbancia de la solución. Por lo tanto, para estudiar la evolución temporal de la interacción aminoácido-nanomaterial, medimos la absorbancia de las muestras en distintos momentos de la interacción.

En esta investigación diseñamos dos tipos de experimentos para estudiar la cinética de adsorción de triptófano en grafeno u óxido de grafeno. En el primero utilizamos grafeno y óxido de grafeno como material adsorbente y TRP2 como adsorbato y utilizamos el equipo Synergy HTX. El experimento consiste en transferir el nanomaterial a las placas de cultivo, de manera que quede en las orillas, lejos del centro del pocillo de la placa (esto es para que el nanomaterial no obstruya el paso de la luz durante la medición en el lector de placas). Después, en cada pocillo con nanomaterial colocamos 6 ml de solución de triptófano TRP2 de distintas concentraciones y medimos su absorbancia a los 298 nm en el lector de placas Synergy HTX en el momento inicial (0:00). Luego, medimos la absorbancia de las soluciones cada media hora hasta la hora 4:00, dejando reposar la placa en el refrigerador a 4°C entre cada medición. Para mantener la humedad y evitar la evaporación del agua de las soluciones de triptófano, la manera de almacenar las muestras en el refrigerador fue colocar las placas de cultivo en una caja con un pocillo con agua dentro. Para este experimento medimos también la absorbancia de las soluciones de triptófano en placas de cultivo sin nanomaterial transferido encima, para utilizar como punto de referencia. Al final del experimento comparamos los valores de absorbancia para estudiar la cinética de adsorción.

En el segundo experimento que diseñamos para el estudio de la cinética de adsorción, utilizamos grafeno y óxido de grafeno como material adsorbente y TRP3 como adsorbato y utilizamos el equipo Spectronic Genesys 5. Este experimento consiste en transferir los nanomateriales en sustratos de dióxido de silicio de dimensiones de 0,8 cm x 4 cm, de modo tal que quepan dentro de las cubetas de cuarzo que van en el espectrofotómetro. Colocamos los sustratos a un costado de la cubeta, y los pegamos con cinta doble faz, de manera que no obstruyera el paso de la luz en el espectrofotómetro (Figura 24). Luego en cada cubeta colocamos 3,5 ml de solución de triptófano de distintas concentraciones y dejamos interactuar dentro del espectrofotómetro Spectronic Genesys 5 a temperatura ambiente. Para estudiar la evolución temporal de la concentración de la solución de triptófano, medimos la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm cada media hora desde el momento inicial (hora 0:00) hasta la hora 4:00 de interacción, luego medimos a la hora 19:00 y finalmente a la hora 24:00 del experimento.

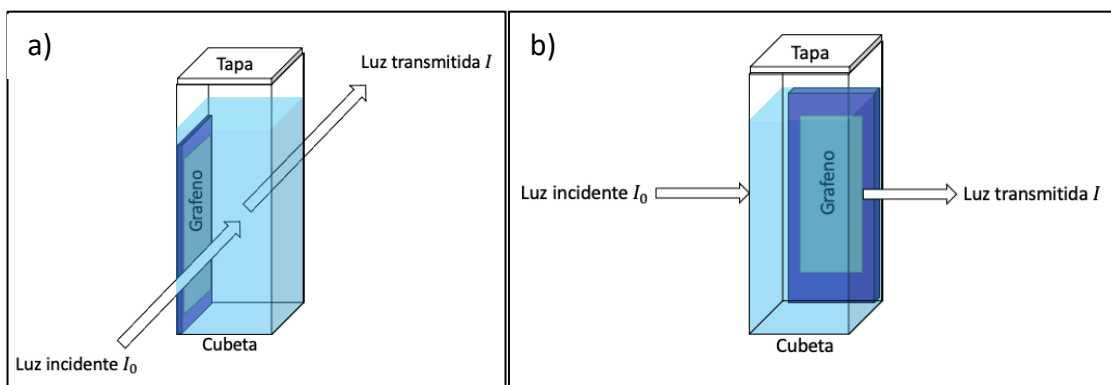


Figura 24. Montaje de la muestra de grafeno u óxido de grafeno sobre silicio dentro de la cubeta de cuarzo y posición respecto al espectrofotómetro. a) Vista frontal, b) Vista lateral.

2.4.6. Análisis de datos

A partir de los datos obtenidos en los espectros de absorbancia vs longitud de onda, las áreas de los nanomateriales medidas en Fiji (ImageJ), y las concentraciones iniciales y finales de aminoácido calculadas a partir de la curva de calibración, llevamos a cabo un análisis de datos con distintos gráficos para comparar los aspectos importantes del experimento.

Gráfico absorbancia (A) vs concentración inicial ($C_{inicial}$)

Primero graficamos los valores medidos de absorbancia (A) en función de su concentración inicial $C_{inicial}$ para cada solución de trp antes y después del proceso de interacción con grafeno u óxido de grafeno. Esto nos sirve para distinguir en una primera instancia si hubo adsorción de trp en el nanomaterial, pues, si el trp se adsorbe, la concentración de la solución cambia, y por consiguiente, también la absorbancia.

Gráfico porcentaje de cambio de absorbancia (% ΔA) vs concentración inicial ($C_{inicial}$)

El porcentaje de cambio de absorbancia % ΔA está dado por la Ecuación 16, donde $A_{inicial}$ y A_{final} son la absorbancia de la solución de trp antes y después de la interacción con el nanomaterial, respectivamente. El gráfico de porcentaje de cambio de absorbancia en función de la $C_{inicial}$ nos indica cuánto cambió la absorbancia en comparación a su valor inicial en función de la concentración inicial de las soluciones de trp. Un % ΔA positivo, indica que la absorbancia disminuyó posterior a la interacción, lo cual es un indicio de que sí hubo adsorción de trp en el nanomaterial.

$$\% \Delta A = \frac{A_{inicial} - A_{final}}{A_{inicial}} \times 100 \quad (16)$$

Gráfico cambio de concentración (ΔC) vs concentración inicial ($C_{inicial}$)

También estudiamos el comportamiento del cambio de concentración ΔC en función de la concentración inicial. El cambio de concentración está dado por la diferencia entre la concentración inicial y final de trp (Ecuación 17). Las concentraciones

fueron calculadas a partir de la curva de calibración de cada experimento, a partir de los valores medidos de absorbancia. Este gráfico nos da una idea de cómo depende la cantidad de trp adsorbido según la concentración inicial de la solución. Un ΔC positivo indica que hubo adsorción de trp en el nanomaterial.

$$\Delta C = C_{inicial} - C_{final} \quad (17)$$

Gráfico cambio de concentración(ΔC) vs área nanomaterial

Al graficar el cambio de concentración en función del área del nanomaterial estudiamos cuánto trp se adsorbe en la superficie del nanomaterial según el área disponible para la interacción.

Gráfico porcentaje de cambio de concentración($\% \Delta C$) vs concentración inicial ($C_{inicial}$)

El porcentaje de cambio de concentración $\% \Delta C$ está descrito por la Ecuación 18, donde $C_{inicial}$ y C_{final} son la concentración de la solución de trp antes y después de la interacción con el nanomaterial, respectivamente. El gráfico de porcentaje de cambio de concentración en función de la $C_{inicial}$ nos indica cuánto cambió la concentración en comparación a su valor inicial en función de la concentración inicial de las soluciones de trp. Un $\% \Delta C$ positivo, indica que la concentración disminuyó posterior a la interacción, lo cual es un indicio de que sí hubo adsorción de trp en el nanomaterial.

$$\% \Delta C = \frac{C_{inicial} - C_{final}}{C_{inicial}} \times 100 \quad (18)$$

Gráfico porcentaje de cambio de concentración($\% \Delta C$) vs área nanomaterial

Al graficar el porcentaje de cambio de concentración en función del área del nanomaterial estudiamos cuánto cambia la concentración de la solución de trp respecto a su valor inicial según el área disponible del nanomaterial para la interacción.

Gráfico q vs concentración inicial ($C_{inicial}$)

Por último, graficamos isothermas de adsorción, i.e. moles adsorbidos por unidad de área (q [$\mu\text{mol}/\text{m}^2$]) en función de la concentración inicial ($C_{inicial}$ [$\mu\text{mol}/\text{L}$]) de las soluciones de triptófano. Para calcular los moles adsorbidos multiplicamos la diferencia de concentración (ΔC) por el volumen (V) de la solución. Luego para calcular q , dividimos los moles adsorbidos por el área del nanomaterial (S) (Ecuación 19).

$$q = \frac{\text{moles adsorbidos}}{\text{área nanomaterial}} = \frac{V \times (C_{inicial} - C_{final})}{S} \quad (19)$$

Las isothermas de adsorción nos permiten estudiar la cantidad de triptófano adsorbido por unidad de área en función de la concentración inicial de la solución.

2.4.7. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM, *Atomic Force Microscopy*)

La técnica de microscopía de fuerza atómica (AFM, *Atomic Force Microscopy*), es una técnica de alta resolución que nos permite analizar la topografía de una muestra mediante un mapeo/rastreo de la superficie empleando un cantilever con una punta (Figura 25). La manera en que funciona es la siguiente: al recorrer la muestra con el cantilever, la interacción entre la punta del cantilever y la muestra, resulta en una deflexión del cantilever. Esta deflexión se puede monitorear utilizando un láser que incide en la parte posterior del cantilever y que se refleja hacia un fotodetector, de modo que si el cantilever sufre una deflexión, la luz reflejada cambiará y el fotodetector recibirá señales distintas. En general, dependiendo del modo de funcionamiento de la medición, según la señal recibida en el fotodetector, un circuito de retroalimentación mantiene la interacción entre la punta y la muestra, controlando la distancia entre la punta y la muestra [42].

El AFM tiene dos posibles modos de operación: estático y dinámico [43]. En el modo estático o modo de contacto, la punta está constantemente en contacto con la muestra, mientras que en el modo dinámico, la punta se hace oscilar ya sea a una frecuencia constante (modo FM: frecuencia modulada) o a una amplitud constante (modo AM: amplitud modulada). Existen dos tipos de modo dinámico: el modo de no contacto, en el que la punta nunca toca la muestra (puede ser modo FM o AM) y el modo repiqueteo (*tapping mode*) en el que la punta está en contacto intermitente con la muestra, para el cual se usa el modo AM. Dependiendo del modo de operación, el sistema de retroalimentación controla la distancia entre la punta y la muestra manteniendo constante: la fuerza aplicada para el modo de contacto, la frecuencia o amplitud para el modo de no contacto y la amplitud de oscilación para el modo *tapping*. Finalmente, a partir del registro de las señales de retroalimentación (altura del cantilever) medidas en cada punto de escaneo, se construye una imagen de la topografía de la muestra.

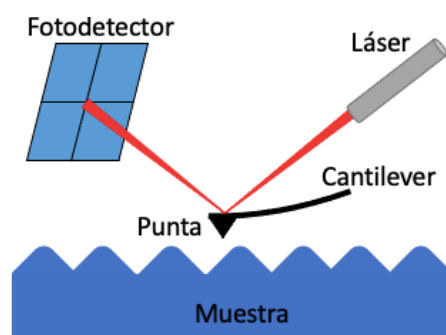


Figura 25. Componentes principales de un microscopio de fuerza atómica.

En este trabajo, con el objetivo de poder distinguir la presencia o ausencia de triptófano en las muestras de grafeno u óxido de grafeno, medimos la topografía de las muestras mediante la técnica de microscopía de fuerza atómica (AFM) antes y después del experimento de cinética de adsorción con sustratos de dióxido de silicio. El instrumento utilizado en esta investigación consiste en un FlexAFM de marca Nanosurf, equipado con una punta PPP-FMR. Para analizar las muestras usamos el modo de repiqueteo (*tapping mode*) y mediante el software Gwyddion obtuvimos imágenes topográficas de $10 \times 10 \mu\text{m}$, $5 \times 5 \mu\text{m}$ y $2 \times 2 \mu\text{m}$.

3. Resultados

3.1. Síntesis de Nanomateriales

De acuerdo con las mediciones de espectroscopía Raman sobre cobre (Figura 26), obtuvimos muestras de grafeno y óxido de grafeno como resultado del proceso de síntesis utilizando la técnica de PECVD. En el caso del grafeno sobre cobre, se observa la presencia de las bandas G en $\sim 1588 \text{ cm}^{-1}$ y 2D en $\sim 2673 \text{ cm}^{-1}$, mientras que la banda D es casi inexistente, indicando la ausencia o poca cantidad de defectos en la muestra. Al contrario, en el caso del óxido de grafeno, observamos que las bandas D en $\sim 1346 \text{ cm}^{-1}$ y G en $\sim 1592 \text{ cm}^{-1}$ son los *peaks* más prominentes y el gran ancho de estas bandas nos dan indicio de la presencia de óxido en la muestra, mientras que la banda 2D en $\sim 2665 \text{ cm}^{-1}$ está casi ausente.

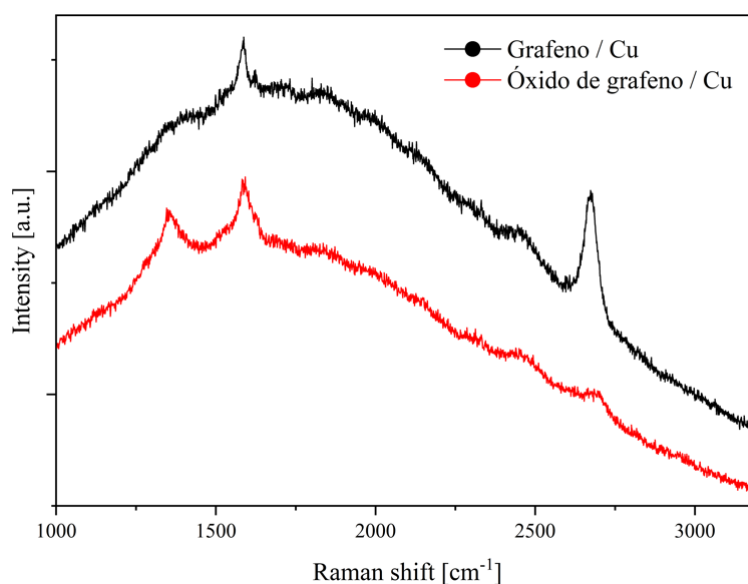


Figura 26. Espectro Raman de grafeno sobre cobre (negro) y óxido de grafeno sobre cobre (rojo).

Para realizar los experimentos de adsorción, transferimos el grafeno y el óxido de grafeno sobre dos tipos de sustrato: placas de cultivo (Figura 27a) y obleas de dióxido de silicio (Figura 27b). En el caso de las placas de cultivo, obtuvimos distintos valores de área de grafeno, siendo la más grande de $2,8 \text{ cm}^2$. Mientras que, en el caso de los sustratos de dióxido de silicio, las áreas de los nanomateriales transferidos se encuentran en un rango entre 1 cm^2 y $2,7 \text{ cm}^2$. La diferencia entre las áreas transferidas de nanomateriales es resultado del proceso de transferencia de grafeno, en el cual el nanomaterial puede fragmentarse, dificultando la posibilidad de transferir el área completa de nanomaterial.

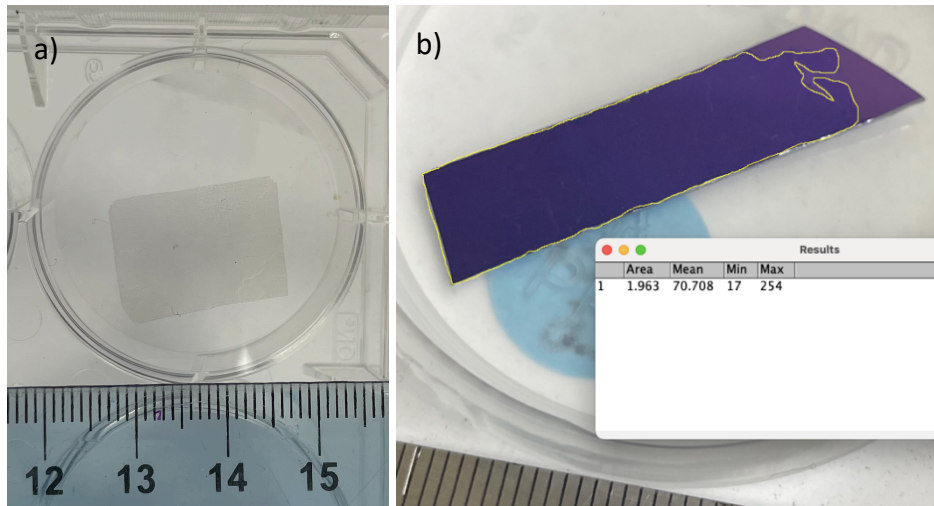


Figura 27. Grafeno transferido sobre: a) una placa de cultivo, b) una oblea de dióxido de silicio.

En el caso de los nanomateriales transferidos sobre placas de cultivo solo tenemos la información de su espectro Raman sobre cobre, que nos permite distinguir entre grafeno y óxido de grafeno, pues no es posible realizar mediciones Raman sobre este tipo de sustrato. Sin embargo, en el caso de los sustratos de dióxido de silicio, sí pudimos realizar mediciones de espectroscopía Raman para estudiar con más profundidad los nanomateriales sintetizados en este experimento. En la Figura 28 se muestran curvas representativas de estos espectros. En el caso del grafeno observamos que la banda D ubicada en $\sim 1344 \text{ cm}^{-1}$ es muy pequeña en comparación a las demás bandas, indicando que corresponde a una muestra con muy pocos defectos. Además, al comparar la intensidad de las bandas G ubicada en $\sim 1584 \text{ cm}^{-1}$ y 2D ubicada en $\sim 2690 \text{ cm}^{-1}$, observamos que el grafeno sintetizado corresponde a una monocapa, ya que la razón entre las intensidades 2D/G es 3,4. En cuanto al óxido de grafeno, observamos que la banda 2D localizada en $\sim 2702 \text{ cm}^{-1}$ es pequeña respecto a las demás bandas, mientras que el ancho e intensidad de las bandas D ubicada en $\sim 1350 \text{ cm}^{-1}$ y G ubicada en $\sim 1595 \text{ cm}^{-1}$, nos indican la presencia de óxido en la muestra.

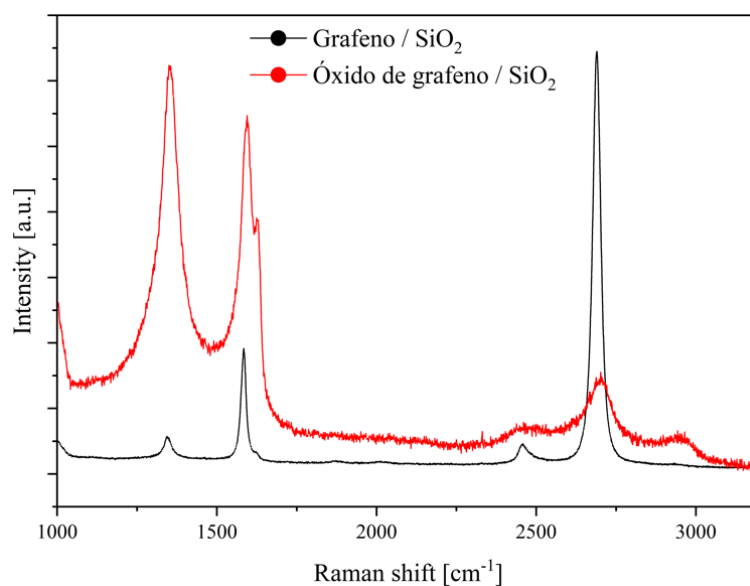


Figura 28. Espectro Raman de grafeno sobre SiO_2 (negro) y óxido de grafeno sobre SiO_2 (rojo).

3.2. Caracterización Triptófano

Como mencionamos en la Metodología, en este trabajo utilizamos tres tipos de triptófano y caracterizamos cada uno de ellos mediante espectroscopía Raman, microscopía óptica y mediciones de absorbancia. En la Figura 29, se muestran los espectros Raman de los distintos tipos de triptófano sobre sustratos de dióxido de silicio. Observamos que existen diferencias entre un espectro y otro, lo cual es algo esperable debido a la diferencia en la estructura química de cada reactivo.

En la Figura 30 se muestran imágenes de microscopio óptico (de la misma escala, con una magnificación de x50) de triptófano sobre sustratos de dióxido de silicio. Se observan diferencias entre los tres tipos de muestra: en el caso del TRP1 se observan aglomeraciones de triptófano, mientras que para el TRP2 y para el TRP3, se observa una estructura prismática, siendo el TRP2 más largo que el TRP3.

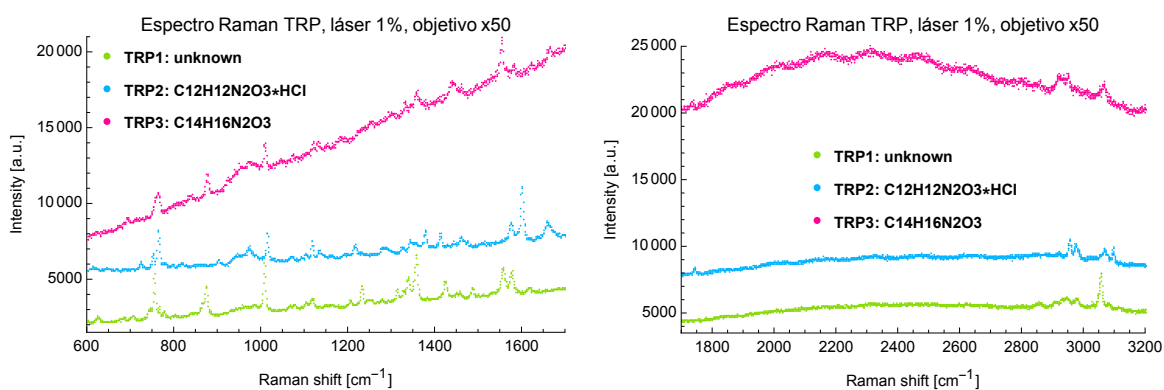


Figura 29. Espectroscopía Raman de TRP1 (verde), TRP2 (azul) y TRP3 (rosa) sobre obleas de dióxido de silicio.

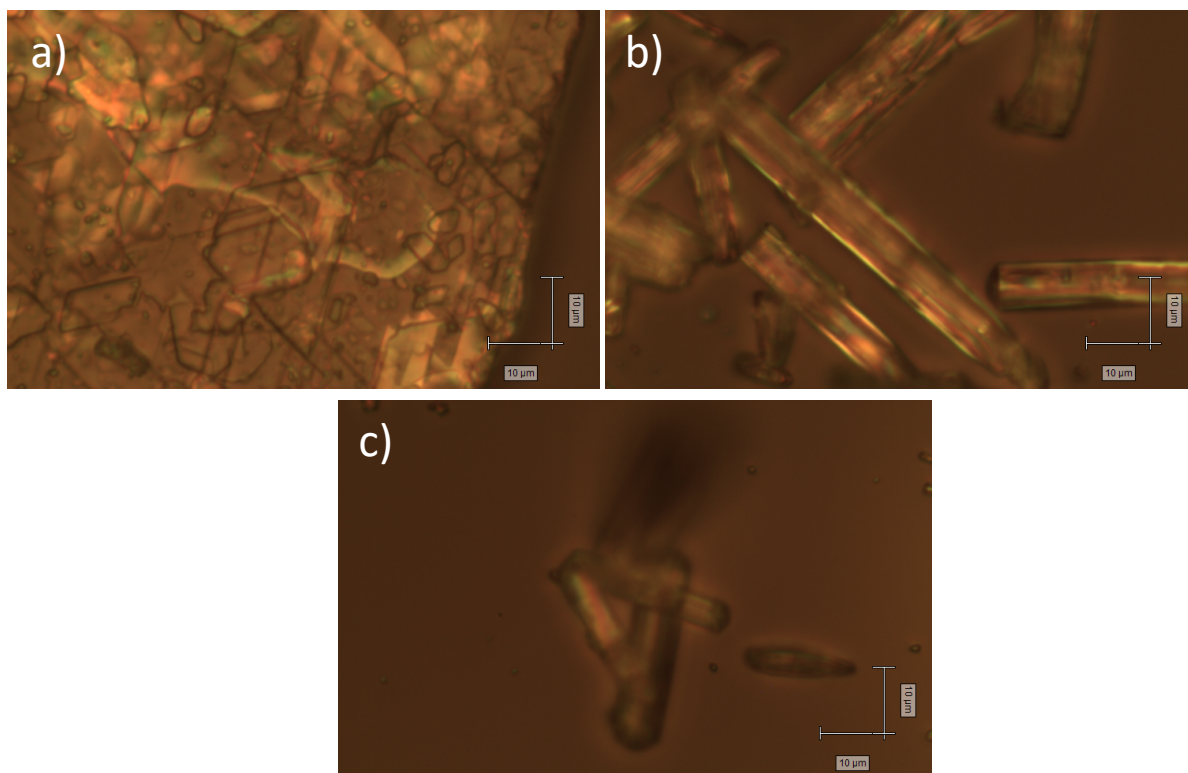


Figura 30. Imágenes de microscopio óptico de triptófano (sólido) sobre obleas de dióxido de silicio: a) TRP1, b) TRP2 y c) TRP3.

Por último, medimos el espectro de absorbancia para distintas concentraciones de triptófano con cada muestra a una temperatura de 4°C (Figura 31). En cada caso, preparamos la solución madre y la diluimos en concentraciones menores usando la misma metodología. Sin embargo, debido a los distintos pesos moleculares de los tipos de triptófano, las concentraciones varían entre un trp y otro. Cabe destacar que el espectro de absorbancia del TRP1 y del TRP2, fueron medidos con el espectrofotómetro Lambda 750, mientras que el espectro de absorbancia del TRP3, fue medido con el espectrofotómetro Spectroquant Prove, debido a que el primero no estaba disponible. Lo primero que observamos es que a medida que aumenta la concentración de triptófano, aumenta también la absorbancia. En el caso del TRP1 (triptófano de prueba) y del TRP3, el *peak* en la absorbancia se encuentra aproximadamente en una longitud de onda de 280 nm, mientras que en el caso del TRP2 el *peak* se encuentra en una longitud de onda de 298 nm.

