



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ingeniería – Programa de Magíster en Ciencias de la Ingeniería con
mención en Ingeniería Química

Desarrollo de un aerogel a base de óxido de grafeno y polivinil alcohol con potencial uso transdérmico

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias de la Ingeniería con
mención en Ingeniería Química

CONSTANZA ISABEL MELLADO CAMPOS
CONCEPCIÓN – CHILE
2017

Profesor Guía: Katherina Fernández Elgueta
Dpto. de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería
Universidad de Concepción
Profesor Co-Guía: Berta Schulz Bañares
Dpto. de Farmacia, Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción



**“Aquel que tiene un *por qué* para vivir,
se puede enfrentar a todos los *cómos*”**

– Friedrich Nietzsche



Dedicado a mi Madre

por su amor verdadero e incondicional

RESUMEN

Las heridas en general son un grupo de patologías que han acompañado al hombre durante toda su existencia, y en la actualidad el costo de su tratamiento es cuantioso en todos los países (en Chile las patologías asociadas a heridas en diabéticos son la primera causa de hospitalización), constituyendo una alta carga social, médica, económica y personal. En esta misma línea, los materiales hemostáticos, son de vital importancia en la medicina civil y militar, ya que un rápido control del sangrado es esencial para la recuperación óptima e incluso la supervivencia. La falta de enfoques terapéuticos eficaces para combatir las discapacidades asociadas con heridas crónicas o agudas representan un desafío actual, y justifica la búsqueda de nuevos materiales para este fin. Existen estudios de materiales basados en grafeno en el campo de la cicatrización, liberación dérmica y/o hemostasia, aunque pocos enfocados en la estabilización y liberación de extractos naturales sobre sustratos tales como el óxido de grafeno (GO). Sobre la base de su capacidad de absorción y de estabilización de compuestos, en este trabajo se desarrolló y caracterizó un aerogel a base de GO y polivinil alcohol (PVA), con propiedades absorbentes, coagulantes y de liberación de componentes, mediante la incorporación de extractos polifenólicos.

Se sintetizó GO a partir de grafito en polvo, mediante el método de Hummers, susceptible de ser funcionalizado con PVA. Durante la síntesis de GO, el tratamiento de exfoliación del óxido de grafito (GfO) es un paso clave para obtener nanoláminas totalmente exfoliadas y con características adecuadas para la posterior formación de aerogeles. Por ello, se comparó el efecto de utilizar dos equipos de ultrasonido (Sonda y Baño) como métodos de exfoliación. La estructura y composición se caracterizó con espectroscopia Raman, Microscopía electrónica de barrido (SEM), difracción de rayos X (XRD), espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), microscopía de fuerza atómica (AFM), análisis elemental, y análisis de ζ -potencial. Se observó que un tiempo prolongado de exposición causó daño estructural, fragmentando las hojas GO en trozos más pequeños con tamaños $<1 \mu\text{m}$ para tiempos de tratamiento mayores de 60 min o 30 min usando un Baño o Sonda de ultrasonido. El uso del Baño fue menos invasivo, no requirió contacto directo con las muestras, permitió un fácil control de la temperatura de la muestra, causó menos arrugas y menos daño a la estructura y morfología de las láminas de GO, comparado con la Sonda. Con el Baño, se infiere la existencia de más grupos químicos disponibles en la estructura del GO para una futura funcionalización.

Basado en los resultados anteriores, se utilizaron dispersiones de GO con tiempos de exfoliación menores de 20 minutos (Baño) y para formular aerogeles a base de GO y PVA mediante un proceso

sol-gel, incorporando extractos naturales de semillas (SD) y piel (SK) de uva País (*Vitis vinífera L.*), ricos en Proantocianidinas (PAs), mediante métodos de unión no covalente. Los aerogeles exhibieron capacidad de coagulación y liberación de los compuestos. Su estructura porosa, y de baja densidad, fue capaz de absorber agua (70 veces su propio peso) y sangre, observándose una coagulación superficial de la sangre, la cual aumentó con la incorporación de los extractos de uva (12% p/p). Este efecto estuvo asociado al incremento de su carga negativa en un 33% ($-18,3 \pm 1,3$ mV) producto de la incorporación de los extractos y como consecuencia, se observó aumentos de 37% y 28% en el tiempo de coagulación, durante los primeros 30 s y 60 s de contacto del aerogel con la sangre. La liberación de extractos desde los aerogeles GO-PVA-SD y GO-PVA-SK se prolongó hasta las 3 h, alcanzando solo 20%, probablemente debido a la existencia de una fuerte unión entre PAs y GO-PVA, caracterizados ambos por la presencia de grupos aromáticos e hidroxilos que pueden formar uniones no covalentes, pero lo suficientemente fuertes y estables para evitar una liberación mayor en el medio. Los análisis FTIR mostraron que la estructura de GO-PVA prevalece en el aerogel, solapando la presencia de los grupos polifenólicos.



TABLA DE CONTENIDOS

Capítulo	Página
RESUMEN	iv
TABLA DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xii
NOMENCLATURAS	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES GENERALES	5
2.1. Carbono.....	5
2.2. Grafito.....	7
2.3. Poli vinil alcohol (PVA).....	8
2.4. Óxido de grafeno (GO).....	9
2.4.1. Propiedades y aplicaciones.....	11
2.4.2. Síntesis de GO.....	13
2.4.3. Funcionalización de GO.....	14
2.4.4. GO integrado como estructuras tridimensionales.....	17
2.5. Uso de Polifenoles.....	19
2.5.1. Características químicas de los polifenoles.....	19
2.5.2. Propiedades de polifenoles.....	20
2.6. Aplicaciones en heridas y cicatrización de materiales basados en grafeno.....	24
2.7. Técnicas de caracterización.....	26
2.8. Referencias.....	31
3. HIPÓTESIS	38
4. OBJETIVOS	39
4.1. Objetivo General.....	39
4.2. Objetivos Específicos.....	39

5. STUDY OF THE INFLUENCE OF ULTRASONIC TREATMENTS USING PROBE OR BATH ON THE GRAPHENE OXIDE STRUCTURE BY RAMAN SPECTROSCOPY.	40
5.1. Abstract	41
5.2. Introduction	42
5.3. Experimental	44
5.3.1. Materials and methods	44
5.3.2. Preparation of GO with different structural characteristics.....	44
5.3.3. Characterization of GO	45
5.4. Results and discussion.....	47
5.5. Conclusion.....	57
5.6. References	58
6. DEVELOPMENT OF GRAPHENE OXIDE COMPOSITE AEROGEL WITH PROANTHOCYANIDINS (PAs) WITH HEMOSTATIC PROPERTIES AS A DELIVERY SYSTEM	61
6.1. Abstract	62
6.2. Introduction	64
6.3. Experimental	66
6.3.1. Materials.....	66
6.3.2. Graphene oxide (GO) synthesis	66
6.3.3. País grape seed and skin extract production.....	67
6.3.4. Preparation of aerogels.....	67
6.3.5. In vitro dynamic whole-blood clotting.....	68
6.3.6. In Vitro País grape extracts release test.....	68
6.3.7. Statistical analysis	69
6.4. Results and Discussion.....	70
6.4.1. Preparation and characterization of GO, Polyvinyl alcohol (PVA) and seed (SD) and skin (SK) grapes extracts.....	70
6.4.2. Preparation and characterization of aerogels.....	72

6.4.3. Evaluation of aerogels properties	82
6.5. Conclusion.....	88
6.6. References	89
7. CONCLUSIÓN	95
8. ANEXOS	98
Anexo I: Supporting information of “Study of the influence of ultrasonic treatments using probe or bath on the graphene oxide structure by Raman spectroscopy”	98
Anexo II: Supporting information of “Development of graphene oxide composite aerogel with Proanthocyanidins (PAs) with hemostatic properties as delivery system”	101



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 2.1. Diagrama de orbitales atómicos e hibridaciones de los átomos de Carbono. Fuente: Elaboración propia.	6
Figura 2.2. Grafito (a) Natural, (b) Estructura atómica, (c) SEM de escamas de grafito. Fuente: Páginas web varias.	8
Figura 2.3. Estructura química del poli vinil alcohol. Fuente: Elaboración propia.....	9
Figura 2.4. Estructura del óxido de grafeno (a) Modelos de estructura atómica del GO (b) Modelo de la dinámica de óxido de grafito. Fuente: Adaptado desde (Lerf, 1998; He, 1998; Buchsteiner, 2006).	10
Figura 2.5. Esquema general de diferentes aplicaciones del grafeno y óxido de grafeno. Fuente: Adaptado desde (Goenka, 2014).	12
Figura 2.6. Esquema de proceso de obtención de óxido de grafeno. Fuente: Elaboración propia... 14	14
Figura 2.7. Funcionalización de óxido de grafeno (GO) con polivinil alcohol (PVA) mediante método de unión Covalente: reacción de esterificación de carbodiimida activada. Fuente: (Cano, 2013).	15
Figura 2.8. Diferencias entre unión covalente y no covalente de Polivinil alcohol (PVA) con óxido de grafeno (GO). Fuente: (Linares, 2016).	17
Figura 2.9. Esponja ultra absorbente y con propiedades hemostáticas (CGS, Cross-linked graphene sponge). Fuente: (Quan, 2015).	19
Figura 2.10. Representación estructural básica de compuestos fenólicos flavonoides (al centro) y principales subfamilias de los compuestos flavonoides (en la periferia). Fuente: (Jaganath, 2009). 20	20
Figura 2.11. Ilustraciones de la piel (a) estructura, (b) representación de la penetración transdérmica a través del estrato córneo y la epidermis viva. La vía intracelular o transcelular comprende la difusión a través de los queratinocitos epidérmicos y la vía intercelular a través de los intersticios celulares, y (c) Representación esquemática de las fases de cicatrización de una herida (c 1) infiltración de neutrófilos en el área de la herida, (c 2) invasión de área de la herida por las células epiteliales, (c 3) epitelio cubre completamente la herida, (c 4) varios de los capilares y fibroblastos formados en la primera etapa han desaparecido. Fuente: (Betlloch y Silvestre, 2002). 26	26
Figure 5.1. Graphical Abstract of “Study of the influence of ultrasonic treatments using probe or bath on the graphene oxide structure by Raman spectroscopy”. Source: Own elaboration.	41

- Figure 5.2.** Scheme of procedures followed starting with graphite flakes (GF) for preparation of graphite oxide (GpO) by methods describe in the literature and subsequent exfoliation to obtain graphene oxide sheets (GO) with different characteristic. Source: Own elaboration. 44
- Figure 5.3. (a)** Diffractograms of (from above) graphite (GO precursor: black) as received, graphite oxide (GfO; yellow) as synthesized; Graphene oxide (GO) subjected to: 5, 15 and 30 min sonication with GfO probe (s-5: purple; s-15: green; s-30: blue), and 1, 3 and 5 h sonication In bath of GfO (b-1: red; b-3: orange; b-5: magenta). **(b)** Hydrodynamic sizes of GOs by DLS. Values presented as mean \pm standard deviation, samples measured in triplicate at 0.5 g/L. Source: Own elaboration. ... 48
- Figure 5.4. (a-c)** AFM images, **(d-f)** height profile of layers, and **(g-i)** the histograms of size distribution of GpO, GO b-5 and p-30 sheets, respectively. Source: Own elaboration. 49
- Figure 5.5.** Elemental analysis of graphite, GpO and GO samples. The C/O ratio of each sample is inserted over each bar in the figure. Source: Own elaboration. 51
- Figure 5.6.** Raman spectra recorded using 633 nm laser excitation of graphene oxide (GO) samples sonicated **(a)** with probe sonicator at the times of 5, 15 or 30 minutes, and **(b)** in a bath sonicator at 60, 180 or 300 minutes. Source: Own elaboration. 52
- Figure 5.7.** Deconvolution of the Raman Spectrum with Lorentzian curves in the 2D region of GO samples sonicated **(a)** with Probe sonicator at the times of 5, 15 or 30 minutes, and **(b)** in a Bath sonicator at 60, 180 or 300 minutes. Source: Own elaboration. 53
- Figure 5.8.** Deconvolution of the Raman Spectrum in $800-200\text{ cm}^{-1}$ of the D and G bands in the D*, D** and D' bands of the GO samples sonicated **(a)** with probe sonicator at the times of 5, 15 or 30 minutes, and **(b)** in a bath sonicator at 60, 180 or 300 minutes. Source: Own elaboration. 54
- Figure 5.9.** Frequency and intensity change for the D*, D, D**, G and D' bands in the $800-2000\text{ cm}^{-1}$ region of the GO samples set. **(a)** Frequency change and **(b)** Intensity change of GO samples sonicated with Probe sonicator at the times of 5, 15 or 30 minutes. **(c)** Frequency change and **(d)** Intensity change of GO samples sonicated in a Bath sonicator at 60, 180 or 300 minutes. Source: Own elaboration. 55
- Figure 6.1.** Graphical Abstract of “Development of graphene oxide composite aerogel with Proanthocyanidins (PAs) as delivery system and reinforcement the hemostatic properties”. Source: Own elaboration. 63
- Figure 6.2.** Characterization of GO **(a)** FTIR spectra of GO and PVA, **(b)** XRD, **(c)** AFM image of GO sheets and **(d)** FTIR spectra of País grape seed (SD) and skin (SK) extracts. Source: Own elaboration. 72

Figure 6.3. Morphology of Aerogels (a) photograph of GO-PVA aerogel (b) SEM image of GO-PVA aerogel, and (c) SEM image of the internal porous structure of the GO-PVA-SD and (d) GO-PVA-SK aerogels. Source: Own elaboration.	73
Figure 6.4. Characterization of Aerogels (a) FTIR spectra, (b) XRD patterns (c) Raman spectra, and (d) TGA curves (at a heating rate of 10°C min ⁻¹ under nitrogen atmosphere) of GO, PVA and aerogels. Source: Own elaboration.....	75
Figure 6.5. Raman Spectra of (a) GO, (b) PVA (c) SD, (d) SK, (e) GO-PVA, and (f) GO-PVA-SK and GO-PVA-SD, respectively. Source: Own elaboration.	76
Figure 6.6. FTIR spectrum of (a) GO-PVA aerogel, and MCR-ALS relative concentration and recovered spectra of chemical components of (b) GO-PVA-SD, and (c) GO-PVA-SK aerogels sample. Source: Own elaboration.....	80
Figure 6.7. (a) Element analysis of the whole pieces of aerogels, (b) ζ-potential (in PBS solutions, n = 3, data values corresponded to mean ± SD). Source: Own elaboration.	81
Figure 6.8. Whole blood clotting (a) In vitro dynamic whole-blood clotting evaluation of GO-PVA-extracts aerogels and control; values corresponded to mean ± SD (n=3). (b) Photographs of the corresponding aqueous solutions of hemoglobin after 60 s. Source: Own elaboration.	84
Figure 6.9. Cumulative release of País grape seed (SD) and skin (SK) extract from GO-PVA aerogel. Source: Own elaboration.	86
Figure SI-10.1. AFM image showing wrinkles in the edges and on the surface of GO sheets p-5 and the height profile of it. Source: Own elaboration.	98
Figure SI-10.2. SEM images of graphite flakes (GF), and graphite oxide (GpO) and graphene oxide (GO) lyophilized samples, sonicated with Probe (p - min) or Bath (b - hours) Sonicator. Source: Own elaboration.	99
Figure SI-10.3. FTIR spectra of graphite oxide (GpO) and graphene oxide (GO) lyophilized samples, sonicated with Probe (p - min) or Bath (b - hours) Sonicator. Source: Own elaboration.	100
Figure SI-10.4. SEM images showing the morphology of graphite flakes (GF). Source: Own elaboration.....	104
Figure SI-10.5. SEM image of GO. Source: Own elaboration.....	105

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla

Página

Table 5.1. Zeta potential (ζ -potencial) of GO samples on MilliQ-water. Values are presented as mean \pm standard deviation. Samples measured in triplicate at 0.5 g/L. 50



NOMENCLATURAS

Abreviaciones

AE	Análisis elemental
AFM	Microscopía de fuerza atómica
AgNO₃	Nitrato de Plata
AINE	Indometacina, antiinflamatorio comercial no esteroideo
AP	Agregación plaquetaria
Ba(NO₃)₂	Nitrato de Bario
CaCl₂	Cloruro de calcio
CGS	Esponja de grafeno reticulada, ‘Crosslinked graphene sponge’
CVD	Enfermedades cardiovasculares
DCC	N,N-diciclohexilcarbodiimida
DCGS	Esponja de grafeno reticulada con ácido 2,3-Diaminopropionico, ‘DapA crosslinked graphene sponge’
DLS	Dispersión de luz dinámica (“Dynamic Light Scattering”)
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDA	Etilendiamina
F_T	Fenoles totales
FTIR	Espectroscopia Infrarrojo con transformada de Fourier
GF	Grafito en escamas (“flakes”)
GfO	Óxido de grafito
GO	Óxido de grafeno (Graphene oxide)
GOFs	“Films” de óxido de grafeno
GO-PVA	Aerogel de GO reticulado con PVA
GO-PVA-SD	Aerogel de GO reticulado con PVA, con SD incorporado en su matriz
GO-PVA-SK	Aerogel de GO reticulado con PVA, con SK incorporado en su matriz
GpO	Graphite oxide
GSD	Extracto de semilla uva
GSK	Extracto de piel se uva
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorhídrico

pH	Coefficiente de grado de acidez o basicidad de una solución
KClO₃	Clorato de Potasio
KMnO₄	Permanganato de Potasio
MQ	Agua Mili-Q
NaNO₃	Nitrato de Sodio
PAs	Proantocianidinas (flavan-3-oles oligoméricos) o taninos condensados
PBS	Solución Fosfato Salina
PVA	Polivinil alcohol
rGO	Óxido de grafeno reducido
SC	Estrato Córneo de la piel
SD	Extracto de semilla de uva País (<i>Vitis vinífera L.</i>)
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SK	Extracto de piel de uva País (<i>Vitis vinífera L.</i>)
TGA	Análisis termogravimétrico
XRD	Difracción de rayos X
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
Mn₂O₇	Heptaóxido de dimanganeso (óxido de manganeso VII)
2,3-DapA	ácido 2,3-Diaminopropionico
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional

Símbolos griegos

ζ	Potencial zeta (mV)
θ	Ángulo de difracción (°)
λ	Longitud de onda (nm)

Caracteres alfabéticos

b	Baño de ultrasonido (“ b ath sonicator”)
C	Elemento químico Carbono
D	Banda de espectro Raman asociada al desorden en el grafeno
<i>d</i>	Distancia atómica interlaminar
e	Espesor del Aerogel (mm)
G	Banda de espectro Raman asociada a la vibración fundamental de elongación tangencial

G'	Banda de espectro Raman (G' o 2D o D*)
H	Elemento químico Hidrógeno
N	Elemento químico Nitrógeno
O	Elemento químico Oxígeno
p	Sonda de ultrasonido (“ p robe sonicator”)
S	Elemento químico Azufre
T	Temperatura

* Los símbolos y las constantes que se definen y usan sólo en una parte específica del informe no se incluyen aquí. Se proporcionan las unidades del SI para indicar las dimensiones de los símbolos.



1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de sistemas funcionales eficaces para la administración de agentes terapéuticos es uno de los desafíos más importantes de la medicina moderna. Los avances en nanociencia y nanotecnología han permitido la síntesis de nanomateriales precursores para el desarrollo de este tipo de sistemas (Langer, 2001). Los nanomateriales (con al menos una dimensión de tamaño nanométrico) y/o los materiales inteligentes (que responden de manera apropiada a estímulos externos) poseen interesantes propiedades fisicoquímicas y biológicas para aplicaciones biomédicas, entre ellas, su pequeño tamaño, su gran área superficial con respecto a su volumen, su habilidad para interactuar con tejidos celulares (Sanchez, 2012) y la sensibilidad a cambios en el medio, cuya respuesta se puede modificar en su diseño (Jiang, 2010). Diversos nanomateriales de diferentes tamaños, formas y composición química, tales como micro y nanopartículas, micelas poliméricas, liposomas, dendrímeros, nanotubos de carbono, metales u óxidos metálicos, micro y nanogeles, han sido explorados como nanoportadores para el suministro de agentes terapéuticos (Yallapu, 2011; A LaVan, 2003).

El reciente surgimiento de Grafeno, una capa monoatómica de carbono de 2 dimensiones (2D), y el Óxido de grafeno (GO), una capa de grafeno oxidada, como nanomateriales en aplicaciones biológicas, biomédicas y farmacéuticas, ha sido reportado en numerosos estudios donde se analiza su potencial uso como plataforma para inmovilizar diversos fármacos, pequeñas moléculas, anticuerpos, ADN, proteínas y genes (Zhang, 2016; Liu, 2013). Los materiales basados en grafeno tienen un amplio rango de potenciales aplicaciones debido a sus únicas propiedades mecánicas, eléctricas y térmicas; en particular el GO, ha atraído cada vez más la atención debido a sus propiedades (Mu, 2016; Jang, 2016), entre las que destaca la fácil dispersión en agua debido a su carácter hidrofílico y la capacidad de incorporación de moléculas y grupos funcionales en sus superficies (Goenka, 2014). Esta gran capacidad de funcionalización y carga de componentes, constituye un gran valor agregado con respecto a otros sistemas, y los esfuerzos en esta materia se han centrado en mejorar principalmente su biocompatibilidad y toxicidad para el uso de aplicaciones *in vivo* (Georgakilas, 2014); en el contexto farmacológico, los materiales basados en grafeno son sustancias xenobióticas, por lo que se requiere de constantes y diversos análisis *in vitro*, para estudiar su biocompatibilidad (Pinto, 2013; Syama, 2016) y para poder utilizar sus propiedades en aplicaciones concretas.

Se sabe que los polifenoles son compuestos producido por las plantas como metabolitos secundarios (Rein, 2013), y diversos estudios han demostrado que tienen efectos beneficiosos para la salud. Por ejemplo, los flavonoides, el mayor grupo de polifenoles de las uvas (pero también presentes en otras

plantas y frutas), presentan propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antibacteriales, anticancerígenas, antibióticas, antivirales, cardioprotectoras, neuroprotectoras, actividades hepatoprotectoras e incluso cicatrizantes de heridas (Dohadwala, 2009; Georgiev, 2014; Fraga, 2010; Dohadwala, 2009; Georgiev, 2014; Lodhi, 2011; 2013; Nayak, 2010; Panico, 2006; Jayaprakasha, 2003; Rhodes, 2006). A pesar de que se ha demostrado que compuestos polifenólicos pueden inhibir la agregación plaquetaria en el plasma sanguíneo (Dohadwala, 2009), también se ha reportado que esta inhibición puede depender de la concentración en el plasma y dosis administrada (Conquer, 1998; Shanmuganayagam, 2002); además, se reportó el uso de compuestos polifenólicos extraídos de la planta de té verde (*Camellia sinensis*) para la detención de hemorragia, disminuyendo significativamente el sangrado en cavidades de encías, causadas por la extracción de dientes, así como la reducción de la posterior secreción (Soltani, 2014). Uno de los flavonoides más comunes son las Proantocianidinas (PAs, flavan-3-oles oligoméricos y poliméricos), compuestos polifenólicos de alto peso molecular (>500 Da). Extractos naturales con alto contenido en PAs pueden ser extraídos y estabilizados desde piel y semilla de uva, por ejemplo, uva País (*Vitis vinifera* L.). Existen reportes donde se ha estudiado la estabilización de compuestos naturales en grafeno y GO (Liao, 2011; Wang, 2017), sin embargo, PAs (o taninos condensados) tales como las extraídas desde uva País no han sido reportados. Por este motivo, en esta investigación se desarrollará un material (aerogel) compuesto de GO, polivinil alcohol (PVA) y extractos de piel y semilla de uva País, para analizar el efecto de las PAs en la capacidad coagulantes del aerogel y su liberación.

Los agentes hemostáticos son complementos que se utilizan para cerrar heridas o lechos quirúrgicos con sangrado activo. Los agentes hemostáticos efectivos que puedan controlar rápidamente el sangrado de heridas o traumatismos, son vitales para la curación de heridas, para una recuperación óptima de la misma o incluso para la supervivencia del paciente, considerando que una hemorragia excesiva puede ser causa de muerte (Alam, H. B., Koustova, E., 2005). Cada uno de estos materiales se diferencia en su mecanismo de acción, costo y modo de aplicación. Algunos materiales hemostáticos, tales como, zeolitas, esmectita, sílices mesoporaosas, o esponjas, se basan en la rápida absorción del componente líquido de la sangre para acelerar la agregación de eritrocitos y plaquetas, lo que promueve la hemostasia (conjunto de mecanismo para detener una hemorragia) (Shukla, 2012; Kozen, 2008 Alam, H.B., D. Burris, 2005; Dai, 2009; 2010; Quan, 2015; 2016); otros, tales como los hechos a base de quitosano promueven la coagulación de la sangre por efecto de la carga eléctrica, es decir, el quitosano con carga positiva atrae a los eritrocitos con carga negativa para formar una capa de coagulo de sangre (Gu, 2010); mientras que otros agentes que incorporan factores propios del mecanismo de coagulación de la sangre (tales como trombina o fibrina) en matrices de gelatinas, hidrogeles, productos a base de celulosa, o la combinación de ellos, su mecanismo de acción se basa, por una parte, en la capacidad de obstruir la herida y por otra parte, en la liberación de componentes propios del sistema de coagulación sanguínea del cuerpo que favorecen la hemostasia

(Traver, 2006; H. de Carvalho, 2013). En el caso de heridas en la piel (agudas o crónicas), los actuales sistemas y tecnologías de curación se centran en mejorar una o más de las etapas del proceso de cicatrización natural de una herida, así como mantener las condiciones favorables para una rápida cicatrización, por ejemplo, la eliminación del exceso de exudado mientras que se mantiene la humedad en el lecho de la herida, o la administración directa de agentes en el sitio de la herida, tales como, antibióticos, vitaminas, minerales, factores de crecimiento y otros aceleradores de cicatrización (Boateng, 2015; Gainza, 2015). La administración directa de estos agentes en el sitio de la herida es deseable, en particular cuando la administración sistémica podría causar daño a órganos debido a los efectos toxicológicos asociados con estos agentes. El apósito ideal debe lograr la curación rápida a un costo razonable, con el mínimo de inconvenientes para el paciente, por lo que surge la necesidad de formulaciones con propiedades mejoradas para la entrega eficaz y precisa de los agentes terapéuticos requeridos.

Recientemente, sobre la base de la capacidad de absorción como mecanismo hemostático, se ha reportado el potencial uso de una aerogel o “esponja” (DCGS) a base de GO reticulada con ácido 2,3-Diaminopropinico (2,3-DapA) en el área de la hemostasia, debido a que esta DCGS porosa no sólo mostró rápida absorción de plasma permitiendo la acumulación de células sanguíneas en su superficie, sino que también DCGS estimuló a eritrocitos y plaquetas para cambiar su forma y estructura normal en la interfaz, lo que promueve aún más la coagulación de la sangre en la superficie de heridas; se demostró que el aumento del grado de oxidación y la densidad de carga negativa fueron fundamentales en la mejora del perfil hemostático (Quan, 2015; 2016; Li, 2016). La información sobre sistemas elaborados en base a GO con potencial hemostático, inspiran a mejorar la eficiencia de estos, en cuanto a su potencial de absorción, capacidad de coagulación y la incorporación de componentes activos que favorezcan la hemostasia e incluso la cicatrización de una herida.

Sobre la base de estos resultados, considerando la fabricación de la DCGS (Quan, 2016) con características adsorbentes y hemostáticas, de fácil preparación, bajo costo, no tóxica y de larga vida útil, considerando la estimulación interfacial a través de la carga negativa como mecanismo de coagulación, y teniendo en cuenta la carga negativa del GO y su versatilidad para combinarse con otros polímeros y formar estructura tridimensionales como un aerogel (o “esponja”), se propuso en este trabajo sintetizar un aerogel en base a GO y polivinil alcohol (PVA) con capacidad de absorción de líquidos, tales como sangre y agua, para analizar su potencial de coagulación e interacción con células sanguíneas, postulando que el PVA, un polímero hidrofílico y de carga negativa, podría favorecer la absorción debido a su característica hidrofílica y también podría estimular eritrocitos y plaquetas a contactarse con la sangre, debido a la presencia de grupos hidroxilos polares en sus cadenas, favoreciendo de esta forma la eficiencia

hemostática de la esponja sintetizada. El tipo de funcionalización entre el GO y el PVA puede ser covalente, a través de un esterificación de los grupos carboxílicos del GO con los grupos hidroxilos del PVA o mediante una unión no covalente, por simple mezcla o reticulación física entre ellos (Linares, 2016); el uso de estas estrategias de inmovilización de GO en las cadenas de PVA, permite modular la biointerfase para reducir los efectos tóxicos del GO y al mismo tiempo mejorar las propiedades mecánicas del compuesto, lo que permite el desarrollo de biomateriales de grafeno/polímero y su aplicación en áreas como Ingeniería de tejidos, implantes óseos y otras aplicaciones biomédicas (Linares, 2016; Zhang, L.W., 2011; Cano, 2013; Cheng, 2012). Además, considerando que el uso de polifenoles podría generar beneficios en el control de hemorragias y/o cicatrización de heridas (Soltani, 2014; Lodhi, 2011; 2013; Nayak, 2010; Jayaprakasha, 2003; Rhodes, 2006; Panico, 2006), se propone en este trabajo analizar el efecto de la incorporación de extractos polifenólicos en la matriz de los aerogel de GO desarrollados, y determinar la capacidad de liberación de los extractos analizando la respuesta del aerogel frente a cambios de pH en el medio. Se utilizarán extractos de piel y semilla de uva País (*Vitis vinífera L.*) ricos en Proantocianidinas (PAs). Estos extractos polifenólicos se utilizarán como compuestos de pruebas, considerando que se pueden incorporar diferentes tipos de compuestos en el aerogel, y que estos polifenoles por diversos motivos podrían presentar problemas en cuanto a su incorporación al aerogel y liberación desde él. Sin embargo, se utilizarán de manera preliminar para estudiar la liberación, y servirán para direccionar en esta materia, para que futuros estudios puedan utilizar otros compuestos similares.

2. ANTECEDENTES GENERALES

En esta sección se presentan los conceptos asociados a la química del grafeno y GO, métodos de síntesis, caracterización y antecedentes de aplicaciones desarrolladas con estos nanomateriales. Por otra parte, se destacan aspectos importantes de la funcionalización de GO con PVA, de la formación de aerogeles en base a GO, las técnicas de caracterización de estos materiales y las propiedades de los extractos polifenólicos. Finalmente se presentan las condiciones para la modelación.

2.1. Carbono

Es uno de los elementos más abundantes en el universo y juega un rol fundamental en la química de los procesos biológicos. El interés general en el Carbono (C) surge de la variedad de formas estructurales en la que este elemento está disponible. Esta variedad resulta de su configuración electrónica que le proporcionan la capacidad de formar diferentes tipos de enlaces de valencia con otros elementos, incluyendo otros átomos de carbono, a través de hibridación de orbitales atómicos dando diferentes conformaciones espaciales. El carbono tiene el número atómico 6 y en su estado fundamental su configuración electrónica ($1s^2 2s^2 2p^2$) le permite formar sólo dos enlaces con otros átomos (dos electrones desapareados). Cuando el átomo de carbono interactúa con otros átomos y se excita, los electrones de un mismo nivel energético pasan de un orbital a otro, es decir, los electrones del orbital 2s son promovidos a un orbital 2p ($1s^2 2s^1 2p_x^1 2p_y^1 2p_z^1$), pues la diferencia energética entre el orbital 2s y 2p es muy pequeña. Entonces, el carbono es un elemento tetravalente, sólo los cuatro electrones desapareados participan en la formación de enlaces químicos covalentes (Warner, 2013). Este reordenamiento de los orbitales puros, para formar enlaces, resulta en la formación de orbitales híbridos. Existen tres hibridaciones posibles, dependiendo de la cantidad de orbitales que intervengan en la formación de enlaces.

En la hibridación sp (figura 2.1), los electrones de 2s se combinan con el orbital 2p_x, dejando los orbitales 2p_y y 2p_z libre y puros, esto genera dos orbitales híbridos del tipo 2sp. Si dos átomos de carbono del tipo sp superponen sus orbitales híbridos 2sp, entonces se forman un enlace σ (C-C) con un ángulo de 180° entre sí debido a repulsión mutua, mientras que los orbitales puros 2p_y y 2p_z darán origen a dos enlaces π ; esta configuración se da en alquinos. En la hibridación sp², se forman tres orbitales híbridos (del tipo 2sp²) formando un plano con separación angular de 120° y con un orbital 2p_z sin hibridar, perpendicular al plano formado por los orbitales hibridados, y disponible para formar enlaces π con otros átomos; esta configuración es característica de alquenos y materiales gráficos. En la hibridación sp³, se forman cuatro

orbitales híbridos (del tipo $2sp^3$) que se distribuyen espacialmente formando un tetraedro de enlaces simples C-C, con una separación de $\sim 109^\circ$ entre átomos; esta configuración se da en alcanos.

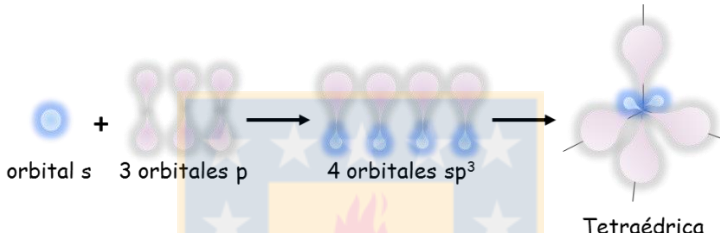
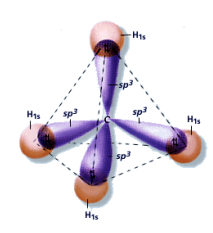
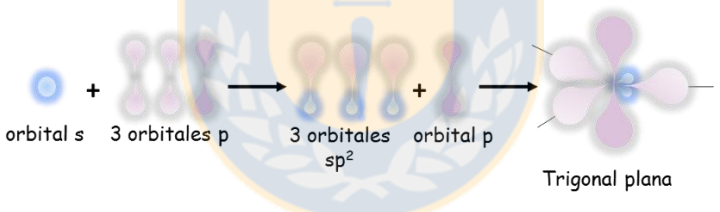
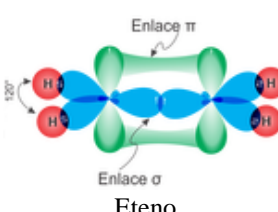
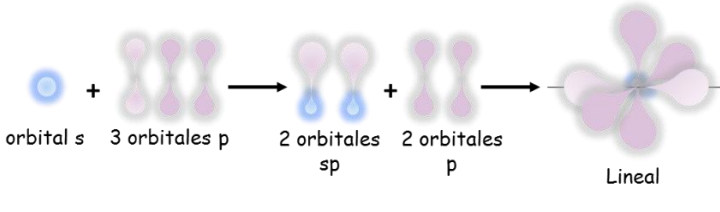
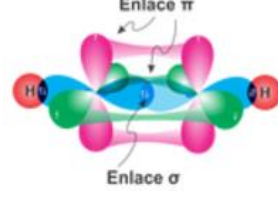
Configuración electrónica	Proceso de hibridación y Geometría	Ejemplo
Estado Fundamental $\uparrow\downarrow \uparrow\downarrow \uparrow \uparrow$ $1s \ 2s \ 2p_x \ 2p_y \ 2p_z$		
Estado Excitado $\uparrow\downarrow \uparrow \uparrow \uparrow \uparrow$ $1s \ 2s \ 2p_x \ 2p_y \ 2p_z$		
Hibridación sp^3 $\uparrow\downarrow \uparrow \uparrow \uparrow \uparrow$ $1s \ sp^3 \ sp^3 \ sp^3 \ sp^3$	 <p>orbital s + 3 orbitales p → 4 orbitales sp^3</p> <p>Tetraédrica</p>	 <p>Metano</p>
Hibridación sp^2 $\uparrow\downarrow \uparrow \uparrow \uparrow \uparrow$ $1s \ sp^2 \ sp^2 \ sp^2 \ p$	 <p>orbital s + 3 orbitales p → 3 orbitales sp^2 + orbital p</p> <p>Trigonal plana</p>	 <p>Enlace π</p> <p>Enlace σ</p> <p>Eteno</p>
Hibridación sp $\uparrow\downarrow \uparrow \uparrow \uparrow \uparrow$ $1s \ sp \ sp \ p \ p$	 <p>orbital s + 3 orbitales p → 2 orbitales sp + 2 orbitales p</p> <p>Lineal</p>	 <p>Enlace π</p> <p>Enlace σ</p> <p>Etino</p>

Figura 2.1. Diagrama de orbitales atómicos e hibridaciones de los átomos de Carbono. Fuente: Elaboración propia.

El carbono es un elemento cuya estructura electrónica es inigualable, pues permite hibridaciones para construir enlaces sp^3 , sp^2 y sp logrando formar los alótopos más estables que cualquier otro elemento pueda formar. Estos están compuestos únicamente por átomos de carbono y se diferencian en el ordenamiento espacial de este átomo. La forma alotrópica de carbono más estable es el grafito (materia

prima de este trabajo), un mineral natural y abundante, que junto con el diamante han sido conocidos desde la antigüedad.

2.2. Grafito

El grafito natural es una forma microcristalina en que se encuentra el carbón naturalmente en depósitos minerales en la tierra. De color gris un poco plateado y textura suave (figura 2.2a). Se caracteriza por ser lubricante, resistente a temperaturas muy elevadas, y muy buen conductor de electricidad, por lo que tiene usos diferentes a otros tipos de carbón.

Su estructura está formada por capas de carbono atómico de hibridación sp^2 que se apilan juntas por fuerzas débiles de van der Waals (figura 2.2b). En el grafito dos de los tres orbitales 2p participan en la hibridación, formando tres orbitales híbridos $2sp$ y el orbital 2p restante sin hibridar se utiliza para formar un enlace π . Por lo tanto, los átomos sp^2 de carbono forman enlaces covalentes en el plano formando la estructura hexagonal plana de grafito y los electrones desapareados y deslocalizados (del enlace π) se pueden mover libremente en este orbital otorgándole al grafito la característica de buen conductor de electricidad en dirección de los planos de los átomos de carbono (Sengupta, 2011). La dureza del grafito se debe a los enlaces covalentes, sin embargo, como las capas se mantienen unidas por fuerzas débiles de van de Waals, se pueden deslizar entre sí. Esta propiedad lo hace útil como lubricante (Chung, 2002). Este acoplamiento tridimensional no es exacto por lo que la distancia interlaminar varía (alrededor de 3,4 Å). Los enlaces σ en el plano de las capas de grafeno (615 kJ/mol) son más fuertes que los enlaces C-C en el diamante de hibridación sp^3 (345 kJ/mol) y los enlaces π interplanares, tienen una energía de enlace significativamente menor, lo que lleva a un fácil cizalle del grafito a lo largo del plano de la capa (material muy anisotrópico). Una sola capa de grafito (las denominadas capas de grafeno) tiene una distancia interatómica entre átomos de carbono vecinos de 1,42 Å y una distancia interplanar entre dos capas de grafeno apiladas adyacentes de 3,35 Å (Warner, 2013).

‘Flake’ grafito es una forma natural de grafito y probablemente la más conocida. Tiene una morfología de escamas o láminas discretas (figura 2.2c) que varían entre 50-800 μm de diámetro y de 1-150 μm de espesor. Todo el grafito tiene en algún nivel una morfología inusual, pero en la mayoría de los casos los flakes de grafito tienen esta estructura, independientemente del tamaño de las partículas. Esta forma de grafito tiene un alto grado de cristalinidad (lo que equivale a cerca de su densidad teórica 2,25 g/cm^3 (Groover, 1997)), alta conductividad térmica y eléctrica, y una baja recuperación elástica (excelentes características de moldeo). Las calidades comerciales están disponibles en purezas entre 80-99,9% de

carbono y los tamaños de 2-800 μm . En base a estas características del grafito en escamas, se seleccionó como materia prima de este trabajo.

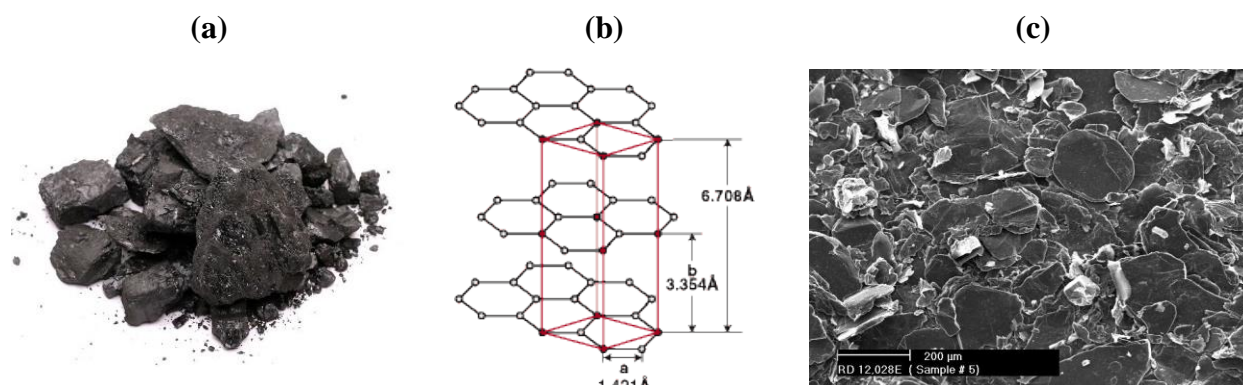


Figura 2.2. Grafito (a) Natural, (b) Estructura atómica, (c) SEM de escamas de grafito. Fuente: Páginas web varias.

2.3. Poli vinil alcohol (PVA)

El PVA (figura 2.3) es un polímero sintético, semicristalino, hidrófilo $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$, sintetizado por polimerización de acetato de vinilo a poli acetato de vinilo (PVAc) y la posterior hidrólisis a PVA; esta reacción es incompleta resultando en un polímero con grado de hidrólisis variable. PVA comercial está disponible en altos grados de hidrólisis (>98,5%) y parcialmente hidrolizados (entre 80,0 y 98,5%). El grado de hidrólisis o el contenido de grupos acetato en PVA afecta a sus propiedades químicas, solubilidad y capacidad de cristalización (Mansur, 2008). Ha sido explorado como un material de implante en aplicaciones biomédicas tales como administración de fármacos, membranas de diálisis, vendaje de heridas, piel artificial, dispositivos cardiovasculares y reparaciones quirúrgicas debido a su excelente biocompatibilidad y baja toxicidad (Kamoun, 2015). Se considera un material compatible, pero con relativamente baja biodegradabilidad y bioactividad, en comparación con óxido de polietileno (PEO), ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) y otros. Hidrogeles de polivinil alcohol (PVA) se han propuesto para uso como biomateriales en aplicaciones biomédicas e Ingeniería de tejidos*, pero sus bajas propiedades mecánicas y de retención de agua han obstaculizado su uso. En este trabajo se explorará la funcionalización del GO con PVA en busca de formar un hidrogel para la generación de aerogeles compuestos GO-PVA.

* Es un campo de investigación y desarrollo interdisciplinario que aplica los conocimientos de la bioingeniería, ciencias de la vida, química física y biología, para resolver problemas clínicos y quirúrgicos asociados a la pérdida de tejidos o al fallo funcional de órganos. Las especies normalmente implicadas en ésta área son células vivas, así como sus componentes extracelulares que participan en el desarrollo de dispositivos que permitan y estimulen o favorezcan la reparación o restauración de un órgano o tejido dañado. Generalmente, se desarrollan estructuras elaboradas a partir de materiales poliméricos.

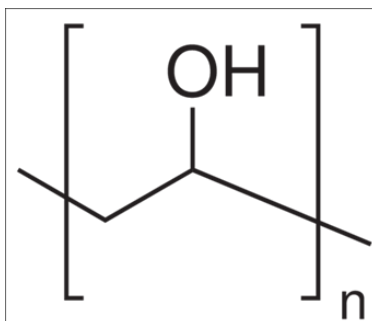


Figura 2.3. Estructura química del poli vinil alcohol. Fuente: Elaboración propia.

2.4. Óxido de grafeno (GO)

El óxido de grafito (GfO) es un material obtenido a partir de grafito tratado con un oxidante fuerte, con el objetivo de funcionalizar sus planos basales y aumentar el espacio entre capas intermedias. Formado por carbono, oxígeno e hidrógeno en proporciones variables, el producto con mayor grado de oxidación es un sólido amarillo y las razones C/O superan la unidad (Poh, 2012); la estructura en capas del grafito se mantiene, pero con capas distorsionadas, irregulares y separadas parcial o completamente. Óxido de grafito puede dispersarse en agua o medios orgánicos polares y ser exfoliado para formar óxido de grafeno (GO) (monocapa o pocas capas), ya que la funcionalidad de la superficie, en particular en medio básico, debilita en gran medida las interacciones entre láminas, debido a su hidrofilia (Dreyer, 2010). Químicamente, el GO y GfO son prácticamente lo mismo, pero estructuralmente son muy diferentes. En estricto rigor, el GO es una lámina de grafeno funcionalizada con grupos oxigenados (figura 2.4a); sin embargo, experimentalmente es muy difícil aislar láminas de grafeno u GO y generalmente desde un proceso de síntesis, se obtiene una distribución de GO con diferentes números de capas (Liao, 2010) y esto depende principalmente del grado de oxidación y el tipo de método de exfoliación utilizado. Usualmente para diferenciar en el número de capas, se habla de: láminas de GO o grafeno (monocapa), bi o tri capas, pocas capas (2-5 láminas), multicapas (2-10 láminas) o nanoplacas de grafitos (material de grafito 2D, con espesores y/o dimensiones laterales menores a 100 nm) (Bianco, 2013). Espesores de alrededor de 1 nm en muestras de GO, indican la presencia de monoláminas, cuyo valor corresponde a la suma del espesor de una lámina de grafeno más los grupos funcionales superficiales. Liao y *col.* (2010) reportan, para una muestra, espesores de monocapas de GO de 0,6 a 1,2 nm (65%), bicapas de 1,2 a 2,4 nm (27%) y multicapas de >2,4 nm (8%), con un diámetro promedio de ~300 nm.

No existe una estructura única de GO, debido a la complejidad de este material. Por una parte, su característica amorfa, no estequiométrica, variabilidad entre muestras, dependencia del tipo de producción y, por otro lado, la falta de métodos y técnicas de análisis precisos para caracterizarlo, hacen que la estructura del GO sea todavía controversial. Las propiedades físicas fundamentales del GO dependen de

su estructura, defectos, proporción y disposición de grupos oxigenados en él, y por este motivo se han utilizado diferentes técnicas experimentales y se han desarrollado simulaciones computacionales para investigarlas. Caracterizaciones experimentales han demostrado que los grupos epóxidos e hidroxilos son los principales grupos funcionales en el plano basal del GO (Cai, 2008). Existen reportes de modelos estructurales propuestos (Dreyer, 2010), que han permitido comprender a nivel atómico el GO y ayudar a explicar algunas propiedades fisicoquímicas observadas experimentalmente. La evolución de los modelos ha ido acompañada de un respaldo de mediciones experimentales basado principalmente en técnicas espectroscópicas. Uno de los modelos ampliamente aceptado es el de Lerf-Klinowski (figura 2.4a) (Lerf, 1998; He, 1998) que propone una estructura con epóxidos e hidroxilos ordenados y encadenados al plano basal de grafeno (considerado termodinámicamente estable para GO), con bordes de las capas terminados en ácidos carboxílicos; en la figura 2.4a, se observa que el modelo de Lerf-Klinowski para el GO muestra variaciones respecto a la ambigua presencia (izquierda) (Lerf, 1998) o ausencia (derecha) (He, 1998) de los ácidos carboxílicos (y otros grupos minoritarios como carbonilos y ésteres) en la periférica del plano basal de las láminas de GO. Sin embargo, otros tales como el modelo Dékány, se han propuesto como alternativas (Szabó, 2006).

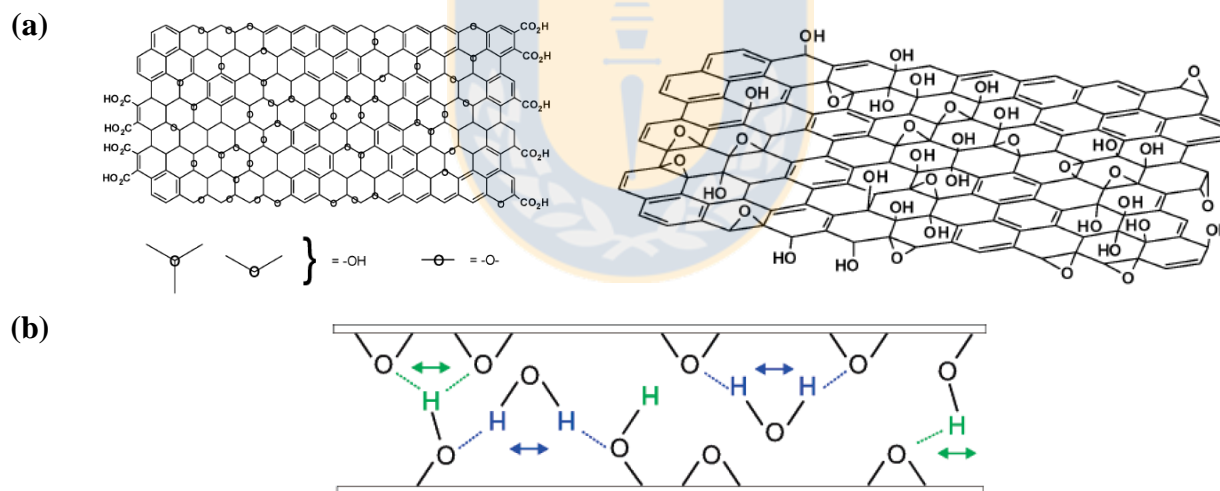


Figura 2.4. Estructura del óxido de grafeno **(a)** Modelos de estructura atómica del GO **(b)** Modelo de la dinámica de óxido de grafito. Fuente: Adaptado desde (Lerf, 1998; He, 1998; Buchsteiner, 2006).

Recientemente, se ha mostrado evidencia de la existencia de contaminantes que se absorben en la superficie del GO impidiendo la observación clara y directa de la estructura atómica intrínseca de este mediante TEM (Dave, 2016), método que ha sido normalmente utilizado para este propósito. Mediante calentamiento in situ dentro de un TEM, se observó que a medida que la temperatura aumenta ($>500^{\circ}\text{C}$), los adsorbatos se desprenden del GO, permitiendo tomar imágenes de su estructura, observándose

pequeños dominios cristalinos de 2-4 nm en la capa policristalina (red sp^2) de GO, defectos o nanoporos que son intrínsecos al material y que se contraponen ligeramente a las observaciones directas de GO que muestran una estructura con regiones sp^2 mayores y con zonas más pequeñas de material amorfo y/o defectos. Esta evidencia apoya modelos alternativos de la estructura de GO, tales como el “modelo de Dékány”, o el “modelo de estructural dinámico” (DSM) (Dimiev, 2013). A pesar de que el origen de los contaminantes no es claro, se cree que podría ser una combinación tanto de hidrocarburos presentes en el aire y, en menor medida, de subproductos del proceso de oxidación.

Además, estos contaminantes superficiales reaccionan con la alta energía del haz de electrones, dando lugar a cambios estructurales que no representan la estructura intrínseca del GO y podrían conducir a resultados mal interpretados. Estos resultados indican que cualquier forma de espectroscopia llevada a cabo a temperatura ambiente, mide tanto los contaminantes como los grupos funcionales unidos directamente al plano basal del GO, que a pesar de que hasta ahora no es posible desacoplarlos se destaca la importancia de esta observación en cualquier trabajo con GO.

2.4.1. Propiedades y aplicaciones

GO ha sido considerado como un material anfifílico con bordes hidrofílicos y planos basales hidrofóbicos. El GO con grupos carboxilos, hidroxilos y epóxidos en su superficie es capaz de formar dispersiones relativamente estables en agua (Chowdhury, 2013). La repulsión electrostática, previene la agregación de las láminas de GO, por lo tanto, la estabilidad de una suspensión de GO depende del pH debido a los diferentes grados de ionización de los grupos funcionales en la superficie. A valores de pH más altos, mayores cantidades de grupos funcionales en la superficie se ionizan y la dispersión se vuelve más estable electrostáticamente (Zang, 2014). A pH más bajo, los grupos funcionales son protonados y las láminas de GO individuales forman agregados, y se ha demostrado que las interacciones hidrofóbicas son las principales en propiciar el acercamiento y provocar la agregación, controlando tanto la cinética como la termodinámica (Tang, 2016). Las diferentes formas de dispersión del GO pueden explicarse por el tamaño y grado de oxidación del material. GO de menor tamaño y razones C/O, muestran una mejor dispersión debido a la menor atracción de fuerzas de Van der Waals y una mayor repulsión electrostática (Luo, 2010). El comportamiento del agua en GO también se ha confirmado en caracterizaciones, mostrando que las moléculas de agua están fuertemente unidas al plano basal e interlaminar de GO (Buchsteiner, 2006) a través de interacciones de enlace de hidrógeno con el oxígeno de los epóxidos e hidroxilos del GO (figura 2.4b, flechas indican posibles movimientos de las moléculas de agua (Buchsteiner, 2006)).

El óxido de grafito, precursor de GO, fue sintetizado por primera vez por el químico Benjamin C. Brodie en Oxford en 1859, tratando grafito con una mezcla de clorato de potasio y ácido nítrico fumante (Brodie, 1959). En 1957 Hummers y Offeman desarrollaron un método más seguro, rápido y eficiente usando una mezcla de H_2SO_4 , NaNO_3 y KMnO_4 , que sigue siendo el método más utilizado, normalmente con algunas modificaciones (Hummers, 1958; Marcano, 2010). Los óxidos de grafito tienen propiedades físicas y químicas distintas dependiendo del grado de oxidación del grafito y el método de obtención. El GO se obtiene por exfoliación de GfO; existen diferentes métodos de exfoliación, comúnmente se aplica ultrasonido a dispersiones de óxido de grafito para separar las láminas. El GO también puede ser reducido por distintos métodos (Pei, 2012), que consisten en la remoción de grupos oxigenados desde el GO. Esta reducción se hace con el objetivo de obtener láminas lo más prístinas y cercas a grafeno posibles. Se han realizado numerosos esfuerzos, pero el objetivo todavía no puede cumplirse, pues los grupos funcionales residuales y defectos alteran drásticamente la estructura del plano de carbono, por lo tanto, no se puede hacer referencia al óxido de grafeno reducido (rGO) simplemente como grafeno ya que las propiedades son sustancialmente diferentes.

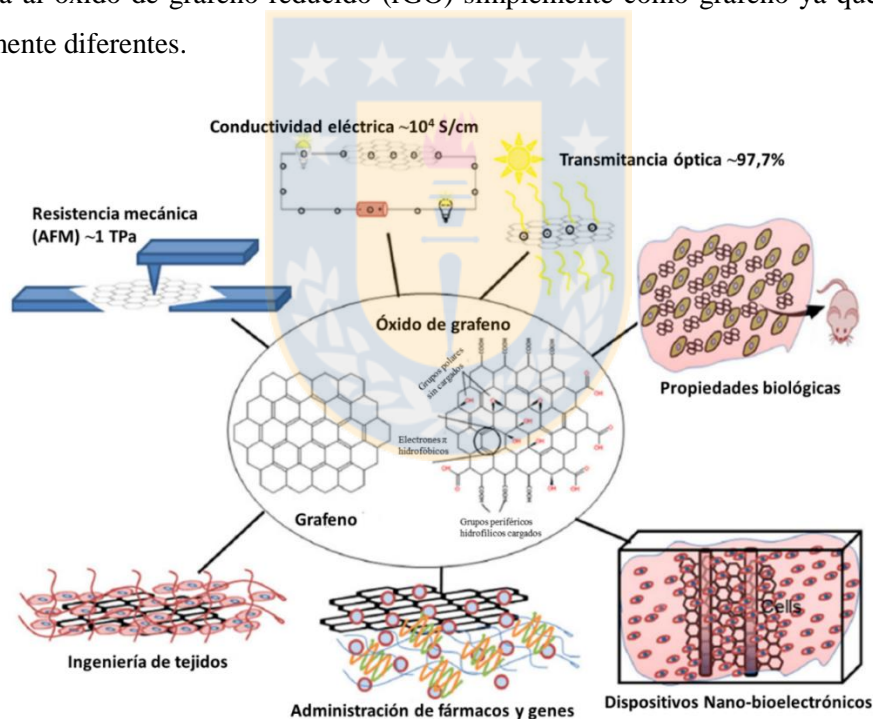


Figura 2.5. Esquema general de diferentes aplicaciones del grafeno y óxido de grafeno. Fuente: Adaptado desde (Goenka, 2014).

El GO ha sido investigado en varias aplicaciones biomédicas y no biomédicas, debido a que presenta excelentes propiedades fisicoquímicas, mecánicas, ópticas y electrónicas (figura 2.5), conferidas, por una parte, por su estructura de grafeno y, por otra parte, por sus grupos funcionales oxigenados localizados en el plano basal o bordes. GO y GfO contienen una serie de grupos funcionales de oxígeno reactivos, lo que

permite funcionalizaciones químicas, favoreciendo su uso en diferentes aplicaciones, tales como electrónica, óptica, conversión de energía y almacenamiento, ciencias ambientales y biotecnología. El GO permite funcionalizaciones por diferentes métodos (covalente o no covalente) que consisten en la adición de otras funcionalidades químicas al GO, lo que conduce a la modificación de alguna propiedad o característica del GO, dependiendo de la aplicación que se le quiera dar (Georgakilas, 2014). Por lo tanto, GO es un elemento importante para la síntesis de diversos materiales funcionales.