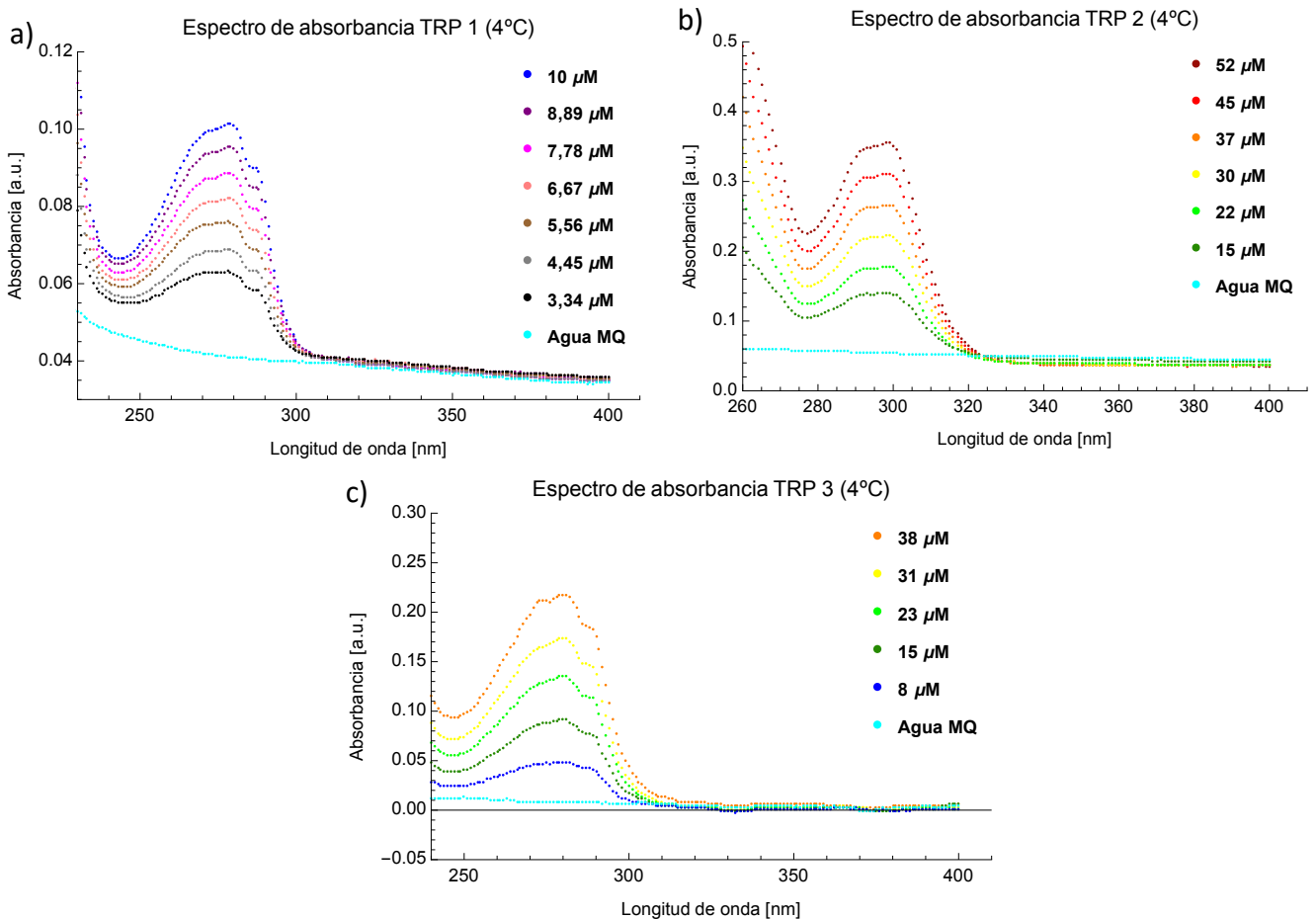


Figura 31. Espectros de absorbancia de los distintos tipos de triptófano: a) TRP1, b) TRP2 y c) TRP3 medidos a 4 °C.

3.3. Experimentos de adsorción

3.3.1. TRP1

Antes de informar los resultados de los experimentos, cabe mencionar algunos aspectos importantes sobre las mediciones del triptófano de prueba TRP1. En primer lugar, todas las mediciones de absorbancia para el TRP1, fueron realizadas con el espectrofotómetro Lambda 750. En segundo lugar, las concentraciones reportadas en estos experimentos fueron preparadas asumiendo una masa molar de 204,23 g/mol para el triptófano de prueba. En tercer lugar, es relevante señalar que previo a cada experimento, medimos el espectro de absorbancia de las soluciones de triptófano de prueba antes de la interacción con los nanomateriales. En todas estas mediciones observamos que las mediciones de absorbancia tenían la forma del espectro de la Figura 31a, en donde se distingue un *peak* característico en los 280 nm. Por ello elegimos esta longitud de onda para comparar y analizar los valores de absorbancia antes y después de cada interacción con el triptófano de prueba TRP1.

3.3.1.1. Interacción con grafeno por 3 horas a T° ambiente

El primer experimento con el triptófano de prueba TRP1 que realizamos en esta investigación consistió en colocar un volumen de 3 ml de soluciones de triptófano de distinta concentración (entre 1 y 10 μM) en contacto con películas de grafeno (con áreas entre 0,17 y 0,3 cm²) depositadas sobre placas de cultivo y dejar interactuar por 3 horas a temperatura ambiente. Una vez pasado el tiempo de interacción, retiramos las soluciones de las placas de cultivo y medimos su espectro de absorbancia en el espectrofotómetro.

Análisis Absorbancia

En la Figura 32 se encuentran los resultados de las mediciones de absorbancia a los 280 nm antes (datos calibración) y después (datos post adsorción) de la interacción. Lo primero que observamos fue que mientras mayor es la concentración inicial, mayor es la absorbancia medida. Al comparar las mediciones previo y posterior a la interacción, observamos que en todos los casos la absorbancia aumentó después de las 3 horas del experimento. Esto es contrario a lo esperado, ya que la adsorción del aminoácido en grafeno baja su concentración en la solución y por ende la absorbancia. Creemos que esto se debe a que el agua se evaporó, por lo tanto, no fue posible detectar si efectivamente el triptófano se adsorbió al grafeno.

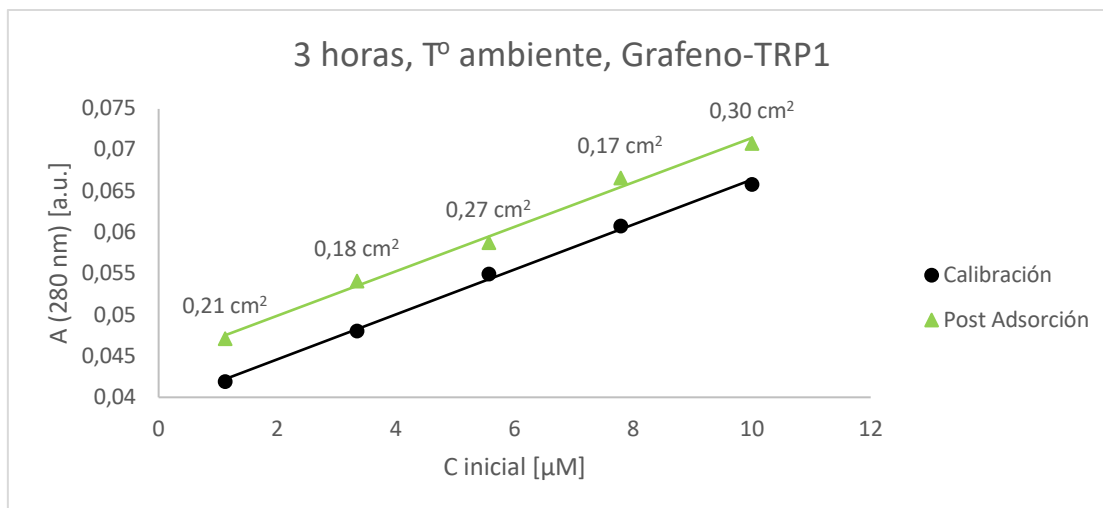


Figura 32. Absorbancia a los 280 nm en función de la concentración inicial de las soluciones de TRP1 antes del experimento de adsorción (negro) y después de 3 horas de interacción con grafeno a temperatura ambiente (verde). Los valores encima de los datos corresponden a las áreas de los grafenos.

Otra posibilidad que consideramos como causa del aumento de la absorbancia fue que el grafeno se podría estar disolviendo en el agua, así que a continuación realizamos un experimento para poner esta hipótesis a prueba. Para ello pusimos agua en contacto con grafeno transferido en placas de cultivo por 24 horas, a 4°C, medimos su espectro de absorbancia después de la interacción y comparamos con el espectro de absorbancia del agua MQ. Los resultados se muestran en la Figura 33. De acuerdo con lo medido, el cambio en el espectro del agua MQ después de la interacción con grafeno no es significativo. Existe la posibilidad de que el grafeno se disuelva en el agua, pero el equipo mide una diferencia muy pequeña, por lo cual no podemos saber a ciencia cierta si el cambio se debe a eso o a un error del equipo de medición. Sin embargo, en cualquiera de los dos casos, la diferencia es tan pequeña, que descartamos la hipótesis de que ésta sea la causa del aumento en la absorbancia del experimento de adsorción anterior.

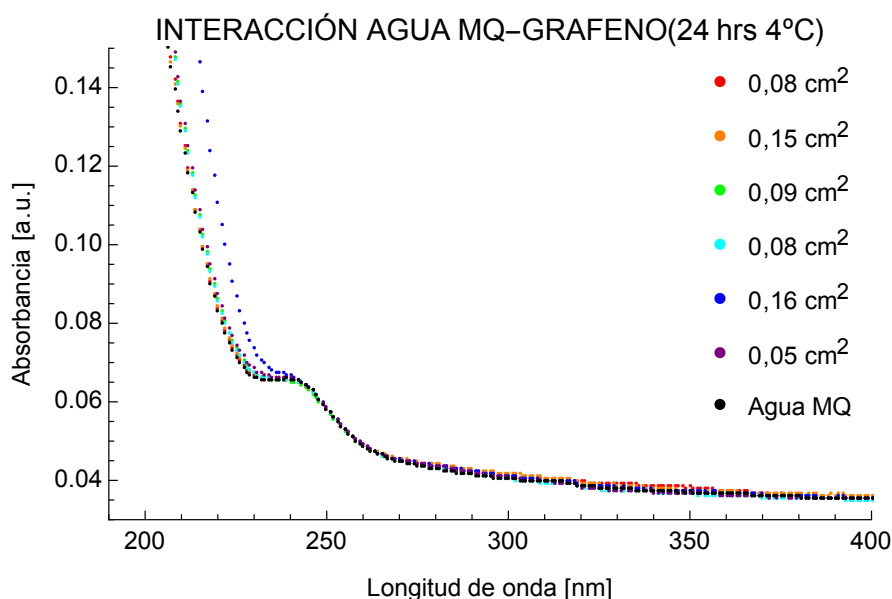


Figura 33. Espectro de absorbancia del agua MQ después de estar en contacto con grafeno por 24 horas a 4°C. Las leyendas indican las áreas de los grafenos.

3.3.1.2. Interacción con grafeno por 3 horas a 4°C

Para evitar el problema de la evaporación del agua, decidimos realizar un segundo experimento de adsorción con el triptófano de prueba TRP1 en grafeno con las mismas condiciones de tiempo (3 horas), volumen (3 ml), concentración inicial de triptófano (entre 1 y 10 μM) y sustrato (placa de cultivo) del primer experimento, pero esta vez a una temperatura de 4°C. En la primera prueba utilizamos un rango pequeño de áreas de grafeno: entre 0,07 y 0,3 cm^2 , mientras que para la segunda prueba utilizamos rangos más grandes: entre 1,0 y 2,3 cm^2 .

Análisis Absorbancia

Lo primero que analizamos a partir de los datos medidos en el espectrofotómetro fue el comportamiento de la absorbancia (a los 280 nm) en función de la concentración inicial (Figura 34). En la Prueba 1, que corresponde a las áreas pequeñas de grafeno, al comparar las absorbancias de las soluciones de TRP1 antes y después de la interacción con grafeno, observamos que hubo adsorción de triptófano sobre grafeno para concentraciones iniciales de triptófano entre 5 y 10 μM , pues la disminución en la absorbancia se relaciona con una disminución de la concentración. Para la concentración de 3,34 μM observamos que la absorbancia post adsorción aumentó. En el caso de la solución de 1,12 μM , la absorbancia se mantuvo prácticamente constante después de estar en contacto con grafeno. Dado que el espectro de absorbancia para esta concentración se encontraba cerca del espectro del agua, la descartamos para los experimentos posteriores.

En la Prueba 2 (Figura 34a), que corresponde a las áreas grandes de grafeno, observamos que en el caso de las tres concentraciones más altas (entre 5 y 10 μM), la absorbancia post adsorción disminuyó, lo cual es un indicio de que sí hubo adsorción de triptófano sobre grafeno. En cuanto a la solución de concentración de 3,34 μM , se observó un leve aumento en la absorbancia, que creemos se encuentra dentro del error del equipo.

Otro aspecto del experimento que estudiamos a partir de los datos medidos fue el comportamiento de el porcentaje de cambio en la absorbancia (Ecuación 16) en función de la concentración inicial a los 280 nm (Figura 35). De acuerdo con la Ecuación 16, los valores positivos en el gráfico de barras indican que hubo adsorción. Observamos que en el caso de la Prueba 1, para áreas pequeñas, hay una tendencia de aumento de $\% \Delta A$ en función de la concentración inicial excepto para la concentración de 3,34 μM . En cuanto a la Prueba 2, para áreas grandes, no observamos ninguna tendencia en particular del porcentaje de cambio de la absorbancia en función de la $C_{inicial}$. En ambas pruebas, no se observó adsorción para la concentración de 3,34 μM .

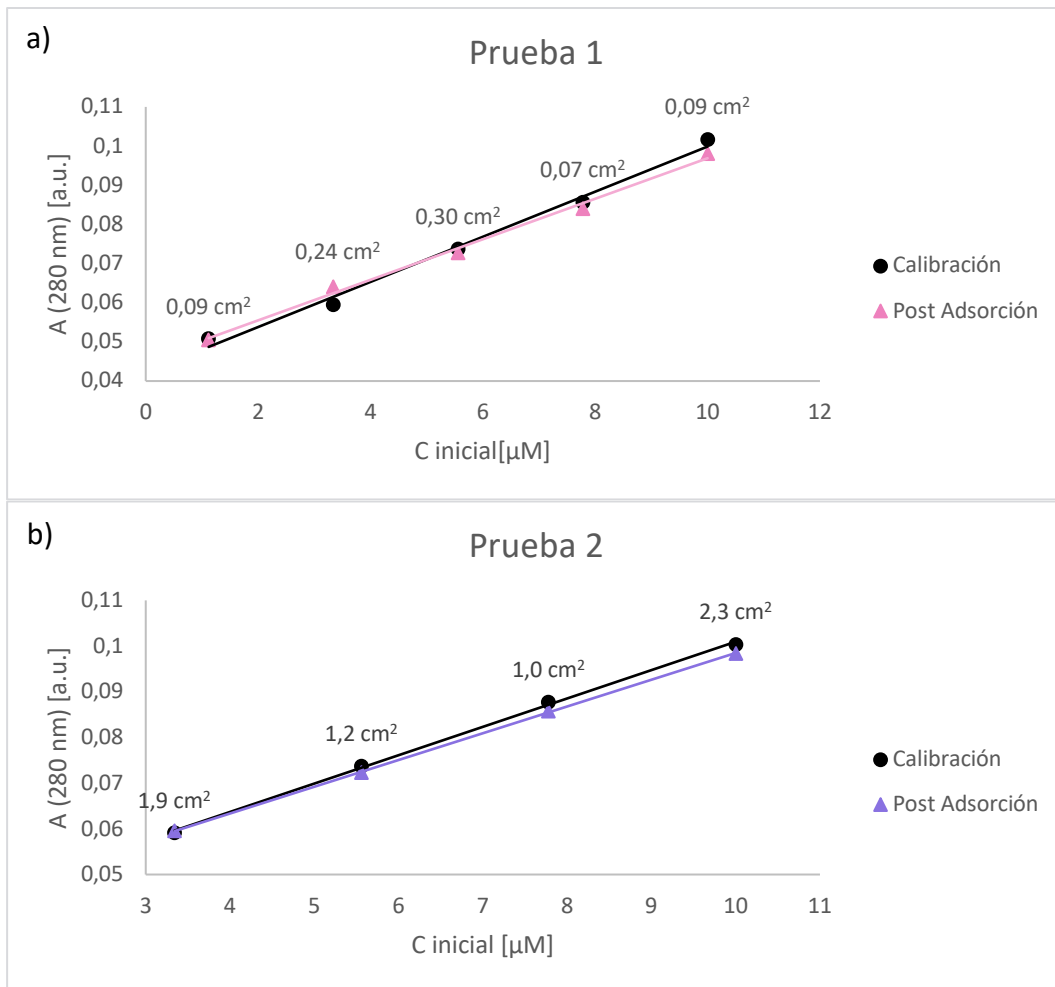


Figura 34. Absorbancia a los 280 nm en función de la concentración inicial de las soluciones de TRP1 antes del experimento de adsorción (calibración) y después de 3 horas de interacción (post adsorción) con grafeno a 4°C para a) Áreas pequeñas y b) Áreas grandes de grafeno (los valores de las áreas se encuentran encima de los datos).

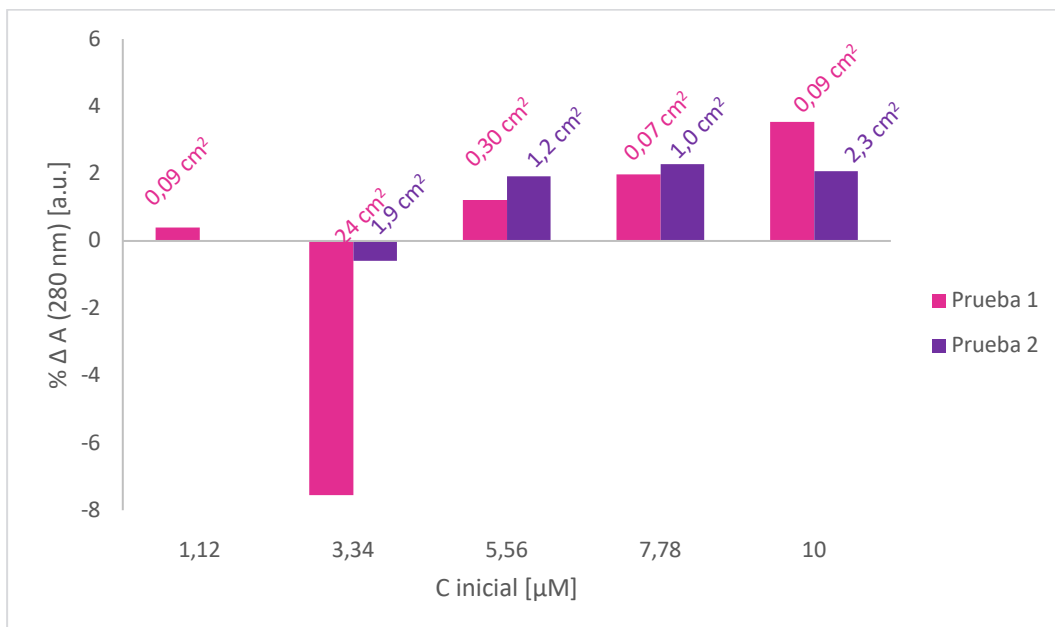


Figura 35. % Δ Absorbancia a los 280 nm en función de la concentración inicial de las soluciones de TRP1 después de 3 horas de interacción con grafeno a 4°C para: Prueba 1 (áreas pequeñas) y Prueba 2 (áreas grandes). Los valores de las áreas se encuentran encima de los datos.

Análisis Concentración

Además del cambio en la absorbancia, estudiamos también el cambio en la concentración de las soluciones, de acuerdo con la Ecuación 17, en función de la concentración inicial. Calculamos la concentración final a partir de la curva de calibración, reemplazando el valor medido de la absorbancia post adsorción en la ecuación de la curva de calibración. En cuanto a la concentración inicial, conocemos su valor debido a que sabemos con cuánta masa de triptófano preparamos la solución. Sin embargo, al reemplazar la $C_{inicial}$ conocida y la C_{final} calculada en la Ecuación 17, los valores no concordaban con lo observado en el análisis de absorbancia. Una disminución en la absorbancia significa una disminución en la concentración. Sin embargo, a pesar de que en algunos casos la absorbancia disminuía, el cálculo de la Ecuación 17 indicaba que la concentración aumentaba para las concentraciones iniciales menores. Con esto concluimos que la curva de calibración no funciona para concentraciones iniciales pequeñas, y por ello, decidimos calcular el ΔC con una $C_{inicial}$ calculada a partir de la curva de calibración. Es decir, introducimos el valor de absorbancia de la solución antes de la interacción en la ecuación de la curva de calibración para obtener una concentración inicial calculada.

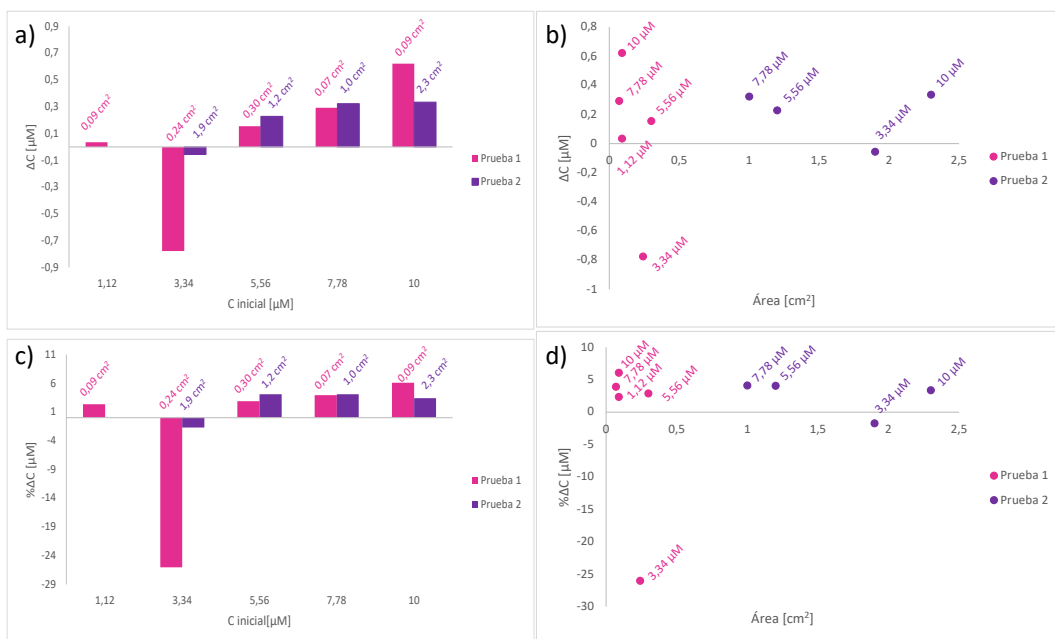


Figura 36. Diferencia de concentración ΔC en función de a) la $C_{inicial}$ y b) el área del grafeno; y porcentaje de cambio de la concentración $\% \Delta C$ en función de c) la $C_{inicial}$ y d) el área de grafeno, después de 3 horas de interacción con grafeno a 4°C para: Prueba 1 (rosado) y Prueba 2 (morado). En a) y c) los valores de las áreas se encuentran encima de los datos. En b) y d) los valores de la $C_{inicial}$ se encuentran encima de los datos.

En la Figura 36a, reportamos el ΔC obtenido con la $C_{inicial}$ calculada en función de la $C_{inicial}$ conocida (no calculada). La razón de no reportar la $C_{inicial}$ calculada en el eje x es que así es más fácil comparar ambas pruebas para las mismas concentraciones iniciales conocidas. Los valores positivos de ΔC indican que hubo adsorción. Observamos que tanto en la Prueba 1, para áreas pequeñas, como en la Prueba 2, para áreas grandes, hay una tendencia de aumento de ΔC en función de la concentración inicial

exceptuando la solución con $C_{inicial}$ de $3,34 \mu M$. Es decir, a mayor concentración inicial de triptófano, mayor es el cambio en la concentración.

Además de la diferencia de concentración, también estudiamos el cambio en porcentaje de la concentración (de acuerdo con la Ecuación 18) en función de la $C_{inicial}$. Los resultados se encuentran en la Figura 36c. Al igual que para ΔC , calculamos $\% \Delta C$ con la $C_{inicial}$ calculada con la curva de calibración. En el caso de la Prueba 1 se observa una tendencia de aumento en el cambio porcentual de la concentración en función de la $C_{inicial}$ exceptuando la solución con $C_{inicial}$ de $3,34 \mu M$. El mayor cambio fue de un 6% respecto a la $C_{inicial}$ de $10 \mu M$. Para la Prueba 2 no observamos una tendencia del $\% \Delta C$ en función de la $C_{inicial}$.

Para estudiar el comportamiento de la adsorción en función del área, graficamos el cambio de concentración ΔC y el cambio porcentual de la concentración $\% \Delta C$ en función del área del grafeno (Figura 36 b y d respectivamente). A partir de los resultados se observa que no hay relación entre el cambio de concentración y el área del grafeno.

Isoterma de adsorción q ($C_{inicial}$)

El último análisis que realizamos para este experimento fue construir una isoterma de adsorción que cuantificara la cantidad de moles adsorbidos por unidad de área (q , Ecuación 19) en función de la $C_{inicial}$ (Figura 37). Cabe mencionar que calculamos q con los valores de $C_{inicial}$ calculados con la curva de calibración.

En el caso de la Prueba 1 (Figura 37a), pudimos hacer un ajuste cuadrático a la isoterma de adsorción incluyendo solo las 3 concentraciones más altas, mientras que en la Prueba 2 no pudimos realizar un ajuste a la curva debido a que no observamos un comportamiento en particular de los datos. Además, debido a la poca cantidad de datos fue difícil observar su comportamiento y modelarlo según la tendencia de los datos.