2.4.2. Síntesis de GO

Durante los últimos años se han desarrollado diferentes técnicas para producir grafeno y óxido de grafeno (Whitener, 2014). La síntesis de ellos ha evolucionado principalmente en aspectos como la búsqueda de métodos fáciles y escalables, de bajos costos de producción, buen rendimiento y, dependiendo de la aplicación, se requiere mayor calidad y/o área específica del producto. Por otro lado, para integrar el GO y/o el grafeno en cualquier aplicación, es esencial contar con un método de producción que sea simple, controlable, reproducible y limpio. Los métodos más usados para producir óxido de grafito utilizan ácidos concentrados en presencia de oxidantes fuertes. Existen 3 métodos estándar de oxidación los cuales utilizan: (a) Método de Staudenmaier, ácido sulfúrico en combinación con ácido nítrico fumante y KClO_3 (b) Método de Hofmann, ácido sulfúrico en combinación con ácido nítrico concentrado y KClO_3 y (c) Método de Hummers, ácido sulfúrico en presencia de NaNO_3 y KMnO_4 . Estos métodos logran diferentes grados de oxidación y espaciamiento entre las láminas de grafeno, lo que influye en las propiedades del óxido de grafito. El Método de Hummers es el que logra el mayor espacio entre láminas lo que concuerda con el mayor grado de oxidación (Poh, 2012). Además, este método requiere menor tiempo y es más seguro (mientras se tenga cuidado con las limitaciones de temperatura) en comparación a los otros. Se puede obtener óxido de grafito con un rango estequiométrico de C/O que depende de los detalles particulares de la síntesis (Liao, 2010). De acuerdo con (Wu, 2013) el rendimiento de esta reacción depende, entre otras cosas, de la razón $\text{NaNO}_3/\text{KMnO}_4$, la velocidad de adición de agua, tiempos y temperaturas de reacción. La velocidad de oxidación depende de la cristalinidad del grafito de partida (Chen, 2015), obteniéndose una oxidación incompleta de grafito cuando su tamaño de partícula es muy grande.

De las opciones disponibles, en este trabajo se optó por producir GO a partir de oxidación de grafito por el método de Hummers, seguido de exfoliación en solución acuosa con ultrasonido (figura 2.6), lo que

permite sintetizar GO a un menor costo y calidad; este método es ampliamente utilizado en aplicaciones biológicas.

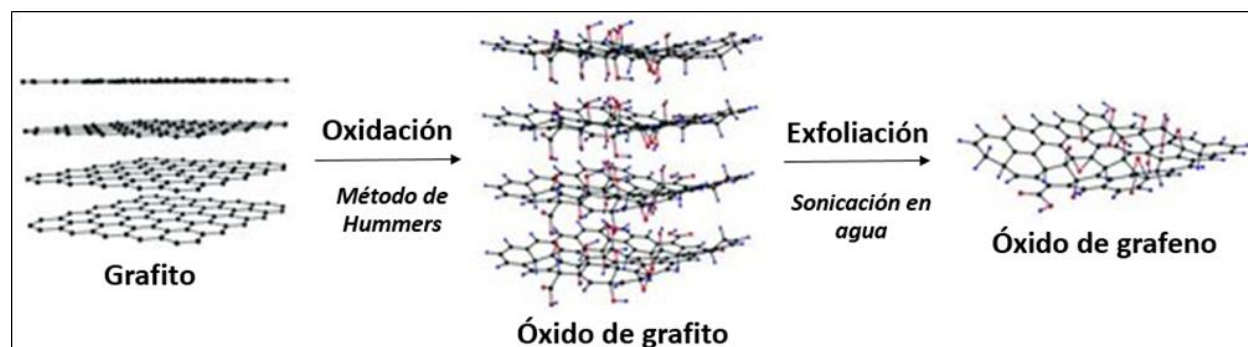


Figura 2.6. Esquema de proceso de obtención de óxido de grafeno. Fuente: Elaboración propia.

2.4.3. Funcionalización de GO

En aplicaciones biológicas y biomédicas, GO ha sido reportado por numerosos estudios, donde se analiza su potencial uso como plataforma para inmovilizar un gran número de sustancias, tales como, fármacos, pequeñas moléculas, anticuerpos, ADN, proteínas y genes (Liu, 2013); sin embargo, la funcionalización de GO es necesaria para la formulación de un sistema eficaz en cuanto a la capacidad de incorporación y liberación de estos compuestos y para mejoras en sus características de biocompatibilidad y toxicidad. Así, GO puede ser funcionalizado por diferentes métodos (Covalente o No covalente), lo que consiste en la adición de otras funcionalidades químicas (polímeros, compuestos orgánicos, nanopartículas, entre otras) que lo conduce a la modificación de alguna propiedad o característica de él, dependiendo de la aplicación que se le quiera dar. Se han explorado y establecido dos métodos principales para la modificación de la superficie de GO. La modificación de la superficie de GO mediante método covalente se logra normalmente a través de un enlace químico, gracias a la presencia de defectos y grupos oxigenados reactivos como sitios ideales para reaccionar. En cambio, modificaciones No covalentes emplean uniones, tales como, fuerzas de van der Waals, interacciones electrostáticas, enlaces hidrógeno, enlaces de coordinación e interacciones π - π , sin afectar la estructura natural del GO; se pueden conseguir mediante reticulación física con algún polímero, adición de agentes tensoactivos o pequeñas moléculas, o las interacciones con biomoléculas, tales como ADN o péptidos (Georgakilas, 2014).

GO está compuesto por un gran número de grupos de ácidos carboxílicos que por lo general se encuentran cerca de los bordes de las láminas. Los ácidos carboxílicos pueden reaccionar: (i) con aminas o moléculas orgánicas y polímeros que llevan grupos amina, a través de la formación de enlaces amida, (ii) alcoholes, fenoles, y epóxidos forman enlaces de éster, y (iii) varios otros compuestos reactivos orgánicos resultando

en la funcionalización orgánica de GO. La unión covalente de PVA a GO, ha sido informada por Salavagione y *col.* (2009), a través de una reacción de esterificación utilizando los grupos carboxílicos de GO y los grupos hidroxilo en PVA, utilizando dos estrategias de síntesis diferentes: (1) mediante esterificación directa y (2) mediante un derivado de cloruro de acilo (transformación de carboxilatos de los cloruros de acilo); demostrando que los enlaces covalentes entre GO y PVA son responsables de importantes alteraciones de la estabilidad térmicas (TGA mostró aumento en la estabilidad térmicas de los compuestos GO/PVA); el GO funcionalizado fue altamente dispersable en agua y en dimetil sulfóxido. Cheng y *col.* (2012) han informado sobre la funcionalización covalente de GO con PVA mediante reacción de esterificación de carbodiimida (Figura 2.7, formación de enlace ester entre los grupos hidroxilos del PVA y los grupos carboxílicos del GO), mediante el uso de N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) como catalizadores de la reacción y Dimetil sulfóxido (DMSO) como dispersante. De acuerdo a los estudios reportados por Cano y *col.* (2013), quienes utilizaron compuestos en base a GO funcionalizado covalentemente con PVA mediante esterificación de grupos carboxílicos de GO con los grupos hidroxilos de PVA, de diferentes pesos moleculares (entre 6 y 500 kg/mol), las propiedades mecánicas de estos compuesto mejoran significativamente con este tipo de unión, en comparación con GO y con simples mezclas de GO y PVA (unión física); en este sentido, los mejores resultados los obtuvieron para compuestos con peso molecular entre 50 y 150 kg/mol; además, mejoras de hasta 60% en el módulo de Young (módulo de elasticidad) y 400% en resistencia a la tracción (“tensile strength”), con respecto a GO prístino.

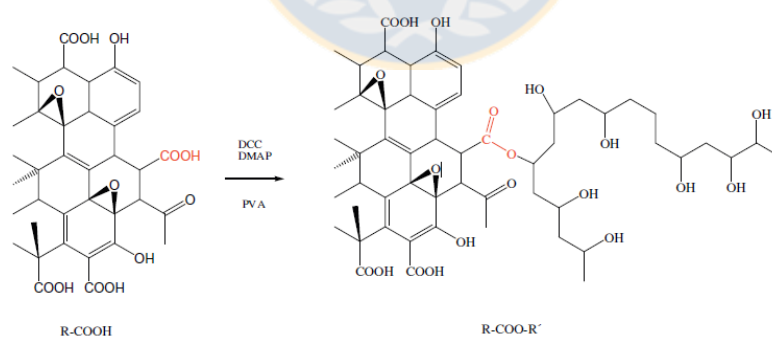


Figura 2.7. Funcionalización de óxido de grafeno (GO) con polivinil alcohol (PVA) mediante método de unión Covalente: reacción de esterificación de carbodiimida activada. Fuente: (Cano, 2013).

Por otro lado, los grupos funcionales oxigenados del GO sirvieron para la reticulación física de hidrogeles (Bai, 2010; 2011; Zhang L., Wang Z., 2011; Sridhar, 2010). Bai y *col.* (2010) informaron la formación de un hidrogel compuesto GO-PVA (mediante unión física) sensible al pH para la liberación de vitamina B12 a pH fisiológico; el hidrogel sintetizado por simple mezcla de los componentes, resultó tener mayor

resistencia mecánica en medio ácido que neutral (módulo de almacenamiento de ~200 a 1000 Pa, respectivamente) y fue capaz de liberar hasta el 84% del compuesto incorporado (vitamina B12) en una solución neutra ($\text{pH} \approx 7,4$) al cabo de 42 horas, versus un 51% en solución ácida ($\text{pH} \approx 1,7$); se cree que enlaces hidrógeno y fuerzas electrostáticas entre las láminas de GO y cadenas de PVA fueron responsables de la formación del hidrogel. Este método de unión simple, ha sido replicado por otros autores, tales como, Zhang y *col.* (2011) quienes agregaron GO a PVA para generar hidrogeles compuestos con mejoras significativas en propiedades mecánicas, en comparación a hidrogeles de PVA, con un aumento de 132% en la resistencia a la tracción y del 36% en resistencia a la compresión, con la adición de 0,8% en peso de GO; además estos hidrogeles compuestos no afectaron la toxicidad de PVA a células de osteoblastos. Un estudio realizado por Bai y *col.* (2011) sobre auto ensamblaje tridimensional de láminas de GO en medio acuoso para formar hidrogeles, mostró que en el proceso de gelificación puede ser impulsado por diferentes interacciones supramoleculares, tales como, enlaces hidrógeno, π -apilamiento, interacciones electrostáticas y coordinación. La gelificación de GO es controlada por la relación de la fuerza de la repulsión electrostática y la fuerza de unión entre las hojas de GO, así como también por la influencia de las dimensiones laterales del GO y el tipo de agente reticulante. Se observaron bajas concentraciones de gelificación crítica y diferentes comportamientos en respuesta al medio. La formación de hidrogeles compuestos GO-polímero está controlada por varios factores, tales como, concentración de GO, pH, y concentración y razón molar del polímero. Se confirmó que las interacciones electrostáticas son más eficaces que los enlaces hidrógeno en la gelificación de GO con polímeros reticulantes; esto se debe a que la interacción electrostática es una fuerza de largo alcance y por lo general, es más fuerte que la de un enlace hidrógeno (Bai, 2011).

El desarrollo de la nanotecnología y la amplia utilización de grafeno y GO conjugado con polímeros biocompatibles, hacen que sea imprescindible evaluar los efectos biológicos potencialmente adversos de nanocompuestos poliméricos-GO. En este sentido, Linares y *col.* (2016) evaluaron diferentes parámetros de biocompatibilidad y los efectos producidos sobre los osteoblastos humanos, de dos compuestos GO-PVA sintetizados mediante funcionalización covalente y no covalente de GO, y demostraron la importancia de la unión covalente, ya que, ambos compuestos reducen el retardo de la proliferación y las alteraciones de las células inducida por GO sobre osteoblastos humanos, sin embargo, la unión covalente de GO a las cadenas de PVA aumento los niveles de viabilidad celular (ANDIL-6) y los niveles de interleucina-6 (IL-6), indicando un aumento en la respuesta protectora, lo que reduce la apoptosis y el contenido de especies reactivas de oxígeno (ROs, que inducen el estrés oxidativo), cuando se compara a la simple mezcla de ambos materiales (Figura 2.8).

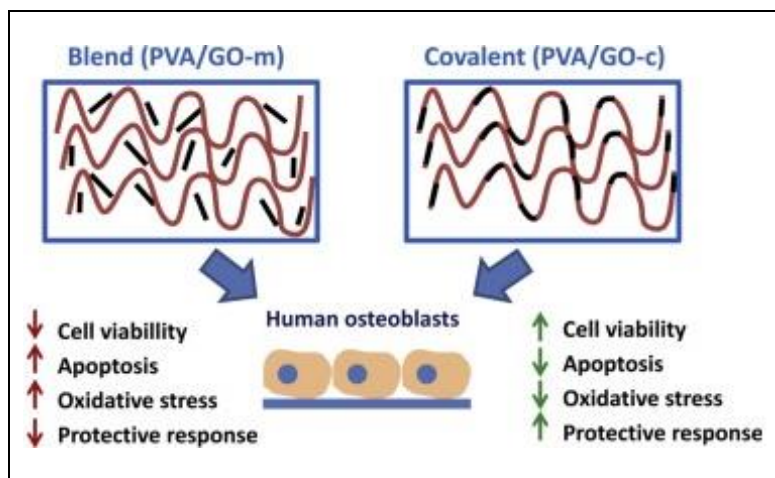


Figura 2.8. Diferencias entre unión covalente y no covalente de Polivinil alcohol (PVA) con óxido de grafeno (GO). Fuente: (Linares, 2016).

Por lo tanto, el uso de esta estrategia de inmovilización de GO en las cadenas de PVA, permite modular la biointerfase para reducir los efectos tóxicos de grafeno preservando al mismo tiempo las características de refuerzo mecánico, para el desarrollo de biomateriales de grafeno/polímero y su aplicación en ingeniería de tejidos, implantes óseos y otras aplicaciones biomédicas. En base a esta información, se optó por realizar en este trabajo ambos tipos de funcionalizaciones, para comparar y analizar diferencias significativas que puedan presentar. Se utilizará un PVA de peso molecular promedio de 85-124 kg/mol, el cuál presentó resultados positivos en cuanto a la gelificación de hidrogeles GO-PVA mediante unión física (Mellado, 2016); la unión covalente de GO con PVA se realizará mediante esterificación, de acuerdo a la metodología reportada por Cheng y *col.* (2012) y Linares y *col.* (2016), con algunas modificaciones.

2.4.4. GO integrado como estructuras tridimensionales

Las láminas de grafeno y sus derivados pueden ser utilizados para formar estructuras tridimensionales (3D) autoensambladas de ellas. En una solución de GO existe un equilibrio de fuerzas entre las atracciones de van de Waals de los planos basales y las repulsiones electrostáticas de los grupos funcionales de las láminas; cuando este equilibrio se rompe, por ejemplo, cambiando el pH de la dispersión (Bai, 2011), la adición de reticulantes (Bai, 2010) o por efecto del ultrasonido (Compton, 2012), puede ocurrir gelificación (Tang, 2017). Se ha informado sobre hidrogeles poliméricos con óxido de grafeno (Huang, 2012; Zhang N., Li, 2011) preparados con monómeros mediante polimerización *in situ* y químicamente reticulado en presencia de láminas GO y agua, donde GO actuó como carga de refuerzo; se observó que la

resistencia a la compresión de un hidrogel de poliacrilamida aumentó en seis veces con la adición de sólo 1% en peso de GO (Zhang N., Li, 2011). Pero también, los grupos funcionales oxigenados del GO sirven para la reticulación física de hidrogeles, es decir, una unión no covalente (Bai, 2010; 2011; Zhang L., Wang, 2011; Sridhar, 2010); La adición de un agente de reticulación en una dispersión de GO, funcionaliza las superficies de grafeno y mejora las interacciones entre las láminas de GO; Bai y *col.* (2010) fueron los primeros en reportar una reticulación con polivinil alcohol (PVA), que promueve el proceso de gelificación de una dispersión GO para formar estructuras 3D de GO.

Aerogeles de óxido de grafeno se pueden armar a través de la formación de reticulación físicas entre las láminas de GO utilizando química sol-gel, que implica la formar un hidrogel altamente reticulado, que puede entonces ser liofilizado o por secado supercríticos con CO₂, para formar un aerogel de GO. Se ha informado que los hidrogeles pueden transformarse en aerogeles por métodos sencillos, por ejemplo, Hu y *col.* 2013, desarrollaron aerogeles ultraligeros de GO (hasta 3 mg/cm³), altamente compresibles (con estructuras que pueden recuperarse por completo sin fracturas después al aplicarles compresión de hasta 90%) y altamente porosos, utilizando una funcionalización de GO con Etilendiamina (EDA) y posterior reducción de GO. Estas estructuras 3D en forma de espumas, esponjas o aerogeles, en base a GO o grafeno han llamado la atención debido a que son materiales que presentan características absorbentes, de baja densidad, alta porosidad, altas superficies específicas, resistencia mecánica, entre otras (Ma, 2015), por lo que pueden tener aplicaciones en diversas áreas, tales como, catálisis, absorbentes de contaminantes orgánicos e iones metálicos, biosensores y dispositivos de detección de gases, almacenamiento y conversión de energía, y aplicaciones biológicas.

Con respecto a aplicaciones biológicas y biomédicas, Quan y *col.* (2015) han reportado la fabricación de la primera esponja (aerogel) en base a GO unida a EDA, con características adsorbentes y hemostáticas, de fácil preparación, bajo costo, no tóxica y de larga vida útil (Figura 2.9). La CGS fue capaz de absorber plasma sanguíneo rápidamente (<40 ms por gota de sangre) formando una capa de células sanguíneas en la superficie de la CGS, las cuales promueven la posterior coagulación; el estudio de la interface, reveló que la rápida coagulación de la sangre se atribuye principalmente al enriquecimiento de hemocitos y plaquetas en la superficie de la herida (ensayos *in vivo* con ratas); además, la capacidad de coagulación fue corroborada en ensayos *in vitro* con sangre. En su posterior trabajo, Quan y *col.* (2016) utilizaron ácido 2,3-Diaminopropionico (2,3-DapA) en vez de EDA para preparar la esponja de GO (DCGS, DapA crosslinked graphene sponge) y comprobaron que la DCGS carboxil-funcionalizada, no sólo puede absorber rápidamente plasma, sino que también estimula a eritrocitos y plaquetas para cambiar su forma y estructura normal en la interfaz, lo que afecta el metabolismo y biofunción de estos componentes,

promoviendo aún más la coagulación de la sangre; se descubrió que el aumento del grado de oxidación y la densidad de carga negativa fueron fundamentales en la mejora del perfil hemostático.

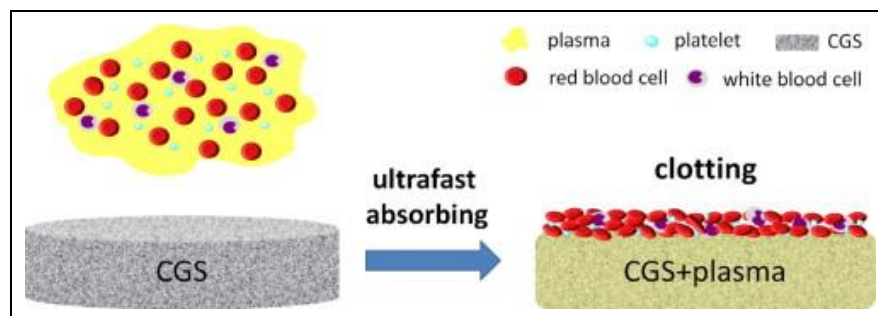


Figura 2.9. Esponja ultra absorbente y con propiedades hemostáticas (CGS, Cross-linked graphene sponge). Fuente: (Quan, 2015).

Considerando estos resultados, y las características de preparación de aerogeles en base a GO, se propuso en este trabajo sintetizar un aerogel en base a GO funcionalizado con PVA e incorporarle extractos naturales ricos en Polifenoles para analizar su potencial de absorción y desorción, con el objetivo de generar un material con potencial uso en el tratamiento de traumas y/o heridas.

2.5. Uso de Polifenoles

2.5.1. Características químicas de los polifenoles

Los polifenoles son compuestos que poseen uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo bencénico, que pueden incluir derivados funcionales como ésteres y glicósidos. Son producidos, por las plantas como metabolitos secundarios los cuales participan en sus procesos, como el crecimiento, lignificación, pigmentación, polinización y resistencia contra patógenos, predadores y estrés medioambiental. Las plantas comestibles, proveen a la dieta humana más de 8000 diferentes polifenoles que, dependiendo del número de anillos fenólicos que posean, y el tipo y número de elementos estructurales unidos al anillo, pueden ser agrupados en dos grupos: compuestos flavonoides y compuestos no flavonoides (Fraga y *col.*, 2010). Los flavonoides es el grupo más común de los polifenoles, poseen una estructura común $C_6-C_3-C_6$ (difencilpropano), consistente en dos anillos aromáticos, A y B, unidos a través de una cadena de 3 carbonos, usualmente organizada como un heterociclo oxigenado (anillo C) (figura 2.10). Los flavonoides pueden ser divididos en varias subfamilias, de acuerdo al grado de oxidación del heterociclo oxigenado:

flavanoles, flavanonas, flavones, flavanoles (esencialmente, flavan-3-oles), isoflavonas y antocianidinas (los más relevantes para la dieta humana) (Fraga y *col.*, 2010). Los flavanoles son, estructuralmente, la subclase más compleja entre los compuestos flavonoides, que van desde los monómeros (+)-catequita y su isómero (-)epicatequina, a las oligoméricas y poliméricas proantocianidinas, las cuales son también conocidas como taninos condensados (Jaganath y *col.*, 2009).

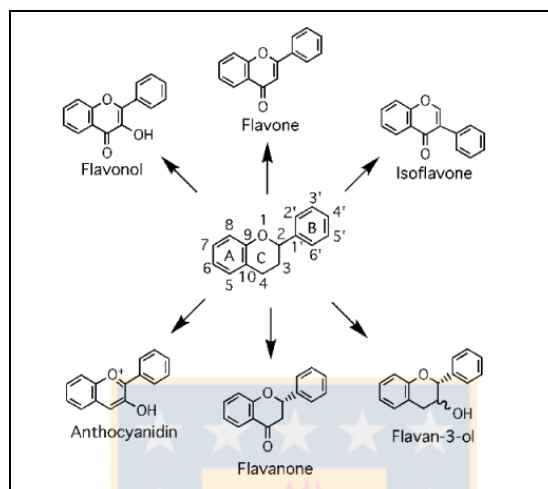


Figura 2.10. Representación estructural básica de compuestos fenólicos flavonoides (al centro) y principales subfamilias de los compuestos flavonoides (en la periferia). Fuente: (Jaganath, 2009).

2.5.2. *Propiedades de polifenoles*

Diferentes estudios indican que los polifenoles y, por ende los flavonoides, tienen efectos beneficiosos sobre la salud humana, y que la ingesta de alimentos ricos en ellos, se ha asociado, en experimentos con humanos y animales, a disminuciones en: i) dislipidemia y aterosclerosis, ii) disfunción endotelial e hipertensión; iii) la activación de plaquetas y trombosis, iv) proceso inflamatorio asociado con la inducción y la perpetuación de enfermedades cardiovasculares (CVD) (Fraga, 2010; Dohadwala, 2009; Georgiev, 2014; Lodhi, 2011; 2013; Nayak, 2010). Dentro de las propiedades de los polifenoles destacan su capacidad antioxidante, cicatrizante de heridas, anti-inflamatorias, bactericidas, entre otras.

La planta *Martynia annua* (*M. annua*) Linn., es una herbácea ramificada, compuesta de glucósidos, taninos, carbohidratos, fenoles, flavonoides y antocianinas; su extracto presenta propiedades antiinflamatorias y fungicidas (contra *Alternaria alternata* y *Aspergillus niger*). Lodhi y *col.* (2011) demostraron el potencial de cicatrización de heridas de fracciones de extracto etanólico de hojas de *M. annua*, como resultado de su aplicación en dos modelos: escisión e incisión en ratas. Luego, Lodhi y *col.* (2013) evaluaron el potencial cicatrizante de fracciones de flavonoides de hojas de *M. annua* Linn. y

luteolina en ratas diabéticas; sus resultados indicaron que la fracción de flavonoides y luteolina (0,5% peso, uno de los flavonoides más comunes, 2-(3,4-Dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-4-cromenona) pueden beneficiar la cicatrización de heridas en condiciones diabéticas, posiblemente debido a la actividad de eliminación de radicales libre de la planta. Nayak y col. (2010) evaluaron la actividad cicatrizante de polvo de piel de uva (*L. Vitaceae*) usando un modelo de heridas de escisión en ratas; sus resultados mostraron un aumento de la velocidad de contracción de la herida, del contenido de hidroxiprolina, y disminución del tiempo de la epitelización en los animales tratados, por lo que es posible el uso de piel de uva en polvo para el manejo de cicatrización de heridas. El consumo de flavonoides dietéticos derivados de la uva en forma de extractos de uva y polvos de semillas de uva se ha demostrado que suprimir efectivamente el estrés oxidativo y prevenir el daño oxidativo in vivo, debido a su gran potencial antioxidante (Georgiev, 2014).

La inflamación es una respuesta protectora de los tejidos frente a la lesión celular, irritación, invasiones de patógenos, así como mecanismo para eliminar las células dañadas y necróticas. Si la inflamación se prolonga puede desarrollarse inflamación crónica. Polifenoles de uva han demostrado reducir la inflamación crónica, ya sea por la modulación de las vías inflamatorias o reduciendo los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS). Extracto liofilizado de vino de uvas "Jacquez" (*Vitis aestivalis-cinerea* × *Vitis vinifera*), que contiene principalmente flavonoides, antocianinas, proantocianidinas y derivados de ácidos hidroxicinámicos, mostró actividad anti-inflamatoria mayor en comparación con Indometacina, un antiinflamatorio comercial no esteroideo (AINE) (Panico, 2006). Las proantocianidinas en las semillas de uva tienen una acción anti-inflamatoria alta, y por lo tanto podrían ser utilizado como materia prima para la extracción de nuevos antiinflamatorios o como aditivos en el procesamiento de alimentos funcionales (Georgiev, 2014).

Las actividades antimicrobianas de la uva, el vino y subproductos derivados de la uva han sido ampliamente discutidas demostrando que el extracto de semilla de uva de *V. vinifera* " Uvas Azules Bangalore" var. exhibe fuerte actividad antibacteriana contra las bacterias Gram-positivas en comparación con la respuesta de bacterias Gram-negativas (Jayaprakasha, 2003). El jugo de uva, extractos de piel y semillas de uva de mesa negra "Ribier" var. también mostró un fuerte efecto inhibidor contra el crecimiento de *Listeria monocytogenes* (Rhodes, 2006). Por otra parte, extractos de vino tinto y blanco sin alcohol han mostrado tener actividad antifúngica moderada sobre *Candida albicans* en función de sus contenidos totales fenólicos (Papadopoulou, 2005).

Estudios recientes han demostrado efectos beneficiosos para la salud que promueve el consumo de uvas y productos derivados de uvas, que se atribuyen a la combinación única de compuestos polifenólicos. Los flavonoides, el mayor grupo de polifenoles de las uvas, tienen propiedades antioxidantes,

antiinflamatorias, anticancerígenas, antibióticas, antivirales, cardioprotectoras, neuroprotectoras, actividades hepatoprotectoras, entre otras (Dohadwala, 2009; Georgiev, 2014). Las proantocianidinas (PAs), compuestos polifenólicos que presentan una amplia distribución de pesos moleculares, están presentes en alimentos como la uva, manzanas, duraznos, etc., y en bebidas como el té verde; las cuales han probado disminuir la presión arterial y estimular la función vascular endotelial, además de poseer propiedades anticancerígenas. Las PAs presentan propiedades inhibitorias de la enzima convertidora de angiotensina I (enzima que cataliza la degradación de angiotensina I a angiotensina II, un potente vasoconstrictor) (Muñoz, 2015), lo que las convierte en una posible opción para el tratamiento antihipertensivo. Una fuente rica en PAs se encuentra en la piel y semillas de uva País (*Vitis vinifera L.*), el cual, es un recurso subutilizado en zonas del país, principalmente en las regiones del Maule y del Bío-Bío, Chile.

Productos de las uvas, ricos en Polifenoles, inhiben la agregación plaquetaria, un factor de riesgo para las CVD. La combinación de extracto de semilla de uva (GSD) con extracto de piel de uva (GSK), principales fuentes de Polifenoles de las uvas, logró aumentar el efecto antiagregante plaquetario individuales (Shanmuganayagam, 2002); los resultados de ensayos de agregación plaquetaria (AP) de este trabajo mostraron que, 50 mg/L de GSD y 250 y 500 mg/L de GSK no tuvo efecto antiplaquetario en sangre humana cuando se usan individualmente, sin embargo, la combinación de GSD (50 mg/mL) + GSK (250 mg/L) y GSD (100 mg/mL) + GSK (500 mg/mL) inhibieron la AP $40,5 \pm 10,1\%$ ($p \leq 0,005$) y $96,5 \pm 3,1\%$ ($p \leq 0,001$), respectivamente (porcentaje con respecto a una línea base de AP).

La quercetina (3,3,4,5,7-pentahidroxi-flavona) es un producto natural de la familia de los flavonoides, bioactivo que se encuentra en frutas y verduras; es conocida por sus propiedades antioxidantes y actividad contra el cáncer, así como por una amplia gama de beneficios para la salud; a pesar de que la quercetina posee grupos hidroxilo, tiene una baja solubilidad en agua y una inestabilidad en los fluidos intestinales. Rahmanian y col. (2014) mostraron que la quercetina puede ser inmovilizado sobre una superficie GO por apilamiento π - π , y el híbrido formado mostró estabilidad en soluciones fisiológicas y ninguna toxicidad *in vitro*; de acuerdo a sus resultados, demostraron que GO puede ser propuesto como un 'nanocarrier' debido a su pequeño tamaño, gran superficie específica, bajo costo, y por otra parte, que las interacciones no covalentes son útiles con flavonoides aromáticos poco solubles tales como la quercetina, pudiendo encontrar aplicaciones en biomedicina. Otro estudio sobre el efecto de la incorporación de este compuesto en la dieta de humanos (Conquer, 1998), concluyó que la suplementación con cápsulas que contienen quercetina mejoraron notablemente la concentración de quercetina en el plasma (~23 veces con respecto al no consumo) pero no tuvo ningún efecto sobre otros factores de riesgo cardiovascular, tales como, niveles de triglicéridos, colesterol LDL o HDL, ni factores de riesgo trombogénicos (AP, producción de

tromboxano B₂ de plaquetas, presión sanguínea y frecuencia cardíaca en reposo); los autores señalan que, a pesar de que otros estudios indican que la quercetina podría inhibir la AP *in vitro* e *in vivo* en animales, atribuyen sus resultados principalmente a que la concentración de quercetina en el plasma de los individuos suplementados (al menos 1,5 µmol/L) no fue suficiente para ejercer un efecto inhibitor sobre la AP, o que la quercetina en el plasma no estaba en una forma que le permita ejercer actividades antioxidantes y modificadoras de factores de riesgo de CVD; otros estudios *in vitro* con quercetina utilizan niveles de 20-500 µmol/L quercetina (13-33 veces superior que lo usado por Conquer y col. 1998); sobre la base de estos estudios, la inhibición de la AP parece requerir un mínimo de ~10 µmol/L quercetina (Conquer, 1998), pero curiosamente cuando quercetina y rutina (quercetin-3-rutinósido) se inyectaron en una corriente extracorpórea de sangre, las concentraciones plasmáticas calculadas de 0,03 µmol/L fueron suficientes para causar la inhibición de la deposición de trombos de plaquetas en una banda de colágeno sangre. Alternativamente, la presencia de otros bioflavonoides o los altos niveles de quercetina (consumo de 1 g quercetina/d en total por cada individuo) utilizados en este estudio pudieron haber tenido un efecto inhibitorio sobre la modificación de los factores de riesgo de CVD (Conquer, 1998).

En la antigüedad, las plantas taníferas como la granada, la hamamelis y el té se usaron como vasoconstrictores para detener hemorragias, tales como, hemorragias menstruales y gingivales (Soltani, 2014). La planta de té verde (*Camellia sinensis*), contiene grandes cantidades de compuestos de polifenoles (con propiedad antioxidante) y taninos. La existencia de taninos en esta planta hace que sea una opción de tratamiento potencial para detener el sangrado gingival. Soltani y col. 2014, evaluaron el efecto de extracto de té verde en la detención de la hemorragia y la secreción después de la eliminación de molares inferiores; gasas estériles impregnadas con extracto de té verde fueron utilizadas inmediatamente después de retirar el diente. Los resultados muestran una diferencia significativa en el tiempo de sangrado entre el grupo de control y el grupo tratado con extractos de té verde ($5,87 \pm 1,76$ frente a $10,09 \pm 3,61$ minutos, $p=0,001$); así, este estudio demuestra que el extracto de té verde contribuye a la disminución significativa en el sangrado en la cavidad de la encía causada por la extracción del diente, así como la reducción de la posterior secreción.

A pesar de que los estudios mencionados informan sobre el efecto antiagregante plaquetario de extractos de uva y otros extractos polifenólicos, también otros estudios demuestran las ventajas de su uso debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antibacteriales, cicatrizantes de heridas y recuperación endoteliales, entre otras; otros estudios con quercetina demuestran que el efecto antiagregante plaquetario podría depender de la cantidad de quercetina u otros factores; además, se sabe que el uso de extractos de té verde logra detener hemorragia y disminuir el sangrado. Considerando todos estos factores, se propone en este trabajo analizar el efecto de la incorporación de extractos polifenólicos en aerogeles de GO en la

eficiencia de liberación de ellos desde el aerogel. Se utilizarán extractos de piel (SK) y semilla (SD) de uva País (*Vitis vinífera L.*) ricos en Proantocianidinas (PAs).

2.6. Aplicaciones en heridas y cicatrización de materiales basados en grafeno

Las propiedades de barrera de la piel son por naturaleza difíciles de superar. La piel (figura 2.11a) es una membrana con permeabilidad selectiva a sustancias químicas que pueden ser absorbidas por esta vía hasta alcanzar la circulación sistémica. La piel es un órgano multilaminar formado por dos capas diferenciadas: la epidermis, más superficial, estratificada y avascular, y la dermis, constituida por tejido conectivo, ampliamente vascularizada y que actúa de soporte de la anterior. La epidermis comprende la epidermis viva, constituida por los queratinocitos, y el estrato córneo (SC), que es la capa más superficial de la piel y es conocido como el factor más contribuyente a estas propiedades de barrera, especialmente para la penetración de sustancias acuosas, que deben seguir un camino "laberíntico" para atravesarlo. El SC se compone de células muertas llenas de queratina conocidos como "corneocitos". La membrana celular de los corneocitos contiene una capa de proteína densa, altamente impermeable. Alrededor de los corneocitos existe una bicapa lipídica continua cristalina (figura 2.11b). Aunque la estructura de la bicapa lipídica no es fácil de superar, su continuidad a través del SC hace que sea una ruta potencial para el transporte a través de él. Por debajo del SC está la epidermis viva; esta muestra un menor número de propiedades de barrera que el SC y contiene enzimas que tienen una función metabólica. Debajo de la epidermis viva están los capilares, que pueden absorber fácilmente sustancias de la epidermis hacia el torrente sanguíneo (Betlloch y Silvestre, 2002).

La cicatrización de heridas es un proceso biológico específico relacionado con el fenómeno de crecimiento y regeneración de tejidos. No es el propósito de este trabajo revisar en detalle la fisiología de la cicatrización de heridas, pero de manera general, la cicatrización de heridas progresa a través de una serie de etapas interdependientes y superpuestas en el que una variedad de componentes celulares y de la matriz actúan juntos para restablecer la integridad del tejido dañado y la sustitución de tejido perdido. Este proceso comprende cinco etapas superpuestas que involucran procesos bioquímicos y celulares complejos: la hemostasia (control de la hemorragia o sangrado), inflamación, migración, proliferación y maduración (figura 2.11c). Formulaciones de la cicatrización de heridas (vendajes) y nuevas tecnologías desarrolladas hasta la fecha se centran en uno o más de estos aspectos del proceso natural de curación, así como en mantener las condiciones favorables para una rápida cicatrización, por ejemplo, la eliminación del exceso de exudado mientras que se mantiene la humedad en el lecho de la herida, o la administración directa de agentes en el sitio de la herida, tales como, antibióticos, vitaminas, minerales, factores de crecimiento y

otros aceleradores de cicatrización (Boateng, 2008). La administración directa de estos agentes en el sitio de la herida es deseable, en particular cuando la administración sistémica podría causar daño a órganos debido a las reacciones toxicológicas asociadas con estos agentes (Boateng, 2015). El apósito ideal debe lograr la curación rápida a un costo razonable, con el mínimo de inconvenientes para el paciente, por lo que surge la necesidad de formulaciones con propiedades mejoradas para la entrega eficaz y precisa de los agentes terapéuticos requeridos. Desde el punto de vista fisiológico se puede destacar que en la herida: se presente una buena tolerancia al apósito, se produzca una perfecta oclusión, cree y mantenga un ambiente húmedo, absorba el exudado, mantenga un adecuado suministro de sangre y oxígeno, mantenga una temperatura adecuada, proteja de contaminaciones bacterianas (medio externo), no deje residuos en la herida, proteja el tejido nuevo formado, entre otras. Los estudios que han medido el pH de las heridas crónicas han detectado un rango entre 7.15–8.9. Se ha demostrado que las heridas con pH más alcalino tienen tasas de curación inferiores a las que tienen un pH cercano a 7. Cuando el proceso de curación comienza a progresar adecuadamente, el pH va haciendo neutro y, posteriormente, ácido, hasta llegar al pH natural de piel (~5,5). Se piensa que el pH no depende de la profundidad de la herida, sino del tipo de tejido que exista en el lecho.

Los materiales con estructura microporosa y altas relaciones de superficie a volumen similar a la matriz extracelular (ECM) de tejido se considera beneficioso para regeneración de la piel y en este sentido, grafeno y GO pueden ofrecer soluciones a estos problemas, ya que pueden ser plataformas de ingeniería de tejidos de la piel debido a su alta área superficial y propiedades de adsorción de proteínas; se demostró que GO-(ácido poliláctico-co-glicólico)/colágeno (GO-PLGA/colágeno) láminas de fibras híbridas con alta hidrofiliabilidad y energía superficial podría promover la adhesión de fibroblastos dérmicos humanos (HDFs) (Lee, 2014). El uso de colágeno permitió interacciones bioquímicas con los HDF comparables a la interacción de la integrina-ECM. Esto lleva a la conclusión de que GO y el colágeno puede interactuar favorablemente para promover la regeneración de la piel debido a su impacto combinado ventajoso sobre la proliferación y migración de fibroblastos dérmicos. En base a las propiedades de los aerogeles y las condiciones que requiere una herida para su cicatrización, se ha propuesto en este trabajo sintetizar aerogeles a base de GO y PVA, con extractos de uva País ricos en Proantocianidinas (PAs) incorporados, y para analizar las propiedades de adsorción y liberación de PAs, que lo identifican como un potencial sistema transdérmico, o apósito para usos en heridas.

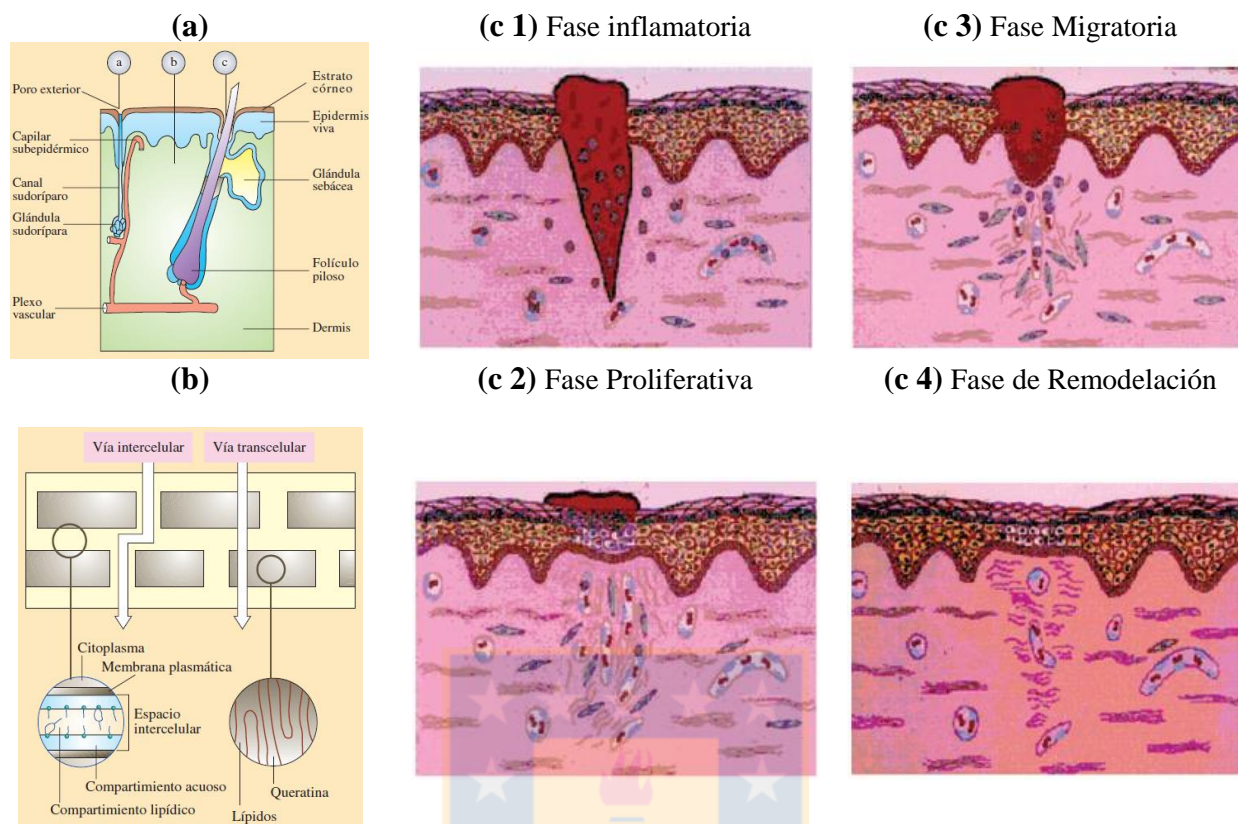


Figura 2.11. Ilustraciones de la piel (a) estructura, (b) representación de la penetración transdérmica a través del estrato córneo y la epidermis viva. La vía intracelular o transcelular comprende la difusión a través de los queratinocitos epidérmicos y la vía intercelular a través de los intersticios celulares, y (c) Representación esquemática de las fases de cicatrización de una herida (c 1) infiltración de neutrófilos en el área de la herida, (c 2) invasión de área de la herida por las células epiteliales, (c 3) epitelio cubre completamente la herida, (c 4) varios de los capilares y fibroblastos formados en la primera etapa han desaparecido. Fuente: (Betlloch y Silvestre, 2002)

2.7. Técnicas de caracterización

Existen distintas técnicas que permiten revelar características cuantitativas y cualitativas de las muestras de óxido de grafeno y de las transformaciones que sufren tras tratamientos de exfoliación y funcionalización. Para interpretar la estructura atómica del GO se utilizan técnicas microscópicas, tales como: Microscopía de transmisión electrónica (TEM), Microscopía electrónica de barrido (SEM), Microscopía de fuerza atómica (AFM) y Microscopio de efecto túnel (STM); también se utiliza difracción de rayos X (DRX). Para identificar la estructura química en la superficie el GO se utilizan técnicas espectroscópicas, tales como, Espectroscopia fotoelectrónica de Rayos X (XPS), Espectroscopia de Raman, Espectroscopia infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR). También se utilizan análisis elemental (AE), y termogravimétrico (TGA). A continuación, se describen brevemente las técnicas utilizadas en este trabajo, para caracterizar los diferentes productos sintetizados.

Análisis elemental (AE). Es análisis que permite reconocer los elementos C, H, N y S (además del O por diferencia) y cuantificar su abundancia en una muestra, en estado sólido o líquido, de todo tipo de naturaleza. El procedimiento consiste en la combustión de una muestra sólida a alta temperatura (por ejemplo, 1050°C), condiciones a las cuales el carbono forma CO₂, el hidrógeno H₂O y el azufre SO₂; así estos compuestos son detectados y medidos por su adsorción en el espectro de infrarrojo (IR); el nitrógeno forma NO_x que son reducidos por Cu a N₂, cuantificando esta especie a partir de la señal obtenida con un detector de conductividad térmica (Thompson, 2008).

Este análisis permitió calcular una razón entre Carbono y Oxígeno en las muestras de óxido de grafeno y aerogeles compuestos, lo que entrega una estimación grado de oxidación de la muestra (Douglas, 2008).

Análisis termogravimétrico (TGA). Es un método de análisis térmico, en el que se registra continuamente la masa de una muestra colocada en una atmosfera controlada en función de la temperatura o del tiempo en que aumenta su temperatura (por lo general, en forma lineal con el tiempo). La representación de la masa o del porcentaje de masa en función del tiempo se denomina termograma o curva de descomposición térmica. Proporciona información cuantitativa de fenómenos químicos o físicos, tales como las reacciones de quimisorción, descomposición y de oxidación, y a procesos como vaporización, sublimación, adsorción y desorción. Normalmente se utiliza para caracterizar materiales mediante comparación de patrones característicos, estudios de mecanismos de descomposición y cinética de reacción, determinación de contenido orgánico e inorgánico de muestras (Skoog, 2008).

TGA permite calcular el porcentaje de pérdida de peso de una muestra y con ello estimar una relación entre la masa de carbono prístino y el carbono que interactúa con los grupos funcionales en el GO, estimar el porcentaje de PVA unido al GO con la funcionalización, y comparar la estabilidad térmica de las distintas muestras (grafito, GO, PVA y GO-PVA). Artículos relacionados con la caracterización de grafeno y sus derivados incluyen típicamente TGA ya que los cambios estructurales de los materiales de grafito antes y después de procedimientos tales como la oxidación y la exfoliación de grafito o la funcionalización de láminas de grafeno o GO provocan diferencias en la pérdida de masa como una función del aumento de la temperatura (con velocidad de calentamiento constante). Wang y col. (2008) presenta datos TGA para el grafito, GO y óxido de grafeno reducido (rGO). La combustión de grafito comienza en 650°C cuando la muestra se calienta en aire, mientras que GO pierde 20% de su peso en 200°C y finalmente se descompone a 550°C. La primera pérdida de peso de GO se atribuye a la eliminación de los grupos de oxígeno, mientras que la temperatura de combustión inferior de GO en comparación con el grafito demuestra la estabilidad térmica más baja de GO debido a la presencia de defectos creados después de la eliminación de restos funcionales de oxígeno. Un comportamiento térmico intermedio se registra en rGO que refleja el menor número de grupos de oxígeno en él. Por tanto, la

temperatura de combustión inferior de GO y rGO también está influenciada por la exfoliación que hace que las hojas estén más fácilmente accesibles al aire, que cuando están estrechamente empaquetados en grafito.

Difracción de Rayos X (XRD). Es un método para análisis materiales, que utiliza la difracción de radiación, un fenómeno físico que se produce al interaccionar un haz de rayos X, de cierta longitud de onda, con un material cristalino. XRD se basa en la dispersión coherente del haz en el material y en la interferencia constructiva de las ondas que están en fase y que se dispersan en determinadas direcciones del espacio. La Ley de Bragg describe este fenómeno y predice la dirección en la que se da interferencia constructiva entre haces de rayos X dispersados coherentemente por el material cristalino a un ángulo θ : $n\lambda = 2d \sin\theta$, d es la distancia entre los planos del cristal, n se denomina orden de difracción (número entero) y λ longitud de onda (Skoog, 2008).

XRD entrega información cristalinidad de muestras de grafito y óxido de grafeno (GO). Permite establecer el espaciamiento entre capas por lo que es una indicación del grado de oxidación y exfoliación del grafito (u óxido de grafito). Normalmente el grafito presenta una reflexión basal (002) y ordenamiento ABAB con un pico $\sim 26,6^\circ$ (en ángulo 2θ) que corresponde a un espaciamiento d de 0,335 nm y representa la distancia entre capas. Al oxidar el grafito el pico de reflexión basal (002) del óxido de grafito resultante se desplaza alrededor de $\sim 10-11^\circ$ (en ángulo 2θ) con espaciamientos interlaminares entre 0,7084 nm y 0,8133 nm (Poh, 2012; Liao, 2010). Este aumento en el espacio interlaminar se atribuye, tanto a los grupos funcionales, como a la intercalación de moléculas de agua entre las capas de grafito oxidado. El ancho de los picos de difracción también es asociado al grado de exfoliación. Cuando el óxido de grafito está completamente exfoliado, este pico desaparece. Por otra parte, XRD permite analizar la evolución estructura en compuestos GO-PVA (Bai, 2010; Linares, 2016; Zhang L.W., 2011) y entrega información sobre la interacción entre GO y PVA. PVA presenta una señal característica en $19,5^\circ$ como resultado de los planos (101) en cristales de PVA (Bai, 2010).

Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR). Es una técnica de análisis químico que se fundamenta en la absorción de la radiación infrarroja por las moléculas, para las cuales existen pequeñas diferencias de energía entre los distintos estados vibracionales y rotacionales. Una molécula absorberá la energía de un haz de luz infrarroja cuando dicha energía incidente sea igual a la necesaria para que se dé una transición vibracional de la molécula. Es decir, la molécula comienza a vibrar de una determinada manera gracias a la energía que se le suministra mediante luz infrarroja (Skoog, 2008). Los espectros de FTIR permiten determinar la presencia de los grupos funcionales presentes en una muestra, pero no cuantificar cantidades relativas de ellos.

Para GO, normalmente se identifica la presencia de cuatro bandas principales; Lee y *col.* (2010) encontró la presencia de bandas a 1050 cm^{-1} , 1680 cm^{-1} , 1380 cm^{-1} y 3470 cm^{-1} , correspondientes a grupos epóxidos (C-O-C), modo de vibración de grupos cetona (-C=O), modo de vibración C-O y grupos hidroxilos (-OH), respectivamente. Krishnamoorthy y *col.* (2013) muestra como las relaciones sp^2/sp^3 de muestras de GO disminuyen con el aumento del grado de oxidación. El espectro FTIR a 1.573 cm^{-1} es debido a la presencia de C-C por la presencia de grafito encontrado en la muestra menos oxidada. Con un mayor aumento en el nivel de oxidación, el espectro de FTIR revelan la presencia de C=O (1.720 cm^{-1}), C-O (1.050 cm^{-1}), C-O-C (1.250 cm^{-1}), C-OH (1.403 cm^{-1}) en las muestras GO. El espectro de FTIR del PVA revela claramente las bandas principales asociadas con polivinil alcohol (Cesteros, 2004; Mansur, 2008); una banda de alquilo C-H en 2910 cm^{-1} asociada a C sp^3 de la cadena alifática; una banda fuerte $\sim 3270\text{ cm}^{-1}$ relacionadas al estiramiento -OH asociada a enlaces hidrógeno intramoleculares e intermoleculares debido a las altas fuerzas hidrofílicas, una banda $\sim 1714\text{ cm}^{-1}$ es debido al estiramiento C=O y C-O de grupos acetatos restantes en el PVA; una banda en 1412 cm^{-1} se asocia a C-H flexión de vibración de -CH_2 , y una banda de absorción importante se verificó en 1142 cm^{-1} se asocia a alcoholes C-O y se utiliza como una forma de evaluar la cristalinidad del PVA.

Microscopía electrónica de barrido (SEM). Entrega imágenes de partes microscópicas o nanoscópicas de muestras, permitiendo distinguir la morfología, superficies y secciones transversales de ellas. En el caso del microscopio electrónico la formación de la imagen se produce por la dispersión de los electrones, mientras que en el óptico la imagen se produce por absorción de los fotones; es decir, la imagen que se observa en un microscopio óptico se debe a la diferente absorción de la luz por las distintas estructuras de la muestra, mientras que en el microscopio electrónico la formación de la imagen está en función de la dispersión y, por consiguiente, pérdida de los electrones. El procedimiento consiste en hacer incidir un barrido de haz de electrones sobre la muestra, normalmente recubierta con una delgada capa de oro o carbón (mediante “pulverización catódica”), lo que le otorga propiedades conductivas, salvo que sea conductora. Con esto se consigue observar hasta los 10 nm, superando la resolución de la microscopía óptica, la cual está limitada por los efectos de difracción respecto a la longitud de onda de la luz (Skoog, 2008).

Es una técnica versátil y de fácil aplicación utilizada frecuentemente en caracterización de materiales y en particular en las investigaciones en GO se utiliza para obtener información sobre tamaño y morfología, donde las áreas que son oscuras en las imágenes SEM están cubiertas por un mayor número de capas de grafeno y áreas que aparecen brillantes están cubiertas por un menor número de capas de grafeno (Warner, 2013).

Raman. Es una técnica que proporciona información química y estructural de compuesto orgánicos e inorgánicos. Los espectros Raman se obtienen al irradiar una muestra con una fuente potente de rayos

laser de radiación monocromática visible o infrarroja. Durante el proceso se registra el espectro de la radiación dispersada a un cierto ángulo, casi siempre 90° , con ayuda de un espectrómetro apropiado (Skoog, 2008). La principal ventaja de esta técnica es que es no-destructiva y se realiza directamente sobre el material sin necesidad de preparar la muestra.

Espectros Raman permiten obtener información estructural y estimar densidad de defectos en láminas de grafeno o GO. La red de sp^2 en el grafeno o GO exhibible una señal $\sim 1590\text{ cm}^{-1}$ conocida como banda G, mientras que los defectos sp^3 en la red sp^2 dan una señal notoria conocida $\sim 1350\text{ cm}^{-1}$, banda D. La relación entre las intensidades de la banda D y G (relación D/G) se usa a menudo como una indicación del grado de desorden en una estructura de carbono (Poh, 2012).

Microscopia de fuerza atómica (AFM). Es una técnica que permite obtener imágenes de alta resolución tanto de superficies conductoras como aislantes. Se fundamentan en el barrido de la superficie de la muestra en un patrón de exploración en un plano xy, con una punta muy aguda que se desplaza hacia arriba y hacia abajo a lo largo del eje z siguiendo los cambios de las características topográficas de la superficie. Una computadora mide y traduce el movimiento en una imagen de las características de la superficie. A menudo esta imagen muestra detalles a una escala de tamaño atómico (Skoog, 2008). Esta técnica permite determinar tamaños de láminas de grafeno y GO y espesores, con valores típicos entre 0,8-1,2 nm para una monocapa de GO.

Potencial- ζ . Este análisis permite cuantificar estabilidad y carga superficial de partículas en dispersión. El potencial ζ es una propiedad física exhibida por cualquier material en dispersión y es un parámetro que se utiliza para la caracterización de las propiedades eléctricas de las capas interfaciales de partículas en dispersión. El potencial zeta se mide utilizando una combinación de las técnicas de medición: Electroforesis y Velocimetría Laser Doppler (LDV). Este método mide la rapidez con que una partícula se mueve en un líquido cuando se aplica un campo eléctrico, es decir, su velocidad (Malvern Instruments Ltd., 2004). Una vez que se conoce la velocidad de la partícula, el campo eléctrico aplicado y la viscosidad y constante dieléctrica de la muestra, se calcula el potencial ζ (Ecuación de Henry). Las partículas con potenciales ζ mayores a $\pm 30\text{ mV}$ se consideran normalmente estables. Es importante tener claro que el potencial ζ es extremadamente sensible al pH de la solución, puede tener cambios incluso de valores positivos a negativos. En solución acuosa con pH cercano a neutro, el GO presenta potenciales ζ negativos (Liao, 2011).

2.8.Referencias

- Boateng, J., & Catanzano, O. (2015). Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing—A Review. *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 104(11), 3653-3680. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.24610>
- Sanchez, V., Jachak, A., Hurt, R., & Kane, A. (2012). Biological Interactions of Graphene-Family Nanomaterials: An Interdisciplinary Review. *Chemical Research In Toxicology*, 25(1), 15-34. <http://dx.doi.org/10.1021/tx200339h>
- A LaVan, D., McGuire, T., Langer, R. Small-scale system for in vivo drug delivery. *Nature Biotechnology* (2003) 21: 1184-1191.
- Alam, H. B., Koustova, E.; Rhee, P. Combat Casualty Care Research: From Bench to the Battlefield. *World J. Surg.* 2005, 29, S7 – S11.
- Alam, H.B., D. Burris, J.A. DaCorta, P. Rhee. Hemorrhage Control in the Battlefield: Role of New Hemostatic Agents. *Military medicine*, (2005) 170 (1), 63 – 69.
- Bai, H., Li, C., Wang, X., Shi, G. 2010. «A pH-sensitive graphene oxide composite hydrogel.» *Chemical Communications* 46: 2376-2378.
- Bai, H., Li, C., Wang, X., Shi, G. 2011. «On the Gelation of Graphene Oxide.» *Journal of Physical Chemistry C* 115: 5545-5551.
- Betlloch M., I. y Silvestre S., J. F. Aspectos cutáneos de los sistemas terapéuticos transdérmicos. *Piel* (2002);17(1):18-26.
- Bianco, A., Cheng, H. M., Enoki, T., Gogotsi, Y., Hurt, R. H., Koratkar, N., Kyotani, T., Monthieux, M., Park, C. R., Tascon, J. M. D., Zhang, J. 2013. «All in the grapheme family – A recommended nomenclature for two-dimensional carbon materials.» *Carbon* 65: 1-6.
- Boateng, J., Matthews, K., Stevens, H., & Eccleston, G. (2008). Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 97(8), 2892-2923. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.21210>
- Brodie, B. C. 1959. «On the atomic weight of graphite.» *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 149: 249-259.
- Buchsteiner, A., Lerf, A., Pieper, J. 2006. « Water Dynamics in Graphite Oxide Investigated with Neutron Scattering.» *Journal of Physical Chemistry B* 110: 22328-22338.
- Cai, M., Thorpe, D., Adamson, D. H., Schniepp, H. C. 2012. «Methods of graphite exfoliation.» *Journal of Materials Chemistry* 22: 24992-25002.
- Cai, W.W., Piner, R.D., Stadermann, F.J., Park, S., Shaibat, M.A., Ishii, Y., Yang, D.X., Velamakanni, A., An, S.J., Stoller, M., An, J.H., Chen, D.M., Ruoff, R.S. 2008. «Synthesis and Solid-State NMR Structural Characterization of ¹³C-Labeled Graphite Oxide.» *Science* 321: 1815-1817.
- Cano, M., Khan, U., Toby Sainsbury, Arlene O'Neill, Zhiming Wang, Ignatius T. McGovern, Wolfgang K. Maser, Ana M. Benito, Jonathan N. Coleman. Improving the mechanical properties of graphene oxide based materials by covalent attachment of polymer chains. *Carbon* 52 (2013) 363 – 371.