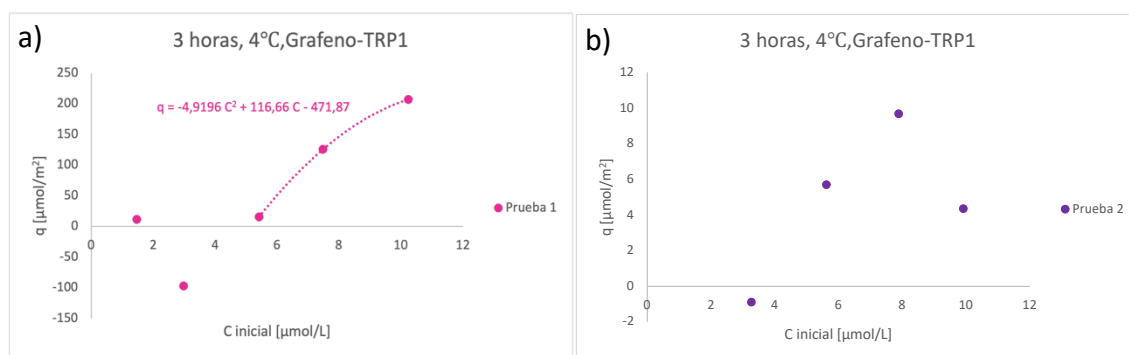


Figura 37. Isotermas de adsorción q ($C_{inicial}$) para: a) Prueba 1 (áreas pequeñas) y b) Prueba 2 (áreas grandes), después de 3 horas de interacción con grafeno a 4°C .

3.3.1.3. Interacción con grafeno por 24 horas a 4°C

A continuación, decidimos estudiar la adsorción del triptófano TRP1 sobre grafeno en placas de cultivo a 4°C después de 24 horas de interacción. Para ello, realizamos el experimento de adsorción dos veces con distintas muestras de grafeno (de áreas grandes entre 1,7 y 2,7 cm²). Dado que en el experimento anterior los resultados para la concentración de 3,34 μM no eran concluyentes y la concentración de 1,12 μM tenía un espectro de absorbancia muy similar al del solvente (agua MQ), en este experimento eliminamos ambas concentraciones y trabajamos con valores de C_{inicial} entre 4 y 10 μM .

Análisis Absorbancia

Para estudiar el comportamiento de adsorción primero graficamos la absorbancia (a los 280 nm) en función de la concentración inicial (Figura 38). Nuevamente, en ambas pruebas observamos que la absorbancia aumenta con la concentración inicial. En la Prueba 1 (Figura 38a) observamos que en todos los casos la absorbancia de las soluciones de triptófano aumentó después de la interacción de 24 horas. Esto puede deberse a que, a pesar de la baja temperatura, el agua se evaporó en las 24 horas del experimento. Por lo tanto, no obtuvimos resultados concluyentes respecto a si ocurre o no adsorción de TRP1 sobre grafeno tras 24 horas de interacción. En la Prueba 2 (Figura 38b) observamos que en los casos de las concentraciones de 7,78 μM y 5,56 μM , la absorbancia post adsorción disminuyó después de la interacción de 24 horas. Sin embargo, en el caso de la concentración de 5,56 μM , el cambio fue mínimo y casi se mantuvo constante el valor de la absorbancia. Para todas las demás concentraciones de triptófano, los valores de absorbancia aumentaron después de la interacción de 24 horas. Esto coincide con los resultados de la Prueba 1 y concluimos que el agua se evapora durante el proceso de interacción de 24 horas.

Debido a que no observamos adsorción de triptófano en grafeno a las 24 horas, no realizamos otros análisis de datos para este experimento ni calculamos la isoterma de adsorción.

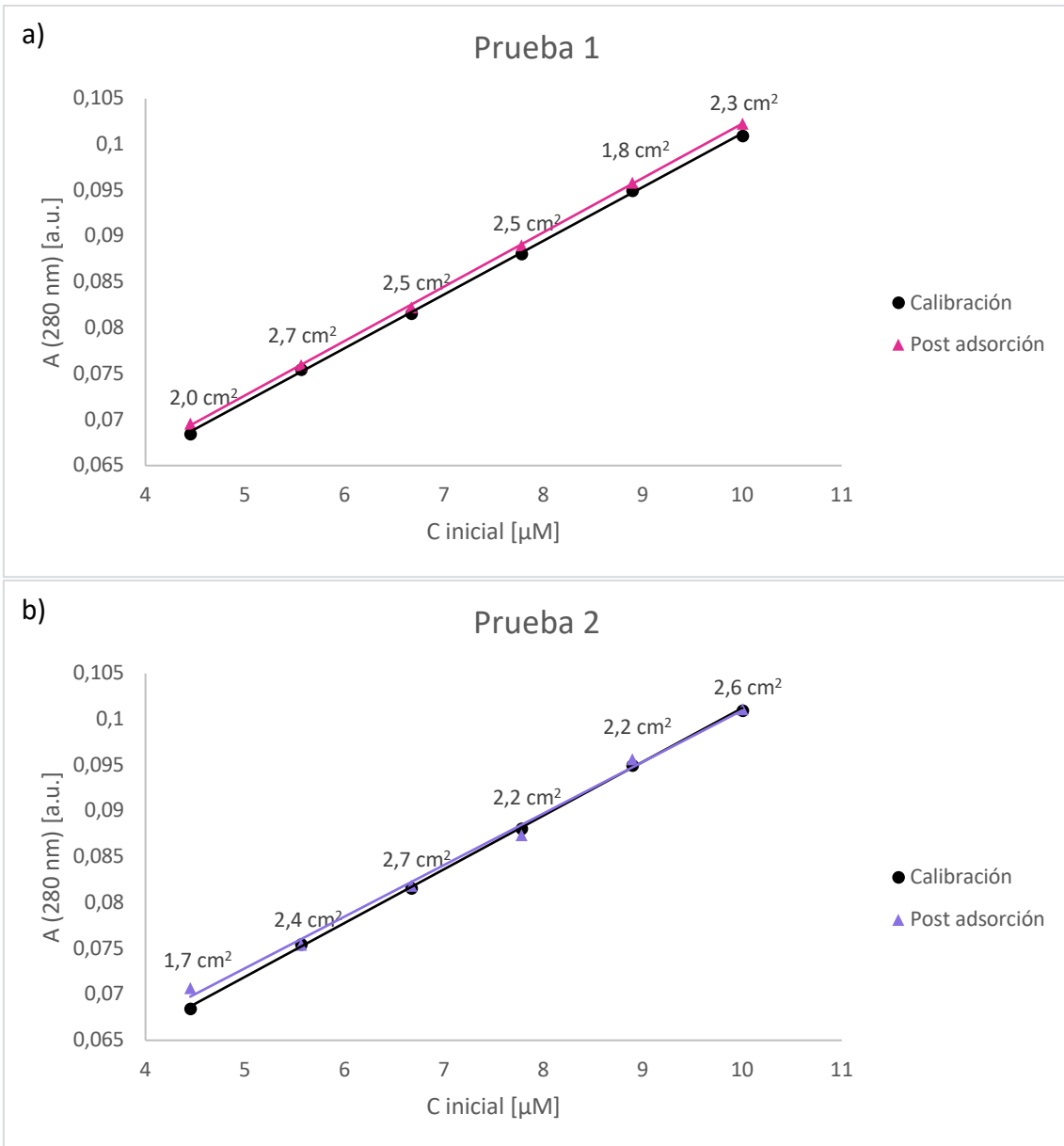


Figura 38. Absorbancia a los 280 nm en función de la concentración inicial de las soluciones de TRP1 antes del experimento de adsorción (calibración) y después de 24 horas de interacción (post adsorción) con grafeno a 4°C para a) Prueba 1 y b) Prueba 2 (los valores de las áreas se encuentran encima de los datos).

3.3.2. TRP2

Una vez que diseñamos y perfeccionamos los experimentos de adsorción con el triptófano de prueba TRP1 que se encontraba en el laboratorio, continuamos nuestro estudio con un nuevo tipo de triptófano: N¹-FORMYL-L-TRYPTOPHAN HYDROCHLORIDE (TRP 2, $C_{12}H_{12}N_2O_3 \cdot HCl$). Antes de proseguir con los resultados de los experimentos, es relevante señalar que previo a cada experimento, medimos el espectro de absorbancia de las soluciones de triptófano TRP2 antes de la interacción con los nanomateriales. En todas estas mediciones observamos que las mediciones de absorbancia tenían la forma del espectro de la Figura 31b, en donde se distingue un *peak* característico en los 298 nm. Por ello elegimos esta longitud de onda para comparar y analizar los valores de absorbancia antes y después de cada interacción con el triptófano TRP2. En este proyecto realizamos dos tipos de experimentos con el TRP2: primero estudiamos la interacción con grafeno por 3 horas a 4°C, y medimos su absorbancia con el espectrofotómetro Lambda 750; luego estudiamos la cinética de adsorción del TRP2 en grafeno y óxido de grafeno durante 4 horas, para lo cual medimos su absorbancia con el lector de placas Synergy HTX.

3.3.2.1. Interacción con grafeno por 3 horas a 4°C

En base a los resultados de los experimentos realizados con el triptófano de prueba TRP1, decidimos estudiar la adsorción del TRP2 en grafeno sólo a las 3 horas de interacción. No estudiamos la adsorción a las 24 horas de interacción debido a nuestra suposición de que el agua se evapora en este lapso a pesar de que la interacción ocurra a 4 °C. Además, debido a la gran cantidad de triptófano TRP2 que teníamos a nuestra disposición en el laboratorio, (a diferencia de la cantidad de TRP1 que era muy limitada) y a las grandes áreas de grafeno que logramos transferir en los últimos experimentos, decidimos trabajar con concentraciones iniciales más altas de triptófano. Basándonos en el trabajo de Mallineni *et al.*[1], utilizamos concentraciones iniciales entre 10 y 60 μM , para llevar a cabo los experimentos con el triptófano TRP2.

Para estudiar la reproducibilidad del experimento de adsorción, en total llevamos a cabo tres pruebas de 3 horas a 4 °C, con concentraciones altas de triptófano TRP2 y áreas grandes de grafeno.

Análisis Absorbancia

El primer análisis que hicimos a partir de los datos medidos fue estudiar el comportamiento de la absorbancia (a los 298 nm) en función de la concentración inicial (Figura 39). A simple vista los datos de absorbancia antes y después de la interacción parecen ser los mismos. Para estudiar el tema más a fondo, realizamos un análisis del porcentaje de cambio de la absorbancia $\% \Delta A$ en función de la concentración inicial (Figura 40) según la Ecuación 16.

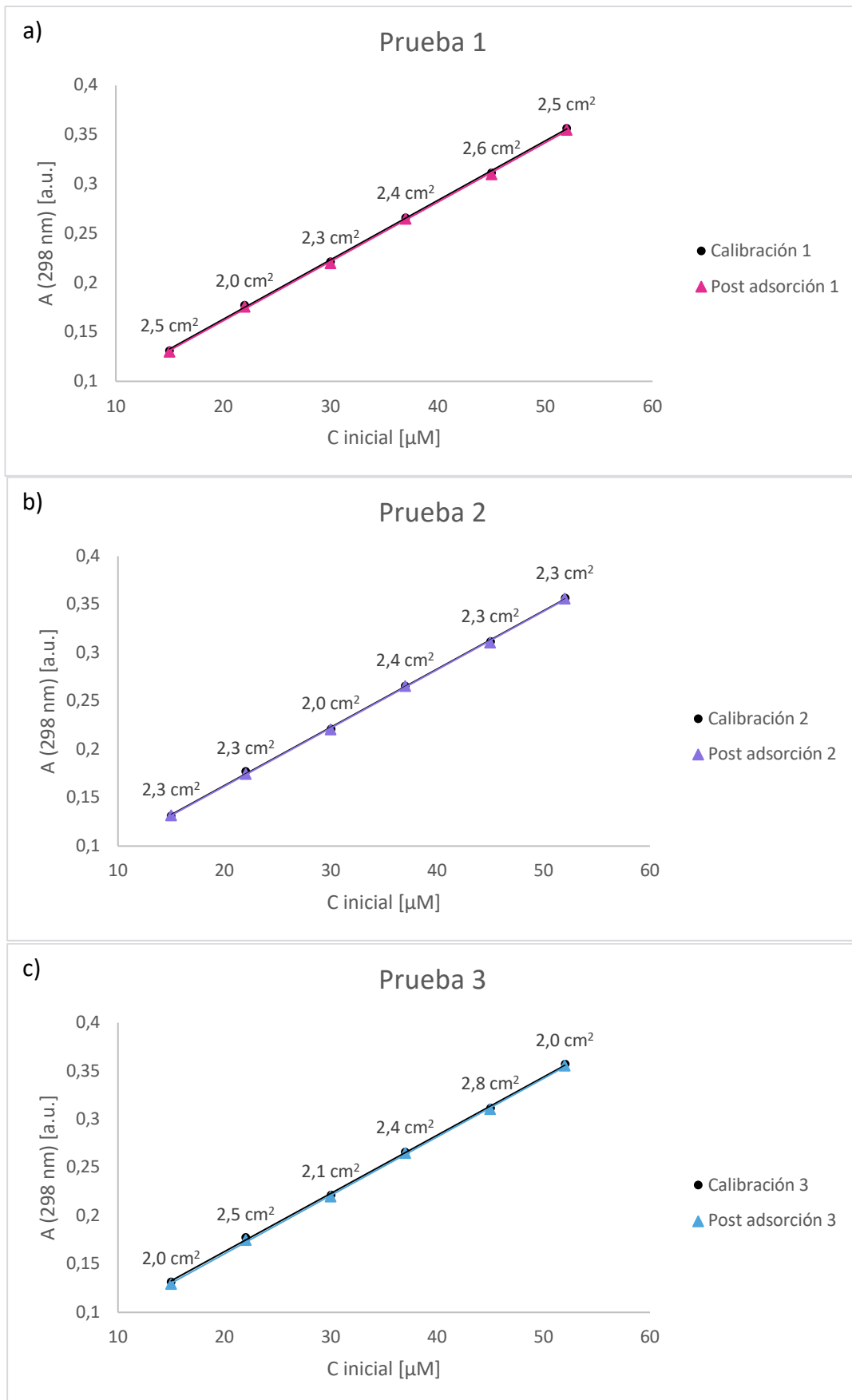


Figura 39. Absorbancia a los 298 nm en función de la concentración inicial de las soluciones de TRP2 antes del experimento de adsorción (calibración) y después de 3 horas de interacción (post adsorción) con grafeno a 4°C para a) Prueba 1, b) Prueba 2 y c) Prueba 3 (los valores de las áreas se encuentran encima de los datos).

Según los resultados de la Figura 40, el triptófano se adsorbió en grafeno en todas las pruebas para todas las concentraciones. En la Prueba 1, a medida que aumentamos la concentración inicial, desde los 15 μM hasta los 45 μM , el cambio porcentual de la absorbancia disminuyó y luego aumentó para la concentración de 52 μM . En la Prueba 2 el cambio porcentual de la absorbancia para la concentración inicial de 15 μM fue pequeño en comparación con las demás concentraciones. Desde la concentración de 22 μM hasta la concentración de 37 μM hubo una disminución del porcentaje de cambio de la absorbancia en función de la concentración inicial. Luego aumentó para la concentración de 45 μM y finalmente disminuyó para la concentración de 52 μM . En la Prueba 3 el cambio porcentual de la absorbancia disminuyó a medida que aumentamos la concentración inicial, desde los 15 μM hasta los 37 μM . Luego aumentó para la concentración de 45 μM y volvió a disminuir para la concentración de 52 μM .

A partir de los resultados observamos que en general, para concentraciones iniciales pequeñas de TRP 2, se registran los mayores valores de $\% \Delta A$, después de la interacción con grafeno. Es decir, para concentraciones iniciales pequeñas, la absorbancia presenta los mayores cambios con respecto a su valor original. Y el hecho de que los valores de $\% \Delta A$ sean positivos, nos indica que la adsorción fue más favorable a concentraciones pequeñas (con excepción de la concentración de 15 μM de la Prueba 2).

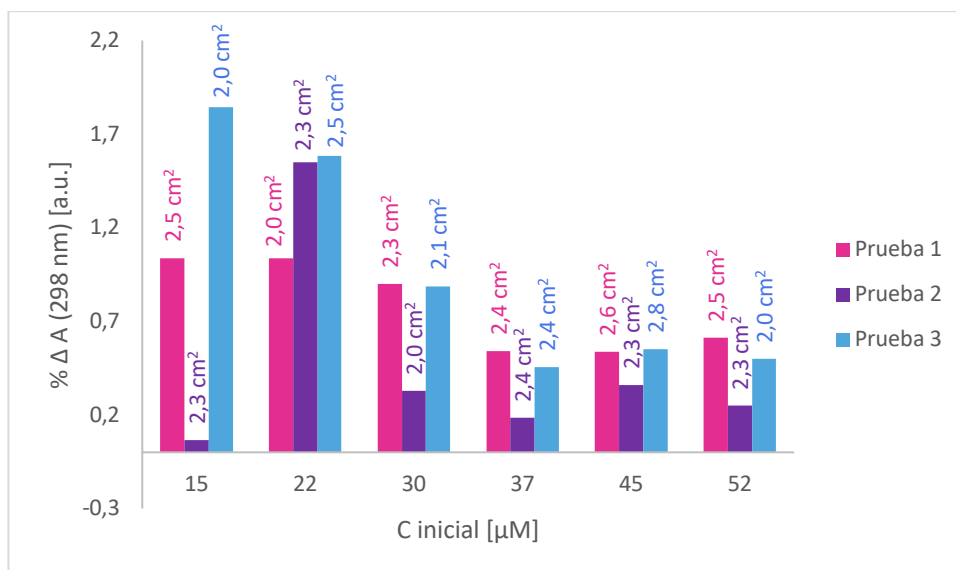


Figura 40. $\% \Delta A$ Absorbancia a los 298 nm en función de la concentración inicial de las soluciones de TRP2 después de 3 horas de interacción con grafeno a 4°C para: Prueba 1 (rosado), Prueba 2 (morado) y Prueba 3 (celeste). Los valores de las áreas se encuentran encima de los datos.

Análisis concentración

A continuación, estudiamos el cambio y el porcentaje de cambio de la concentración de las soluciones, de acuerdo con la Ecuación 17 y la Ecuación 18, en función de la $C_{inicial}$ y el área del grafeno (Figura 41). En virtud de la consistencia entre los datos analizados, al igual que en la sección 3.1.2.2. realizamos el cálculo de ΔC y de $\% \Delta C$ usando los valores de la concentración inicial calculada a partir de la curva de calibración (es decir, a partir de la absorbancia medida). Sin embargo, los valores de concentración inicial reportados en el eje x de la Figura 41 corresponden a la $C_{inicial}$ conocida para facilitar la comparación de los resultados de las tres pruebas.

Los valores positivos de ΔC de la Figura 41a indican que hubo adsorción de TRP2 en grafeno. Sin embargo, no observamos una tendencia del cambio de concentración en función de la $C_{inicial}$. Luego, en la Figura 41b, reportamos los valores de ΔC en función del área del grafeno. En este caso tampoco observamos una tendencia en particular para la diferencia de concentración en función del área del grafeno.

En el caso del cambio porcentual de la concentración $\% \Delta C$, según los resultados de la Figura 41c se observa una disminución de $\% \Delta C$ a medida que la $C_{inicial}$ aumenta. El mayor cambio porcentual de la concentración se observó para la concentración inicial de $15 \mu M$ de la Prueba 3, con un valor de 2,7%. Es decir, un 2,7% del TRP2 se adsorbió en el grafeno. Finalmente, al graficar $\% \Delta C$ en función del área del grafeno (Figura 41d) no se observó una tendencia en específico.

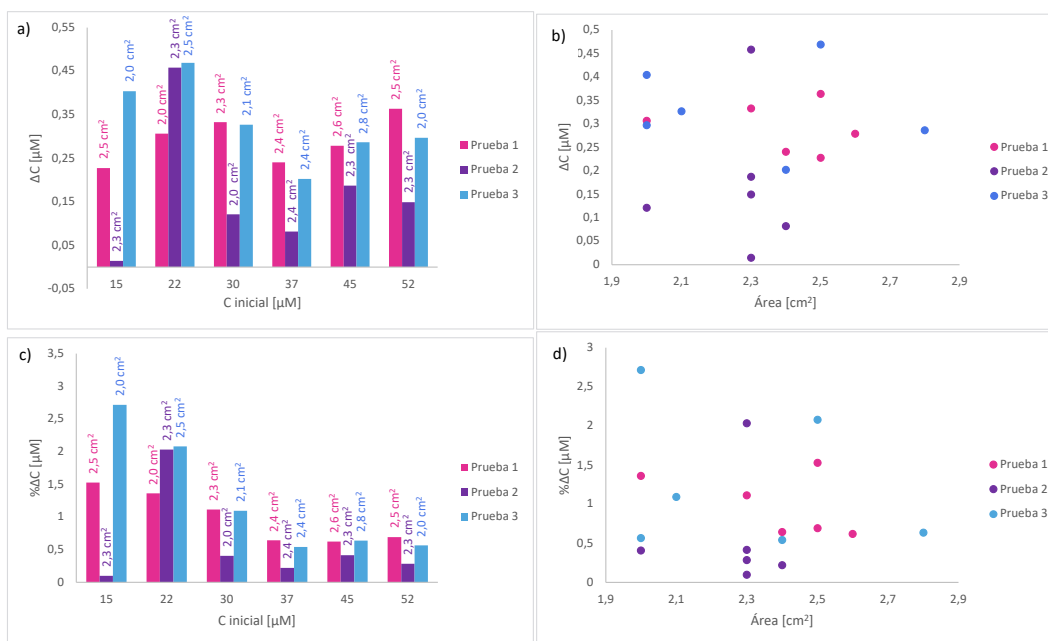


Figura 41. Diferencia de concentración ΔC en función de a) la $C_{inicial}$ y b) el área del grafeno; y porcentaje de cambio de la concentración $\% \Delta C$ en función de c) la $C_{inicial}$ y d) el área de grafeno, después de 3 horas de interacción con grafeno a $4^{\circ}C$ para: Prueba 1 (rosado), Prueba 2 (morado) y Prueba 3 (celeste). En a) y c) los valores de las áreas se encuentran encima de los datos.

Isoterma de adsorción q ($C_{inicial}$)

En cuanto al análisis de la cantidad de TRP2 adsorbido en función de la $C_{inicial}$, construimos isotermas de adsorción para las tres pruebas a partir de la Ecuación 19 usando los valores de $C_{inicial}$ calculada con la curva de calibración, obteniendo los resultados de la Figura 42. Las líneas punteadas no corresponden a ajustes de curvas, sino que simplemente siguen la dispersión de los datos para facilitar la visualización de su comportamiento.

Si bien las isotermas de adsorción no se asemejan a los modelos de Langmuir ni de BET, sí son consistentes entre las tres pruebas. Entre las concentraciones iniciales de 20 y 40 μM , la cantidad de TRP2 adsorbido por unidad de área en el grafeno disminuye, luego aumenta para la concentración de 45 μM y finalmente, en los casos de la Prueba 1 y 3 sigue aumentando, mientras que disminuye para la Prueba 2 en la concentración de 52 μ .

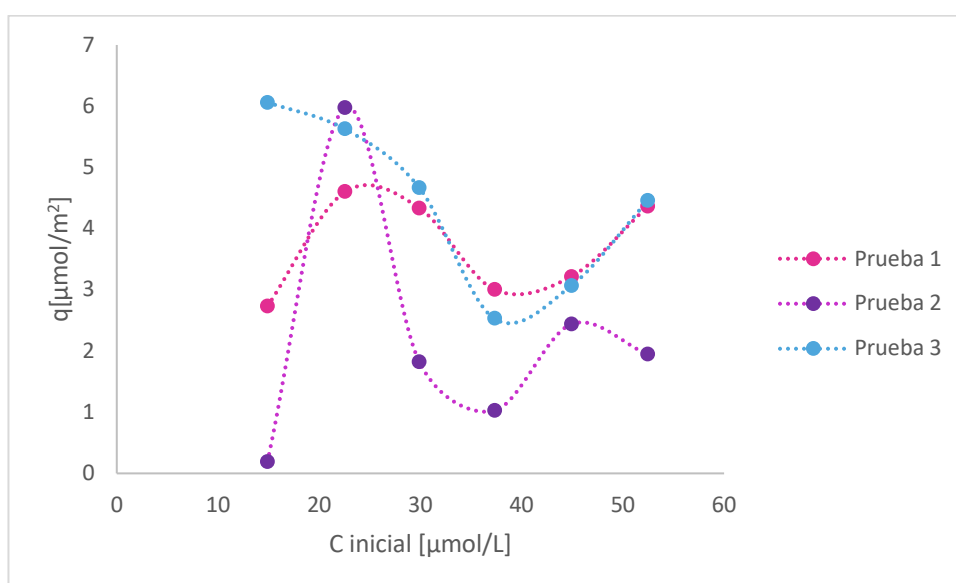


Figura 42. Isotermas de adsorción q ($C_{inicial}$) para: a) Prueba 1 (rosado), b) Prueba 2 (morado) y c) Prueba 3 (celeste), después de 3 horas de interacción entre TRP2 y grafeno a 4°C. Las líneas punteadas no son ajustes de curva, son líneas de dispersión.

3.3.2.2. Cinética Adsorción de 4 horas a 4 °C para grafeno y óxido de grafeno

A continuación, realizamos un experimento de cinética de adsorción de TRP2 en grafeno y óxido de grafeno transferidos en placas de cultivo. Este experimento consiste en medir la absorbancia de la solución en función del tiempo. En este caso el equipo de medición que utilizamos (lector de placas Synergy HTX) mide la absorbancia para valores específicos de longitud de onda. Basándonos en el espectro de la Figura 31b, decidimos medir la absorbancia a los 298 nm (*peak* del espectro).