- Cesteros, L. C. 2004. «Aplicaciones de la FTIR al estudio de las interacciones polímero-polímero.» *Revista Iberoamericana de polímeros* 5: 111-132.
- Chen, J., Li, Y., Huang, L., Li, C., Shi, G. 2015. « High-yield preparation of graphene oxide from small graphite flakes via an improved Hummers method with a simple purification process.» *Carbon* 81: 826-834.
- Cheng, H. K. F., Sahoo, N. G., Yan Pei Tan, Yongzheng Pan, Hongqian Bao, Lin Li, Siew Hwa Chan, and Jianhong Zhao. Poly(vinyl alcohol) Nanocomposites Filled with Poly(vinyl alcohol)-Grafted Graphene Oxide. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2012, 4, 2387–2394.
- Chowdhury, I., Duch, M. C., Manuskhani, N. D., Hersam, M. C., Bouchard, D. 2013. «Colloidal properties and stability of graphene oxide nanomaterials in the aquatic environment.» *Environmental Science & Technology* 47: 6288-6296.
- Chung, D.D.L. (2002). Review: Graphite. *Journal of Materials Science*, 37(8), 1475-1489. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1014915307738>
- Compton, O. C., An, Z., Putz, K. W., Hong, B. J., Hauser, B. G., Brinson, L., C., Nguyen, S. T. 2012. «Additive-Free hydrogelation of graphene oxide by ultrasonication.» *Carbon* 50: 3399-3406.
- Conquer, J. A. , Maiani, G. , Azzini, E., Raguzzini, A., and Holub, B. J. Supplementation with Quercetin Markedly Increases Plasma Quercetin Concentration without Effect on Selected Risk Factors for Heart Disease in Healthy Subjects. *The Journal of Nutrition*, 1998 Mar; 128(3), 593 – 7. PMID: 9482769.
- Dai, C., Liu, C., Wei, J., Hong, H., Zhao, Q. Molecular imprinted macroporous chitosan coated mesoporous silica xerogels for hemorrhage control. *Biomaterials* 31 (2010) 7620 – 7630.
- Dai, C., Yuan, Y., Liu, C., Wei, J., Hong, H., Li, X., Pan, X. Degradable, antibacterial silver exchanged mesoporous silica spheres for hemorrhage control. *Biomaterials* 30 (2009) 5364–5375.
- Dave, S., Gong, C., Robertson, A., Warner, J., & Grossman, J. (2016). Chemistry and Structure of Graphene Oxide via Direct Imaging. *ACS Nano*, 10(8), 7515-7522. <http://dx.doi.org/10.1021/acsnano.6b02391>
- Dimiev, A., Alemany, L., & Tour, J. (2013). Graphene Oxide. Origin of Acidity, Its Instability in Water, and a New Dynamic Structural Model. *ACS Nano*, 7(1), 576-588. <http://dx.doi.org/10.1021/nn3047378>
- Dohadwala, M. M., and Vita, J. A. Grapes and Cardiovascular Disease. *The Journal of Nutrition*, 2009 Sep, 139 (9), 1788S – 93S. doi: 10.3945/jn.109.107474.
- Dreyer, D. R., Park, S., Bielawski, C. W., Ruoff, R. S. 2010. «The chemistry of graphene oxide.» *Chemical Society Reviews* 39 : 228-240.
- Fraga, CG., Galleano, M., Verstraeten, S., y Oteiza, P. “Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols.” *Molecular aspects of medicine* 31, no. 6 (2010): 435-445.
- Gainza, G., Villullas, S., Pedraz, J., Hernandez, R., & Igartua, M. (2017). Advances in drug delivery systems (DDSs) to release growth factors for wound healing and skin regeneration. Retrieved 7 November 2017, from
- Georgakilas, V. (2014). *Functionalization of Graphene*. Weinheim, Bergstr: Wiley-VCH.
- Georgiev, V., Ananga, A., and Tsoleva, V. Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals. *Nutrients* 2014, 6, 391 – 415. doi:10.3390/nu6010391.

- Goenka, S., Sant, V., Sant, S. 2014. «Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering.» *Journal of Controlled Release* 173: 75-88.
- Groover, M. P. 1997. *Fundamentos de Manufactura Moderna: Materiales, Procesos Y Sistemas*. Mexico: Prentice Hall Hispanoamericana S.A.
- Gu, R., Sun, W., Zhou, H., Wu, Z., Meng, Z., Zhu, X., Tang, Q., Dong, J., Dou, J. The performance of a fly larva shell-derived chitosan sponge as an absorbable surgical hemostatic agent. *Biomaterials* 31 (2010) 1270 – 1277.
- H. de Carvalho, M. V., Marchi, E., Pantoroto, M., Rossini, M., Marcus San da Silva, D., Franco Teodoro, L. F., Pantaroto, A. Topical haemostatic agents and tissue adhesives. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2013; 40(1): 066-071
- He, H., Klinowski, J., Forster, M., Lerf, A. 1998. «A new structural model for graphite oxide.» *Chemical Physics Letters* 287: 53-56.
- Hu, H., Zhao, Z., Wan, W., Gogotsi, Y., Qiu, J. Ultralight and Highly Compressible Graphene Aerogels. *Adv. Mater.* 2013, 25, 2219–2223.
- Huang, Y., Zeng, M., Ren, J., Wang, J., Fan, L., Xu, Q. 2012. «Preparation and swelling properties of graphene oxide/poly(acrylic acid-co-acrylamide) super-absorbent hydrogel nanocomposites.» *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 401: 97-106.
- Hummers Jr. William S., Offeman Richard E. (1958) Preparation of graphitic oxide. *Journal of the American Chemical Society*, 80 (6) 1339.
- Jaganath, I y Crozier, A. “Dietary Flavonoids and Phenolic Compounds.” In *Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology*. John Wiley & Sons, Inc, 2009.
- Jang, J., Woo, J., Lee, J., & Han, C. (2016). Ambivalent Effect of Thermal Reduction in Mass Rejection through Graphene Oxide Membrane. *Environmental Science & Technology*, 50(18), 10024-10030. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.6b02834>
- Jayaprakasha, G.K., Selvi, T., Sakariah, K.K. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Res. Int.* 2003, 36, 117–122. PII: S0963-9969(02)00116-3.
- Jiang, L., Feng, L. 2010. *Bioinspired intelligent nanostructured interfacial materials*. Singapore: Chemical Industry Press.
- Kamoun, E., Kenawy, E., Tamer, T., El-Meligy, M., & Mohy Eldin, M. (2015). Poly (vinyl alcohol)-alginate physically crosslinked hydrogel membranes for wound dressing applications: Characterization and bio-evaluation. *Arabian Journal Of Chemistry*, 8(1), 38-47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.12.003>
- Kozen, B.G. , S.J. Kircher, J. Henao, F.S. Godinez, A.S. Johnson. An Alternative Hemostatic Dressing: Comparison of CELOX, HemCon, and QuikClot. *Acad. Emerg. Med.* 15 (2008) 74.
- Krishnamoorthy, K., Veerapandian, M., Yun, K., Kim, S.-J. 2013. «The chemical and structural analysis of graphene oxide with different degrees of oxidation. Krishnamoorthy K., Veerapandian M., Yun K., Kim S.-J. The chemical and structural analysis of graphene oxide.» *Carbon* 53: 38-49.
- Langer, R. Drugs on target. *Science* (2001) 293: 58-59.
- Lee, D. W., L. De Los Santos, V., Seo, J. W., Leon Felix, L., A. Bustamante, D., Cole, J. M., Barnes, C. H. W. 2010. «The Structure of Graphite Oxide: Investigation of Its Surface Chemical Groups.» *Journal of Physical Chemistry B* 114: 5723-5728.

- Lee, E.J., Lee, J. H., Shin, Y. C., Hwang, D.-G., Kim, J. S., Jin, O. S., Jin, L., Hong, S. W., Han, D. W., Graphene Oxide-decorated PLGA/Collagen Hybrid Fiber Sheets for Application to Tissue Engineering Scaffolds, *Biomater. Res.*, 18 (2014) 18-24.
- Lerf, A., He, H., Forster, M., Klinowski J. 1998. «Structure of graphite oxide revisited.» *Journal of Physical Chemistry B* 102: 4477-4482.
- Li, G., Quan, K., Liang, Y., Li, T., Yuan, Q., & Tao, L. et al. (2016). Graphene-Montmorillonite Composite Sponge for Safe and Effective Hemostasis. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(51), 35071-35080. <http://dx.doi.org/10.1021/acsami.6b13302>
- Liao, K. H., Lin, Y. S., Macosko, C. W., Haynes, C. L. 2011. «Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts.» *ACS Applied Materials and Interfaces* 3: 2607-2615.
- Liao, K. H., Mittal, A., Bose, S., Leighton, C., Mkhoyan, K. A., Macosko, C. W. 2010. «Aqueous only route toward graphene from graphite oxide.» *ACS nano* 5: 1253-1258.
- Liao, R., Tang, Z., Lei, Y., & Guo, B. (2011). Polyphenol-Reduced Graphene Oxide: Mechanism and Derivatization. *The Journal Of Physical Chemistry C*, 115(42), 20740-20746. <http://dx.doi.org/10.1021/jp2068683>
- Linares, J., Matesanz, M. C., Feito, M. J., Salvagione, H. J., Martínez, G., Gómez-Fatou, M., Portolés M. T. Influence of the covalent immobilization of graphene oxide in poly(vinyl alcohol) on human osteoblast response. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, 2016, 138, 50 – 59.
- Liu, J., Cui, L., Losic, D. 2013. «Graphene and graphene oxide as a new nanocarrier for drug delivery.» *Acta Biomaterialia* 9: 9243-9257.
- Lodhi, S., Singhai, A. K. Preliminary pharmacological evaluation of *Martynia annua* Linn. leaves for wound healing. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2011; 1(6), 421 – 427. doi:10.1016/S2221-1691(11)60093-2.
- Lodhi, S., Singhai, A. K. Wound healing effect of flavonoid rich fraction and luteolin isolated from *Martynia annua* Linn. On streptozotocin induced diabetic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2013; 453 – 459. doi: 10.1016/S1995-7645(13)60053-X.
- Luo, J., Cote, L. J., Tung, V. C., Tan, A. T., Goins, P. E., Wu, J., Huang, J. 2010. «Graphene oxide nanocolloids.» *Journal of the American Chemical Society* 132: 17667-17669.
- Ma, Y., Chen, Y. Three-dimensional graphene networks: synthesis, properties and applications. *National Science Review*, 2015, 2, 40–53.
- Malvern Instruments Ltd. (2004). Zetasizer Nano Series User Manual, Mano317 Issue 1.1. England: Biophysics Facility. Retrieved 7 November 2017, from http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf
- Mansur, H. S., Sadahira, C. M., Souza, A. N. Mansur, A. A. P. 2008. « FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde.» *Materials Science and Engineering C* 28: 539-578.
- Marcano, D. C., Kosynkin, D. V., Berlin, J. M., Sinitskii, A., Sun, Z., Slesarev, A., Alemany, L. B., Lu, W., Tour, J. M. 2010. «Improved synthesis of graphene oxide.» *ACS Nano* 4: 4806-4814.
- Mellado, C. “Síntesis de óxido de grafeno como nanocarrier para la liberación sostenida de componente”. Memoria de título, Universidad de Concepción, Concepción, Chile, 2016.

- Mu, L., Gao, Y., & Hu, X. (2016). Characterization of Biological Secretions Binding to Graphene Oxide in Water and the Specific Toxicological Mechanisms. *Environmental Science & Technology*, 50(16), 8530-8537. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.6b02494>
- Muñoz, V. “Síntesis y evaluación fisicoquímica y biológica de nanopartículas de lauril succinil quitosano (LSC) para la nanoencapsulación de Proantocianidinas (PAs) de extractos de semilla de uva.” Memoria de Título, Universidad de Concepción, Concepción, Chile, 2015.
- Nayak, B. S., Ramdath, D. D., Marshall, J. R., Isitor, G. N., Eversley, M., Xue, S., Shi, J. Wound-healing activity of the skin of the common grape (*Vitis Vinifera*) variant, Cabernet Sauvignon. *Phytotherapy Research* (2010), 24, 1151 – 1157. doi: 10.1002/ptr.2999.
- Panico, A. M., Cardile, V., Avondo, S., Garufi, F. Gentile, B., Puglia, C., Bonina, F., Santagati, N. A., Ronsisvalle, G. The in vitro effect of lyophilized extract wine obtained from Jacquez grapes on human chondrocytes. *Phytomedicine* (2006) Jul., 13(7), 522 – 526. doi: 10.1016/j.phymed.2005.06.009.
- Papadopoulou, C., Soulti, K., Roussis, I.G. Potential antimicrobial activity of red and white wine phenolic extracts against strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *Food Technol. Biotechnol.* 2005, 43, 41–46.
- Pinto, A., Gonçalves, I., & Magalhães, F. (2013). Graphene-based materials biocompatibility: A review. *Colloids And Surfaces B: Biointerfaces*, 111, 188-202. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.05.022>
- Poh, H. L., Šaněk, F., Ambrosi, A., Zhao, G., Sofer, Z., Pumera, M. 2012. «Graphenes prepared by Staudenmaier, Hofmann and Hummers methods with consequent thermal exfoliation exhibit very different electrochemical properties.» *Nanoscale* 4: 3515-3522.
- Quan, K., Li, G., Luan, D., Qipeng Yuan, Lei Tao, Xing Wang. Black hemostatic sponge based on facile prepared cross-linked graphene. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 132 (2015) 27–33.
- Quan, K., Li, G., Tao, L., Xie, Q., Yuan, Q., Wang, X. Diaminopropionic Acid Reinforced Graphene Sponge and Its Use for Hemostasis. *ACS Applied Materials and Interfaces*, (2016) 8, 7666-7673.
- Rahmanian N., Hamishehkar H., Jafar Ezzati Nazhad Dolatabadi, Aرسالani N. Nano graphene oxide: A novel carrier for oral delivery of flavonoids. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 123 (2014) 331–338.
- Rein, M., Renouf, M., Cruz-Hernandez, C., Actis-Goretta, L., Thakkar, S., & da Silva Pinto, M. (2013). Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *British Journal Of Clinical Pharmacology*, 75(3), 588-602. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04425.x>
- Rhodes, P.L., Mitchell, J.W., Wilson, M.W., Melton, L.D. Antilisterial activity of grape juice and grape extracts derived from *Vitis vinifera* variety ribier. *Int. J. Food Microbiol.* 2006, 107, 281–286. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.022.
- Salavagione, H. J., Gómez, M. A., Martínez, G. Polymeric Modification of Graphene through Esterification of Graphite Oxide and Poly(vinyl alcohol). *Macromolecules* 2009, 42, 6331 – 6334.
- Sengupta, R., Bhattacharya, M., Bandyopadhyay, S., & Bhowmick, A. (2011). A review on the mechanical and electrical properties of graphite and modified graphite reinforced polymer composites. *Progress In Polymer Science*, 36(5), 638-670. <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.11.003>

- Shanmuganayagam, D., Beahm, M. R., Osman, H. E., Krueger, C. G., Reed, J. D., and Folts, J. D. Grape Seed and Grape Skin Extracts Elicit a Greater Antiplatelet Effect When Used in Combination than When Used Individually in Dogs and Humans. *The Journal of Nutrition*, 2002 Dec; 132(12), 3592–8. PMID: 12468593.
- Shukla, A., Fang, J. C., Puranam, S., Jensen, F. R., Hammond, P. T. Hemostatic Multilayer Coatings. *Advanced Materials* 2012, 24, 492–496.
- Skoog, D., Holler, F., Crouch, S., & Skoog, D. (2008). *Principios de análisis instrumental*. 6e. Mexico, México: Cengage Learning Editores S.A. de C.V.
- Soltani, R., Haghghat, A., Fanaei, M., Asghari, G. Evaluation of the Effect of Green Tea Extract on the Prevention of Gingival Bleeding after Posterior Mandibular Teeth Extraction: A Randomized Controlled Trial. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2014, Article ID 857651, 4 pages, 2014. doi:10.1155/2014/857651.
- Sood, A. K., Rao, C. N. R. *Graphene: Synthesis, Properties, and Phenomena*. Germany: Wiley, VCH, 2013.
- Sridhar, V., Oh, I.-K. A coagulation technique for purification of graphene sheets with graphene-reinforced PVA hydrogel as byproduct. *Journal of Colloid and Interface Science* (2010), 348, 384–387.
- Syama, S., & Mohanan, P. (2016). Safety and biocompatibility of graphene: A new generation nanomaterial for biomedical application. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 86, 546-555. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.116>
- Szabó, T., Berkesi, O., Forgó, P., Josepovits, K., Sanakis, Y., Petridis, D., & Dékány, I. (2006). Evolution of Surface Functional Groups in a Series of Progressively Oxidized Graphite Oxides. *Chemistry Of Materials*, 18(11), 2740-2749. <http://dx.doi.org/10.1021/cm060258+>
- Tang, H., Zhao, Y., Yang, X., Liu, D., Shao, P., & Zhu, Z. et al. (2017). New Insight into the Aggregation of Graphene Oxide Using Molecular Dynamics Simulations and Extended Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek Theory. *Environmental Science & Technology*, 51(17), 9674-9682. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.7b01668>
- Thompson, M. (2008). *Analytical Methods Committee Technical Briefs N° 29*. London: The Royal Society of Chemistry. Retrieved 6 November 2017, from http://www.rsc.org/images/CHNS-elemental-analysers-technical-brief-29_tcm18-214833.pdf
- Traver, M. A., Assimos, DG. New generation tissue sealants and hemostatic agents: Innovative urologic applications. *Rev Urol*. 2006;8(3):104-11.
- Wang, G., Yang, J., Park, J., Gou, X., Wang, B., Liu, H., and Yao, J. Facile Synthesis and Characterization of Graphene Nanosheets. *J. Phys. Chem. C*, (2008), 112, 8192–8195.
- Wang, X., Hao, L., Zhang, C., Chen, J., & Zhang, P. (2017). High efficient anti-cancer drug delivery systems using tea polyphenols reduced and functionalized graphene oxide. *Journal Of Biomaterials Applications*, 31(8), 1108-1122. <http://dx.doi.org/10.1177/0885328216689364>
- Warner, J. H., Schäffel, F., Bachmatiuk, A., Rummeli, M. H. 2013. *Graphene: Fundamentals and emergent applications*. London: Elsevier.
- Whitener Jr., K. E., Sheehan, P. E. 2014. «Graphene synthesis.» *Diamond & Related Materials* 46: 25-34.

- Wu, T.T., Ting, J.M. 2013. « Preparation and characteristics of graphene oxide and its thin films.» *Surface and Coatings Technology* 231: 487-491.
- Yallapu, M. M., Jaggi, M., Chauhan, S. C. Design and engineering of nanogels for cancer treatment. *Drug Discov Today* (2011) 16: 457-63.
- Zhang, B., Wang, Y., Zhai, G. Biomedical applications of the graphene-based materials. *Materials Science and Engineering* (2016), 61, 953-964.
- Zhang, L., Wang, Z., Xu, C., Li, Y., Gao, J., Wang, W., Liu, Y. High strength graphene oxide/polyvinyl alcohol composite hydrogels. *Journal of Materials Chemistry*, 2011, 21, 10399-10406.
- Zhang, N., Li, R., Zhang, L., Chen, H., Wang, W., Liu, Y., Wu, T., Wang, X., Wang, W., Li, Y., Zhao, Y., Gao, J. Actuator materials based on graphene oxide/polyacrylamide composite hydrogels prepared by in situ polymerization. *Soft Matter* (2011), 7, 7231-7239.
- Zhao, J., Wang, Z., White, J., & Xing, B. (2014). Graphene in the Aquatic Environment: Adsorption, Dispersion, Toxicity and Transformation. *Environmental Science & Technology*, 48(17), 9995-10009. <http://dx.doi.org/10.1021/es5022679>



3. HIPÓTESIS

- Aerogeles a base de óxido de grafeno (GO) y polivinil alcohol (PVA) formados a través de una unión no covalente, serán capaces de absorber líquidos, tales como, agua y sangre, y de incorporar extractos polifenólicos a su matriz.
- Dichos aerogeles tendrán la capacidad de liberar los extractos polifenólicos desde su matriz, en respuesta a la presencia de sangre en el medio, por lo que tendrán un potencial uso como agente dérmico.



4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Desarrollar un material compuesto (aerogel) a base de óxido de grafeno (GO) y polivinil alcohol (PVA), con propiedades absorbentes, coagulantes y de liberación de componentes, mediante la incorporación de extractos polifenólicos, para su uso en aplicaciones dérmicas, hemostáticas y/o cicatrizantes.

4.2. Objetivos Específicos

1. Determinar las características de estructura, composición y morfología de láminas de GO obtenidas mediante exfoliación mecánica de óxido de grafito, susceptibles de ser modificadas con PVA.
2. Comparar las propiedades fisicoquímicas de aerogeles de GO reforzados con PVA mediante método de unión no covalente, a los cuales se le ha incorporado extractos de uva País.
3. Determinar la capacidad de coagulación *in vitro* de los aerogeles desarrollado en el punto anterior.
4. Determinar la capacidad de liberación de extractos de uva País ricos en Proantocianidinas (PAs), analizando la respuesta del aerogel frente a cambios de pH en el medio.

A continuación, los capítulos 5 y 6 están ordenados cada uno con sus respectivas introducciones, metodologías, resultados, análisis y conclusiones. En ellos se desarrollan temas relacionados a los objetivos específicos de este trabajo. El objetivo específico 1 se desarrolla en el capítulo número 5, y los objetivos específicos 2 a 4 se desarrollan en el capítulo número 6.

5. STUDY OF THE INFLUENCE OF ULTRASONIC TREATMENTS USING PROBE OR BATH ON THE GRAPHENE OXIDE STRUCTURE BY RAMAN SPECTROSCOPY

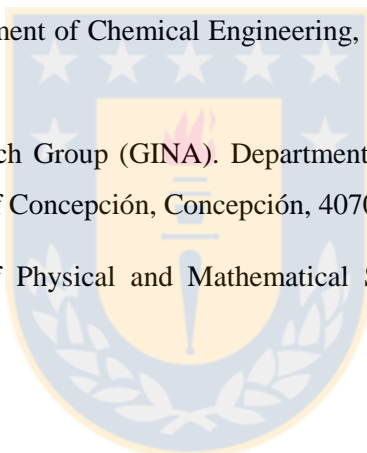
El presente capítulo es parte de un manuscrito enviado a publicación, que actualmente se encuentra en revisión en *Journal of Raman Spectroscopy*. Los coautores del manuscrito se mencionan a continuación:

C. Mellado^a, T. Figueroa^a, R. Báez^{b,c}, M.F. Melendrez^b, K. Fernández^{a,b}

^aLaboratory of Biomaterials, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, University of Concepción, Concepción, Chile.

^bAdvanced Nanocomposites Research Group (GINA). Department of Materials Engineering (DIMAT), Faculty of Engineering, University of Concepción, Concepción, 4070409 Chile.

^cDepartment of Physics, Faculty of Physical and Mathematical Sciences, University of Concepción, Concepción, Chile.



5.1. Abstract

During the synthesis of graphene oxide (GO) sheets, the exfoliation treatment of graphite oxide (GpO) has become a key step to obtain fully exfoliated sheets. For this purpose, ultrasound is typically applied, using either water bath or probe sonication. We compared the effect of using each of these ultrasound methods on the morphological and chemical characteristics of the obtained GO sheets. The structural and chemical properties of the prepared GO sheets were characterized by Raman spectroscopy, scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, atomic force microscopy (AFM), elemental analysis (EA), and ζ -potential analysis. A prolonged ultrasonication time caused structural damage, fragmenting the GO sheets into smaller pieces with sizes $<1\ \mu\text{m}$ for treatment times greater than 60 min using a bath or 30 min using a probe sonicator. To use bath ultrasonication was less invasive, does not require direct contact with the samples, allows easy control of the sample temperature, causes fewer wrinkles and less damage to the structure and morphology of the sheets and forms sheets of equal sizes than probe sonication, with more chemical groups available for further functionalization. The GO exhibited highly broadened D and G Raman bands and in addition, have a modulated behavior indicating the formation of crystalline defects. Bands G^* , G' , $D+D'$ and $2D'$ indicated that the samples are formed by graphene bilayers, but due to the increase of the power and time of the ultrasonic treatment, the defects of the sheets increase, due to the damage caused by the shock waves. Explanation of the mechanisms of damage caused by ultrasonic treatment samples and some suggestions are discussed in the present work.



Figure 5.1. Graphical Abstract of “Study of the influence of ultrasonic treatments using probe or bath on the graphene oxide structure by Raman spectroscopy”. Source: Own elaboration.

5.2. Introduction

Graphene is a two-dimensional (2D) sheet with a single layer of carbon atoms arranged in a hexagonal lattice, appearing as red crystals; these sheets have exceptional electrical, thermal and mechanical properties [1, 2]. Graphene oxide (GO) is essentially a layer of oxidized graphene that presents functional groups, such as hydroxyl, epoxide and carboxylic groups, on the planes and edges of the sheet. These functional groups make GO soluble due to the high affinity of these groups for water molecules. GO is an amphiphilic nanomaterial with an edge-to-center distribution of hydrophilic and hydrophobic domains. The properties of GO are determined by the number of layers, lateral dimensions, surface chemistry, defect density, composition and purity, which depend largely on the production method [3].

GO has been successfully manufactured by the controlled oxidation of graphite to produce graphite oxide (GpO), which is exfoliated via mechanical or thermal exfoliation methods to obtain GO sheets [4]. In the past few years, studies involving GO production or the fabrication of composites containing GO have been performed [5, 6], and the influence of ultrasonication on the mechanical, electrical or absorbent properties of the composites has been studied. Less attention has focused on the composite chemical properties, which are fundamental for functionalizing the GO samples [7].

In practice, the most common method to obtain fully exfoliated GpO to prepare GO sheets is a mechanical method that involves sonicating and/or stirring GpO in water. Typically, the ultrasound systems used for mechanical exfoliation are water bath sonicators [8] or probe sonicators [9], where time and equipment power are the relevant parameters in the ultrasonication treatment.

Prolonging the ultrasonication time (and/or increasing the energy input) can lead to a size reduction of the GO sheets, thus weakening the sheets or the GO-based composite [10]. There is a consensus that high-power and/or long-lasting ultrasonication tends to: (1) improve the dispersion of the GO sheets in aqueous solution and achieve better GO dispersion in the polymer matrix, (2) achieve full exfoliation of the GpO to form single layer GO sheets, and (3) shatter and induce defects on GO sheets [11-13].

In addition, the effect of GO sonication on the mechanical properties of the treated area has been studied. The fabrication of GO films (GOFs) using GO without sonication resulted in films with a high degree of elongation but very low fracture strength and toughness, primarily due to the formation of inhomogeneous structures. In contrast, a mild sonication within 2 min can fully exfoliate GpO, producing a substantial amount of large GO sheets. As the sonication time increases to 10, 30, and 60 min, the mechanical properties of GOFs gradually deteriorate; this is primarily attributed to the reduced GO sizes caused by sonication [8].

GO contains chemically reactive oxygen functionalities that are important for possible functionalization. Based on the existing GO models [14, 15], four types of bonds are present in GO sheets: carbon-carbon double bonds (C=C), carbon-oxygen bonds (C-O), carbon single bonds (C-C) in which a hydroxyl group is attached to one of the carbon atoms (HO-C-C), and C-C bonds in which hydroxyls are attached to both of the carbon atoms (HO-C-C-OH) [14]. Mechanical energy input in the form of ultrasonication creates fluid motion that can result in interparticle collisions as well as collisions between the particles and the wall of the beaker. These collisions can also cause an accumulation of tensile stress in the particles, resulting in crack formation. The crack formation energy per unit crack length depends on the energy of the bonds that are broken as well as the number of bonds broken per unit crack length. The accumulation of a tensile load in the sheets causes a size reduction, as has been shown in several previous studies [8, 13, 16, 17], but less importance has been given to the chemical damage to the GO sheets.

On the other hand, the effects of possible damage that can cause the use of ultrasound on the graphene oxide structure can be monitored by Raman spectroscopy. Following the investigations of Reich and Thomson [18], Dresselhaus et al. [19, 20] y Ferrari et al. [21, 22] and many others, the Raman spectrum of graphite and graphene oxide are fairly well understood, both theoretically and experimentally. The spectra consist of three prominent characteristic peaks, namely the D band, the G band, and the G' (or 2D) band. A few less intense peaks called the D, D+G, D+D, G+D, 2D' etc. are observed in some cases. The presence or absence of these bands, their relative shapes, positions and intensity ratios provide distinguishable information regarding the sample being studied [21] and therefore are fundamental in characterizing graphene and graphene oxide. Therefore, a follow-up of the previous bands will give us relevant information on the changes that have arisen on the structure of graphene oxide. That is why, in this study, we synthesize GO sheets from graphite flake (GF) powder to produce GpO, using ultrasonication (using a bath or a probe) as the mechanical exfoliation method, with the objective of comparing the influence of both sonication treatments on the GO characteristics by analyzing its morphology and chemical structure through Raman Spectroscopy and other complementary techniques.