En este experimento, los nanomateriales transferidos en las placas de cultivo se depositaron en las orillas de los pocillos de la placa (Figura 43). De esta manera, al medir con el lector de placas (donde el haz de luz pasa por el centro de cada pocillo), el nanomaterial no interfería en la medición de la absorbancia de la solución de triptófano TRP2. El diseño de este experimento consistió en medir la absorbancia de las soluciones de TRP2 durante la interacción, cada 30 minutos hasta completar 4 horas de interacción. Entre cada medición colocamos las placas de cultivo con las soluciones de triptófano en un refrigerador a 4 °C para que el agua no se evapore.

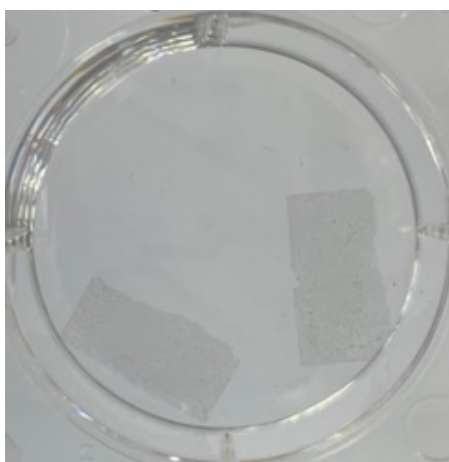


Figura 43. Imagen representativa de grafeno transferido sobre una placa de cultivo. El grafeno es depositado en las orillas y no en el centro.

Los resultados de la absorbancia a los 298 nm en función del tiempo para grafeno y óxido de grafeno se observan en las Figuras 44a y b respectivamente. En el caso del grafeno, para la concentración de 30 μM se observó una disminución de la absorbancia después de la primera hora de interacción (indicando la adsorción de TRP2 en grafeno), luego se mantuvo constante hasta la hora 3,5 de la interacción para luego disminuir un poco más en la hora 4 del experimento. En el caso de la concentración de 22 μM , el valor de absorbancia se mantuvo completamente constante durante las 4 horas de interacción por lo que no pudimos observar indicios de adsorción de TRP2 en grafeno, Luego para la concentración de 15 μM , observamos una disminución de la absorbancia a los 30 minutos de interacción, indicando que el TRP2 se adsorbió en el grafeno, luego se mantuvo constante hasta que aumentó en la hora 1,5 del experimento (podría ser un proceso de desorción). Luego en la segunda hora la absorbancia disminuyó de nuevo, indicando que el TRP2 se volvió a adsorber en el grafeno y se mantuvo constante hasta la hora 4 del experimento.

En el caso del óxido de grafeno, para la concentración inicial de $30 \mu M$, la absorbancia aumentó a los 30 minutos de interacción. Luego, al llevar 1 hora de interacción la absorbancia disminuyó a un valor menor que el de la absorbancia inicial (hora 0). A continuación, siguió disminuyendo hasta la segunda hora de interacción, después de la cual la absorbancia mantuvo un valor constante hasta las 4 horas de interacción. En el caso de la concentración inicial de $22 \mu M$ la absorbancia se mantuvo constante durante los primeros 30 minutos y luego disminuyó en la primera hora de interacción (el TRP2 se adsorbió en el óxido de grafeno). Media hora después medimos una absorbancia mayor, lo cual puede ser un indicio de desorción del TRP2 de la superficie. En la segunda hora de interacción la absorbancia disminuyó de nuevo y se mantuvo constante hasta la hora 3,5 del experimento. En la hora 4 se observó un aumento de la absorbancia.

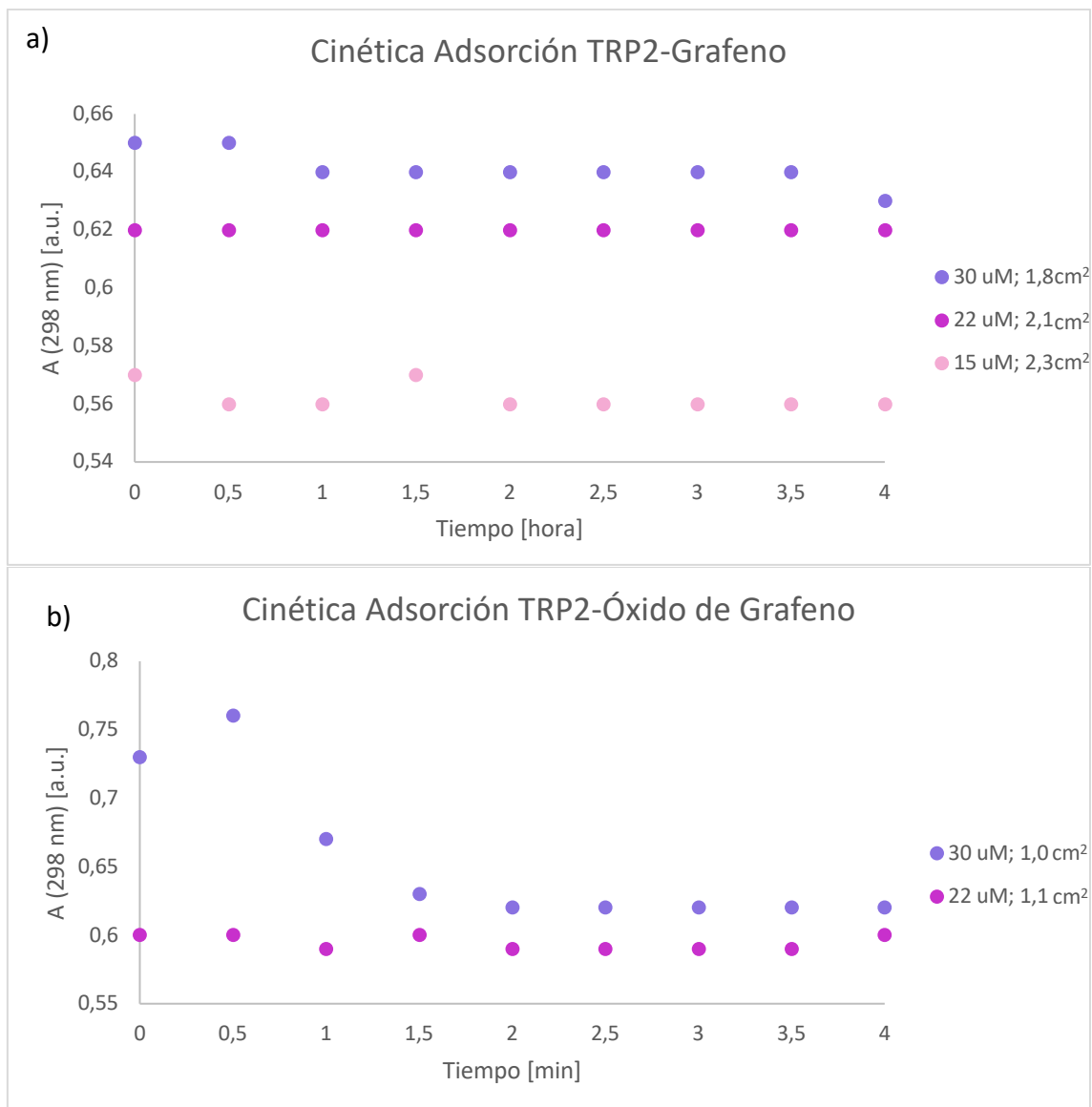


Figura 44. Absorbancia a los 298 nm en función del tiempo para las soluciones de TRP2 durante la interacción con a) grafeno y b) óxido de grafeno. Las concentraciones iniciales y áreas de los nanomateriales se encuentran en la leyenda.

Al comparar los resultados en grafeno y en óxido de grafeno, lo más interesante es que para la concentración de $30 \mu M$ de TRP2, la adsorción fue más favorable en el caso del óxido de grafeno, en el cual el cambio de absorbancia y por consiguiente el cambio de concentración fue más drástico. No obstante, en el caso de la concentración de $22 \mu M$ la adsorción en óxido de grafeno fue leve.

Cabe aclarar que en este experimento medimos también las soluciones de TRP2 en placas de cultivo sin nanomaterial como blanco de referencia, y los resultados que obtuvimos fueron poco confiables. Al construir la curva de calibración con los datos de absorbancia medidos en función de las tres concentraciones iniciales (15 , 22 y $30 \mu M$) en la hora 0 del experimento con el óxido de grafeno, obtuvimos un coeficiente $R^2=0,69$, mientras que para el grafeno obtuvimos un coeficiente $R^2=0,98$ para dichas concentraciones iniciales.

Estos errores de medición podrían deberse a que el diseño del experimento involucra una alta manipulación de las muestras durante la interacción. El hecho de colocar las placas de cultivo en el espectrofotómetro, el movimiento que experimentan durante la medición dentro del equipo cuando al cambiar de pocillo y el transporte hasta el refrigerador para luego comenzar el mismo ciclo significa que la muestras están en constante movimiento lo cual podría afectar la medición. Los errores de medición también podrían deberse a problemas del equipo para realizar mediciones en el rango ultravioleta. Además de la longitud de onda de 298 nm intentamos medir la absorbancia de las soluciones a longitudes de onda menores, pero los valores de A obtenidos fueron mayores a 1 lo cual discrepa con la ley de Beer-Lambert, por lo cual descartamos estas mediciones. Si bien para la longitud de onda de 298 nm los valores de absorbancia fueron menores a 1, no podemos asegurar mediciones confiables en el rango ultravioleta.

3.3.3. TRP3

El último triptófano que utilizamos en este estudio fue el NALPHA-ACETYL-DL-TRYPTOPHAN METHYL ESTER (TRP3, $C_{14}H_{16}N_2O_3$), con el cual llevamos a cabo tres estudios de cinética de adsorción con nanomateriales transferidos en sustratos de dióxido de silicio. El primer estudio para óxido de grafeno de áreas pequeñas durante 4 horas, y el segundo y tercero para óxido de grafeno y grafeno de áreas grandes durante 24 horas. Antes de realizar estos experimentos estudiamos el espectro de absorbancia del TRP3 en el espectrofotómetro Spectroquant Prove y obtuvimos el gráfico de la Figura 31c, en el cual observamos que el *peak* característico del TRP3 se encontraba en los 280 nm . Los tres experimentos de adsorción de TRP3 fueron realizados en el espectrofotómetro Spectronic Genesys 5, en el cual medimos los valores de absorbancia de las soluciones a los 280 nm (este equipo no mide espectros de longitud de onda, sino valores específicos). Los experimentos de cinética de adsorción consistieron en colocar los sustratos de dióxido de silicio con el nanomaterial transferido encima de ellos en las cubetas de cuarzo dentro del espectrofotómetro, y dejar interactuar con las soluciones de triptófano TRP3 a temperatura ambiente. Esto disminuyó la manipulación de las muestras, al dejar las cubetas dentro del espectrofotómetro durante toda la interacción.

Para asegurarnos de que el equipo era capaz de medir diferencias pequeñas de concentración, antes de realizar los experimentos de cinética de adsorción con los nanomateriales, llevamos a cabo una macrocalibración (Figura 45a) para soluciones de TRP3 de concentraciones entre 10 y 50 μM , a intervalos de 10 μM , y una microcalibración (Figura 45b) para concentraciones entre 27 y 33 μM , a intervalos de 1 μM (en ambas mediciones colocamos sustratos de dióxido de silicio sin nanomaterial transferido dentro de las cubetas). La diferencia entre las ecuaciones de las curvas de calibración se debe a que las mediciones se hicieron en días distintos, no obstante, en ambas calibraciones los datos tuvieron un excelente ajuste lineal con un $R^2=0,9998$ para la calibración macro y un $R^2=0,9942$ para la calibración micro. Con esto quedó demostrado que el equipo Spectronic Genesys 5 es capaz de detectar un cambio de 1 μM de la concentración de TRP3.

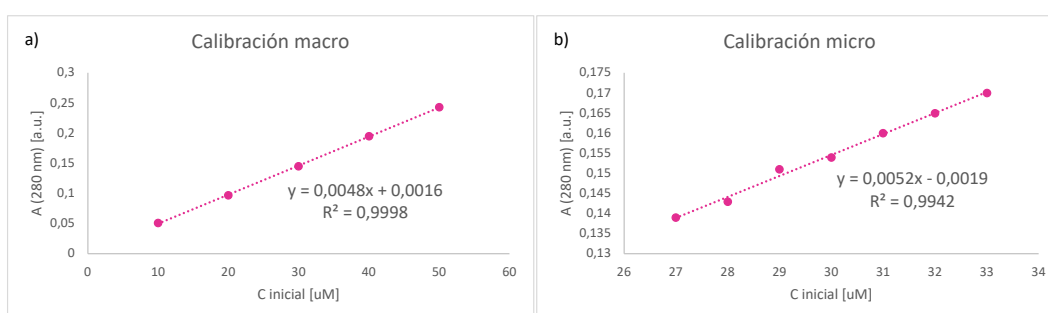


Figura 45. Curvas de calibración del TRP3 a temperatura ambiente (Absorbancia a los 280 nm en función de la $C_{inicial}$) para a) concentraciones mayores y b) concentraciones menores.

3.3.3.1. Cinética Adsorción de 4 horas a T° ambiente para óxido de grafeno

El primer experimento que realizamos con el triptófano TRP3 consistió en estudiar la interacción entre óxido de grafeno de áreas pequeñas (entre 0,2 y 0,5 cm^2) transferidos sobre sustratos de dióxido de silicio y soluciones de TRP3 con concentraciones entre 10 y 50 μM a temperatura ambiente. Estudiamos la interacción durante 4 horas, midiendo la absorbancia de las soluciones de TRP3 cada media hora en el espectrofotómetro.

Análisis Absorbancia

El primer análisis que realizamos fue sobre el comportamiento de la absorbancia a los 280 nm en función del tiempo (Figura 46). Como es esperable, observamos que a medida que la $C_{inicial}$ aumentaba, la absorbancia también aumentaba. A simple vista la absorbancia pareciera mantenerse constante en el tiempo según el gráfico de la Figura 46. Así que decidimos estudiar el cambio porcentual de la absorbancia en función del tiempo (Figura 47). Lo que observamos fue que la absorbancia aumentó a medida que pasaba el tiempo. Creemos que se debe al hecho de realizar el experimento a temperatura ambiente y a que al tener áreas de óxido de grafeno pequeñas no hubo una gran adsorción que pudiéramos observar a partir de las mediciones de absorbancia. En general las concentraciones más pequeñas fueron las que experimentaron los cambios porcentuales más grandes de la absorbancia con respecto a su valor inicial.

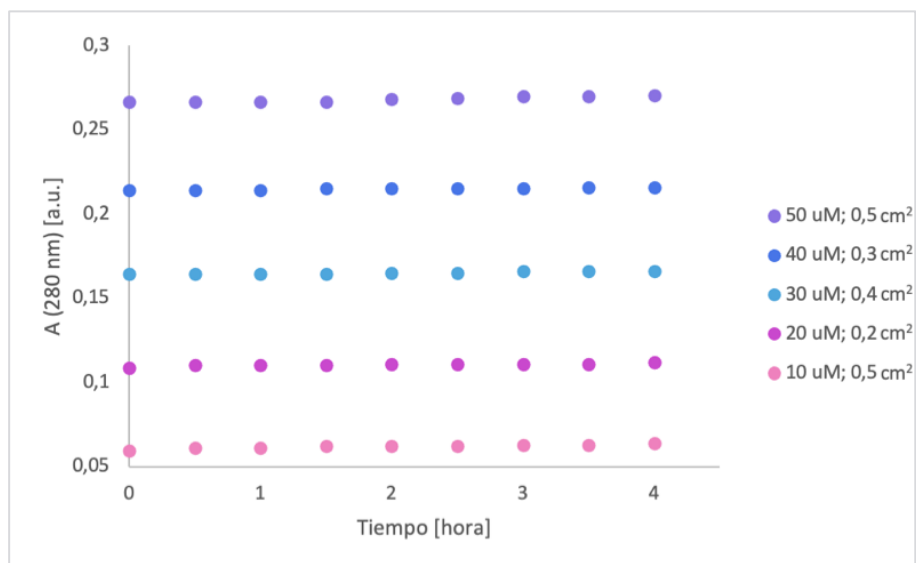


Figura 46. Absorbancia a los 280 nm en función del tiempo para las soluciones de TRP3 durante la interacción con óxido de grafeno a temperatura ambiente. Las concentraciones iniciales y áreas de óxido de grafeno se encuentran en la leyenda.

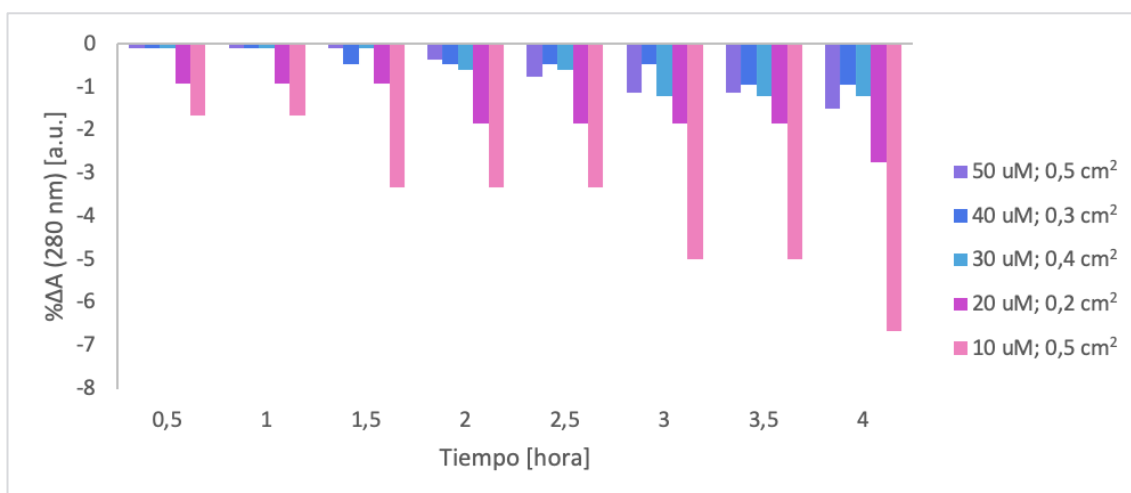


Figura 47. %ΔAbsorbancia a los 280 nm en función del tiempo para las soluciones de TRP3 durante la interacción con óxido de grafeno a temperatura ambiente. Las concentraciones iniciales y áreas de óxido de grafeno se encuentran en la leyenda.

3.3.3.2. Cinética Adsorción de 24 horas a T°ambiente para óxido de grafeno

El segundo experimento que realizamos con el triptófano TRP3 consistió en estudiar la interacción entre óxido de grafeno de áreas grandes (entre 1,3 y 2,7 cm²) transferidos sobre sustratos de dióxido de silicio y soluciones de TRP3 con concentraciones entre 20 y 70 μM a temperatura ambiente. Estudiamos la interacción durante 24 horas. En un principio el objetivo era medir la absorbancia de las soluciones de TRP3 cada media hora durante las primeras 4 horas y luego realizar otras dos mediciones a la hora 19 y 24 del experimento. Sin embargo, durante la medición hubo un corte de luz y solo alcanzamos a medir la absorbancia hasta la hora 2,5 de interacción

en vez de la hora 4. Aun así, fue posible realizar las mediciones posteriores a las horas 19 y 24 del experimento.

Análisis Absorbancia

Al analizar el comportamiento de la absorbancia a los 280 nm en función del tiempo (Figura 48), observamos como se esperaba que, a medida que la $C_{inicial}$ aumentaba, la absorbancia también aumentaba. Según las mediciones de absorbancia, observamos adsorción de TRP3 en óxido de grafeno para las concentraciones iniciales de 30, 40, 50 y 70 μM en algún momento en las primeras 2,5 horas. Además, en los casos de las concentraciones iniciales de 30 y 50 μM observamos que la absorbancia volvió a aumentar a las 2 y 2,5 horas de interacción respectivamente, lo cual puede deberse a la desorción del triptófano. En el caso de la concentración inicial de 20 μM la absorbancia se mantuvo constante durante las primeras 2,5 horas de interacción. Por otro lado, la concentración inicial de 60 μM aumentó constantemente y no pudimos observar a partir de las mediciones de absorbancia si el TRP3 se adsorbió en el óxido de grafeno para esa $C_{inicial}$. Todas las soluciones de TRP3 aumentaron su absorbancia a las 19 y 24 horas (posiblemente debido a la evaporación del agua).

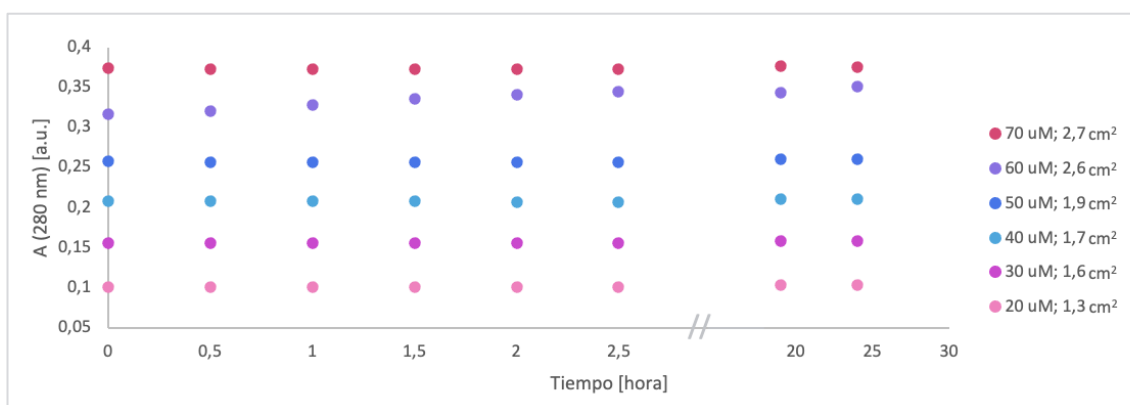


Figura 48. Absorbancia a los 280 nm en función del tiempo para las soluciones de TRP3 durante la interacción con óxido de grafeno a temperatura ambiente. Las concentraciones iniciales y áreas de óxido de grafeno se encuentran en la leyenda.

Para estudiar el porcentaje de cambio de la absorbancia $\% \Delta A$ en función de la concentración inicial según la Ecuación 16, escogimos dos tiempos en los cuales observamos adsorción para la mayoría de las concentraciones iniciales: a la hora y media de interacción (Figura 49a) y a las 2 horas y media de interacción (Figura 49c). Los valores positivos de $\% \Delta A$ son indicio de que sí hubo adsorción de TRP3. Como dijimos anteriormente, la $C_{inicial}$ de 20 μM se mantuvo constante durante las primeras horas de interacción por lo que el cambio porcentual de la absorbancia fue nulo en ambas mediciones. Y la concentración inicial de 60 μM mostró un inusual aumento de la absorbancia en todas las mediciones durante el experimento. Si bien a partir de las mediciones pudimos observar si hay o no adsorción de TRP3 en óxido de grafeno, no encontramos una tendencia en particular para el porcentaje de cambio de la absorbancia en función de la $C_{inicial}$. En la hora 1,5 de interacción, la $C_{inicial}$ de 50 μM fue la que mostró un mayor $\% \Delta A$ igual a 0,78%, mientras que en la hora 2,5 de interacción, la $C_{inicial}$ de 30 μM fue la que mostró un mayor $\% \Delta A$ igual a 0,64%.

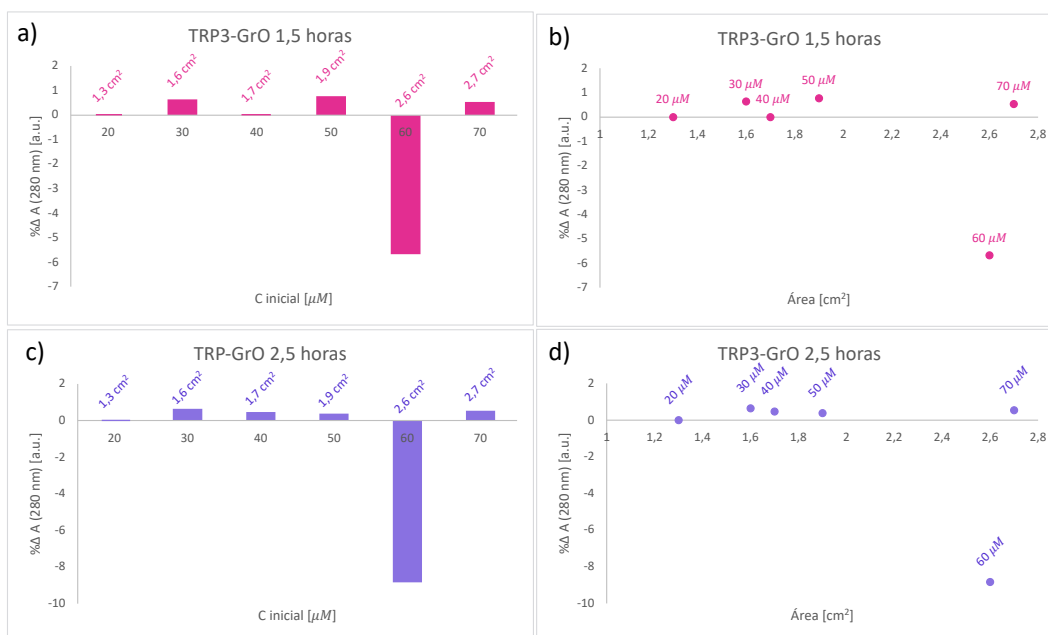


Figura 49. % Δ Absorbancia a los 280 nm para la interacción de TRP3 con óxido de grafeno a temperatura ambiente: a las 1,5 horas de interacción en función de a) la concentración inicial y del b) área del nanomaterial; y a las 2,5 horas de interacción en función de c) la concentración inicial y del d) área del nanomaterial. En a) y c) los valores de las áreas se encuentran encima de los datos. En b) y d) los valores de la $C_{inicial}$ se encuentran encima de los datos.

Otro aspecto del proceso de adsorción que estudiamos fue el porcentaje de cambio de la absorbancia % ΔA en función del área del óxido de grafeno, a la hora y media de interacción (Figura 49b) y a las 2 horas y media de interacción (Figura 49d). A partir de las mediciones no observamos una tendencia que dependiera del área del nanomaterial.

Isoterma de adsorción q(C)

En cuanto al análisis de la cantidad de TRP3 adsorbido en función de la $C_{inicial}$, construimos isotermas de adsorción a partir de la Ecuación 19 usando los valores de $C_{inicial}$ calculada con la curva de calibración, a la hora y media de interacción (Figura 50a) y a las 2 horas y media de interacción (Figura 50b). Las líneas punteadas no corresponden a ajustes de curvas, sino que simplemente siguen la dispersión de los datos para facilitar la visualización de su comportamiento. En las isotermas de adsorción no consideramos los datos correspondientes a la $C_{inicial}$ de 60 μM debido a que los datos no eran confiables.

Las isotermas de adsorción no se asemejan a los modelos de Langmuir ni de BET, pero muestran un comportamiento similar a las isotermas de la Figura 42 para el TRP2. En la hora 1,5 de interacción, la cantidad de TRP3 adsorbido en la superficie del óxido de grafeno es nula tanto para las concentraciones de 20 y 40 μM . Entre la $C_{inicial}$ de 30 μM y de 50 μM , la cantidad de TRP3 adsorbido por unidad de superficie aumentó con la $C_{inicial}$ y luego entre la $C_{inicial}$ de 50 μM y de 70 μM la cantidad de TRP3 adsorbido por unidad de superficie disminuyó con la $C_{inicial}$.

En la hora 2,5 de interacción, la cantidad de TRP3 adsorbido en la superficie del óxido de grafeno es nula para la $C_{inicial}$ de $20 \mu M$ y luego aumenta para la $C_{inicial}$ de $30 \mu M$. Entre la $C_{inicial}$ de $30 \mu M$ y de $50 \mu M$, la cantidad de TRP3 adsorbido por unidad de superficie disminuyó con la $C_{inicial}$ y luego entre la $C_{inicial}$ de $50 \mu M$ y de $70 \mu M$ la cantidad de TRP3 adsorbido por unidad de superficie aumentó con la $C_{inicial}$.

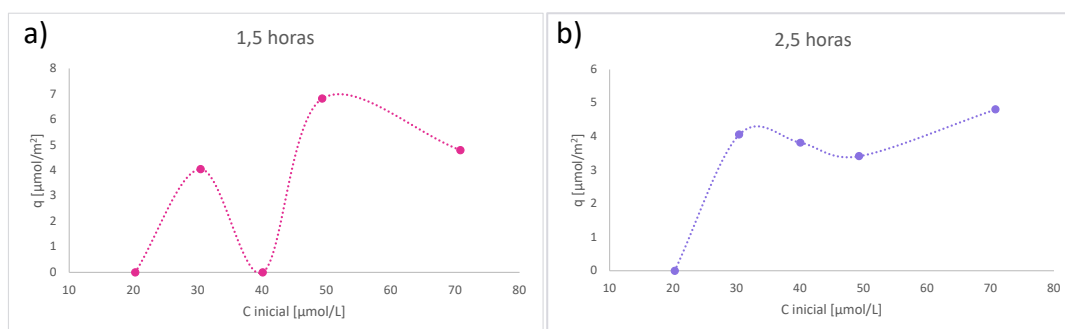


Figura 50. Isothermas de adsorción q ($C_{inicial}$) entre TRP3 y óxido de grafeno a temperatura ambiente a las a) 1,5 horas y b) 2,5 horas de interacción. Las líneas punteadas no corresponden a ajustes de curva, son líneas de dispersión.

3.3.3.3. Cinética Adsorción de 24 horas a T° ambiente para grafeno

El tercer experimento que realizamos con el triptófano TRP3 consistió en estudiar la interacción entre grafeno de áreas grandes (entre $1,1$ y $2,4 \text{ cm}^2$) transferidos sobre sustratos de dióxido de silicio y soluciones de TRP3 con concentraciones entre 20 y $70 \mu M$ a temperatura ambiente. Estudiamos la interacción durante 24 horas, midiendo la absorbancia de las soluciones de TRP3 cada media hora durante las primeras 4 horas y luego realizamos otras dos mediciones a la hora 19 y 24 del experimento.

Análisis Absorbancia

Al analizar el comportamiento de la absorbancia a los 280 nm en función del tiempo (Figura 51), observamos que, a medida que la $C_{inicial}$ aumentaba, la absorbancia también aumentaba. Según las mediciones de absorbancia, observamos adsorción de TRP3 en grafeno para las concentraciones iniciales de 20 , 50 , 60 y $70 \mu M$ en algún momento durante las primeras 4 horas de interacción. Además, en todas esas concentraciones, excepto la de $60 \mu M$ observamos que la absorbancia volvió a aumentar, lo cual puede deberse a la desorción del triptófano o a la evaporación del agua. En el caso de la concentración inicial de $40 \mu M$ la absorbancia se mantuvo constante durante las primeras 4 horas de interacción por lo cual no podemos afirmar que se haya adsorbido el TRP en el grafeno. Por otro lado, la concentración inicial de $30 \mu M$ aumentó después de la primera hora de interacción y se mantuvo constante hasta la cuarta hora de interacción, por lo cual tampoco pudimos observar a partir de las mediciones de absorbancia si el TRP3 se adsorbió en el grafeno para esa $C_{inicial}$. Todas las soluciones de TRP3 aumentaron su absorbancia a las 19 y 24 horas (posiblemente debido a la evaporación del agua).

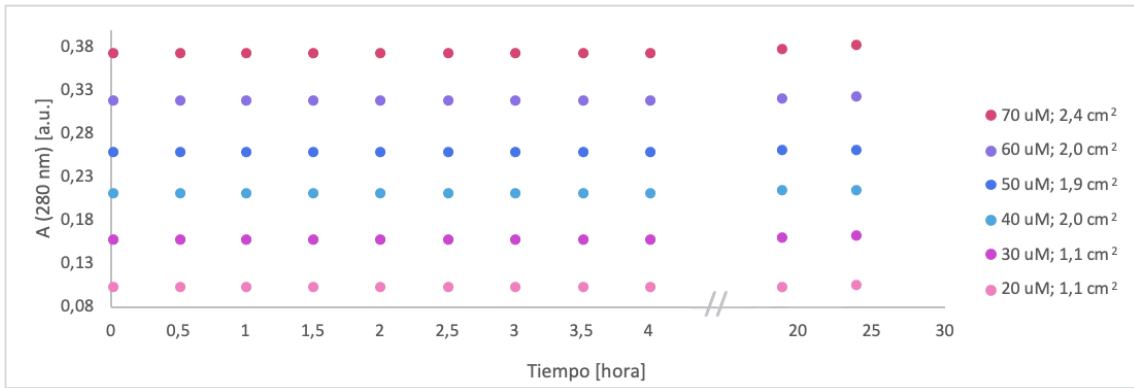


Figura 51. Absorbancia a los 280 nm en función del tiempo para las soluciones de TRP3 durante la interacción con grafeno a temperatura ambiente. Las concentraciones iniciales y áreas de grafeno se encuentran en la leyenda.

Para estudiar el porcentaje de cambio de la absorbancia $\% \Delta A$ en función de la concentración inicial (Figura 52a), escogimos los datos correspondientes a la hora 1,5 de interacción porque en ese momento observamos adsorción para la mayoría de las concentraciones iniciales. Los valores positivos de $\% \Delta A$ son indicio de que sí hubo adsorción de TRP3. Como dijimos anteriormente, la $C_{inicial}$ de $40 \mu M$ se mantuvo constante durante las primeras horas de interacción por lo que el cambio porcentual de la absorbancia fue nulo ($\% \Delta A = 0$). La concentración inicial de $30 \mu M$ mostró un aumento de la absorbancia. Si bien a partir de las mediciones pudimos observar que hubo adsorción de TRP 3 en grafeno para las $C_{inicial}$ de 20, 50, 60 y $70 \mu M$, no encontramos una tendencia en particular para el porcentaje de cambio de la absorbancia en función de la $C_{inicial}$. En la hora 1,5 de interacción, la $C_{inicial}$ de $20 \mu M$ fue la que mostró un mayor $\% \Delta A$ igual a 0,98%.

Otro aspecto del proceso de adsorción que estudiamos fue el porcentaje de cambio de la absorbancia $\% \Delta A$ en función del área del grafeno, a la hora y media de interacción (Figura 52b). A partir de las mediciones no observamos una tendencia de $\% \Delta A$ que dependiera del área del nanomaterial.

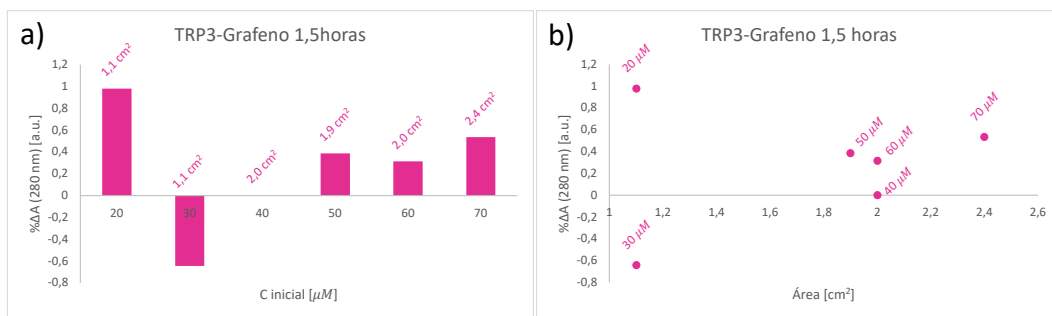


Figura 52. $\% \Delta$ Absorbancia a los 280 nm para la interacción de TRP3 con grafeno a temperatura ambiente a las 1,5 horas de interacción en función de a) la concentración inicial y del b) área del nanomaterial. En a) y b) los valores de encima de los datos corresponden al área de grafeno y a la $C_{inicial}$ respectivamente.

Isoterma de adsorción $q(C)$

En cuanto al análisis de la cantidad de TRP3 adsorbido en función de la $C_{inicial}$, construimos isotermas de adsorción a partir de la Ecuación 19 usando los valores de $C_{inicial}$ calculada con la curva de calibración, a la hora y media de interacción (Figura 53). Las líneas punteadas no corresponden a ajustes de curvas, solo siguen la dispersión de los datos para facilitar la visualización de su comportamiento. En las isotermas de adsorción no consideramos los datos correspondientes a la $C_{inicial}$ de $30\mu M$ debido a que la absorbancia aumentó y no sabemos si hubo adsorción.

La isoterma de adsorción no se asemeja a los modelos de Langmuir ni de BET, pero muestra un comportamiento similar a las isotermas de las Figuras 42 y 50. En la hora 1,5 de interacción, la cantidad de TRP3 adsorbido en la superficie del grafeno por unidad de superficie, q , es nula para la concentración inicial de $40\mu M$. Entre la $C_{inicial}$ de $20\mu M$ y de $60\mu M$, la cantidad de TRP3 adsorbido por unidad de superficie disminuyó con el aumento de la $C_{inicial}$ y luego aumentó para la $C_{inicial}$ de $70\mu M$.

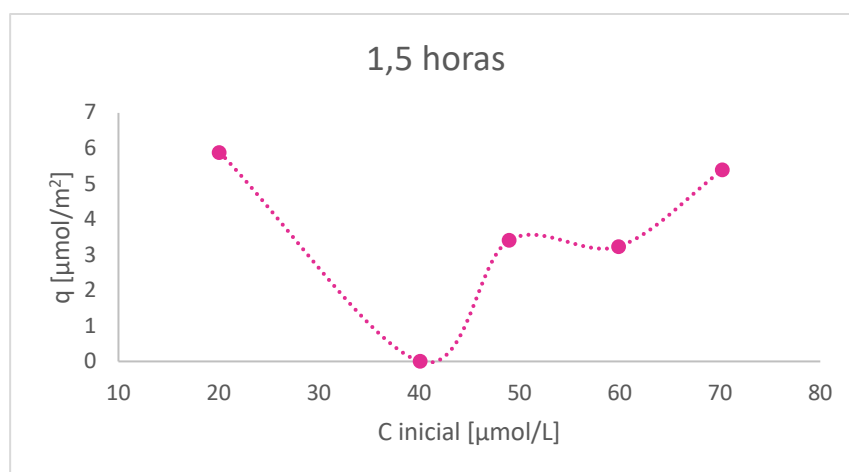


Figura 53. Isoterma de adsorción $q(C_{inicial})$ entre TRP3 y grafeno a temperatura ambiente después de 1 hora y media de interacción. Las líneas punteadas no corresponden a ajustes de curva, son líneas de dispersión.

3.3.3.4. Mediciones AFM

Para los experimentos de cinética de adsorción de 24 horas con TRP3, medimos las muestras de grafeno y de óxido de grafeno mediante AFM antes y después de la interacción con triptófano.

Las Figuras 54 a,b,c corresponden a imágenes topográficas de óxido de grafeno sobre óxido de silicio en distintas zonas de la misma muestra. Después de interactuar por 24 horas con una solución de TRP3 de $70 \mu M$, al medir esta muestra mediante AFM obtuvimos las imágenes de las Figuras 54 d,e,f. Al comparar las imágenes previas y posteriores a la interacción con TRP3 notamos algunas diferencias en la topografía de la muestra, sin embargo, esto puede deberse a que las imágenes post-adsorción corresponden a distintas zonas de la muestra que las imágenes pre-adsorción. No obstante, en la Figura 54f observamos una rugosidad de la muestra, que podría deberse a la adsorción de TRP3, aunque no es posible saberlo con certeza sólo a partir de la imagen AFM.

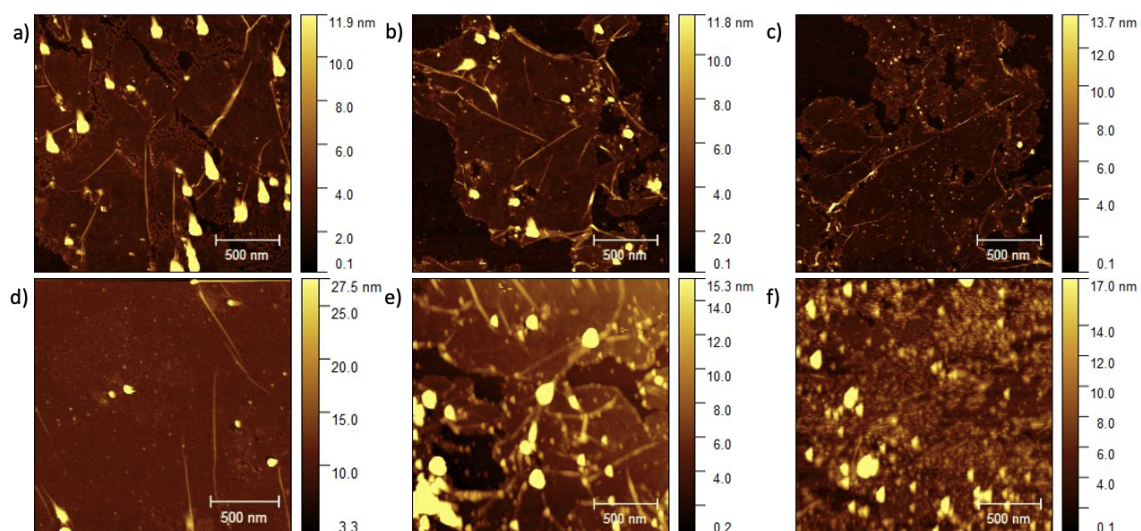


Figura 54. Imágenes AFM de óxido de grafeno sobre óxido silicio antes (a,b y c) y después (d,e y f) de interactuar por 24 horas con una solución de TRP3 de $70 \mu M$. Cada imagen tiene dimensiones de $2 \times 2 \mu m$.

Las Figuras 55 a,b,c corresponden a imágenes topográficas de grafeno sobre óxido de silicio en distintas zonas de la misma muestra. Después de interactuar por 24 horas con una solución de TRP3 de $50 \mu M$, al medir esta muestra mediante AFM obtuvimos las imágenes de las Figuras 55 d,e,f. Igual que con el óxido de grafeno, las principales diferencias que observamos entre las imágenes antes y después de la interacción se deben a que fue imposible medir la muestra exactamente en la misma zona a una escala tan pequeña. Sin embargo, en las imágenes post adsorción (Figuras 55 d,e,f) observamos una mayor rugosidad de la muestra.

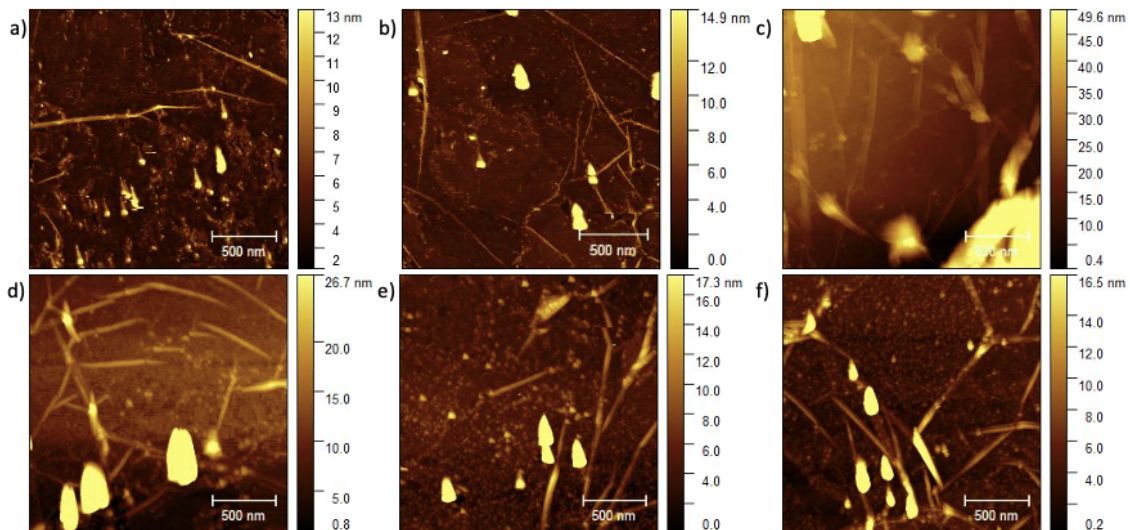


Figura 55. Imágenes AFM de grafeno sobre óxido de silicio antes (a,b y c) y después (d,e y f) de interactuar por 24 horas con una solución de TRP3 de $50 \mu M$. Cada imagen tiene dimensiones de $2 \times 2 \mu m$.

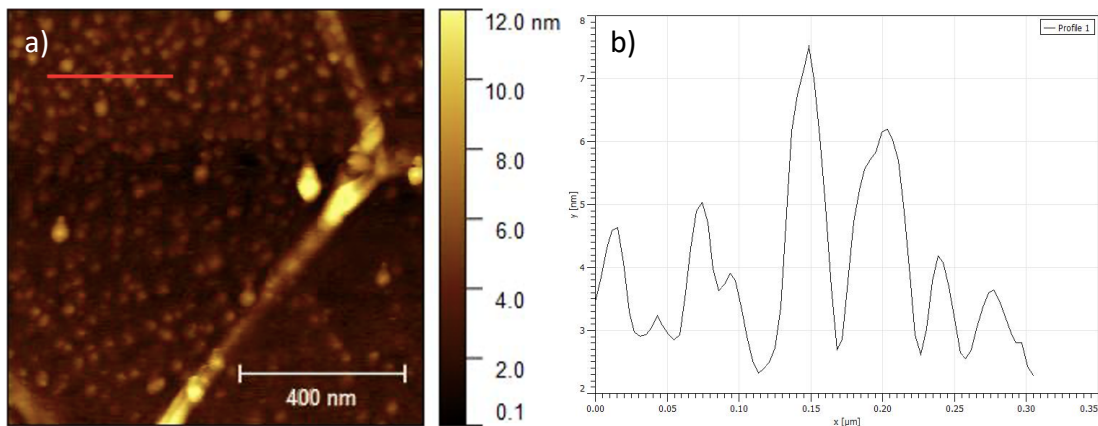


Figura 56. a) Imagen magnificada de la Figura 55f, b) perfil de altura de la línea roja en la imagen AFM de esta Figura.

Para estudiar con mayor detalle la rugosidad recién mencionada, medimos la muestra de grafeno post adsorción en la misma zona de la Figura 55f, pero con una mayor magnificación, obteniendo la imagen AFM de la Figura 56a. Luego, medimos su perfil de altura donde está marcado con una línea roja en la imagen de la Figura 56a, obteniendo el gráfico de la Figura 56b. Según lo observado en el perfil de altura, creemos que se trata de aglomeraciones de triptófano.

3.3.3.5. Resumen isotermas de adsorción

A partir de los resultados de esta investigación, en la Figura 57 mostramos una recopilación de todas las isotermas de adsorción de triptófano obtenidas en este trabajo, excepto la de la Figura 37a, que toma valores de q mucho más grandes que los de las demás isotermas y presenta un carácter cuadrático. A partir de la forma de las isotermas de adsorción descartamos la isoterma de Langmuir como posible modelo de nuestros datos. Esto concuerda con las mediciones de AFM que sugieren que la adsorción de triptófano en grafeno y en óxido de grafeno ocurre en aglomeraciones de moléculas y no en una adsorción de monocapa de adsorbato. Independiente del tipo de triptófano y del nanomaterial, las isotermas de la Figura 57 son similares entre sí y si

bien no realizamos ajustes de curva, creemos que el modelo BET podría servir como un modelo base de nuestros datos.

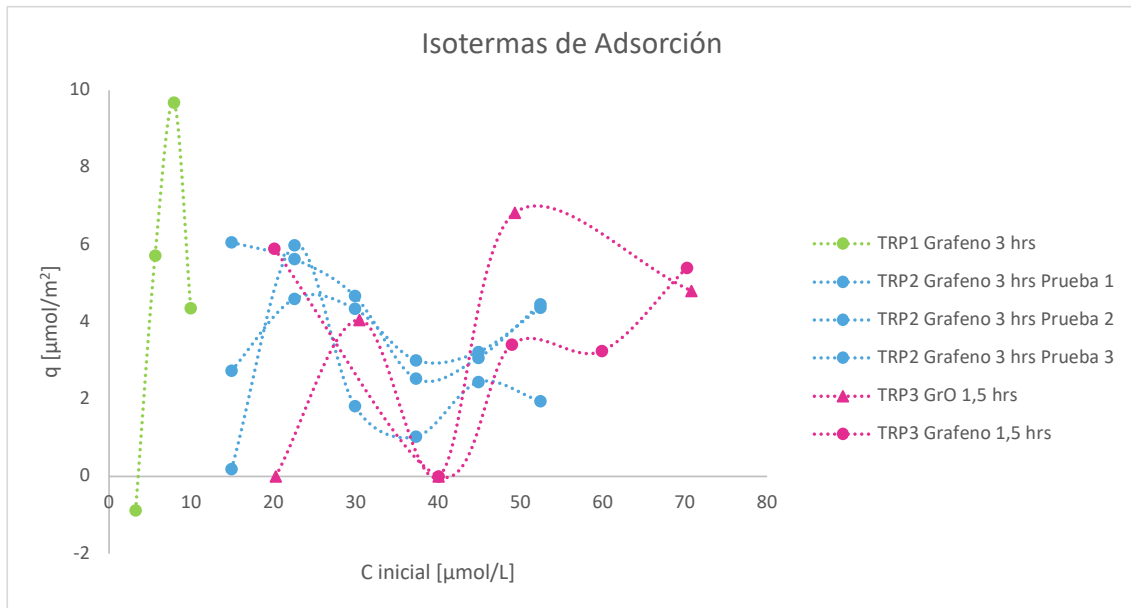


Figura 57. Isotermas de adsorción para los distintos experimentos llevados a cabo en esta investigación. En la leyenda indicamos el tipo de triptófano, el nanomaterial utilizado y el tiempo en el cual medimos la cantidad de trp adsorbido. Las líneas punteadas indican la tendencia de cada experimento, no son ajuste de modelo.

4. Pasantía CEA INES

Con el propósito de profundizar en la caracterización de nuestras muestras de grafeno, durante el proyecto de investigación fuimos al Instituto Nacional de Energía Solar en Francia (INES: *Institut National de l'Énergie Solaire*), en el contexto de una pasantía, y analizamos nuestras muestras mediante las técnicas de elipsometría espectroscópica (SE: *Spectroscopic Ellipsometry*), microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido (SEM: *scanning electron microscopy*) y espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDX: *Energy Dispersive X-Ray spectroscopic*), bajo la tutela de Delfina Muñoz y Perrine Carroy.

El primer objetivo de este trabajo fue calcular el grosor de las películas de grafeno transferidas en dos tipos de sustrato: obleas de dióxido de silicio y vidrio; y calcular los índices de refracción n y k , a partir de mediciones de elipsometría espectroscópica. En general estos índices se conocen como índice de refracción n y coeficiente de extinción k , y corresponden a la parte real e imaginaria respectivamente del índice de refracción complejo $n + ik$. Antes de discutir nuestros resultados, mencionaremos algunos estudios experimentales que se han hecho al respecto.

4.1. Estado del Arte

En el trabajo de Li *et al.*[44] transfirieron películas de grafeno crecidas mediante la técnica de CVD sobre sustratos de cuarzo de 11 mm de grosor y realizaron mediciones de elipsometría espectroscópica en un rango de energía de 0,7 eV a 9,0 eV (~130 nm a 1800 nm). Las muestras de este trabajo consistían en monocapas, bicapas y tricapas de grafeno (las dos últimas fueron preparadas repitiendo el proceso de transferencia). A partir de las mediciones de SE, y fijando los grosores de monocapa, bicapa y tricapa de grafeno a sus valores conocidos: 0,335 nm; 0,67 nm y 1,005 nm, respectivamente, obtuvieron los valores de n y k reportados en la Figura 58, y los compararon con los índices del grafito. A partir de los resultados observaron que, para los 4 materiales (monocapa, bicapa, tricapa de grafeno y grafito) para energías sobre 1 eV, a medida que la energía del fotón aumenta, el coeficiente k primero decrece y luego aumenta hasta llegar a un *peak* alrededor de los 4,8 eV (~258 nm), mientras que n decrece alrededor de esa energía. En los rangos de energía entre 1 eV y 4,8 eV; y entre 6 eV y 8 eV, observaron que el índice de refracción n decrece al aumentar el número de capas de grafeno. Por otro lado, en el rango de energía entre 1 eV y 4,8 eV observaron que el índice k es mayor mientras más capas de grafeno tenga la muestra.