5.3. Experimental

5.3.1. Materials and methods

Graphite powders (Flake, mesh 325) were purchased from Asbury Online (Asbury Carbons, New Jersey, USA). All the other chemicals and solvents, such as sulfuric acid (H_2SO_4 , 98%), potassium permanganate powder (KMnO_4 , 99,9%), sodium nitrate (NaNO_3), and hydrochloric acid (HCl , 37% v/v), were purchased from Merck (Darmstadt, Germany); these chemicals were used as received without further purification. Milli-Q water was used throughout the study. For the sonication treatments, a probe sonicator (Branson 450 model, 42 kHz, 240 W) or a bath sonicator (Digital Ultrasonic Cleaner model, 42 kHz, 160 W) was used for various sonication times as described below.

5.3.2. Preparation of GO with different structural characteristics

The characteristics of the extent of GO exfoliation were compared when coupling an oxidation approach with an exfoliation step via mechanical media (see the scheme in fig. 5.2). GO particle suspensions were synthesized by the oxidation of natural GF powder using the classical Hummers' method [23, 24] to obtain GpO; then, GpO was exfoliated by ultrasonication to obtain GO.

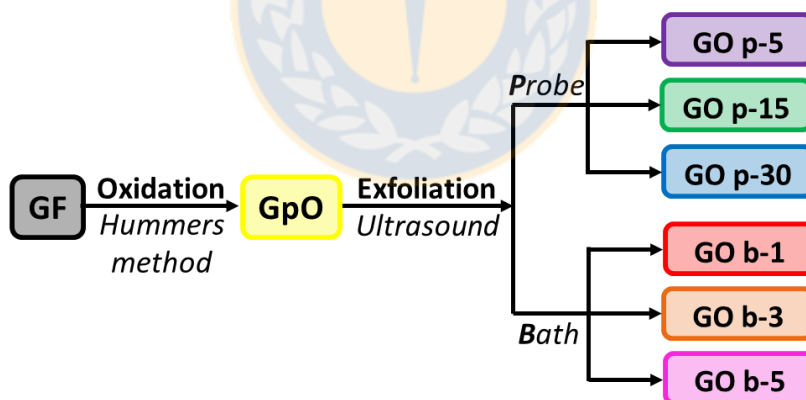


Figure 5.2. Scheme of procedures followed starting with graphite flakes (GF) for preparation of graphite oxide (GpO) by methods describe in the literature and subsequent exfoliation to obtain graphene oxide sheets (GO) with different characteristic. Source: Own elaboration.

GpO synthesis: Graphite powder (5 g), concentrated sulfuric acid 98% (H_2SO_4 , 115 mL) and sodium nitrate (NaNO_3 , 2.5 g) were mixed in an ice bath for 4 h followed by the slow addition of KMnO_4 (15 g) with stirring for 2 h. The rate of addition was carefully controlled to prevent the temperature of the suspension from exceeding 20°C . The suspension was removed from the ice bath, and the temperature of the suspension was increased to 35°C and maintained for 30 min. MQ water (250 mL) was slowly added

to the reaction mixture, and the temperature was controlled below 70°C for 20 min. Subsequently, MQ water (~2 L) and 30% (v/v) H₂O₂ were added separately, resulting in a yellow-brown mixture. Finally, the mixture was centrifuged and washed with aqueous HCl solution (5% v/v) and then with MQ water (five times) to remove metal ions. To verify that the washing step was complete, the indicators of Ba(NO₃)₂ and AgNO₃ were used. Dry GpO was obtained by drying at 40°C for 72 h under vacuum. The GpO obtained formed a stable aqueous dispersion due to its strong hydrophilicity; the dispersion was dialyzed for 1 week to remove any impurities, such as any remaining metal species.

GO preparation: Different extents of exfoliation to obtain a variety of GO sheets were achieved by varying the intensity and time of sonication. For this purpose, samples obtained from the GpO aqueous dispersion were sonicated for 5, 15 and 30 min using a probe sonicator directly on the samples (p-5, p-15 and p-30, respectively), or the samples were immersed in a bath sonicator for 60, 180 and 300 min (b-1, b-3 and b-5, respectively) for exfoliation to form GO.

5.3.3. *Characterization of GO*

The structure, morphology, exfoliation extent, oxygen content, and surface charge of GpO and GO samples were characterized using different analysis methods.

Raman spectroscopy was used to characterize the GO structure. The vibrational analysis was acquired through spectroscopy with a 633-nm excitation laser line with a power of 13.3 mW and 1.96 eV. The laser spot was centered on the sample using an Olympus 100x VIS lens and an NUV camera (B/S UV 50/50 + Lens F125 D25). The intensity of the laser remained constant to minimize any damage to the sample. The samples were excited with a 633-nm Raman laser. The six samples were measured using an object holder at room temperature (~22°C); none of the six samples were characterized in solution.

Scanning Electron Microscopy (SEM) was performed using a JEOL JSM-6380LV microscope at 10 kV. The aqueous GO suspensions (5 mg/mL) were freeze dried for 2 days. The lyophilized GO samples were coated using a gold sputter coater, and the surfaces were observed with different resolutions to compare the internal structures.

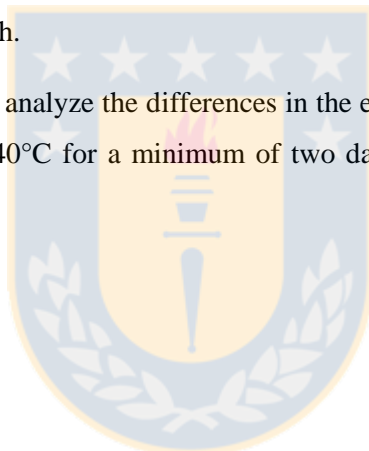
X-Ray Diffraction (XRD) spectra of the lyophilized GO samples were measured using an X-ray diffractometer (Bruker AXS, D4 Endeavor) with Cu K α radiation ($\lambda=1.541841$ Å; 2.2 kW) as the reference target, a voltage of 40 kV, and a current of 20 mA. The samples were measured from 2 to 50° (2 θ) with steps of 0.02° and a measuring time of 141 s per step.

ζ -Potential measurements (Zetasizer III, Malvern Instruments, UK) were used to detect the electric field potential of the GO; all GO and GpO samples were prepared in Milli-Q water at a concentration of 0.5 g/L, and each sample was tested at least three times to obtain an average value. The ζ -potential and the hydrodynamic size of the GO samples were determined using a particle size analyzer (Zetasizer III, Malvern Instruments, UK) via Dynamic Light Scattering (DLS). All the particles were suspended in Milli-Q water at a concentration of 0.5 g/L. Each sample was measured in a polystyrene container (DTS0012), and each measurement was repeated at least three times to obtain an average value.

Fourier transform infrared (FTIR) spectrometry (Perkin Elmer UATR Two FTIR Spectrometer, USA) was used to characterize the lyophilized GO samples at wavenumbers ranging from 500 to 4000 cm^{-1} .

Atomic Force Microscopy (AFM) measurements were performed in AC mode using an OmegaScope 1000 (AIST-NT Inc., USA). The samples for AFM were prepared by dropping a silica wafer onto the GO solutions (≈ 0.01 mg/mL) for 20 min, followed by washing the samples with Milli-Q water and drying them under ambient conditions for 2 h.

Elemental analysis (EA) was used to analyze the differences in the elemental compositions among the dry GO samples (in a vacuum oven at 40°C for a minimum of two days to constant weight), using a Leco TrueSpec CHN (USA) analyzer.



5.4. Results and discussion

The preparation of GO sheets by chemical exfoliation consists of three key steps: the oxidation of GFs to obtain GpO, the exfoliation of GpO to prepare GO sheets by sonication, and subsequent dispersion and centrifugation to remove non-oxidized GF particles. To elucidate the effects of subjecting a GpO sample to an ultrasonic bath vs. probe sonication, we investigated the effects of the exfoliation parameters, such as the sonication time and the intensity of ultrasound, on the physicochemical characteristics of the obtained GO sheets. GO samples were prepared from GFs via Hummers' method and were subsequently exfoliated by sonication, as described in the methodology (fig. 5.2). The GO samples were named p-5, p-15, and p-30 for probe sonication and b-1, b-3, and b-5 for bath sonication. Then, all of the samples were carefully treated for characterization.

It was visually observed that most of the GpO particles precipitated at the bottom of the tube, and the supernatant had a yellow color. In contrast, the GO samples showed good dispersion for both probe and bath sonication, and the transparency of the supernatant decreased with an increasing sonication time, which was previously observed [13].

To investigate the structure of the GO samples, an XRD analysis was performed. The oxidation of the graphene layers weakens the van der Waals forces that join the oxidized planes in GpO, thus increasing the interlayer space and rendering the layered GpO easier to cleave by an exfoliation treatment [25]. As shown in fig. 5.3a, the formation of GpO was confirmed by the characteristic peak (2θ), which was weaker and wider at 9.222° , corresponding to a d -spacing of 0.959 nm, in contrast to the peak of GF, which was more intense and thin at 26.496° (d -spacing of 0.336 nm); therefore, it is inferred that the oxidation and purification process was effective and allowed the separation of the graphene layers. Furthermore, as observed in fig. 5.3a, as the sonication time of GpO increased, the diffraction line of the GO samples exhibited 2θ peak positions at 9.062 , 9.062 , and 9.162° for p-5, p-15, and p-30, and 8.841 , 8.843 , and 8.863° for b-1, b-3, and b-5, respectively. All of these peaks were smaller than the GpO diffraction peak, which agrees with a previous report [8], indicating that the sonication process increased the d -spacing. These d -spacing values were calculated from Bragg's law, and it was observed that sonication with a bath sonicator achieves samples with greater d -spacing ($d \approx 1.00$ nm) than that of the samples obtained using a probe sonicator ($d \approx 0.97$ nm) for the tested times. Furthermore, the increase in the ultrasonication time affected the peak intensity and width for the samples sonicated using each method. The diffraction peak of b-5 and p-30 was weaker and broader than that of b-1 and p-5, respectively. From the Scherrer equation [26], it is known that the crystallite size is determined by the reciprocal ratio of the half peak at 2θ , so the sheet size in b-5 and p-30 is smaller than that in b-3 and p-15, and these, in turn, are smaller than that in b-1 and p-5, respectively. Thus, the XRD results also confirmed

that prolonging the ultrasonication time causes structural damage, fragmenting the GO sheets and decreasing their size. These results were also consistent with the hydrodynamic size measurements (fig. 5.3b). The hydrodynamic size of each ultrasonication treatment (probe or bath) decreased exponentially with time, with mean values between 280 and 630 nm. We observed a correlation between the reduction of the sheet size and the increasing sonication times.

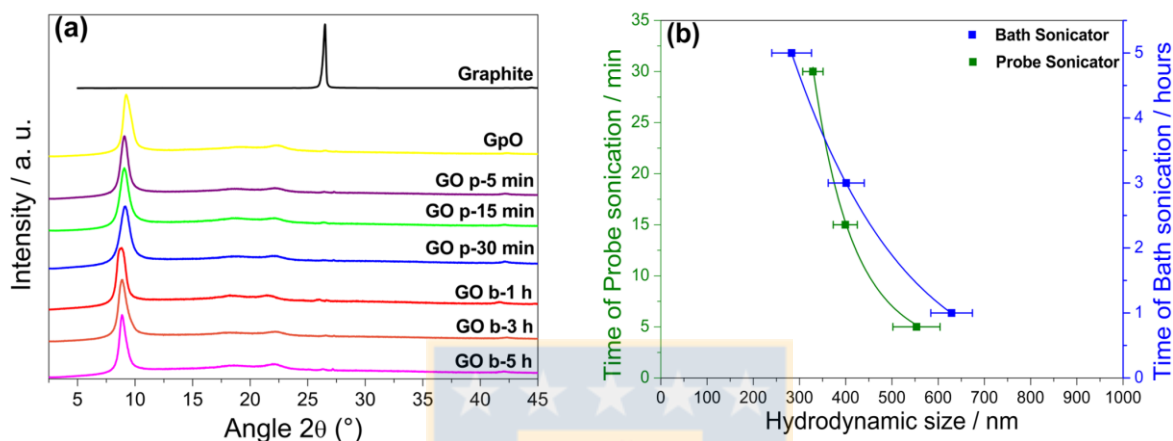


Figure 5.3. (a) Diffractograms of (from above) graphite (GO precursor: black) as received, graphite oxide (GfO; yellow) as synthesized; Graphene oxide (GO) subjected to: 5, 15 and 30 min sonication with GfO probe (s-5: purple; s-15: green; s-30: blue), and 1, 3 and 5 h sonication In bath of GfO (b-1: red; b-3: orange; b-5: magenta). (b) Hydrodynamic sizes of GOs by DLS. Values presented as mean \pm standard deviation, samples measured in triplicate at 0.5 g/L. Source: Own elaboration.

The AFM images of the GpO, b-5 and p-30 samples are shown in fig. 5.4. For GpO, large agglomerations of GO sheets without a recognizable form can be observed (fig. 5.4a). In the height profiles (fig. 5.4d), heights of 8 nm can be observed, indicating the presence of at least three layers of GO corresponding to some incompletely exfoliated layers of GpO particles [27]. In the next 2 cases (fig. 5.4b and 5.4c), the sheets were exfoliated, and a small size (fig. 5.4h and 5.4i) and low height profiles were observed, with a maximum height of 2 nm, which can be interpreted as a GO sheet with a maximum of 2 layers or the presence of large oxygen groups in a monolayer.

In comparison, the b-5 and p-30 samples did not show significant differences regarding their sizes (p -value <0.05) or morphology (fig. 5.4e and 5.4f), but they were larger than the hydrodynamic size results previously discussed. This finding suggests that the hydrodynamic size measurements using DLS were not comparable to those estimated by AFM. This difference might be due to the total amount of material that is accounted for by the AFM method and the sample preparations, which involve washing the silica wafer, possibly removing the smaller GO sheets. Thus, AFM images visually demonstrated a fragmentation of

the GO sheets into smaller pieces with an increasing sonication time of GpO, which agrees with previous reports [8, 13, 16].

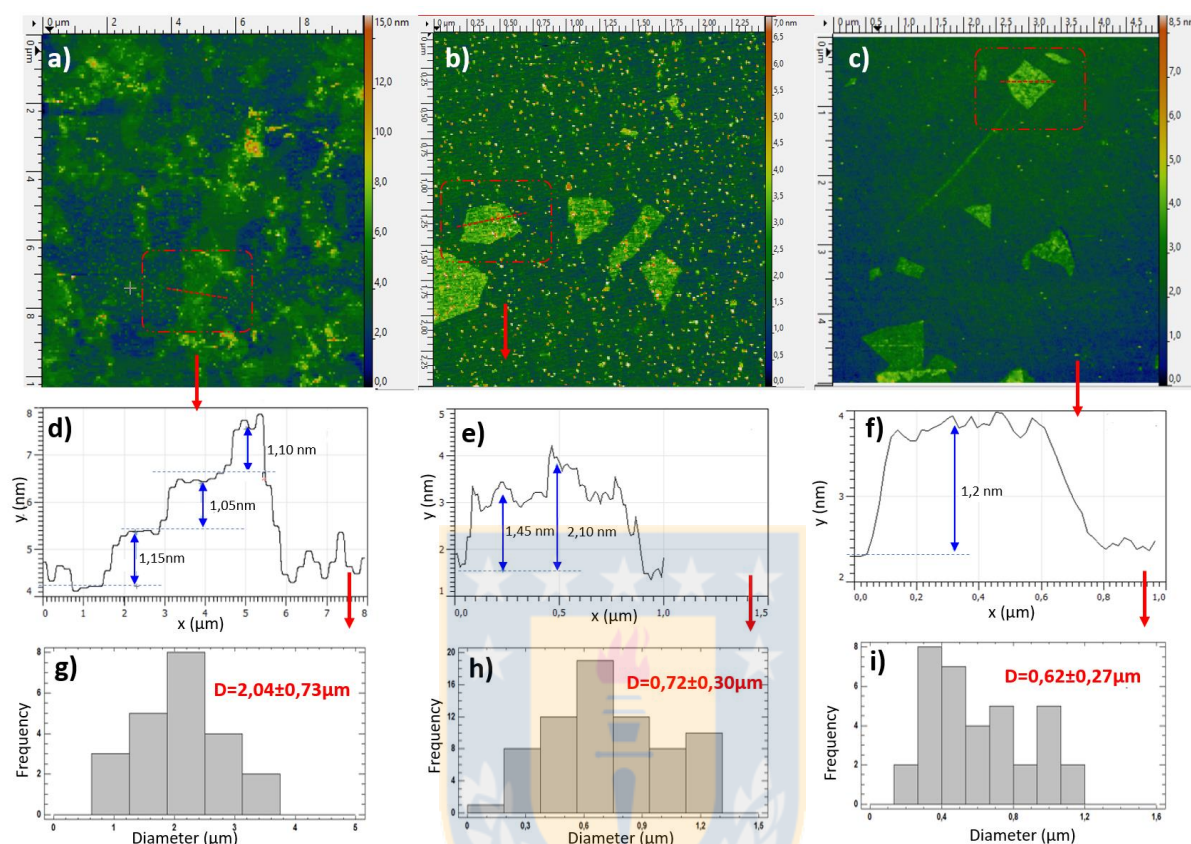


Figure 5.4. (a-c) AFM images, (d-f) height profile of layers, and (g-i) the histograms of size distribution of GpO, GO b-5 and p-30 sheets, respectively. Source: Own elaboration.

Due to the sonication treatment of the p-5 sample, wrinkles appeared both at the edges and on the surface on the GO sheets (fig. SI-10.2, Supporting information). According to the height profiles, these wrinkles have a height of 2.35 nm, which represents 2 layers. These types of "line-wrinkles" have been commonly observed in the AFM images of GpO or GO samples [8, 9], and they were clearly visualized in the SEM image (fig. SI-10.2) of lyophilized GO samples. The amount of wrinkles increased with the sonication time for both the probe and bath sonication methods but to a greater extent on the GO sheets treated with the probe sonicator.

The GO samples had a negative surface charge with respect to the medium (table 5.1), with similar ζ -potential values, indicating a similar oxygen content on the sheets. Generally, the sonication step causes a size decrease and an increase in the oxidation degree of the smaller GO sheets [28, 29], resulting in the formation of more lattice defects, which increase the d -spacing. The change in the oxidation degree can be

evidence by the EA shown in fig. 5.5. The graphite was oxidized, as evidenced by the decrease in the percentage of carbon (C) to 50% with respect to GpO. The GO samples showed an increase in the oxygen (O) content with increasing time, suggesting that the smaller GO sheets achieved a higher oxidation degree vs. the GO samples with a shorter sonication time. The exfoliation with the ultrasonic bath allowed more O content than that using probe ultrasonication.

Table 5.1. Zeta potential (ζ -potencial) of GO samples on MilliQ-water. Values are presented as mean \pm standard deviation. Samples measured in triplicate at 0.5 g/L.

ζ -Potential (mV)	p-5	p-15	p-30	b-1	b-3	b-5
	-53.1 ± 2.1	-49.3 ± 2.8	-50.1 ± 2.9	-53.8 ± 1.6	-52.4 ± 1.3	-52.5 ± 1.3

Source: Own elaboration.

Moreover, the FTIR spectra (fig. SI-10.3) of all the samples presented the same characteristic bands as those associated with GO [30], such as $\text{C}=\text{O}$ ($\sim 1720 \text{ cm}^{-1}$), $\text{C}-\text{OH}$ ($\sim 1225 \text{ cm}^{-1}$), $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ ($\sim 1050 \text{ cm}^{-1}$), and an $\text{O}-\text{H}$ stretching vibration ($3200\text{-}3500 \text{ cm}^{-1}$), as well as the characteristic band at $\sim 1624 \text{ cm}^{-1}$ corresponding to the $\text{C}=\text{C}$ stretching vibration of the sp^2 carbon skeletal network. However, the intensity ratio of the $\text{C}=\text{O}/\text{C}=\text{C}$ peaks remained nearly unchanged in the spectra of all the GO samples (~ 1.008 for probe and ~ 1.018 for bath sonication), while this ratio for the GpO spectrum was higher (~ 1.054), indicating that the GpO sample had the highest content of carbonyl groups; the same finding was observed for the other oxygenated groups, exhibiting a lower ratio than that of GpO. These results suggested that an increase in the sonication time increases the oxidation degree but generates a loss of functional groups compared with those of GpO without sonication. This loss was more noticeable in samples sonicated with a probe than those sonicated in a bath. The decrease in the relative amount of carbonyl groups in the GO sheets may be important if they will be further functionalized for another chemical use.

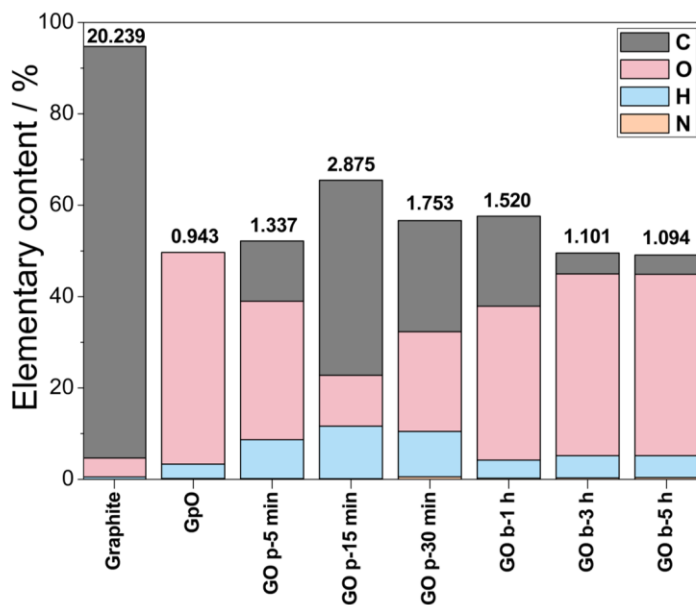


Figure 5.5. Elemental analysis of graphite, GpO and GO samples. The C/O ratio of each sample is inserted over each bar in the figure. Source: Own elaboration.

Fig. 5.6 presents the Raman spectra of the six GO samples, showing two intense bands in the region between 700 and 1800 cm^{-1} . In this region, the band at $\sim 1324 \text{ cm}^{-1}$ is associated with the D band of graphene, which exhibits a dominant intensity compared with that of the G band found at $\sim 1593 \text{ cm}^{-1}$ within the same region. In the high-frequency zone, in the region between 2000 and 3600 cm^{-1} , the band known as 2D or G' or D* is located at $\sim 2699 \text{ cm}^{-1}$ [31]. The form of the 2D band is due to the variation in the amount of functional groups remaining in each of the samples, which is associated with a disordered effect on the morphology of the samples [32]. In each spectra, the 2D band has a wide region with low intensity (fig. 5.6). The behavior of these profiles in the Raman spectrum is related to that of typical samples composed of wrinkled graphene layers, which is explained as a disorderly exponential growth of the layers along the c-axis direction [33]. Each of the six samples had different profiles in the 2D region, indicating that they contain crystalline defects, where the hexagonal arrangement of the GO samples provides a high concentration of stacking points, giving rise to amorphous and low-intensity profiles in the 2D region [34].

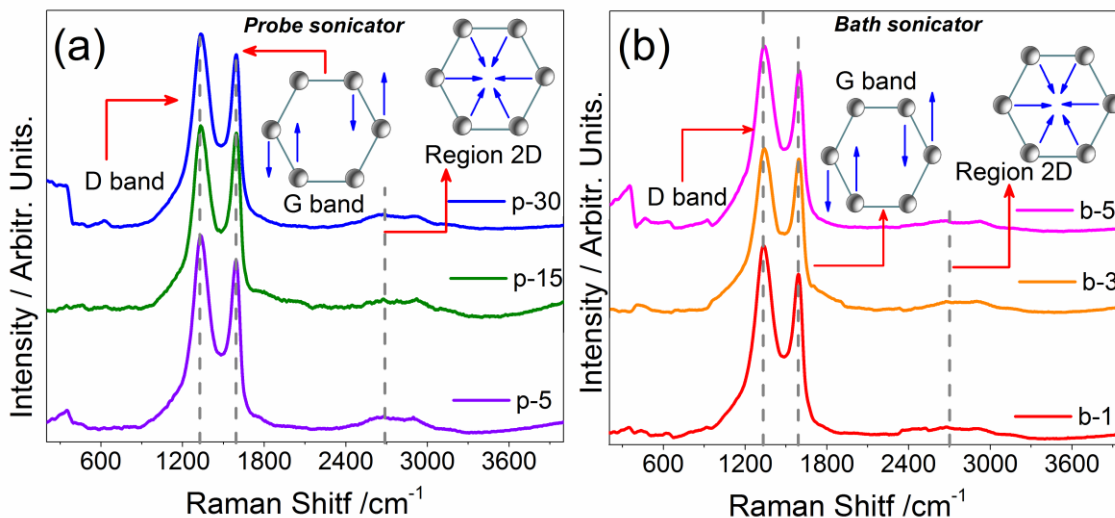


Figure 5.6. Raman spectra recorded using 633 nm laser excitation of graphene oxide (GO) samples sonicated (a) with probe sonicator at the times of 5, 15 or 30 minutes, and (b) in a bath sonicator at 60, 180 or 300 minutes. Source: Own elaboration.

Fig. 5.7 shows the adjustment of the Raman spectrum using Lorentzian curves for the samples in the region of 2000 to 3600 cm^{-1} . Fig. 7a shows the division of the 2D band into four peaks ($G^* \sim 2433 \text{ cm}^{-1}$, $G' = 2D \sim 2649 \text{ cm}^{-1}$, $D+D' \sim 2908 \text{ cm}^{-1}$ and $2D' \sim 3154 \text{ cm}^{-1}$). The spectra of the GO p-5 and p-30 samples indicate that these samples are composed of graphene bilayers [35]. However, the spectrum of GO p-15 indicates a shift and a widening of the G^* band, which is due to deformations on the graphene bilayers due to external thermal gradients during sample growth [36]. These types of deformations could lead to the existence of more than two graphene layers and, as a result, the absence of the G^* band [35, 37]. Fig. 5.7b shows an irregular behavior regarding the G^* band, such that in the spectrum of GO b-1, this band had a higher intensity than that of the other bands, as it was close to the main G' band. This finding is attributed to the amorphous patterns and defects between the bilayers of the carbon atom planes, making the bilayers of atoms appear as a single wrinkled and amorphous layer, inducing uncontrolled growth in the G^* band intensity [38]. The spectra of GO b-3 and b-5 in fig. 6b show a regular intensity of the G^* band, with the characteristic patterns of graphene bilayers [31]. Although the spectrum of GO b-3 in fig. 5.7b displays a displacement of the G^* band in the high-frequency zones, the thermodynamic effect of the stacking between the graphene bilayers was lower than that in the bilayers of the GO p-15 spectrum in fig. 5.7a; this finding was associated with the thermal effects of the stacking of graphene layers.

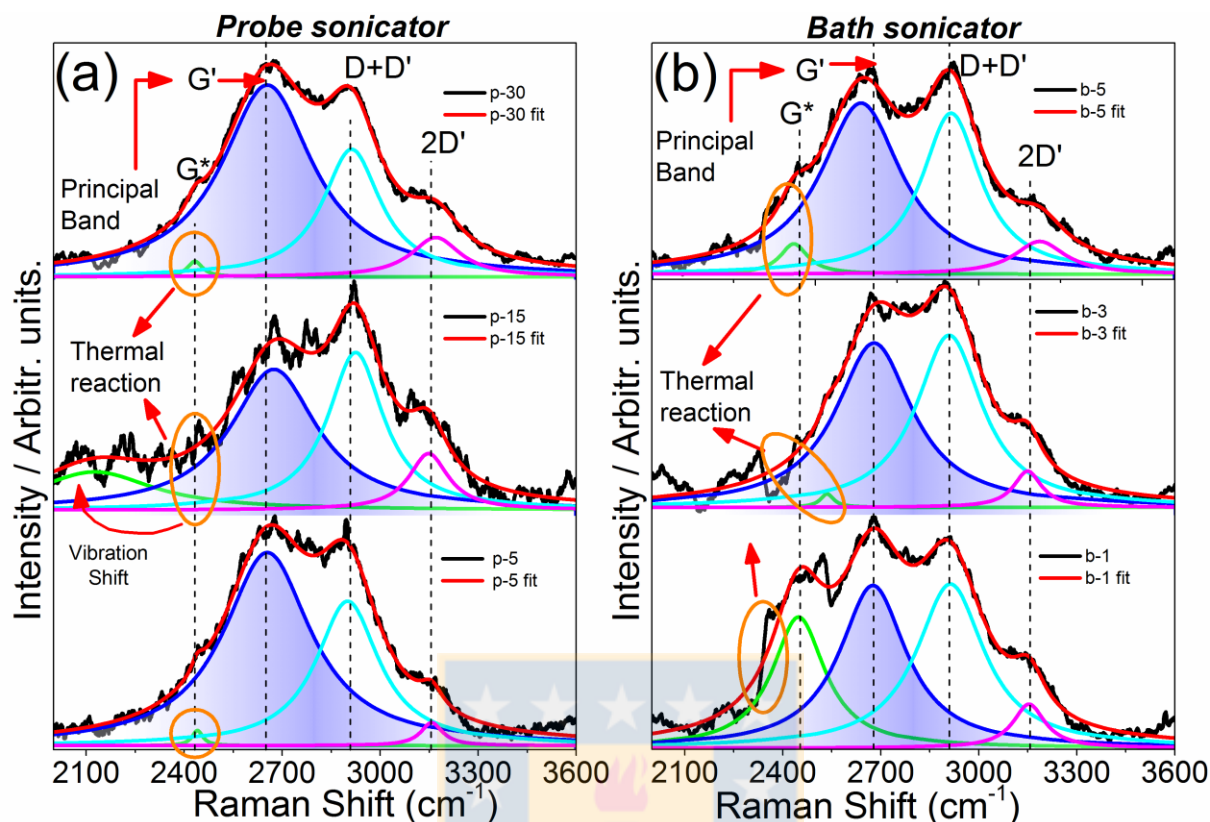


Figure 5.7. Deconvolution of the Raman Spectrum with Lorentzian curves in the 2D region of GO samples sonicated (a) with Probe sonicator at the times of 5, 15 or 30 minutes, and (b) in a Bath sonicator at 60, 180 or 300 minutes. Source: Own elaboration.

As discussed above, the D and G bands in the GO samples indicate the distribution of the number of layers in the samples [32, 39]. As the number of layers increases in the samples originating from graphite, the intensity of the G band decreases [40]. In addition, for samples based on stacked graphene layers, the region between 700 and 1800 cm^{-1} contains common vibrational modes, shown as the D' bands [32]. Fig. 5.8 shows the sample deconvolution with Lorentzian functions of the Raman spectra. In fig. 5.8a and 5.8b, the G band at $\sim 1583 \text{ cm}^{-1}$ experiences an expansion due to the presence of the D' band at $\sim 1609 \text{ cm}^{-1}$, demonstrating the existence of defects in all the samples. The absence of the D' band means that the sample does not contain defects [31]. The low-frequency zone in the adjusted spectra demonstrates the existence of the D* band at 1126 cm^{-1} , revealing the presence of sp^3 faces with a high concentration of amorphous carbons [41]. A D** band was found at $\sim 1508 \text{ cm}^{-1}$, which is attributed to the phonons in the graphite crystals with a finite size and the vibrations of C=C and C-H bonds in carbon compounds with a single hydrogen bonded to the carbon [32, 38]. Thus, the samples sonicated for different times with a probe sonicator showed a change in the vibration frequency for the D*, D, D**, G and D' bands,

indicating the existence of tension on the crystalline planes of GO in the p-5, p-15 and p-30 samples; this tension is manifested in the stacking of the graphene sheets, as shown in fig. 5.7.

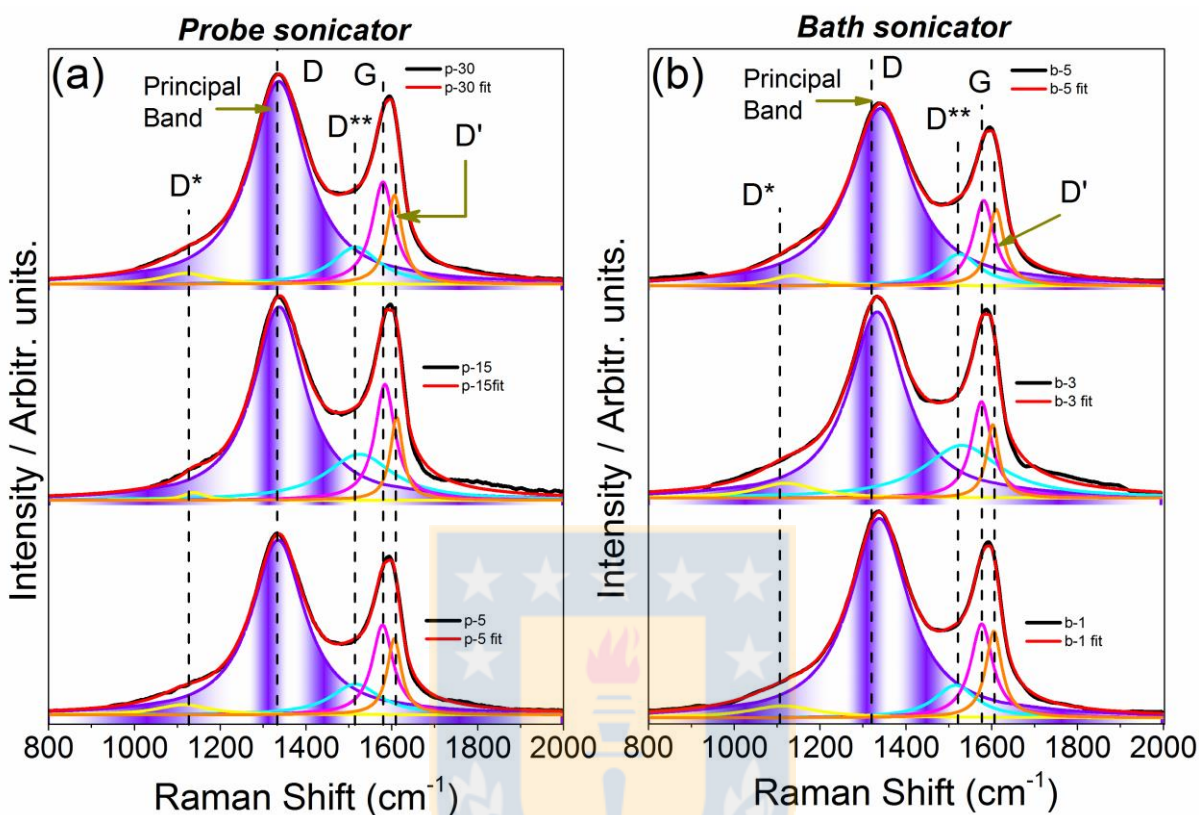


Figure 5.8. Deconvolution of the Raman Spectrum in 800-2000 cm^{-1} of the D and G bands in the D*, D** and D' bands of the GO samples sonicated (a) with probe sonicator at the times of 5, 15 or 30 minutes, and (b) in a bath sonicator at 60, 180 or 300 minutes. Source: Own elaboration.

Fig. 5.9a and 5.9c show the vibration frequency change for the p-1, p-3 and p-5 samples and for the b-1, b-3 and b-5 samples, respectively. For the probe sonication, the maximum stress suffered was expressed in sample p-15 where the main D band underwent a shift of 0.99% relative to the D band in sample p-5. The frequency shift between p-15 and p-30 was almost null since the percentage shift was $\sim 0.01\%$, indicating that the maximum deformation of the graphene sheets was complete within 15 min of sonication with the probe. However, for the bath sonication, the maximum stress suffered by the samples was presented at a time of 300 min for sample GO b-5. Sample b-3 had the minimum vibration frequency with a percentage shift of $\sim 0.3\%$ relative to that of b-5; for b-1, the percentage shift was $\sim 0.07\%$, indicating that the maximum deformation of the graphene sheets was complete within 300 min of bath sonication.

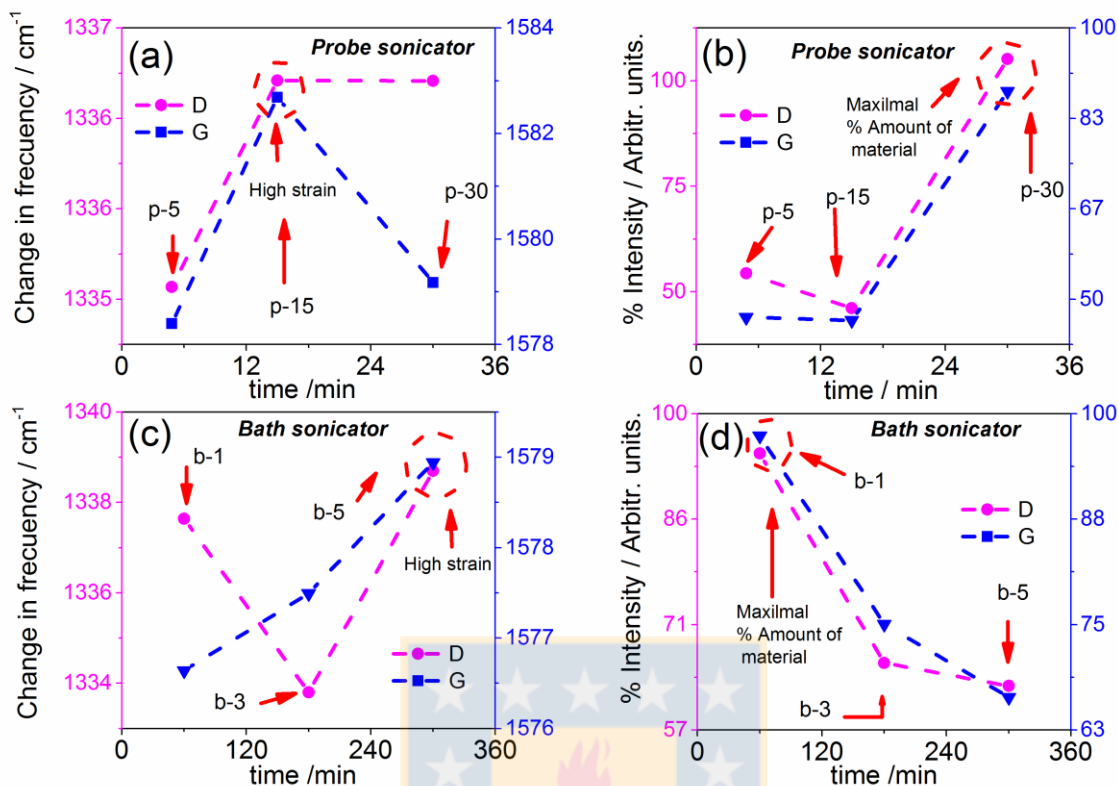


Figure 5.9. Frequency and intensity change for the D*, D, D**, G and D' bands in the 800-2000 cm^{-1} region of the GO samples set. (a) Frequency change and (b) Intensity change of GO samples sonicated with Probe sonicator at the times of 5, 15 or 30 minutes. (c) Frequency change and (d) Intensity change of GO samples sonicated in a Bath sonicator at 60, 180 or 300 minutes. Source: Own elaboration.

Fig. 5.9b and 5.9d show the increased percentage of the maximum vibration intensity for the samples. The maximum value for the D and G bands was observed in the p-30 sample. This finding can be associated with a larger population of vibrating carbon centers in this sample, which is in agreement with the results of fig. 5.9a. In contrast, the bath-sonicated samples presented a decay in the vibration intensity with time for both bands, with the maximum number of carbon centers vibrating in sample b-1, as shown in fig. 5.9d. This result indicates that compared to samples b-3 and b-5, the graphene sheets of b-1 have greater mechanical stability than that of the grain layers.

These results enable an understanding of the structural damage induced in the GO sheets subjected to ultrasound. For the samples studied, when using probe sonication directly on the GpO samples, sonication times greater than 15 min induce deformities between the layers, causing the GO sheets to acquire a greater degree of stacking and degrading their morphological properties. On the other hand, for the samples subjected to bath, before the 300 min of sonication, no structural effects equivalent to those of the probe were observed.

Using the ultrasonic bath treatment, nanometer-size sheets can be obtained using sonication times greater than 60 min. Similar results were achieved by Ye *et al.* [8], with 97-99% <1 μm for both 30 min and 60 min under bath sonication. However, Pan *et al.* [16] observed that 98% of the GO films were <10 μm after completely oxidized GpO was shaken for 6 h and sonicated for 0.5 h; this size is significantly smaller than that obtained from partially oxidized GpO without long-lasting mechanical agitation or sonication. From these differences, it is clear that there is no unique relationship between time and size since other variables, such as the graphite size in the starting material and the synthesis conditions of GpO, should be considered in the effect of time and/or power on the size of GO sheets. A higher or lower degree of oxidation of synthesized GpO results in stronger or weaker GO films, respectively, and films that are susceptible to fracture upon the entry of external mechanical energy such as ultrasound [29, 42]. Therefore, it is not possible to estimate the size as a function of time if the preparation starts with samples having different degrees of oxidation. In addition, the graphite size affects the size of the synthesized GO sheets [43] since a smaller graphite particle size (10000 vs. 325 mesh) generates smaller GO sheets (0.2-0.4 μm vs. 0.6-0.8 μm average size, respectively).

For the probe sonication treatment, at least 30 min are required to achieve nanometer-size GO sheets. This finding agrees with the results reported by Liao *et al.* [44], who obtained GO sample sizes of <1 μm for a sample sonicated with a probe for 30 min. Regardless of the equipment used for the GpO exfoliation treatment, the working power of the equipment must be considered. Significant differences were found when comparing the effect of bath sonication with probe sonication in which a higher power caused greater damage to the chemical composition and morphology of the GO sheets.

5.5. Conclusion

In this work, GO was prepared from GOFs using Hummers' method; GpO samples were subjected to direct mechanical exfoliation using a probe sonicator or indirect exfoliation using a bath sonicator. The experimental results showed that both of the sonication treatments were effective for exfoliation, as they can fragment the GO sheets, thus decreasing the size and increasing the interlayer space, resulting in an exfoliation to thin sheets. However, increases in the sonication time and the sonication power (or type of equipment) caused substantial damage to the structure and morphology of GO sheets. Comparing the bath and probe sonication methods, for the same sonication time, probe causes more damage and wrinkles on the GO sheets; in addition, probe-sonicated samples showed a more noticeable reduction in the amount of functional groups available for further chemical transformations. The loss of functional groups may not be desirable if the GO sheets will be functionalized after the exfoliation process. Thus, the use of bath ultrasonication to obtain GO sheets is preferable to probe ultrasonication since it is less invasive, allows easy control of the sample temperature, and causes fewer wrinkles and less damage to the sheet structure and morphology. Raman analysis showed results enable an understanding of the structural damage induced in the GO sheets subjected to ultrasound. When using probe sonication directly on the GpO samples, sonication times greater than 15 min induce deformities between the layers, causing the GO sheets to acquire a greater degree of stacking and degrading their morphological properties. For samples subjected to bath sonication, damage to the GO sheets occurs after 300 min of continuous sonication. It is recommended that a sample should not be subjected to more than 15 min of probe sonication because the additional time generates greater tension in the GO sheets, thus decreasing their size without achieving further exfoliation. In general, probe sonication causes a greater number of deformations on the GO sheets than that of the ultrasonic bath. Therefore, it is advisable to use the bath method instead of the probe method, as it is less invasive, does not require direct contact with the samples, and allows easy control of the sample temperature, which is an important factor for avoiding the thermal effects that generate deformations in GO sheets. In addition, compared with probe sonication, bath sonication causes less structural and morphological damage and can achieve equal sheet sizes, with more chemical groups available for further functionalization.

5.6. References

- [1] A.K. Geim, K.S. Novoselov, The rise of graphene, *Nat Mater* 6(3) 183-191 (2007).
- [2] C.N.R. Rao, U. Maitra, H.S.S.R. Matte, Synthesis, characterization, and selected properties of graphene, graphene, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA2012, pp. 1-47.
- [3] V.C. Sanchez, A. Jachak, R.H. Hurt, A.B. Kane, Biological interactions of graphene-family nanomaterials: an interdisciplinary review, *Chemical research in toxicology* 25(1) 15-34 (2012).
- [4] K.E. Whitener Jr, P.E. Sheehan, Graphene synthesis, *diamond and related materials* 46 25-34 (2014).
- [5] D.R. Dreyer, S. Park, C.W. Bielawski, R.S. Ruoff, The chemistry of graphene oxide, *Chemical Society reviews* 39(1) 228-40 (2010).
- [6] K. Wang, J. Ruan, H. Song, J. Zhang, Y. Wo, S. Guo, D. Cui, Biocompatibility of Graphene Oxide, *Nanoscale Res Lett* 6(1) 1-8 (2010).
- [7] V. Georgakilas, Functionalization of graphene by other carbon nanostructures, functionalization of graphene, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA2014, pp. 255-282.
- [8] S. Ye, J. Feng, The effect of sonication treatment of graphene oxide on the mechanical properties of the assembled films, *RSC Advances* 6(46) 39681-39687 (2016).
- [9] K.H. Liao, Y.S. Lin, C.W. Macosko, C.L. Haynes, Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts, *ACS Appl Mater Interfaces* 3(7) 2607-15 (2011).
- [10] D. Li, M.B. Muller, S. Gilje, R.B. Kaner, G.G. Wallace, Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets, *Nature nanotechnology* 3(2) 101-5 (2008).
- [11] D.R. Dreyer, S. Park, C.W. Bielawski, R.S. Ruoff, The chemistry of graphene oxide, *Chemical Society reviews* 39(1) 228-240 (2010).
- [12] U. Khan, A. O'Neill, M. Lotya, S. De, J.N. Coleman, High-concentration solvent exfoliation of graphene, *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 6(7) 864-71 (2010).
- [13] Y. Li, R. Umer, Y.A. Samad, L. Zheng, K. Liao. The effect of the ultrasonication pre-treatment of graphene oxide (GO) on the mechanical properties of GO/polyvinyl alcohol composites, *Carbon* 55 321-327 (2013).
- [14] R. Ruoff, Graphene: Calling all chemists, *Nat Nano* 3(1) 10-11 (2008).
- [15] Y. Guo, B. Duan, L. Cui, P. Zhu, Construction of chitin/graphene oxide hybrid hydrogels, *Cellulose* 22(3) 2035-2043 (2015).
- [16] S. Pan, I.A. Aksay, Factors controlling the size of graphene oxide sheets produced via the graphite oxide route, *ACS nano* 5(5) 4073-4083 (2011).
- [17] C.-Y. Su, Y. Xu, W. Zhang, J. Zhao, X. Tang, C.-H. Tsai, L.-J. Li, Electrical and Spectroscopic Characterizations of Ultra-Large Reduced Graphene Oxide Monolayers, *Chemistry of Materials* 21(23) 5674-5680 (2009).
- [25]. S. Reich and C. Thomsen, Philos. Raman spectroscopy of graphite *T. Roy. Soc. A* 362, 2271 (2004).
- [26]. M. A. Pimenta, G. Dresselhaus, M. S. Dresselhaus, L. G. Cancado, A. Jorio, and R. Saito, Studying disorder in graphite-based systems by Raman spectroscopy, *Chem. Chem. Phys.* 9, 1276 (2007)
- [27]. L. M. Malard, M. A. Pimenta, G. Dresselhaus, and M. S. Dresselhaus, Raman spectroscopy in graphene, *Phys. Rep.* 473, 51 (2009).

- [28]. A. C. Ferrari, Raman spectroscopy of graphene and graphite: Disorder, electron–phonon coupling, doping and nonadiabatic effects. *Solid State Commun.* 143, 47 (2007).
- [29]. A. C. Ferrari, J. C. Meyer, V. Scardaci, C. Casiraghi, M. Lazzeri, F. Mauri, S. Piscanec, D. Jiang, K. S. Novoselov, S. Roth, and A. K. Geim, Raman Spectrum of Graphene and Graphene Layers, *Phys. Rev. Lett.* 97, 187401 (2006).
- [23] W.S. Hummers, R.E. Offeman, Preparation of graphitic oxide, *Journal of the American Chemical Society* 80(6) 1339-1339 (1958).
- [24] D.C. Marcano, D.V. Kosynkin, J.M. Berlin, A. Sinitskii, Z. Sun, A. Slesarev, L.B. Alemany, W. Lu, J.M. Tour, Improved synthesis of graphene oxide, *ACS nano* 4(8) 4806-4814 (2010).
- [25] M. Cai, D. Thorpe, D.H. Adamson, H.C. Schniepp, Methods of graphite exfoliation, *Journal of Materials Chemistry* 22(48) 24992-25002 (2012).
- [26] A. Weibel, R. Bouchet, F. Boulc, P. Knauth, The big problem of small particles: A comparison of methods for determination of particle size in nanocrystalline anatase powders, *Chemistry of Materials* 17(9) 2378-2385 (2005).
- [27] K.P. Loh, Q. Bao, P.K. Ang, J. Yang, The chemistry of graphene, *Journal of Materials Chemistry* 20(12) 2277-2289 (2010).
- [28] J. Chen, Y. Zhang, M. Zhang, B. Yao, Y. Li, L. Huang, C. Li, G. Shi, Water-enhanced oxidation of graphite to graphene oxide with controlled species of oxygenated groups, *Chemical Science* 7(3) 1874-1881 (2016).
- [29] L. Zhang, J. Liang, Y. Huang, Y. Ma, Y. Wang, Y. Chen, Size-controlled synthesis of graphene oxide sheets on a large scale using chemical exfoliation, *Carbon* 47(14) 3365-3368 (2009).
- [30] Rattana, S. Chaiyakun, N. Witit-anun, N. Nuntawong, P. Chindaudom, S. Oaew, C. Kedkeaw, P. Limsuwan, Preparation and characterization of graphene oxide nanosheets, *Procedia Engineering* 32 759-764 (2012).
- [31] L.M. Malard, M.A. Pimenta, G. Dresselhaus, M.S. Dresselhaus, Raman spectroscopy in graphene, *Physics Reports* 473(5–6) 51-87 (2009).
- [32] A. Kaniyoor, S. Ramaprabhu, A Raman spectroscopic investigation of graphite oxide derived graphene, *AIP Advances* 2(3) 032183 (2012).
- [33] M.A. Pimenta, G. Dresselhaus, M.S. Dresselhaus, L.G. Cancado, A. Jorio, R. Saito, Studying disorder in graphite-based systems by Raman spectroscopy, *Physical Chemistry Chemical Physics* 9(11) 1276-1290 (2007).
- [34] R. Beams, L. Gustavo Cancado, L. Novotny, Raman characterization of defects and dopants in graphene, *Journal of physics. Condensed matter : an Institute of Physics journal* 27(8) 083002 (2015).
- [35] D. Graf, F. Molitor, K. Ensslin, C. Stampfer, A. Jungen, C. Hierold, L. Wirtz, Spatially resolved raman spectroscopy of single- and few-layer graphene, *Nano Letters* 7(2) 238-242 (2007).
- [36] L.G. Cançado, K. Takai, T. Enoki, M. Endo, Y.A. Kim, H. Mizusaki, N.L. Speziali, A. Jorio, M.A. Pimenta, Measuring the degree of stacking order in graphite by Raman spectroscopy, *Carbon* 46(2) 272-275 (2008).
- [37] A. Gupta, G. Chen, P. Joshi, S. Tadigadapa, P.C. Eklund, Raman scattering from high-frequency phonons in supported n-graphene layer films, *Nano Lett* 6(12) 2667-73 (2006).
- [38] A.C. Ferrari, J.C. Meyer, V. Scardaci, C. Casiraghi, M. Lazzeri, F. Mauri, S. Piscanec, D. Jiang, K.S. Novoselov, S. Roth, A.K. Geim, Raman spectrum of graphene and graphene layers, *Physical review letters* 97(18) 187401 (2006).
- [39] M.M. Lucchese, F. Stavale, E.H.M. Ferreira, C. Vilani, M.V.O. Moutinho, R.B. Capaz, C.A. Achete, A. Jorio, Quantifying ion-induced defects and Raman relaxation length in graphene, *Carbon* 48(5) 1592-1597 (2010).

- [40] M.A. Bissett, M. Tsuji, H. Ago, Strain engineering the properties of graphene and other two-dimensional crystals, *Physical Chemistry Chemical Physics* 16(23) 11124-11138 (2014).
- [41] R.E. Shroder, R.J. Nemanich, J.T. Glass, Analysis of the composite structures in diamond thin films by Raman spectroscopy, *Physical review. B, Condensed matter* 41(6) 3738-3745 (1990).
- [42] J. Zhao, S. Pei, W. Ren, L. Gao, H.-M. Cheng, Efficient preparation of large-area graphene oxide sheets for transparent conductive films, *ACS Nano* 4(9) 5245-5252 (2010).
- [43] Y.-D. Gao, Q.-Q. Kong, Z. Liu, X.-M. Li, C.-M. Chen, R. Cai, Graphene oxide aerogels constructed using large or small graphene oxide with different electrical, mechanical and adsorbent properties, *RSC Advances* 6(12) 9851-9856 (2016).
- [44] K.-H. Liao, Y.-S. Lin, C.W. Macosko, C.L. Haynes, Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts, *ACS Applied Materials & Interfaces* 3(7) 2607-2615 (2011).



6. DEVELOPMENT OF GRAPHENE OXIDE COMPOSITE AEROGEL WITH PROANTHOCYANIDINS (PAs) WITH HEMOSTATIC PROPERTIES AS A DELIVERY SYSTEM

Este capítulo corresponde a una parte de un manuscrito que será enviado a publicación, y cuyos coautores se mencionan a continuación:

C. Mellado^a, R. Báez^b, R. Castillo^c, M. Melendrez^d, B. Schulz^e, K. Fernández^a

^aLaboratory of Biomaterials, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, University of Concepción, Concepción, Chile.

^bDepartment of Physics, Faculty of Physical and Mathematical Sciences, University of Concepción, Concepción, Chile.

^cDepartment of Instrumental Analysis, Faculty of Pharmacy, University of Concepción, Concepción, Chile.

^dDepartment of Materials, Faculty of Engineering, University of Concepción, Concepción, Chile.

^eDepartment of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, University of Concepción, Concepción, Chile.

6.1. Abstract

A significant amount of research has already taken place into graphene aerogels' attractiveness for many applications. However, their dermal potential use as both a hemostatic agent and dermal delivery system has scarcely been investigated. In this study, we used a sol-gel process for generating dry and stable composite aerogels based on graphene oxide (GO) and polyvinyl alcohol (PVA). Furthermore, we incorporated natural extract of País grape seed (SD) and skin (SK), rich in Proanthocyanidins (PAs or condensed tannins), into the aerogels and compared the effectiveness of each one. Different hydrogels were obtained and converted to aerogels by a lyophilization process. The effect of the incorporation of the grape extracts was investigated in relation to the aerogels' structure, coagulation performance and the release of the extracts. The results demonstrated that the aerogels favor coagulation and the delivery of compounds. They have a porous structure and low density, capable of absorbing water and blood (73 times their own weight). The incorporation of 12% (w/w) of PA extracts into the aerogel increased the coagulation of whole blood. The negative zeta potential of the material also rose by 33% (-18.3 ± 1.3 mV), and as a consequence the coagulation time was reduced by 37% and 28% during the first 30 and 60 seconds of contact between the aerogel and whole blood, respectively. The release of extracts from the GO-PVA-SD and GO-PVA-SK aerogels was prolonged to 3 h but reached only 20%, probably due to the existence of strong binding between PAs and GO-PVA, both characterized by the presence of aromatic and hydroxyl groups that can form non-covalent bonds but strong and stable enough to avoid a greater release into the medium. This work provides a new GO-based aerogel, which has a great potential use in the field of dermal delivery, wound healing and/or the treatment of trauma bleeding.

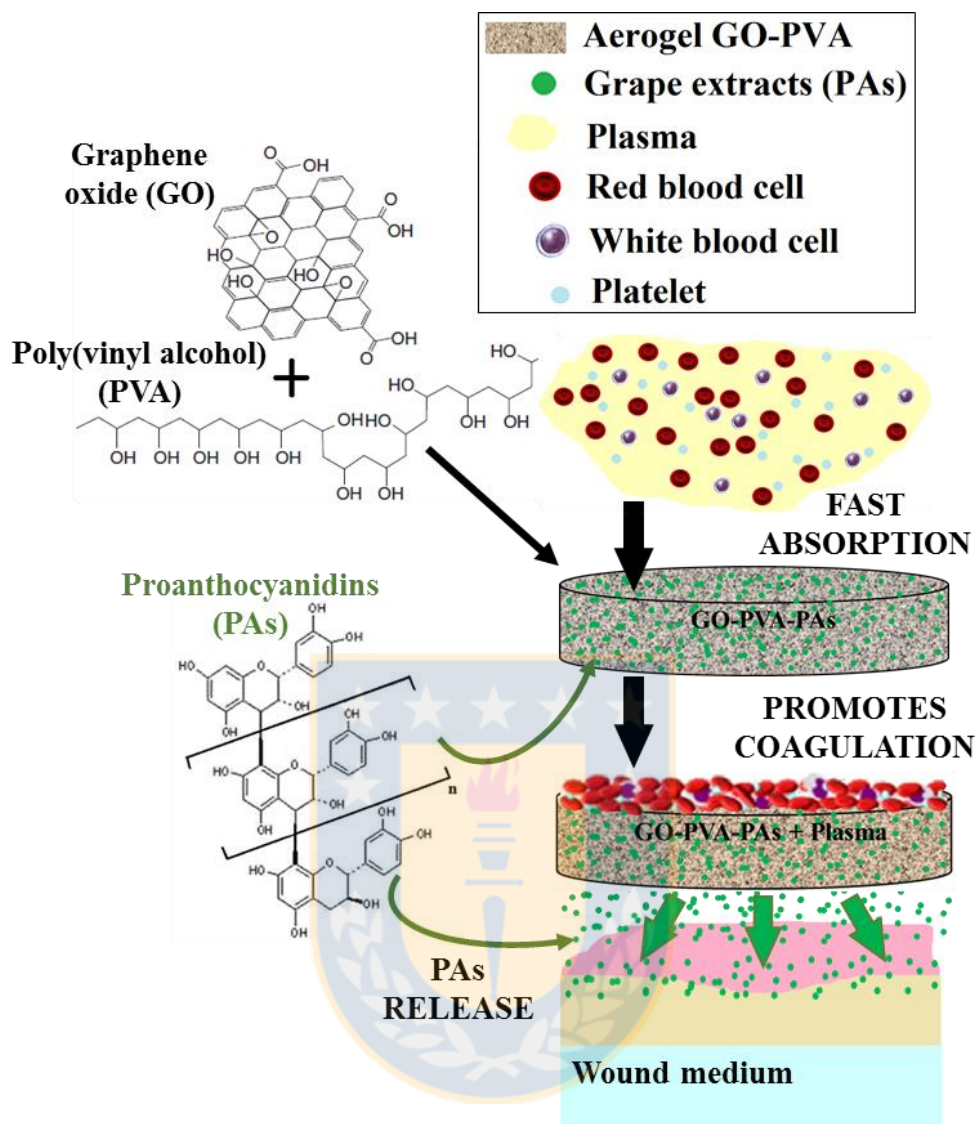


Figure 6.1. Graphical Abstract of “Development of graphene oxide composite aerogel with Proanthocyanidins (PAs) as delivery system and reinforcement the hemostatic properties”. Source: Own elaboration.