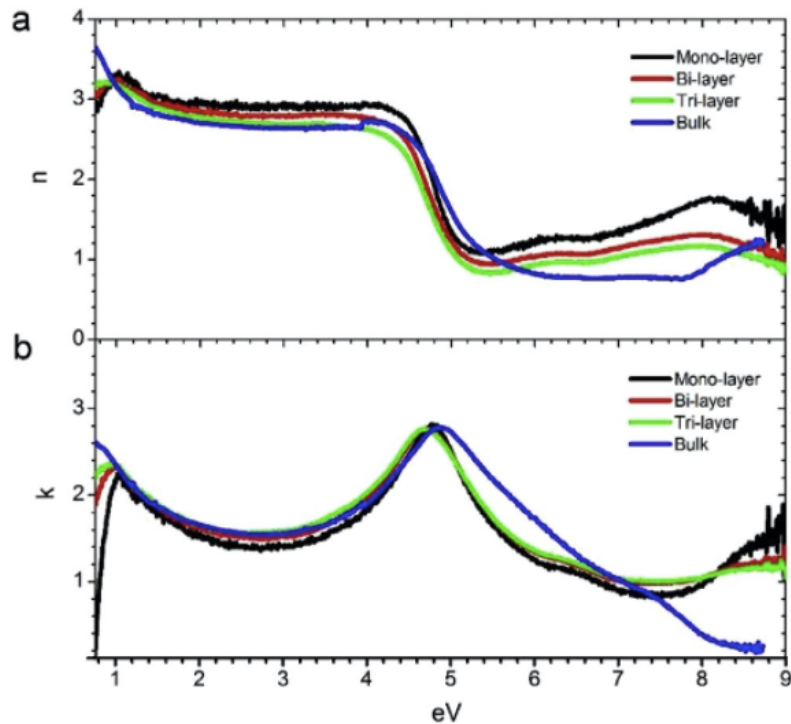


Figura 58. Resultados de Li *et al.* para a) el Índice de refracción n y b) el coeficiente de extinción k para monocapa (negro), bicapa (rojo) y tricapa (verde) de grafeno crecido mediante CVD. Las curvas azules corresponden a grafito usado como referencia.

En el trabajo de Weber *et al.* [45] prepararon una monocapa de grafeno mediante la técnica de exfoliación mecánica y la depositaron sobre un sustrato de dióxido de silicio de 98 nm de grosor sobre silicio cristalino. Esta muestra fue analizada mediante SE en un rango de longitud de onda entre 210 nm y 1000 nm. A partir de las mediciones de SE calcularon un grosor de $0,34 \pm 0,004$ nm para el grafeno. Los resultados para las constantes ópticas n y k del grafeno obtenidas en este trabajo se encuentran en la Figura 59. Para el caso del coeficiente k , observaron un *peak* a los 270 nm (4,6 eV), mientras que el índice n presentó un *peak* cerca de los 300 nm (4,1 eV). Ambos índices aumentaron con la longitud de onda al acercarse al espectro infrarrojo.

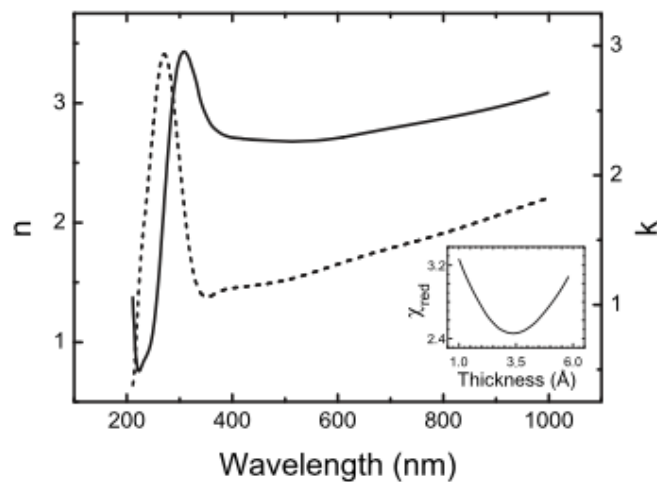


Figura 59. Resultados de Weber *et al.* para el Índice de refracción n (línea sólida) y coeficiente de extinción k (línea punteada) para una monocapa de grafeno obtenida mediante exfoliación mecánica. Recuadro: estimador de la calidad de ajuste χ_{red} en función del parámetro de ajuste del grosor de grafeno.

En el trabajo de Kravets *et al.* [46] depositaron grafeno sobre dos tipos de sustrato: óxido de silicio (300 nm) sobre silicio y cuarzo amorfo. La técnica de preparación de grafeno no fue descrita por los autores. A partir de las mediciones de SE, y fijando el grosor del grafeno a 0,335 nm, obtuvieron los coeficientes n y k del grafeno reportados en las Figuras 60a y 60b para los sustratos de silicio y cuarzo respectivamente. En la Figura 60a excluyeron los datos cerca de las longitudes de onda de 380 nm y 800 nm debido a que los datos no eran confiables, y la irregularidad alrededor de los 540 nm (2,3 eV) puede atribuirse a una contaminación del grafeno. El coeficiente k del grafeno sobre cuarzo (Figura 60b) mostró un *peak* a los 256 nm (4,8 eV), mientras que el índice n mostró una caída abrupta para longitudes de onda menores del espectro UV.

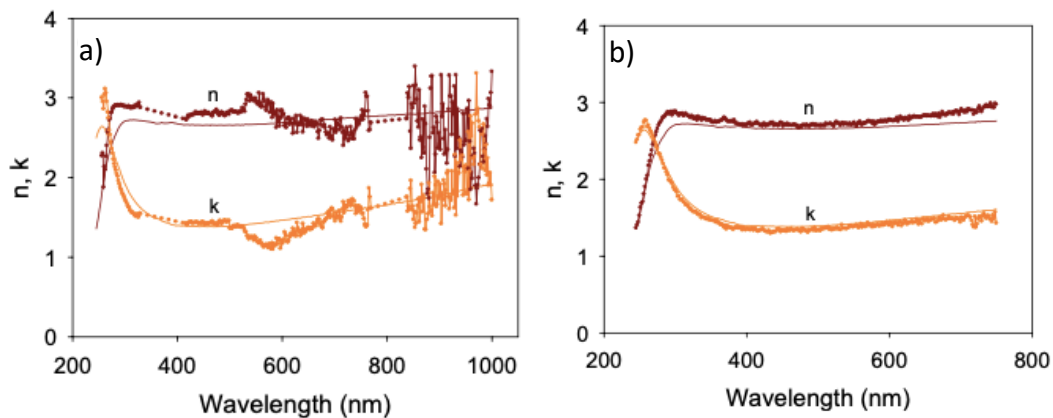


Figura 60. Resultados de Kravets *et al.* para el Índice de refracción n (rojo oscuro) y coeficiente de extinción k (naranja) de grafeno sobre a) sustratos de silicio y b) sustratos de cuarzo amorfo.

En el trabajo de Isic' *et al.* [47] prepararon muestras de grafeno mediante exfoliación micromecánica y las depositaron sobre sustratos de dióxido de silicio de 300 nm sobre silicio dopado tipo n. Mediante mediciones de AFM encontraron que el grosor del grafeno era de 2,3 nm, y a partir de mediciones de espectroscopía Raman determinaron que el grafeno era de buena calidad y tenía más de una capa. A partir de mediciones de SE en un rango de longitud de onda de 250 nm a 650 nm y considerando un grosor del grafeno de 2 nm, obtuvieron los espectros de n y k para el grafeno reportados en la Figura 61. Encontraron que el índice de refracción n era menor que en los estudios de Weber *et al.* y Kravets *et al.* y no observaron la fuerte disminución de n al acercarse a longitudes de onda menores a 300 nm que se observa en dichos estudios. Además, el carácter decreciente de n al aumentar la longitud de onda no está claro y podría deberse a errores de medición. En el caso del coeficiente de extinción k , a longitudes de onda mayores a 450 nm se observa una pendiente negativa del coeficiente k , en desacuerdo con las referencias de estudios previos. Sin embargo, al acercarse al espectro UV se observa una tendencia de aumento de k de acuerdo con los trabajos anteriores.

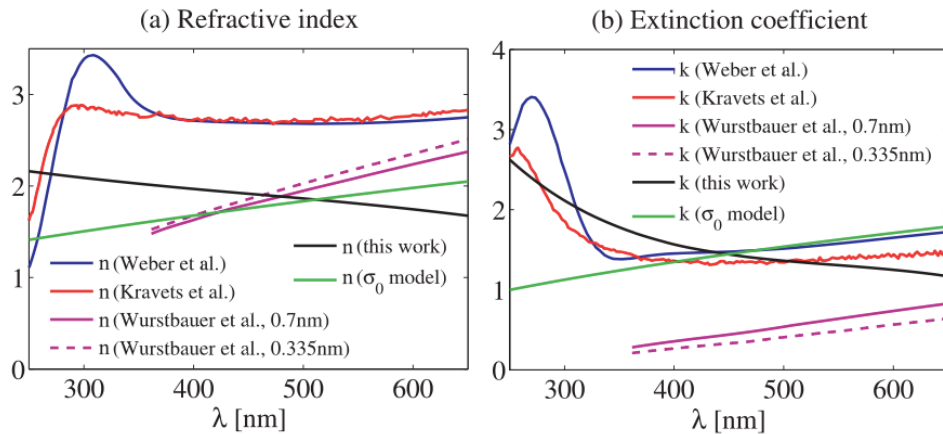


Figura 61. Resultados de Isic' *et al.* (negro) para: a) el índice de refracción y b) el coeficiente de extinción k de grafeno sobre sustratos de silicio. Las curvas en rojo, azul, magenta y verde corresponden a referencias de otros estudios.

En el trabajo de Nelson *et al.* [48] crecieron muestras de grafeno mediante la técnica de CVD y las transfirieron a sustratos de vidrio. Mediante mediciones de espectroscopía Raman determinaron que el grafeno que transfirieron consistía en una monocapa. Por ello usaron un grosor de grafeno de 0,335 nm para ajustar las mediciones de SE que fueron llevadas a cabo en un espectro de longitud de onda entre 150 nm y 1700 nm. Los resultados de los índices de refracción obtenidos en este trabajo se encuentran en la Figura 62. Los valores de n y k del grafeno que obtuvieron en este estudio son relativamente cercanos a los valores generalmente aceptados para el grafito: $n \sim 2,6$ y $k \sim 1,3$ (valores constantes en un rango de longitud de onda entre 300 nm y 590 nm) [49,50]. Además, observaron un *peak* en el espectro del coeficiente de extinción k a los ~ 275 nm ($\sim 4,5$ eV) y un aumento tanto para n como para k con el aumento de la longitud de onda en la región infrarroja.

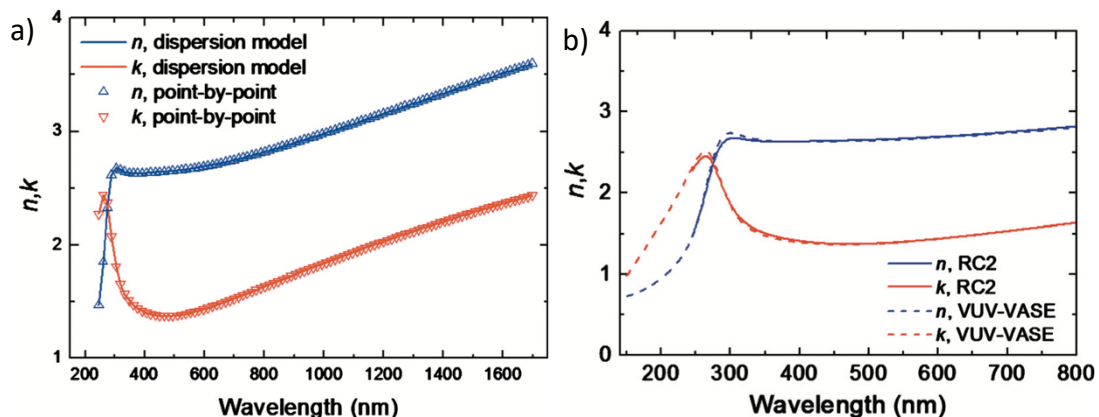


Figura 62. Resultados de Nelson *et al.* para el índice de refracción n (azul) y el coeficiente de extinción k (rojo) de grafeno sobre vidrio a) para un rango de longitudes de onda entre 200 nm y 1700 nm usando dos modelos distintos y b) entre 150 nm y 800 nm para los dos elipsómetros utilizados en el experimento (RC2 y VUV-VASE).

Finalmente, en el trabajo de Schöhe *et al.* [51] estudiaron las propiedades ópticas de muestras de óxido de grafeno (GO) y óxido de grafeno reducido (r-GO) mediante SE en un rango de longitud de onda de 193 nm a 1690 nm. El GO fue preparado mediante el método de Hummers y depositado en sustratos de SiO_2 sobre silicio. Al modelar sus resultados, encontraron que el grosor del GO era de 1926,3 nm (muchas capas), mientras que, luego del proceso de reducción, encontraron que la muestra estaba compuesta por GO de 1828,1 nm de grosor con una capa de r-GO de 36,4 nm.

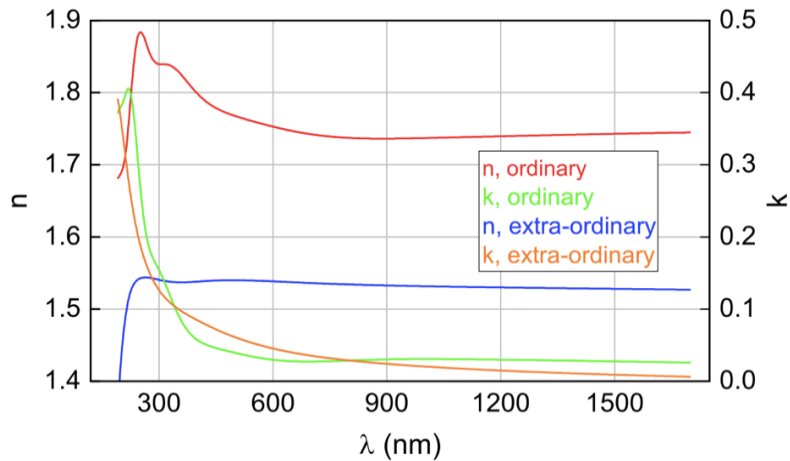


Figura 63. Resultados de Schöche *et al.* para el índice de refracción n del óxido grafeno sobre silicio. Los índices n y k ordinarios (rojo y verde) y extraordinarios (azul y naranja) están asociados a las componentes del tensor de función dieléctrica perpendicular y paralela a la normal de la superficie de la muestra respectivamente.

Los resultados de las constantes ópticas del óxido de grafeno se encuentran en la Figura 63, y están separados en índices ordinarios y extraordinarios. Para materiales ópticamente isotrópicos, el índice de refracción complejo se relaciona con la función dieléctrica ε mediante la Ecuación (20). Para materiales ópticamente anisotrópicos, como es el caso del GO de este trabajo, la función dieléctrica ε corresponde a un tensor de dos componentes independientes: ε_{\perp} y ε_{\parallel} , que son perpendicular y paralela a la normal de la superficie de la muestra, respectivamente. Los índices ordinarios y extraordinarios de la Figura 63 están asociados a ε_{\perp} y ε_{\parallel} , respectivamente, según la Ecuación (20). Los resultados de los índices n y k del óxido de grafeno se asemejan a la forma de los índices del grafeno de estudios previos, pero con magnitudes menores. El índice n ordinario tiene una forma similar al del trabajo de Weber *et al.*, mientras que el índice n extraordinario es similar al de los trabajos de Li *et al.*, Kravets *et al.* y Nelson *et al.*

$$\varepsilon = (n + ik)^2 \quad (20)$$

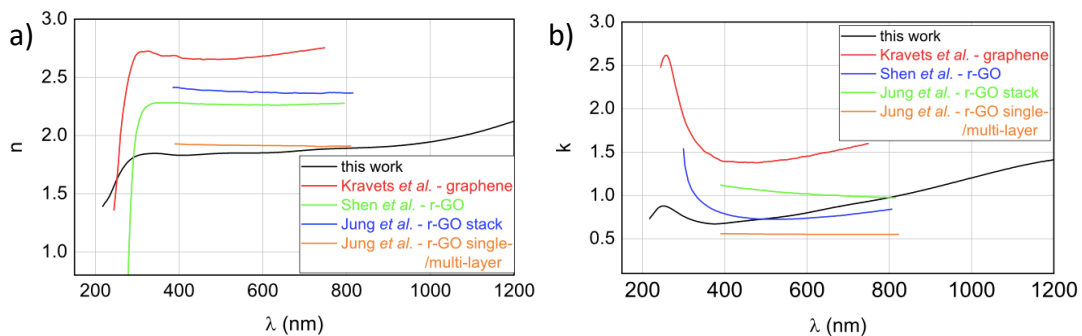


Figura 64. Resultados de Schöche *et al.* (curvas negras) para: a) el índice de refracción n y b) el coeficiente de extinción k del óxido de grafeno reducido r-GO.

En la Figura 64 observamos los resultados de los índices n y k del óxido de grafeno reducido. Al igual que con el GO, la forma de las curvas de n y k del r-GO (curvas negras) se asemejan a las del grafeno (curvas rojas) del trabajo de Kravets *et al.*, sin embargo, ambos índices n y k presentan valores menores para el r-GO, lo cual puede deberse a la incompleta reducción del GO.

En las Tablas 4 y 5, mostramos un resumen de los nanomateriales y sustratos utilizados en cada trabajo, los grosores calculados (o asumidos), y valores de los índices n y k para longitudes de onda específicas. En particular, reportamos los valores máximos del índice de refracción ($n_{m\acute{a}x}$) y el coeficiente de extinción ($k_{m\acute{a}x}$) en el espectro UV, y también los valores de n y k a los 620 nm. Cabe mencionar los valores máximos de los índices fueron considerados solo para el espectro UV porque aquí es donde en general pueden ser observados los *peaks* del coeficiente k o las caídas abruptas de n .

Además, en la Figura 65 mostramos un resumen de los resultados para los índices del grafeno en función del espesor del material de los estudios recién mencionados. Para el grosor correspondiente a una monocapa de grafeno ($\sim 0,3$ nm), el índice de refracción n se encuentra en un rango entre 2,7 a 2,9. Si bien para espesores de grafeno mayores a 0,6 nm observamos una disminución del índice n al aumentar el espesor, al considerar los datos para el espesor de la monocapa no podemos afirmar que exista una correlación entre el índice n y el espesor del grafeno. Por otro lado, los valores del coeficiente k varían en un rango entre 1,3 a 1,7, para el espesor correspondiente a una monocapa de grafeno ($\sim 0,3$ nm). A partir de los datos de la Figura 65, tampoco encontramos una correlación entre el coeficiente k y el espesor del grafeno según los valores reportados en la literatura para el grafeno.

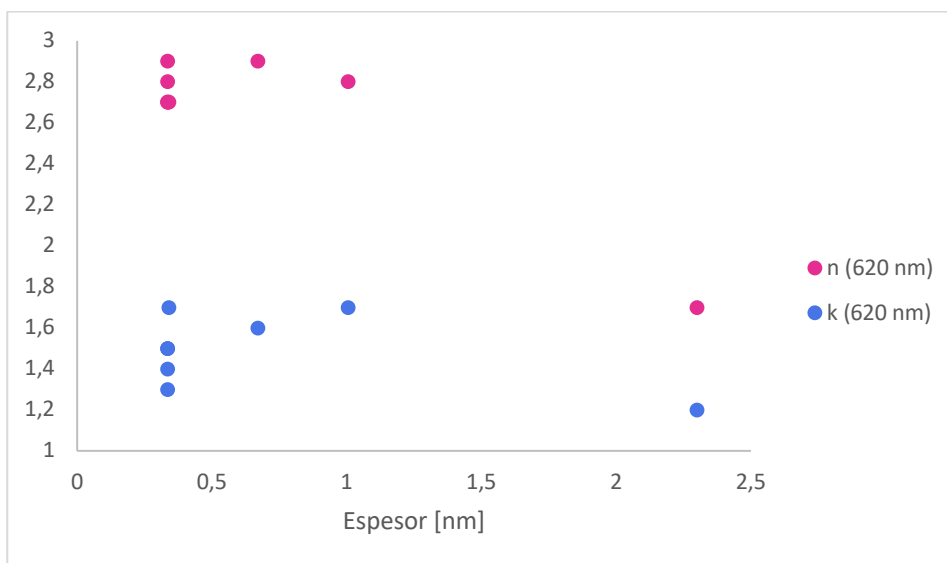


Figura 65. Índice de refracción n (rosado) y coeficiente de extinción k (azul) a los 620 nm en función del espesor del grafeno calculados en los estudios de Li *et al.*, Weber *et al.*, Kravets *et al.*, Isic' *et al.* y Nelson *et al.*

Tabla 4. Resumen de los nanomateriales, sus grosores, métodos de preparación y sustratos utilizados en los estudios previos de elipsometría espectroscópica.

Autores	Nanomaterial/Método de preparación	Sustrato utilizado	Grosor nanomaterial [nm]	Número de capas
Li <i>et al.</i>	Grafeno/CVD	Cuarzo (11 mm)	0,335	1
			0,67	2
			1,005	3
Weber <i>et al.</i>	Grafeno/Exfoliación mecánica	$SiO_2(98 \text{ nm})/Si(100)$	$0,34 \pm 0,004$	1
Kravets <i>et al.</i>	Grafeno/-	$SiO_2(300 \text{ nm})/Si(100)$	0,335	1
		Cuarzo amorfo		
Isic' <i>et al.</i>	Grafeno/Exfoliación mecánica	$SiO_2(300 \text{ nm})/Si(100)$ dopado tipo n	2,3	>1
Nelson <i>et al.</i>	Grafeno/CVD	Vidrio	0,335	1
Schöche <i>et al.</i>	GO/método de Hummer	$SiO_2/Si(100)$	1926,3	-
	r-GO/-		36,4	-

Tabla 5. Resumen de los índices de refracción n y coeficientes de extinción k de los estudios previos de elipsometría espectroscópica. Reportamos los valores máximos de los índices con su longitud de onda respectiva y los valores de los índices a los 620 nm. Para determinar estos datos, analizamos los gráficos en el software WebPlotDigitizer. [52]

Autores		$n_{m\acute{a}x}(\lambda)$	$k_{m\acute{a}x}(\lambda)$	$n_{620 \text{ nm}}$	$k_{620 \text{ nm}}$
Li <i>et al.</i>	Monocapa	2,9 (298 nm)	2,8 (258 nm)	2,9	1,5
	Bicapa	2,8 (316 nm)	2,7 (263 nm)	2,9	1,6
	Tricapa	2,6 (312 nm)	2,8 (265 nm)	2,8	1,7
	Grafito	2,7 (296 nm)	2,8 (255 nm)	2,7	1,7
Weber <i>et al.</i>		3,4 (306 nm)	2,9 (269 nm)	2,7	1,3
Kravets <i>et al.</i>	Silicio	2,9 (281 nm)	3,1 (264 nm)	2,7	1,3
	Cuarzo	2,9 (287 nm)	2,7 (256 nm)	2,8	1,4
Isic' <i>et al.</i>		2,2 (250 nm)	2,6 (250 nm)	1,7	1,2
Nelson <i>et al.</i>		2,7 (300 nm)	2,4 (266 nm)	2,7	1,5
Schöche <i>et al.</i>	GO (ordinario)	1,9 (244 nm)	0,4 (227 nm)	1,8	0,03
	GO (extraordinario)	1,5 (252 nm)	0,4 (198 nm)	1,5	0,04
	r-GO	1,8 (316 nm)	0,9 (249 nm)	1,9	0,8

4.2. Metodología

4.2.1. Muestras

Las muestras que analizamos en esta pasantía consistían en 10 muestras de grafeno sobre sustratos de silicio y 4 muestras de grafeno sobre vidrio (Figura 66). Los sustratos de silicio se componen de una base de silicio cristalino dopado tipo p de $500\ \mu\text{m}$ de grosor con una capa de dióxido de silicio encima de $285\ \text{nm}$ de grosor, mientras que los sustratos de vidrio tienen un grosor de $1\ \text{mm}$.

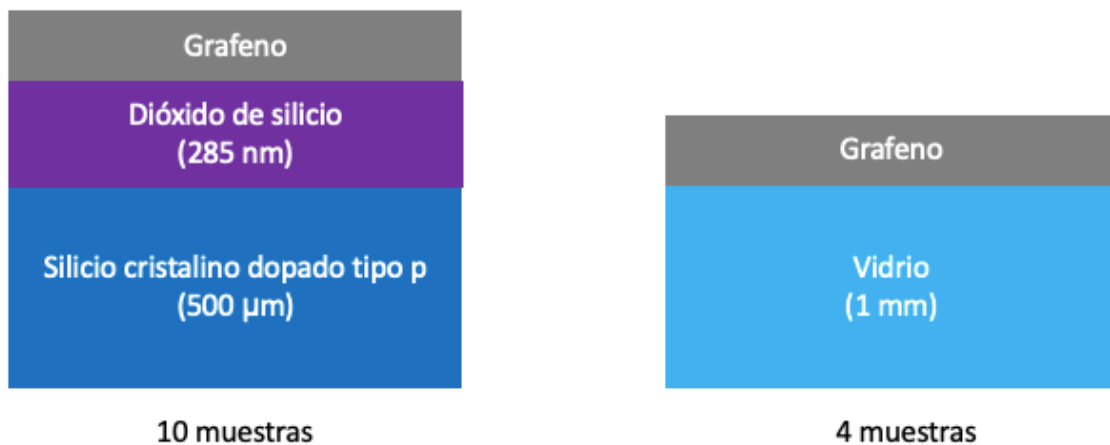


Figura 66. Muestras que analizamos en la pasantía: grafeno sobre sustratos de dióxido de silicio (izquierda) y grafeno sobre vidrio (derecha).

4.2.2. Elipsometría Espectroscópica

La elipsometría espectroscópica es una técnica no destructiva que sirve para caracterizar las propiedades ópticas de los materiales. Esta técnica mide el cambio en la polarización de la luz después de ser reflejada por una muestra (Figura 67), en específico, mide el cambio de amplitud (Ψ) y la diferencia de fase (Δ) entre la luz incidente y reflejada en un espectro de longitud de onda. Los parámetros Ψ y Δ están relacionados según la Ecuación (21), donde r_p y r_s son los coeficientes de reflexión de Fresnel de la luz de las polarizaciones p y s de la luz reflejada, respectivamente [53]. Los resultados de las mediciones de SE dependen de las propiedades ópticas del material y de su espesor, por lo que la SE permite determinar indirectamente las constantes ópticas (como el índice de refracción n y el coeficiente de extinción k), y el grosor del material. Incluso en muestras con multicapas, permite calcular el grosor de las películas que componen la muestra.

$$r_p/r_s = \tan\Psi \exp i \Delta. \quad (21)$$

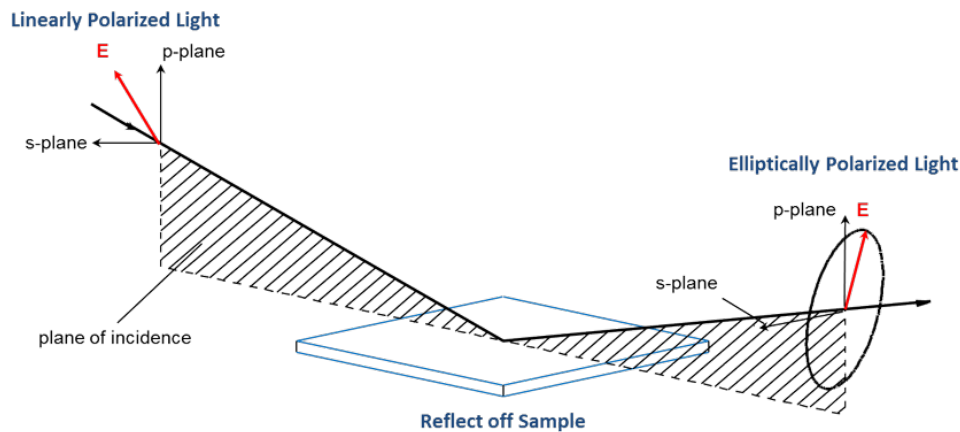


Figura 67. Esquema de medición mediante elipsometría espectroscópica [54].

En este trabajo, para realizar nuestras mediciones de SE utilizamos un elipsómetro HYJ UVISEL, ubicado en INES (Chambéry, Francia), equipado con una lámpara de Xenon y un *spot* (tamaño del haz incidente) de 1 mm para medir los parámetros Ψ y Δ de nuestras muestras. Para cada muestra realizamos 3 mediciones en distintos lugares donde hubiera grafeno y una medición del sustrato solo (sin grafeno encima) en un rango de energía de fotón entre 1,5 eV y 4,7 eV (~ 260 nm a ~ 830 nm), a intervalos de 0,1 eV, con un ángulo de incidencia de 70° . Luego modelamos los datos medidos mediante el *software* DeltaPsi y mediante simulaciones obtuvimos los valores para el grosor de las películas de grafeno y los índices de refracción n y k .

En el caso de las muestras con sustratos de silicio, empleamos un modelo de 3 capas con el *software* DeltaPsi: Si/SiO₂/grafeno, usando los parámetros de los materiales que se encontraban en la librería del *software*. Sin embargo, primero modelamos el sustrato sin grafeno a partir de la medición hecha en el elipsómetro con un modelo de 2 capas. A pesar de que teníamos una idea de antemano del grosor de la película de dióxido de silicio (285 nm según el fabricante), ésta fue determinada por las mediciones de SE hechas en el sustrato solo (sin grafeno) para cada muestra. Para ello, en el *software* DeltaPsi realizamos simulaciones del grosor de la película de SiO₂ en un rango entre 250 nm y 300 nm, a intervalos de 1 nm y escogimos la que mejor se ajustó a los datos medidos. Luego, para realizar las simulaciones de las muestras con grafeno, fijamos el valor que mejor se ajustó al grosor de la capa de dióxido de silicio y buscamos el mejor ajuste para el grosor del grafeno en un rango entre 1 nm y 10 nm, a intervalos de 1 nm. En el caso de las muestras con sustratos de vidrio simplemente fijamos el grosor del sustrato a 1 mm y empleamos un modelo de 3 capas: Vacío/vidrio/grafeno para realizar simulaciones del grosor del grafeno en un rango entre 1 nm y 10 nm, a intervalos de 1 nm para encontrar el mejor ajuste.

Finalmente para complementar los resultados obtenidos mediante SE, obtuvimos imágenes de algunas muestras mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (SEM).

4.3. Resultados

Lo primero que calculamos a partir de las mediciones de elipsometría espectroscópica fue el grosor de las películas de grafeno. En la Figura 68 observamos los resultados de las simulaciones. En cada muestra el dato en color rojo representa el promedio de los grosores medidos en las 3 mediciones que realizamos para cada muestra y la barra azul indica la desviación estándar de los datos. Observamos que en el caso del vidrio las barras de error son mucho más grandes que para el silicio, lo cual podría deberse a la rugosidad del sustrato. En el caso de las muestras con sustrato de dióxido de silicio, el promedio del grosor de las películas de grafeno de las 10 muestras fue de $6,9 \pm 2,7 \text{ nm}$. Mientras que para las 4 muestras sobre vidrio, el promedio del grosor del grafeno fue de $7,7 \pm 5,9 \text{ nm}$.

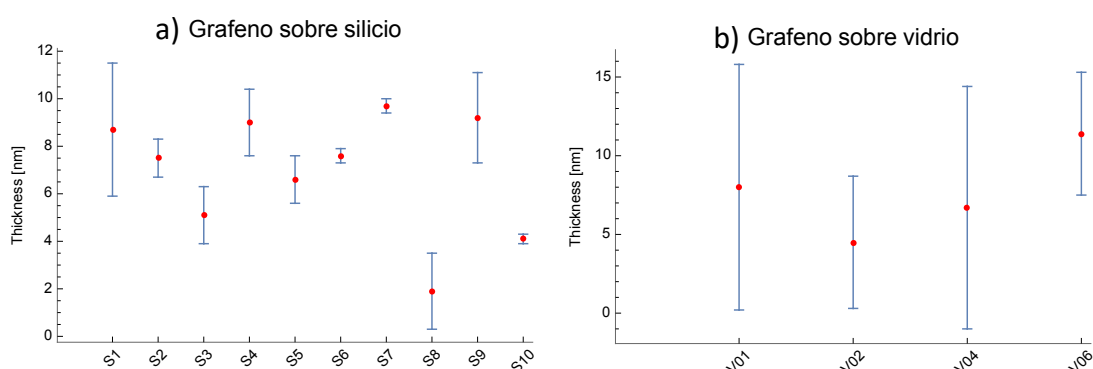


Figura 68. Grosor de las películas de grafeno calculadas mediante simulaciones de las mediciones de SE sobre a) sustratos de dióxido de silicio (10 muestras) y b) sobre vidrio (4 muestras).

Lo segundo que calculamos fueron los índices de refracción n y k del grafeno a partir de las mediciones de elipsometría espectroscópica. En las Figuras 69 y 70 mostramos los mejores resultados del índice n y del coeficiente k , respectivamente, para las muestras de grafeno sobre sustratos de silicio. En todas las mediciones observamos una caída abrupta de n en longitudes de onda entre 200 nm y 300 nm, y una tendencia de n de aumentar en las longitudes de onda del espectro infrarrojo, lo cual concuerda con los estudios de Li *et al.*, Kravets *et al.* y Nelson *et al.* Considerando que todos los gráficos tienen la misma escala, podemos observar que los valores del índice n para las muestras S4 y S7 (Figura 69a y c, respectivamente), se encuentran en un rango más acotado que en las muestras S5 y S10 (Figura 69b y d, respectivamente).

El coeficiente k por otro lado, presenta un *peak* en todas las mediciones de grafeno sobre silicio, en un rango aproximado de longitud de onda entre 280 y 300 nm. Además, observamos una tendencia de aumento de k en las longitudes de onda del espectro infrarrojo, lo cual concuerda con los estudios de Li *et al.*, Weber *et al.*, Kravets *et al.* y Nelson *et al.* Al comparar los espectros de k de la Figura 70, observamos que la muestra S10 (Figura 70d), que tiene los grosores más bajos de grafeno es la que mostró mayores valores del índice k , mientras que la muestra S4 (Figura 70a) es la que presentó los menores valores del índice k .

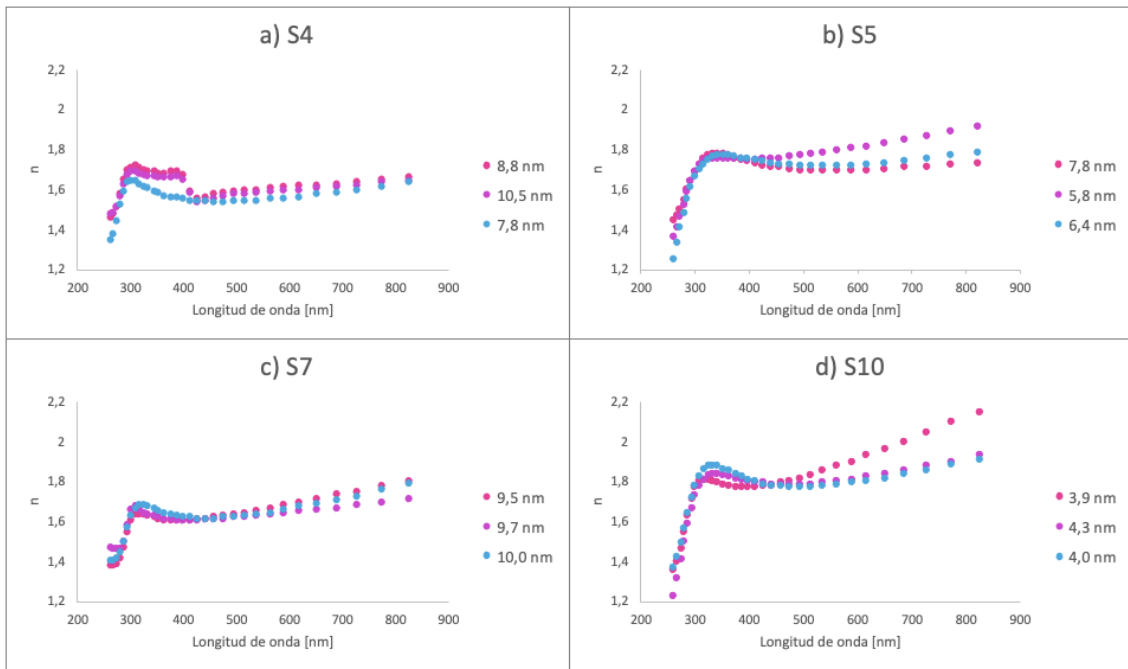


Figura 69. Resultados del índice de refracción n de las películas de grafeno sobre sustratos de silicio para distintas muestras. En cada una se reportan los índices calculados en cada una de las 3 mediciones por muestra. En la leyenda se encuentran los grosores del grafeno asociados a las mediciones.

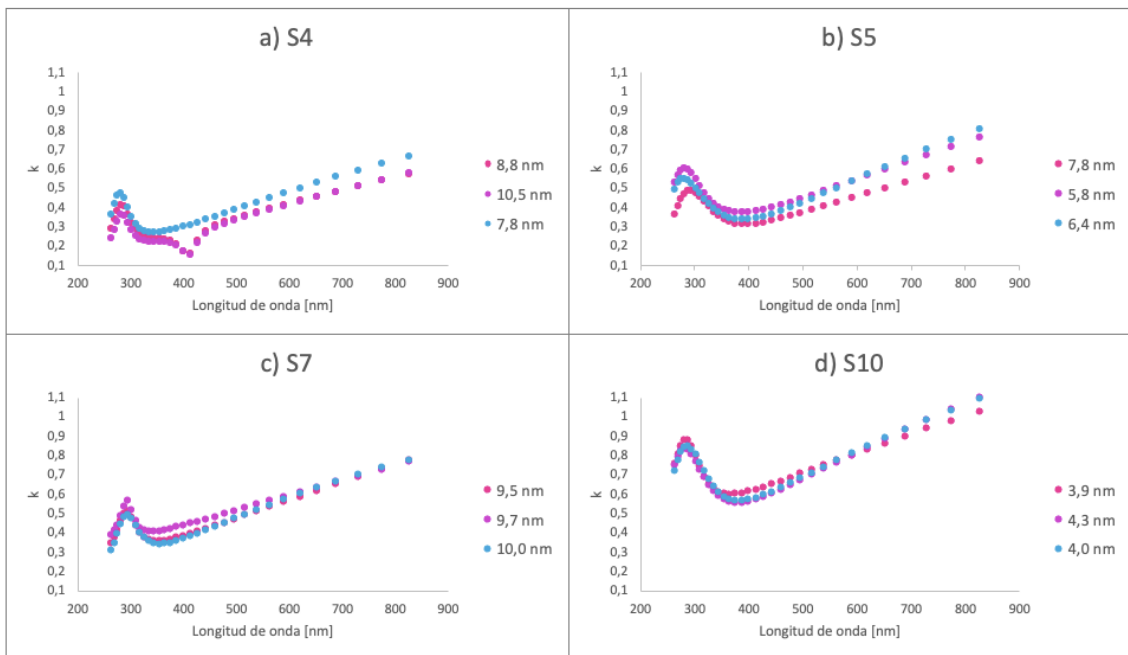


Figura 70. Resultados del índice k de las películas de grafeno sobre sustratos de silicio para las mismas muestras de la Figura 69. En cada una se reportan los índices calculados en cada una de las 3 mediciones por muestra. En la leyenda se encuentran los grosores del grafeno asociados a las mediciones.

Los índices n y k que calculamos para algunas de las muestras de grafeno sobre vidrio se encuentran en la Figura 71. Primero que todo, como mencionamos anteriormente, los valores de los grosores de grafeno variaron mucho para la misma muestra, lo cual puede deberse a la rugosidad del sustrato y por consiguiente a la rugosidad del grafeno. En la muestra V01 (Figuras 71 a y c) observamos que hay una diferencia notoria entre las 3 mediciones por muestra tanto para el índice n como para

el coeficiente k , a diferencia de los resultados de grafeno sobre SiO_2 , en donde las 3 mediciones eran más congruentes entre sí para cada muestra. En el caso de la muestra V06, entre las 3 mediciones por muestra, los índices de refracción n (Figura 71b) resultaron similares entre sí, al igual que los valores para los coeficientes de extinción k (Figura 71d) que si bien mostraron algunas diferencias, no distaban mucho entre sí como para la muestra V01. Es posible que la discrepancia entre las 3 mediciones por muestra, (tanto para n como para k) de la muestra V01 se deba a la rugosidad y heterogeneidad del grafeno, pues, como se observa en la Tabla 6 la desviación estándar entre los grosores calculados de grafeno de la muestra V01 fue el doble que para la muestra V06.

La forma del espectro del índice n de la muestra V01 (Figura 71a) se asemeja a los espectros de n que obtuvimos para las muestras de grafeno sobre SiO_2 (Figura 69), sin embargo el índice n de la muestra V06 (Figura 71b) presenta un *peak* cerca de los 300 nm, similar a lo observado por Weber *et al.* En ambas muestras: V01 y V06 observamos que k aumenta abruptamente hacia longitudes de onda pequeñas, pero no alcanzamos a observar el *peak* característico que reportamos en los resultados de la Figura 70 para el grafeno sobre dióxido de silicio y que es mencionado en la literatura. Esto puede deberse a que el *peak* se encuentra justo en el límite, fuera del rango de longitudes de onda que utilizamos en nuestras mediciones. En el estudio de Li *et al.*, el *peak* del coeficiente de extinción se encontraba cerca de los 258 nm mientras que la menor longitud de onda que utilizamos para medir nuestras muestras fue de 260 nm.

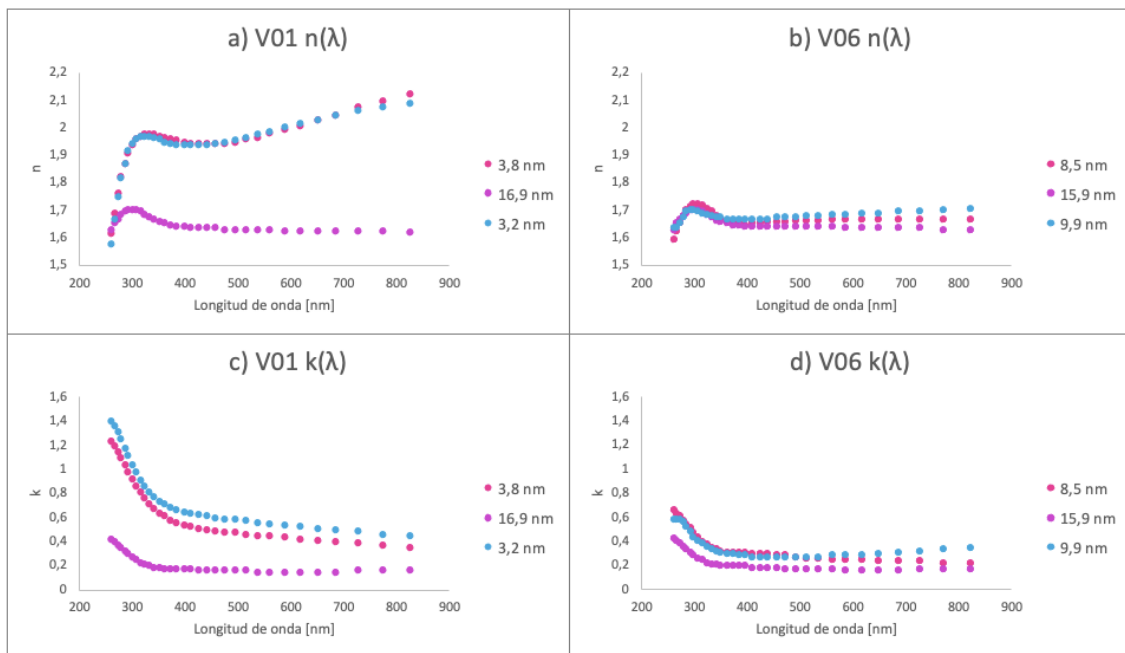


Figura 71. Resultados de los índices de refracción n (a) y (b) y de los coeficientes de extinción k (c) y (d) de dos muestras de grafeno sobre sustratos de vidrio (V01 y V06). En cada gráfico se reportan los índices calculados en cada una de las 3 mediciones por muestra. En la leyenda se encuentran los grosores del grafeno asociados a las mediciones.

En la Tabla 6 se encuentra un resumen de los resultados de las Figuras 69, 70 y 71 para los grosores de grafeno de cada muestra, con su error respectivo; los valores máximos de los índices n y k (considerando solo el espectro UV), y el valor de los índices n y k para la longitud de onda de 620 nm (2 eV).

El valor máximo del índice n en el espectro UV tomó valores bajos (entre $\sim 1,66$ y $1,9$, en longitudes de onda entre 303 nm y 348 nm), en comparación a los resultados de los índices de refracción para el grafeno de trabajos previos (Tabla 5), que se encontraban en rangos entre $2,2$ y $3,4$, y en longitudes de onda menores: entre 250 nm y 316 nm.

El valor máximo de k de nuestras muestras de grafeno, que corresponde al *peak* observado en el espectro UV, tuvo valores entre $0,42$ y 1 . La posición de este *peak* se localizó entre 264 nm y 266 nm para grafeno sobre vidrio; y entre 282 nm y 295 nm para grafeno sobre silicio. Los valores del coeficiente k de nuestro grafeno fueron más bajos que los de la literatura según la Tabla 5 (entre $\sim 2,4$ y $3,1$), en los cuales el *peak* estaba posicionado entre 250 nm y 270 nm.

Por lo que se refiere a la longitud de onda de 620 nm, el índice de refracción n de nuestro grafeno tomó valores entre $1,59$ y $1,9$, mientras que en la literatura se encuentra en un rango entre $2,7$ y $2,9$ (a excepción del trabajo de Isic' *et al.* donde $n_{620\text{nm}} = 1,7$). Por otro lado, el coeficiente de extinción k de nuestro grafeno tomó valores bajos (entre $0,22$ y $0,84$) en la longitud de onda de 620 nm en comparación a la literatura del grafeno donde reportan valores de k entre $1,2$ y $1,7$ a los 620 nm.

Tabla 6. Valores calculados del grosor y los índices de refracción n y k del grafeno a partir de las Figuras 69-71. Los valores de $n_{m\acute{a}x}$ y $k_{m\acute{a}x}$ corresponden a los valores máximos de los índices en el rango UV. Los valores de $n_{620\text{nm}}$ y $k_{620\text{nm}}$ son los valores de los índices en la longitud de onda de 620 nm. Los valores reportados corresponden a los promedios entre las 3 mediciones por muestra. Las muestras con nomenclatura Sx y Vx corresponden a grafeno depositado sobre dióxido de silicio y vidrio respectivamente.

Muestra	Grosor grafeno [nm]	$n_{m\acute{a}x}$	$k_{m\acute{a}x}$	$n_{620\text{nm}}$	$k_{620\text{nm}}$
S4	$9,0 \pm 1,4$	$1,68 \pm 0,04$ (~ 305 nm)	$0,42 \pm 0,06$ (~ 282 nm)	$1,59 \pm 0,03$	$0,46 \pm 0,04$
S5	$6,6 \pm 1,0$	$1,77 \pm 0,01$ (~ 348 nm)	$0,55 \pm 0,06$ (~ 286 nm)	$1,74 \pm 0,06$	$0,54 \pm 0,05$
S7	$9,7 \pm 0,3$	$1,66 \pm 0,02$ (~ 318 nm)	$0,52 \pm 0,04$ (~ 295 nm)	$1,67 \pm 0,02$	$0,60 \pm 0,01$
S10	$4,1 \pm 0,2$	$1,84 \pm 0,03$ (~ 332 nm)	$0,86 \pm 0,02$ (~ 286 nm)	$1,85 \pm 0,07$	$0,84 \pm 0,01$
V01	$8,0 \pm 7,8$	$1,9 \pm 0,2$ (~ 321 nm)	$1,0 \pm 0,5$ (~ 264 nm)	$1,9 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,2$
V06	$11,4 \pm 3,9$	$1,71 \pm 0,01$ (~ 303 nm)	$0,54 \pm 0,12$ (~ 266 nm)	$1,66 \pm 0,03$	$0,22 \pm 0,06$

Para estudiar la dependencia entre de los índices n y k , y el espesor del grafeno graficamos $n_{620\text{nm}}$ y $k_{620\text{nm}}$ en función del grosor de la película de grafeno Figura 72. Si bien, para las muestras de silicio S4, S5 y S10, observamos que tanto el índice n como el coeficiente k disminuyen de magnitud al aumentar el espesor del grafeno, la muestra S7 no sigue esta tendencia, por lo cual no podemos afirmar que exista una correlación entre los índices ópticos y el espesor del grafeno. Esto concuerda con los resultados de la literatura (Figura 65) en donde tampoco observamos una correlación entre esas magnitudes. En cuanto las muestras de grafeno sobre vidrio, no podemos inferir información sobre cómo dependen los índices ópticos del espesor del grafeno debido a que el error del espesor es muy grande en este tipo de muestra.

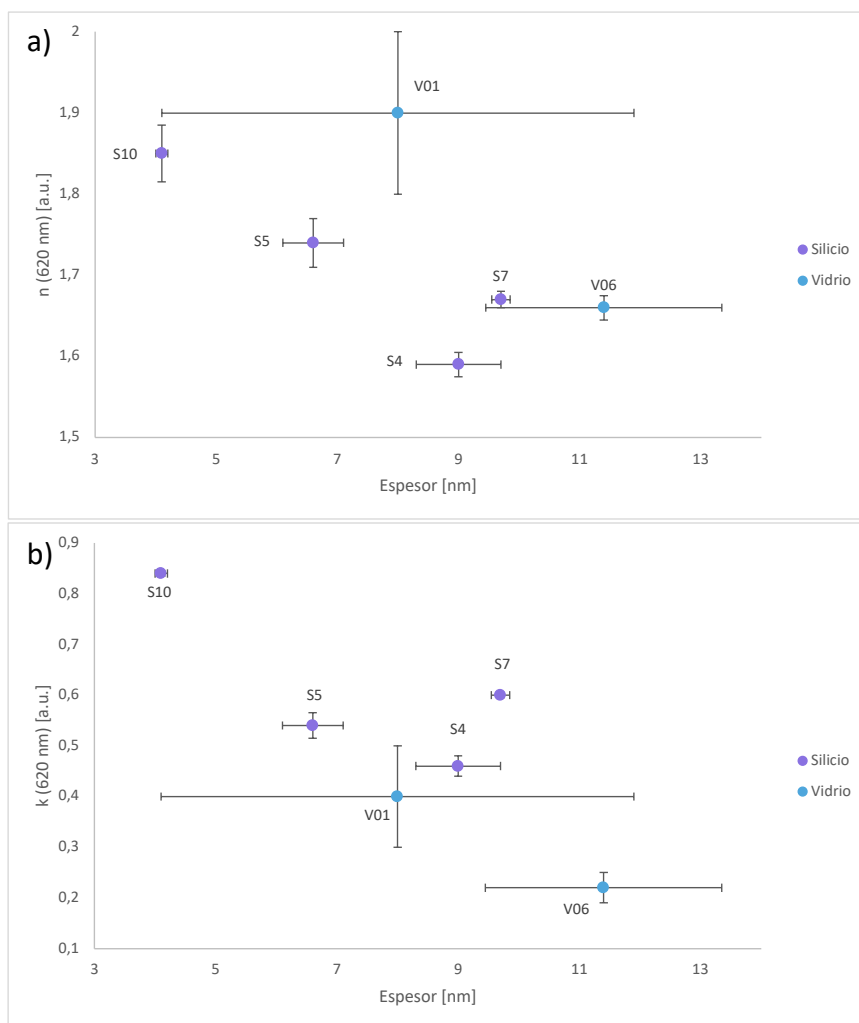


Figura 72. a) Índice de refracción n y b) coeficiente de extinción k , a los 620 nm en función del espesor del grafeno para las muestras sobre silicio (morado) y vidrio (celeste).

Para complementar las mediciones de elipsometría espectroscópica y estudiar la estructura de las muestras, realizamos algunas mediciones de microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDX). En las Figuras 73 a y b podemos observar la estructura de las muestras de grafeno sobre dióxido de silicio S4 y S5 respectivamente. En la imagen de la muestra S4, el color más oscuro representa el sustrato de SiO_2 , las zonas grises corresponden al grafeno y las líneas blancas son los defectos del nanomaterial. Observamos que en general la muestra S4 no era homogénea, pues, como observamos en la imagen el grafeno se fragmentó y el sustrato no quedó completamente cubierto, además de la gran cantidad de defectos en la muestra, que pueden ser producto del proceso de transferencia. Por otro lado, la imagen de la muestra S5 (Figura 73b) indica que tiene mejor calidad, pues el grafeno no está fragmentado en ese sector de la muestra y los defectos (zonas blancas) son más pequeños que para la muestra S4. Esto podría explicar la irregularidad de los índices n (Figura 69a) y k (Figura 70a) de la muestra S4 alrededor de los 400 nm. Además la desviación estándar del grosor de grafeno calculado para la muestra S4 (Tabla 6), que tuvo un valor más alto que para la muestra S5, podría explicarse a la heterogeneidad de la muestra, pues, los distintos lugares en donde realizamos las mediciones de SE podrían no ser equivalentes.

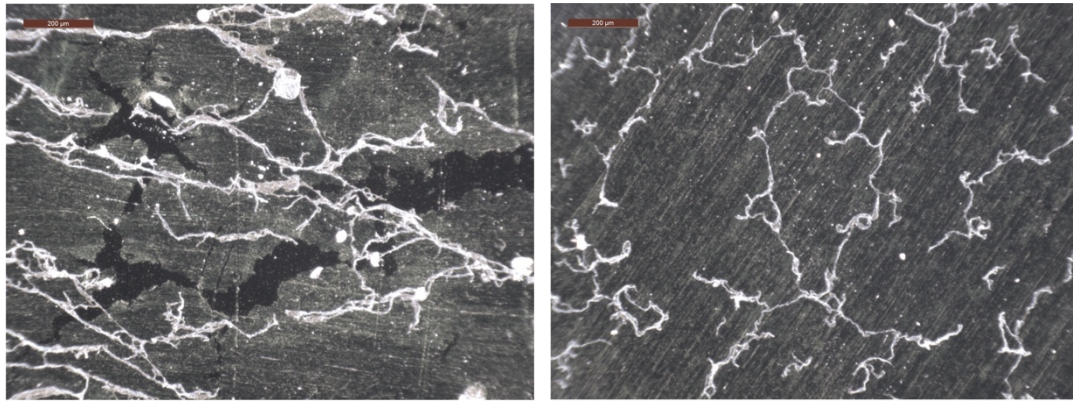


Figura 73. Imágenes de microscopía óptica de grafeno sobre dióxido de silicio de las muestras: a)S4 y b)S5. Ambas imágenes están a la misma escala, como indica la barra (de 200 μm) en la esquina superior izquierda de las imágenes.

Para profundizar en los defectos que podrían presentar algunas de nuestras muestras, analizamos la muestra S4, de grafeno sobre dióxido de silicio, mediante la técnica de SEM, obteniendo las imágenes de la Figura 74. A diferencia de las imágenes de microscopio óptico de la Figura 73, en las imágenes SEM las zonas más claras corresponden al sustrato de SiO_2 y las zonas más oscuras corresponden a la película de grafeno. En la imagen milimétrica (Figura 74a) observamos que el grafeno estaba fragmentado, lo cual puede ocurrir durante el proceso de transferencia al sustrato. Además observamos algunas líneas donde pareciese ser que la muestra estaba rayada, debido a una mala manipulación de la muestra. Aun así, observamos sectores de áreas de grafeno considerables para realizar mediciones de SE. En la imagen micrométrica (Figura 74b) observamos una rugosidad del grafeno que podría deberse a que en el proceso de transferencia, la película de grafeno se arruga en el momento en que se evapora el agua después de haber sido transferida al sustrato.

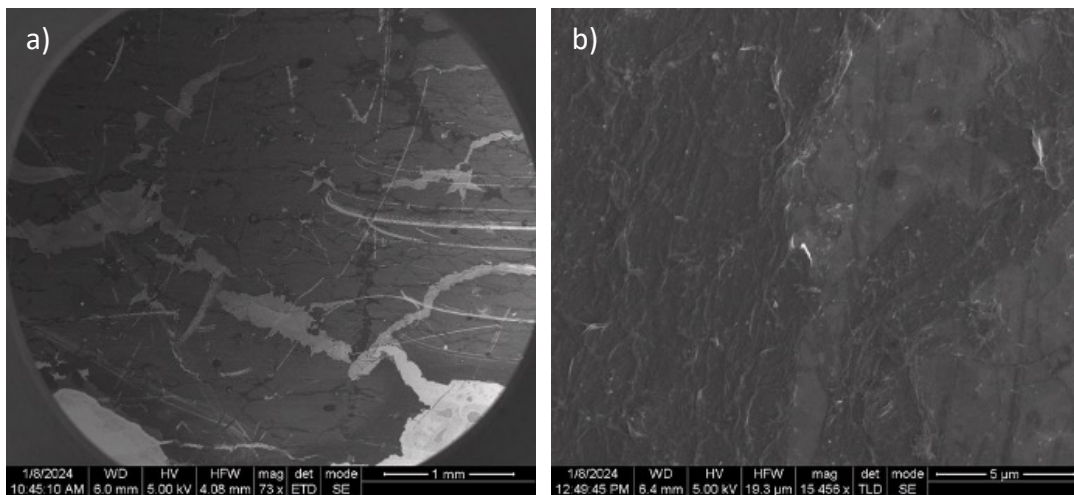


Figura 74. Imágenes SEM de grafeno sobre dióxido de silicio de la muestra S4 a) a una escala milimétrica y b) a una escala micrométrica.

En la imagen SEM de la Figura 74b, notamos que a pesar de que toda la superficie estaba cubierta por grafeno, habían zonas un poco más oscuras que otras, por lo cual llevamos a cabo mediciones de EDX obteniendo los resultados de la Figura 75. Observamos que los elementos predominantes de la muestra correspondían a carbono, oxígeno y silicio lo cual era esperable ya que el carbono es el componente del grafeno y el oxígeno y silicio son los componentes principales del sustrato sobre el que estaba

depositada la película de grafeno. En particular, observamos que en la zona 1 de la Figura 75 (denotado con amarillo en el espectro EDX) que corresponde a la zona más oscura de la imagen SEM, había una mayor contribución de carbono que para las zonas 2 y 3 (denotadas con naranja y rojo en el espectro EDX, respectivamente), que correspondían a las zonas más claras de la imagen SEM. Eso nos hace pensar que podría haber zonas de la muestra con más capas de grafeno, lo cual explica la diferencia entre los grosores calculados para la misma película de grafeno, en distintas zonas de la muestra.

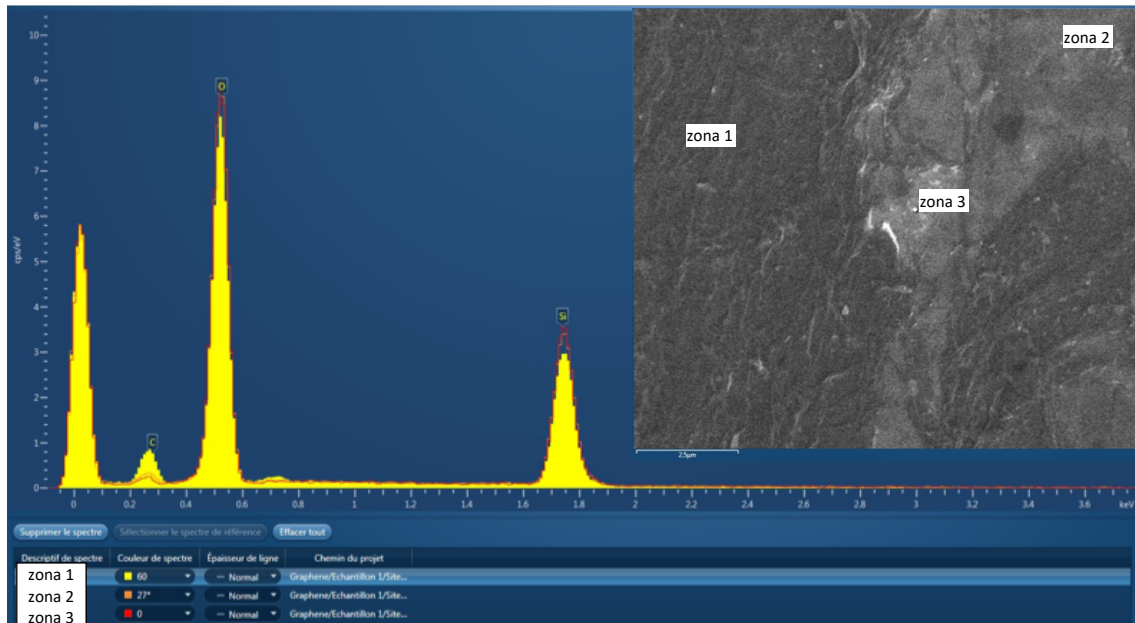


Figura 75. Espectro EDX de grafeno sobre dióxido de silicio para tres zonas de la muestra S4, indicadas por los colores amarillo, naranja y rojo (zonas 1, 2 y 3, respectivamente indicadas en el recuadro con la imagen SEM).

5. Conclusiones

En este trabajo, sintetizamos grafeno y óxido de grafeno mediante la técnica de PECVD y logramos transferir áreas grandes de hasta $2,8 \text{ cm}^2$ sobre sustratos de óxido de silicio y placas de cultivo. Mediante espectroscopía Raman determinamos que las muestras de grafeno consistían en monocapas con pocos defectos. Los tipos de triptófano que utilizamos en este trabajo consisten en un triptófano de prueba (TRP1), un triptófano con terminal clorhidrato (TRP2) y un triptófano con terminal metilo (TRP3). A partir de imágenes de microscopía óptica y espectroscopía Raman observamos las diferencias estructurales entre los tres tipos de triptófano utilizados en esta investigación. Y por medio de mediciones de espectrofotometría UV-vis, observamos diferencias en los espectros de absorbancia entre los distintos tipos de triptófano. TRP1 y TRP3 presentaron un *peak* en la longitud de onda de 280 nm, mientras que para el TRP2 el *peak* se encontraba en los 298 nm.

Para estudiar la adsorción de los distintos tipos de triptófano en grafeno analizamos el cambio de concentración de las soluciones de trp en contacto con los nanomateriales, a partir de mediciones de absorbancia ultravioleta. Encontramos que a las 3 horas de interacción, a 4°C , el triptófano de prueba TRP1 se había adsorbido en grafeno solo para las concentraciones iniciales entre $5 \mu\text{M}$ y $10 \mu\text{M}$, rango en el cual hubo una tendencia de aumento de ΔC en función de la $C_{inicial}$. No observamos una dependencia entre la adsorción del triptófano TRP1 y el área del grafeno. El triptófano TRP2 (N'-FORMYL-L-TRYPTOPHAN HYDROCHLORIDE, $C_{12}H_{12}N_2O_3^*HCl$), presentó adsorción en grafeno a las 3 horas de interacción, a 4°C , para concentraciones iniciales entre $10 \mu\text{M}$ y $60 \mu\text{M}$, sin embargo no observamos una correlación entre la adsorción y la $C_{inicial}$ o el área del grafeno.

También analizamos la cinética de adsorción del TRP3 (N-ALPHA-ACETYL-DL-TRYPTOPHAN METHYL ESTER, $C_{14}H_{16}N_2O_3$) en grafeno y en óxido de grafeno durante 24 horas a temperatura ambiente. Si bien observamos que el TRP3 se adsorbe en los nanomateriales para algunas concentraciones iniciales entre $20 \mu\text{M}$ y $70 \mu\text{M}$, no observamos una dependencia entre la adsorción y la $C_{inicial}$ o el área del grafeno. A partir del análisis del cambio en la absorbancia, observamos que el TRP3 no muestra una preferencia de adsorción entre grafeno u óxido de grafeno.

Al comparar los gráficos del porcentaje de cambio de absorbancia en función de la $C_{inicial}$ en los casos donde sí hubo adsorción en grafeno, obtuvimos que el TRP1 mostró el mayor $\% \Delta A$ (entre 0,4 y 3,5%), indicando una mejor adsorción en el nanomaterial, para concentraciones iniciales pequeñas (entre 5 y $10 \mu\text{M}$). En cuanto a los otros tipos de triptófano, para concentraciones mayores entre 10 y $70 \mu\text{M}$, el $\% \Delta A$ tomó valores entre 0,07 y 1,8% para el TRP2 y entre 0,3 y 1% para el TRP3.

Según de las mediciones de AFM creemos que el triptófano se adsorbe sobre la superficie del grafeno y el óxido de grafeno en aglomeraciones de moléculas. Esto sugiere que la adsorción de triptófano ocurre en multicapas, y que sería adecuado ajustar las isotermas de adsorción a un modelo BET.

A partir de mediciones de elipsometría espectroscópica calculamos los índices ópticos n y k y el grosor de las películas de grafeno. Los índices ópticos presentaron valores más pequeños que los reportados en la literatura. Los grosores calculados de grafeno resultaron más grandes que el grosor de una monocapa de grafeno (0,3 nm). Mediante mediciones de SEM-EDX, observamos que ello se debe a la rugosidad del grafeno y a que en algunas zonas había más de una capa del nanomaterial.

6. Referencias

1. Mallineni, S.S.K., Shannahan, J., Raghavendra, A.J., Rao, A.M., Brown, J.M., and Podila, R. (2016) Biomolecular Interactions and Biological Responses of Emerging Two-Dimensional Materials and Aromatic Amino Acid Complexes. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **8** (26), 16604–16611.
2. Barria-Urenda, M., Ruiz-Fernandez, A., Gonzalez, C., Oostenbrink, C., and Garate, J.A. (2023) Size Matters: Free-Energy Calculations of Amino Acid Adsorption over Pristine Graphene. *J. Chem. Inf. Model.*, **63** (21), 6642–6654.
3. Ferrari, A.C., Meyer, J.C., Scardaci, V., Casiraghi, C., Lazzeri, M., Mauri, F., Piscanec, S., Jiang, D., Novoselov, K.S., Roth, S., and Geim, A.K. (2006) Raman spectrum of graphene and graphene layers. *Phys. Rev. Lett.*, **97** (18), 1–4.
4. Hawaldar, R., Merino, P., Correia, M.R., Bdikin, I., Grácio, J., Méndez, J., Martín-Gago, J.A., and Singh, M.K. (2012) Large-area high-throughput synthesis of monolayer graphene sheet by Hot filament thermal chemical vapor deposition. *Sci. Rep.*, **2**, 2–10.
5. van Quang, V., Trong, N.S., Trung, N.N., Hoa, N.D., van Duy, N., and van Hieu, N. (2014) Full-Layer Controlled Synthesis and Transfer of Large-Scale Monolayer Graphene for Nitrogen Dioxide and Ammonia Sensing. *Anal. Lett.*, **47** (2), 280–294.
6. Cazorla, C. (2010) Ab initio study of the binding of collagen amino acids to graphene and A-doped (A = H, Ca) graphene. *Thin Solid Films*, **518** (23), 6951–6961.
7. Chong, Y., Ge, C., Yang, Z., Garate, J.A., Gu, Z., Weber, J.K., Liu, J., and Zhou, R. (2015) Reduced Cytotoxicity of Graphene Nanosheets Mediated by Blood-Protein Coating. *ACS Nano*, **9** (6), 5713–5724.
8. Duan, G., Kang, S.G., Tian, X., Garate, J.A., Zhao, L., Ge, C., and Zhou, R. (2015) Protein corona mitigates the cytotoxicity of graphene oxide by reducing its physical interaction with cell membrane. *Nanoscale*, **7** (37), 15214–15224.
9. Hassan, N., Verdinelli, V., Ruso, J.M., and Messina, P. V. (2012) Assessing structure and dynamics of fibrinogen films on silicon nanofibers: Towards hemocompatibility devices. *Soft Matter*, **8** (24), 6582–6592.
10. Hazra, C., Samanta, T., and Mahalingam, V. (2014) A resonance energy transfer approach for the selective detection of aromatic amino acids. *J. Mater. Chem. C*, **2** (47), 10157–10163.
11. Kocman, M., Pykal, M., and Jurečka, P. (2014) Electric quadrupole moment of graphene and its effect on intermolecular interactions. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **16** (7), 3144–3152.
12. Vovusha, H., Sanyal, S., and Sanyal, B. (2013) Interaction of nucleobases and aromatic amino acids with graphene oxide and graphene flakes. *J. Phys. Chem. Lett.*, **4** (21), 3710–3718.
13. Podila, R., Vedantam, P., Ke, P.C., Brown, J.M., and Rao, A.M. (2012) Evidence for charge-transfer-induced conformational changes in carbon nanostructure-protein corona. *J. Phys. Chem. C*, **116** (41), 22098–22103.
14. Podila, R., Rao, R., Tsuchikawa, R., Ishigami, M., and Rao, A.M. (2012) Raman spectroscopy of folded and scrolled graphene. *ACS Nano*, **6** (7), 5784–5790.
15. Rao, A.M., Eklund, P.C., Bandow, S., Thess, A., and Smalley, R.E. (1997) Evidence

- for charge transfer in doped carbon nanotube bundles from raman scattering. *Nature*, **388** (6639), 257–259.
16. Jung, N., Kim, N., Jockusch, S., Turro, N.J., Kim, P., and Brus, L. (2009) Charge transfer chemical doping of few layer graphenes: Charge distribution and band gap formation. *Nano Lett.*, **9** (12), 4133–4137.
 17. Rajesh, C., Majumder, C., Mizuseki, H., and Kawazoe, Y. (2009) A theoretical study on the interaction of aromatic amino acids with graphene and single walled carbon nanotube. *J. Chem. Phys.*, **130** (12), 1–6.
 18. Camden, A.N., Barr, S.A., and Berry, R.J. (2013) Simulations of peptide-graphene interactions in explicit water. *J. Phys. Chem. B*, **117** (37), 10691–10697.
 19. Hughes, Z.E., and Walsh, T.R. (2015) What makes a good graphene-binding peptide? Adsorption of amino acids and peptides at aqueous graphene interfaces. *J. Mater. Chem. B*, **3** (16), 3211–3221.
 20. Welch, C.M., Camden, A.N., Barr, S.A., Leuty, G.M., Kedziora, G.S., and Berry, R.J. (2015) Computation of the binding free energy of peptides to graphene in explicit water. *J. Chem. Phys.*, **143** (4).
 21. Dasetty, S., Barrows, J.K., and Sarupria, S. (2019) Adsorption of amino acids on graphene: assessment of current force fields. *Soft Matter*, **15** (11), 2359–2372.
 22. Hlady, V., Buijs, J., and Jennissen, H.P. (1999) [26] Methods for studying protein adsorption, in *Bone*, vol. 23, pp. 402–429.
 23. Langmuir, I. (1916) THE CONSTITUTION AND FUNDAMENTAL PROPERTIES OF SOLIDS AND LIQUIDS. PART I. SOLIDS. *J. Am. Chem. Soc.*, **38** (11), 2221–2295.
 24. Brunauer, S., Emmett, P.H., and Teller, E. (1938) Adsorption of gases in multimolecular layers. *J. Am. Chem. Soc.*, **60**, 309–316.
 25. Khalfaoui, M., Knani, S., Hachicha, M.A., and Lamine, A. Ben (2003) New theoretical expressions for the five adsorption type isotherms classified by BET based on statistical physics treatment. *J. Colloid Interface Sci.*, **263** (2), 350–356.
 26. Latour, R.A. (2015) The Langmuir isotherm: A commonly applied but misleading approach for the analysis of protein adsorption behavior. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, **103** (3), 949–958.
 27. Myers, D. (1999) *Surfaces, interfaces and colloids*, Wiley-VCH, New York, NY.
 28. Van Erp, T.S., and Martens, J.A. (2011) A standardization for BET fitting of adsorption isotherms. *Microporous Mesoporous Mater.*, **145** (1–3), 188–193.
 29. Ebadi, A., Soltan Mohammadzadeh, J.S., and Khudiev, A. (2009) What is the correct form of BET isotherm for modeling liquid phase adsorption? *Adsorption*, **15** (1), 65–73.
 30. Behere, K., and Yoon, S. (2021) n-Layer BET adsorption isotherm modeling for multimeric Protein A ligand and its lifetime determination. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **1162** (November 2020).
 31. Downes, A., and Elfick, A. (2010) Raman spectroscopy and related techniques in biomedicine. *Sensors*, **10** (3), 1871–1889.
 32. Ferrari, A.C., and Basko, D.M. (2013) Raman spectroscopy as a versatile tool for studying the properties of graphene. *Nat. Nanotechnol.*, **8** (4), 235–246.
 33. Heo, G., Kim, Y.S., Chun, S.H., and Seong, M.J. (2015) Polarized Raman spectroscopy with differing angles of laser incidence on single-layer graphene. *Nanoscale Res. Lett.*, **10** (1).
 34. Reina, A., Jia, X., Ho, J., Nezich, D., Son, H., Bulovic, V., Dresselhaus, M.S., and Jing,

- K. (2009) Large area, few-layer graphene films on arbitrary substrates by chemical vapor deposition. *Nano Lett.*, **9** (1), 30–35.
35. Malard, L.M., Pimenta, M.A., Dresselhaus, G., and Dresselhaus, M.S. (2009) Raman spectroscopy in graphene. *Phys. Rep.*, **473** (5–6), 51–87.
 36. Dong, X., Wang, P., Fang, W., Su, C.Y., Chen, Y.H., Li, L.J., Huang, W., and Chen, P. (2011) Growth of large-sized graphene thin-films by liquid precursor-based chemical vapor deposition under atmospheric pressure. *Carbon N. Y.*, **49** (11), 3672–3678.
 37. Pimenta, M.A., Dresselhaus, G., Dresselhaus, M.S., Cançado, L.G., Jorio, A., and Saito, R. (2007) Studying disorder in graphite-based systems by Raman spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **9** (11), 1276–1291.
 38. Perumbilavil, S., Sankar, P., Priya Rose, T., and Philip, R. (2015) White light Z-scan measurements of ultrafast optical nonlinearity in reduced graphene oxide nanosheets in the 400–700 nm region. *Appl. Phys. Lett.*, **107** (5), 1–5.
 39. Krishnamoorthy, K., Veerapandian, M., Yun, K., and Kim, S.J. (2013) The chemical and structural analysis of graphene oxide with different degrees of oxidation. *Carbon N. Y.*, **53**, 38–49.
 40. Boukhvalov, D.W., Kurmaev, E.Z., Urbańczyk, E., Dercz, G., Stolarczyk, A., Simka, W., Kukhareenko, A.I., Zhidkov, I.S., Slesarev, A.I., Zatsepin, A.F., and Cholakh, S.O. (2018) Atomic and electronic structure of graphene oxide/Cu interface. *Thin Solid Films*, **665**, 99–108.
 41. Zhang, N.M.Y., Li, K., Shum, P.P., Yu, X., Zeng, S., Wu, Z., Wang, Q.J., Yong, K.T., and Wei, L. (2017) Hybrid Graphene/Gold Plasmonic Fiber-Optic Biosensor. *Adv. Mater. Technol.*, **2** (2), 1–24.
 42. Alessandrini, A., and Facci, P. (2005) AFM: A versatile tool in biophysics. *Meas. Sci. Technol.*, **16** (6).
 43. Giessibl, F.J. (2003) Advances in atomic force microscopy. *Rev. Mod. Phys.*, **75** (3), 949–983.
 44. Li, W., Cheng, G., Liang, Y., Tian, B., Liang, X., Peng, L., Hight Walker, A.R., Gundlach, D.J., and Nguyen, N. V. (2016) Broadband optical properties of graphene by spectroscopic ellipsometry. *Carbon N. Y.*, **99**, 348–353.
 45. Weber, J.W., Calado, V.E., and Van De Sanden, M.C.M. (2010) Optical constants of graphene measured by spectroscopic ellipsometry. *Appl. Phys. Lett.*, **97** (9), 2–4.
 46. Kravets, V.G., Grigorenko, A.N., Nair, R.R., Blake, P., Anissimova, S., Novoselov, K.S., and Geim, A.K. (2010) Spectroscopic ellipsometry of graphene and an exciton-shifted van Hove peak in absorption. *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.*, **81** (15), 1–6.
 47. Isić, G. (2011) Spectroscopic ellipsometry of few-layer graphene. *J. Nanophotonics*, **5** (1), 051809.
 48. Nelson, F.J., Kamineni, V.K., Zhang, T., Comfort, E.S., Lee, J.U., and Diebold, A.C. (2010) Optical properties of large-area polycrystalline chemical vapor deposited graphene by spectroscopic ellipsometry. *Appl. Phys. Lett.*, **97** (25), 2–4.
 49. Blake, P., Hill, E.W., Castro Neto, A.H., Novoselov, K.S., Jiang, D., Yang, R., Booth, T.J., and Geim, A.K. (2007) Making graphene visible. *Appl. Phys. Lett.*, **91** (6), 13–15.
 50. Bruna, M., and Borini, S. (2009) Optical constants of graphene layers in the visible

- range. *Appl. Phys. Lett.*, **94** (3), 1–4.
51. Schöche, S., Hong, N., Khorasaninejad, M., Ambrosio, A., Orabona, E., Maddalena, P., and Capasso, F. (2017) Optical properties of graphene oxide and reduced graphene oxide determined by spectroscopic ellipsometry. *Appl. Surf. Sci.*, **421**, 778–782.
 52. WebPlotDigitizer. <https://apps.automeris.io/wpd4/>
 53. Azzam, R.M.A., and Bashara, N.. *Ellipsometry and Polarized Light*, North-Holland Publishing Company, 1977.
 54. J.A.Woollam. <https://www.jawoollam.com/resources/ellipsometry-tutorial/what-is-ellipsometry>