6.2. Introduction

The development of effective functional systems for therapeutic management is one of the most important challenges of modern medicine. Both, effective hemostatic agents that rapidly control wound bleeding or trauma, and the administration of topical formulations to control the release of drugs or biomolecules for wound healing are vital for the healing of chronic or acute wounds, to reduce healing time, avoid bacterial infections, aid optimal recovery of the wound, or even for survival, considering that excessive bleeding can be a cause of death in both civilian and military medicine (Alam, Koustova and Rhee, 2005).

There are different pros and cons related to hemostatic agents, dermal delivery systems and wound dressing currently used (Boateng, 2015), which inspire and justify the search for new materials. Some hemostatic materials, such as zeolites, mesoporous silica, or sponges, rely on the rapid absorption of the liquid component of the blood to accelerate the aggregation of red blood cells and platelets, which promotes hemostasis (Alam, Burris et al., 2005; Dai, Yuan et al., 2009; Dai, Liu, et al., 2010; Kozen, et al. 2008; Shukla, et al., 2012). Others, such as those based on chitosan, promote blood clotting by the loading effect i.e., positively charged chitosan attracts negatively charged erythrocytes to form a layer of blood clot (Gu et al., 2010); while other agents incorporate specific factors into the blood coagulation mechanism (such as thrombin or fibrin) in matrices of gelatins, hydrogels, cellulose based products, or the combination thereof. Their action mechanism is based –both on the ability to "plug" the wound, and on the release of components in the body's coagulation system that favor hemostasis (Traver and Assimos, 2006). The use of alginate aerogels, pectin and/or a combination of them for wound healing applications has been reported, taking into consideration their high liquid retention capacity (Mallepally et al., 2013; Del Gaudio et al., 2013; García-González et al., 2015).

Recently, on the basis of absorption capacity as a hemostatic mechanism, the potential use of a cross-linked graphene sponge (aerogels) with remarkable hemostatic performance has been reported capable of absorbing blood plasma rapidly, allowing the accumulation of blood cells on its surface, and also stimulating erythrocytes and platelets to change their normal structure and shape at the interface, which further promotes blood clotting on the wound surface (Quan et al., 2015; 2016). Carbon aerogels are lightweight materials that exhibit extremely low density, a 3D network, high specific surface area, and a high porosity structure (Wang and Ellsworth, 2009). They can be synthesized from graphene oxide (GO), a nanomaterial whose intrinsic properties make it and its functionalized derivatives very attractive for biomedical applications such as drug delivery, tissue engineering and cancer therapy (Liu et al., 2013; Yin

et al., 2015). GO has a two-dimensional planar structure, is biocompatible, hydrophilic and possesses the ability to incorporate molecules and functional groups on their surfaces for functional modifications. PVA-supported GO aerogels have already been successfully synthesized, with a high structural stability and adsorption performance (Dai, 2016).

Various stimuli have been used to cause the release of drugs from graphene-based matrices, including pH (Yang, 2008; Bai, 2010; Turcheniuk, 2014), electrical (Weaver, 2014), electrochemical (Lee, 2016) and light (Kim, 2014). When the drugs are attached to the drug carriers such as GO, via pH-sensitive linkers, it is possible to control the release of the drug by manipulating the pH value of environments.

Drug delivery systems (DDS) based on GO that respond to environmental stimulation have been reported: GO functionalized by covalent or noncovalent modifications (Georgakilas, 2012), hydrogels based on GO used as a carrier for delivery of an anticancer drug, such as Doxorubicin (Liu, 2008; Wen, 2012; Wu, 2012; Bai, 2011), vitamin B12 (Bai, 2010), 5-Fluorouracil (Wang, 2014), flavonoids (Rahmanian, 2014) among others, under different controlled pH conditions.

Although the study of natural bioactive compounds has increased over the past few decades, few studies in the stabilization of natural compounds, such as Proanthocyanidins (PAs or condensed tannins) on substrates such as GO are available. Proanthocyanidins (PAs, oligomeric and polymeric flavan-3-ols) are high molecular weight polyphenolic compounds (over 500 Da). Natural extracts with high PA content can be extracted from the skin and seed of *País* grapes (*Vitis vinifera L.*) (Godoy, 2012). PAs have a potential to be used for wounds due to their reported bioactivities and beneficial properties, such as wound healing, antiinflammatory and antibacterial activities (Georgiev, 2014; Lodhi, 2013; Nayak, 2010; Jayaprakasha, 2003; Rhodes, 2006).

We investigated the opportunities offered by GO-reinforced PVA aerogels obtained by freeze-drying hydrogels, a method that allows the preservation of the porous nanostructure of the wet gel in a dry form by incorporating into them *País* grape extracts, rich in PAs. Thus, we take advantage of the bioactive properties of the PAs, which can also increase the level of oxidation and the negative charges of the material through its hydroxyl groups, which favors the coagulation process. Thus, the aim of this research is to develop porous aerogels based on GO with the inclusion of PAs, as agents that promote coagulation, for use in dermal, hemostatic and/or wound healing applications.

6.3. Experimental

6.3.1. Materials

Graphite powders (Flake, mesh 325) were bought from Asbury Online (Asbury Carbons, N.J., USA). GO particle suspension was synthesized by the oxidation of natural graphite powder using Hummers' method (Hummers and Offeman, 1958) and subsequent exfoliation by ultrasound. Poly(vinyl alcohol) (PVA, molecular weight 85000-124000 and hydrolysis degree ~99%) was purchased from Sigma Aldrich Company (St. Louis, MO, USA). All the other chemicals and solvents, such as sulfuric acid (H_2SO_4 , 98%), potassium permanganate powder (KMnO_4 , 99.9%), sodium nitrate (NaNO_3), hydrochloric acid (HCl , 37%), and calcium chloride (CaCl_2), were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and they were used as received, without further purification. The País véraison grapes were collected on March 15, 2012, from the Quillón Valley, Biobío Region, Chile, and the grapes were preserved in sealed bags and frozen at -18°C . País grape extracts were produced at the Bioengineering Laboratory of the Chemical Engineering Department, University of Concepción (Concepción, Chile), as described below. Milli-Q water was used throughout the work. Gauze sponge (sterile, aseptic and hydrophilic, 100% cotton) was purchased from a commercial pharmacy.

6.3.2. Graphene oxide (GO) synthesis

Graphite oxide (GpO) particle suspension was synthesized by the oxidation of natural graphite powder using Hummers' method (Hummers and Offeman, 1958; Marcano, 2010). Graphite powder (5 g), concentrated sulfuric acid 98% (H_2SO_4 , 115 mL) and sodium nitrate (NaNO_3 , 2.5 g) were mixed in an ice bath for 4 h followed by the slow addition of KMnO_4 (15 g) with stirring for 2 h. The rate of addition was carefully controlled to prevent the temperature of the suspension from exceeding 20°C , then the ice bath was removed and the temperature of the suspension brought to 35°C and maintained for 30 minutes. Milli-Q water (250 mL) was slowly added to the reaction mixture and the temperature was controlled below 70°C for 20 min. Subsequently, Milli-Q water (~2 L) and 30% (v/v) H_2O_2 were added separately, resulting in a yellow brown mixture. Finally, the mixture was centrifuged and washed with aqueous HCl solution (5% v/v) and then with Milli-Q water to remove metal ions, until the pH of the upper layer of suspension was near 7. To verify the washing, the indicators of $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ and AgNO_3 were used. Dry GpO powder was obtained by drying at 40°C for 72 h under vacuum. The GpO obtained was able to form stable aqueous dispersion owing to its strong hydrophilicity, which was dialyzed for 1 week to remove any impurities. The resulting GpO aqueous dispersion was then stirred and sonicated for 15 minutes (Digital

Ultrasonic Cleaner model, 42 kHz, 160 W) to exfoliate it to GO. The GO dispersion was then centrifuged at 3000 r.p.m. for 40 minutes twice to remove the unexfoliated particles (Chen, 2015).

6.3.3. *País grape seed and skin extract production*

The seeds and skin of 200 País grapes were separated manually. The extraction was performed in an Erlenmeyer flask with 250 mL of 33% (v/v) of acetone in water using a New Brunswick G24 gyratory shaker (New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ, USA) for 15 h at room temperature and in the dark to avoid oxidation. The acetone was eliminated at a reduced pressure and temperature (<35°C) in a rotary evaporator (Bibby Sterilin Ltd, RE-100B, Stone Staffordshire, England) until 50 mL of the grape seed and skin extract remained. The liposoluble compounds of the grape extract were removed using three 50 mL washing steps with n-hexane. For diffusion coefficient measurements and aerogel synthesis, we used these raw extracts.

6.3.4. *Preparation of aerogels*

A polymer reinforced graphene oxide aerogel (GO-PVA) was prepared with GO and PVA by non covalently attached. They were attached by simple blending (Bai, 2010; Dai, 2016), with some modifications. A PVA solution (10 mg/mL) was prepared, in a sonicating bath and with stirring at 50 °C, until the PVA was completely dissolved. Then, GO was dispersed in Milli-Q water to form a dispersion of 10 mg/mL, and 5 mL GO (10 mg/mL) was poured into 2.5 mL of PVA solution (10 mg/mL) into Falcon tubes and vigorously stirred for 20 seconds to form the hydrogel. Finally, for the gelation process, the sample was subjected to ultrasonication (bath) for 10 minutes. The final GO content in the hydrogel was 5 mg/mL. The GO-PVA mixture was poured onto glass slides, or into culture dishes or cylindrically shaped molds to obtain different aerogel shapes. Samples were pre-frozen in the refrigerator at -15°C for 48 h. The frozen GO-PVA were lyophilized (Labconco freeze dry system, Alemania) for 36-48 h, enough time that allowed the formation of the porous structure of the different aerogel samples through the sublimation of water. GO-PVA aerogels loaded with seed or skin extracts were prepared. Solutions of 4 g/L of skin extract (SK) and seed extract (SD) of País grapes were prepared. Then, 2.5 mL of each extract solution was added to the GO-PVA mixture, prepared as mentioned above. GO-PVA-SD and GO-PVA-SK aerogels were obtained by following the same process as for GO-PVA. The structure, morphology and composition of aerogels were investigated using Raman spectroscopy, Scanning Electron Microscopy (SEM), X-Ray Diffraction (XRD), Fourier Transform Infrared microspectroscopy by Attenuated Total Reflectance (micro FTIR), Atomic Force Microscopy (AFM), Thermogravimetric Analysis (TGA),

Elemental Analysis (EA) and ζ -Potential measurements. A detailed aerogels characterization is included in the S.I. Moreover, in order to estimate the absorption capacity of the aerogels, a test was carried out with water (See details in S.I.).

6.3.5. *In vitro dynamic whole-blood clotting*

In order to evaluate the coagulation capacity of the aerogels, an *in vitro* coagulation time test was performed, which allowed the comparison of coagulation efficiency between GO-PVA and GO-PVA-extracts with respect to a control, using reported methodologies (Behrens, 2014; Quan, 2015; Shih, 2006). A total volume of 50 μl of fresh blood (from a healthy volunteer) was dropped directly into each of six test groups, including a blank, Ca^{2+} (4 μl of CaCl_2 solution, 0.2 mol/L), sterile gauze sponge, and the aerogels synthesized (GO-PVA, GO-PVA-SD and GO-PVA-SK) in precipitated glass vessels of 50 mL. Samples of equal size ($\sim 1 \times 1 \times 0.25 \text{ cm}^3$) were used. Each group was allowed to interact for 30, 60, 120, and 240 s, at room temperature. After each time, 10 ml of Milli-Q water was added slowly onto the sample to stop the coagulation process and quantify the uncoagulated blood from the supernatant. The hemoglobin content in the supernatant of each sample was estimated by measuring the absorption with a UV-VIS double beam spectrophotometer (Techcomp, UV2300, China) at 540 nm. As a reference value, the absorption of 50 μl fresh blood in 10 ml Milli-Q water (the blank) was measured. As a blood clotting index, the hemoglobin content in the resulting solution was quantified for each group at each time interval, using the following equation: Hemoglobin Absorbance = $\text{Is}/\text{Ir} \times 100\%$, where **Is** is the absorbance of the resulting sample, and **Ir** is the absorbance of the reference value. This experiment was repeated 3 times with the blood of the same individual under the same conditions.

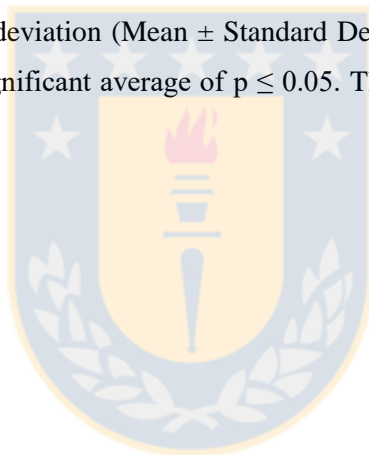
6.3.6. *In Vitro País grape extracts release test*

The release kinetics of extracts from the GO-PVA-SD and GO-PVA-SK aerogels matrix were performed with aerogel samples with an initial amount of extract incorporated as described above and of similar size ($\sim 2 \times 2 \times 0.1 \text{ cm}^3$), which were weighed before the test. The medium in which the extracts were released was a phosphate saline solution (PBS), which simulates blood plasma conditions and/or exudate from a wound. The aerogels were immersed in PBS at 37 °C and pH 7.4, capped with parafilm to avoid evaporation of the fluid, and about 1 ml of the solution was extracted at every certain time interval during about 9 hours, to analyze the evolution of the released extract concentration over time. Meanwhile, the same volume of PBS solution was added to keep the volume constant. The difference in extract concentrations between the original PBS solution and the supernatant (with dissolved extract) at time t_i ,

were measured using a dual-beam UV-VIS spectrophotometer (Techcomp, UV2300, China) at a wavelength of 765 nm. The amount of extract released from the aerogel, $Q_d(t_i)$, at time t_i was calculated using the following equation: $Q_d(t_i) = q_d(t_i)/m$, where $q_d(t_i)$ is the content of total phenols in the medium (mg eq gallic acid/mg extract) and m is the mass of aerogel (mg). The content of total phenols in the samples extracted from the release medium was measured using the Folin Ciocalteu reagent, which colors the solution in the presence of phenols, and through spectrophotometry, making it possible to determine the concentration of phenols expressed as grams of gallic acid equivalents (See determination of the total concentration of the phenols in the S.I.).

6.3.7. Statistical analysis

The spectrophotometric determinations were performed in duplicate, and the software OriginPro8® was used as a plot. All experimental designs were performed in triplicate, and the results expressed as the arithmetic means with the standard deviation (Mean \pm Standard Deviation) using Statgraphics Centurion XVI software, with a statistically significant average of $p \leq 0.05$. The mean values and the error bars are reported in each figure.



6.4. Results and Discussion

6.4.1. Preparation and characterization of GO, Polyvinyl alcohol (PVA) and seed (SD) and skin (SK) grapes extracts

Graphite flake powder (GF) was the precursor of graphene oxide sheets (GO), which in turn was the raw material for the preparation of the aerogels. GO was prepared from GF via Hummers' method and subsequently exfoliated by sonication. The morphology of GF used corresponded to graphite flake, an heterogeneous sample, with sizes of $<50\ \mu\text{m}$, approximately (fig. SI-10.4).

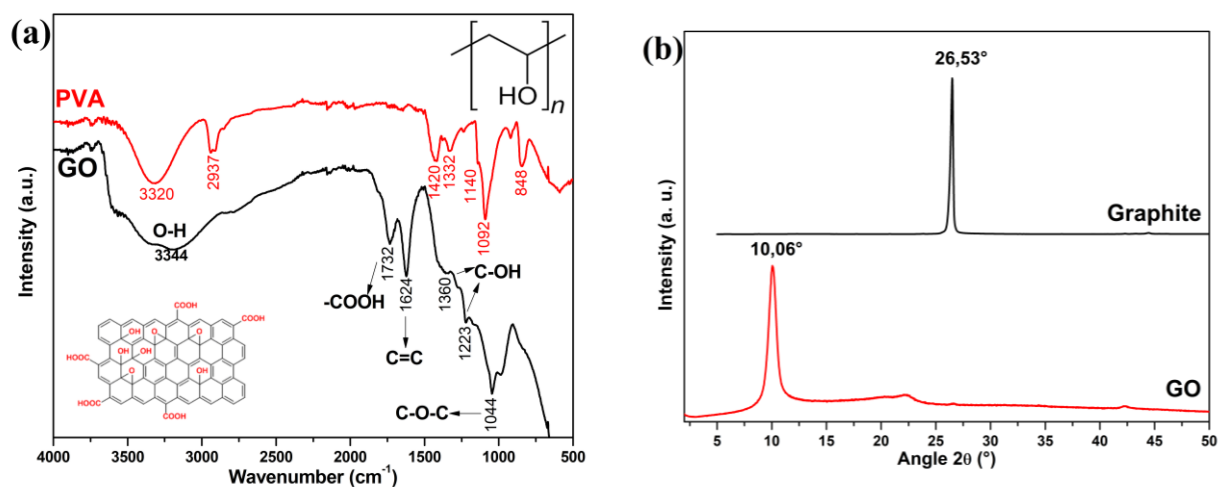
Micro FTIR demonstrated the successful chemical oxidation of the GO surface. The FTIR spectrum of GO (fig. 6.2a) show the characteristic band at $1624\ \text{cm}^{-1}$ arises from C=C stretching vibration of the sp^2 carbon skeletal network (from unoxidized sp^2 C=C bonds), and bands related to oxygen-containing functional groups such as, carbonyl groups -C=O at $1732\ \text{cm}^{-1}$, C-O flexion vibrational mode at $1223\ \text{cm}^{-1}$, C-O-C epoxy groups at $1044\ \text{cm}^{-1}$, and at $\sim 3344\ \text{cm}^{-1}$ denotes C-OH stretching vibration, were clearly visible (Marcano, 2010; Lee, 2010). The FTIR spectra of polyvinyl alcohol (PVA) clearly reveals the major bands associated with PVA (Cesteros, 2004; Mansur, 2008); two important bands stand out at $1420\ \text{cm}^{-1}$ associated with C-H vibration flexion of -CH_2 , and $1332\ \text{cm}^{-1}$ associated to C-OH, both typical of secondary alcohols. In addition, a alkyl band C-H at $2937\ \text{cm}^{-1}$ associated with C sp^3 of the aliphatic chain, and a strong band $\sim 3320\ \text{cm}^{-1}$ related to the stretching -OH associated with intramolecular and intermolecular hydrogen bonds due to the high hydrophilic forces.

An X-ray diffraction (XRD) analysis was also performed on the samples (fig. 6.2b). The oxidation of the graphene layers caused a weakness in the van der Waals forces that joined the oxidized planes, increasing the interlayer space and making the layered GO easier to cleave by some exfoliation treatment (Cai, Thorpe et al., 2012). The feature diffraction peak (2θ) of the GO was observed to be weaker and wider at 10.06° , the AB stacking order with layer-to-layer distance (d -spacing) of $0.879\ \text{nm}$, in contrast to the peak of the graphite (GF), that was more intense and thinner at 26.50° (d -spacing of $0.336\ \text{nm}$); it is therefore inferred that the oxidation and purification process was effective and allowed the separation of the graphene layers, because of the functional groups on the basal plane of the GO sheets (such as epoxy, hydroxyl, and carboxil groups) and the intercalated water molecules between the layers.

The morphology of the GO was characterized by scanning electron microscopy (SEM) measurements. As shown in fig. SI-10.5, the GO presented an unordered sheets distribution, exhibiting a loose and porous internal structure, which was due to the freeze-drying process, during which the stacked GO layers were

further separated from each other, promoting a significant increase in the specific surface area. The atomic force microscopy (AFM) image (fig. 6.2c) indicated that the GO sheets used to prepare the aerogels had a flat structure and very little thickness, with a maximum height of ~ 2 nm, suggesting that they were probably mono and bilayer nanostructures. Thus, the results shown above prove successful preparation of GO, which was used as the raw material for the preparation of aerogels.

Natural extracts rich in Proanthocyanidins (PAs) were produced from the skin and seed of *País* grapes following the methodology described by Morales et al. (Morales, 2014). Powdered extracts of *País* grape seed (SD) and skin (SK) were obtained (images in figure 1d.), and their composition and physicochemical properties were characterized (Morales, 2014; Muñoz, 2015), showing that the PA molecules from SD extracts have a lower molecular size than those of the SK, and a higher proportion of phenolic polymers (measured by gel permeation chromatography), with an average molecular weight of 3019 ± 87 g/mol and 7565 ± 221 g/mol for SD and SK extracts, respectively. Therefore, SD and SK extracts presented different polymer composition, which could influence their wound healing potential (Lodhi, 2013), antibacterial and/or antioxidant activities (Georgiev, 2014; Jayaprakasha, 2003). The total phenol content (measured as g equivalents gallic acid/g extract, for 1 g/L solutions) was higher in the SD extracts (0.73 ± 0.47) than in the SK extracts (0.62 ± 0.15). The FTIR spectra of SK and SD extracts (figure 1d), clearly show bands associated with functional groups of phenolic compounds (Fernández & Agosin, 2007), such as, C-O stretch from pyran-derived ring structure ($1200-1280$ cm^{-1}), C=C-C aromatic ring stretch ($1440-1520$ cm^{-1} ; $1604-1612$ cm^{-1}), and hydroxyl groups -OH ($3200-3400$ cm^{-1}) indicating the presence of this group in phenolic rings, and also C-H extensions of aromatic rings out-of-plane bend ($700-880$ cm^{-1}) and in-plane bend ($950-1200$ cm^{-1}) of the plane present in the PAs. Thus, this results shown evidence of functional groups present on components of the País grape extracts. These SD and SK extracts were incorporated into the preparation of GO-PVA aerogels.



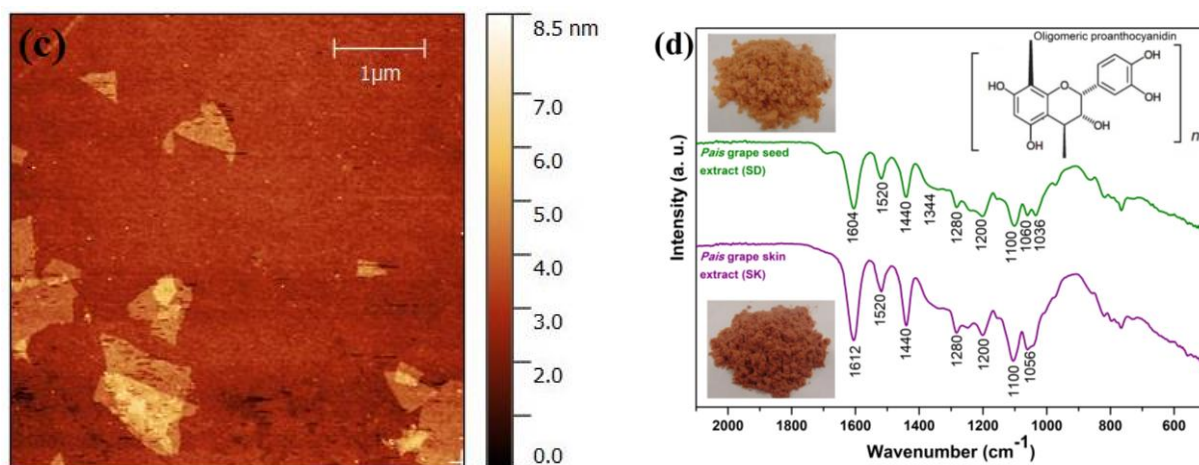


Figure 6.2. Characterization of GO (a) FTIR spectra of GO and PVA, (b) XRD, (c) AFM image of GO sheets and (d) FTIR spectra of País grape seed (SD) and skin (SK) extracts. Source: Own elaboration.

6.4.2. Preparation and characterization of aerogels

The presence of oxygen groups on the surface of the GO provides a remarkable chemical reactivity and hydrophilic character, although GO is an amphiphilic nanomaterial (Cote, 2010). GO has been commonly conjugated with biocompatible polymers in order to reduce their toxic effects (Pinto, 2013; Liao, 2011; Linares, 2016). Additionally, it has been used as reinforcement material for hydrogels (Bai, 2010), biodegradable films (Li, 2013), aerogels (Dai, 2016) and other tissue engineering scaffolds (Goenka, 2014). Polyvinyl alcohol (PVA) is a biocompatible polymer (Alexandre, 2014; Sedlarik, 2009) and is biodegradable (Solaro, 2000), hydrophilic, soluble in water, has good physical and chemical properties (Kumar, 2017), and has been used in various applications such as drug release, tissue engineering, enzyme immobilization and even combined with GO to produce nanocomposites with improved mechanical and electrical characteristics. The interfacial interactions between GO sheets and a polymer matrix can be achieved either by noncovalent molecular association (Bai, 2011) or by covalent attachment of a polymer onto GO (Salavagione, 2011).

We developed a GO-based aerogel using PVA to stabilize its porous structure, through noncovalent functionalization. The macro-morphology of the GO-PVA aerogel is shown in fig. 6.3a, and its micro-morphology is observed in the SEM image (fig. 6.3b). A porous structure was observed, as has been reported by other researchers in this type of aerogels (Dai, 2016), that was slightly different from the GO structure (fig. SI-10.5). The GO layers were connected due to the adhesion of PVA polymeric chains on the surface of GO layers and many wrinkle-like structures being observed on the GO sheets, suggesting

that they were rolled up by PVA, or PVA chains were adsorbed on the surfaces of the GO sheets, forming a single large-scale phase.

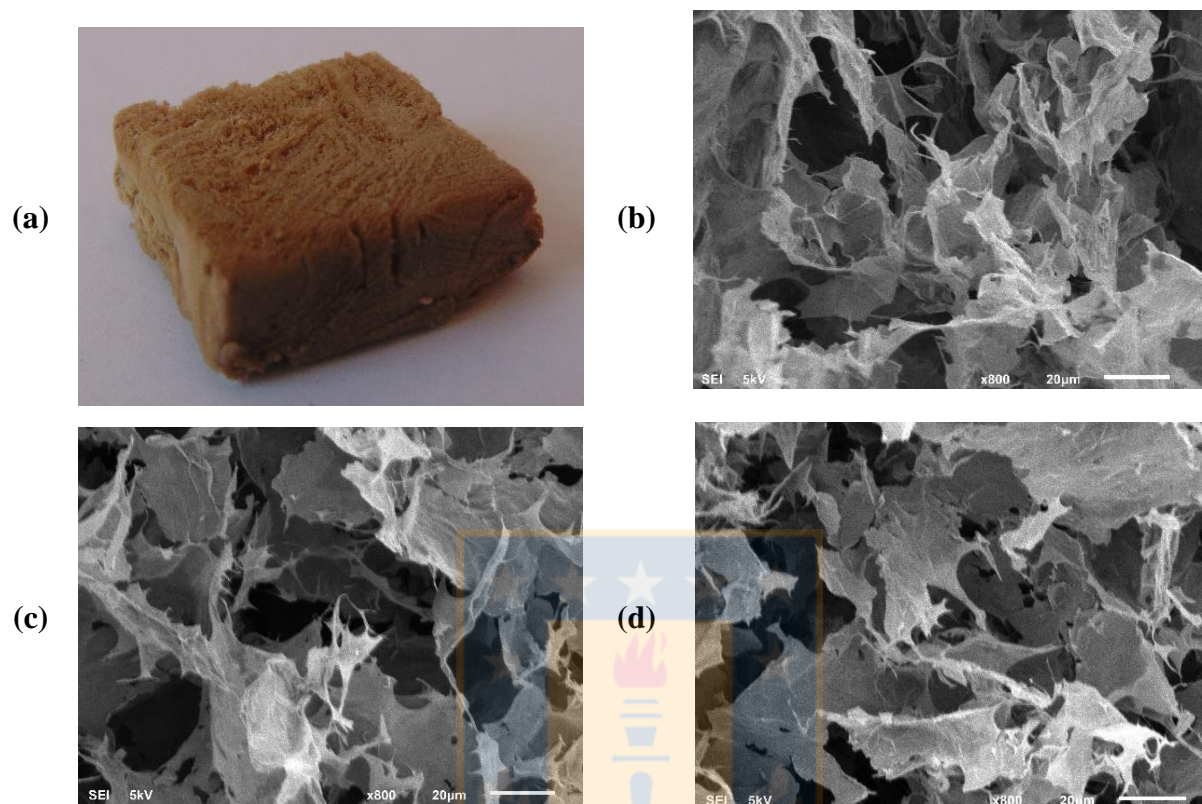


Figure 6.3. Morphology of Aerogels (a) photograph of GO-PVA aerogel (b) SEM image of GO-PVA aerogel, and (c) SEM image of the internal porous structure of the GO-PVA-SD and (d) GO-PVA-SK aerogels. Source: Own elaboration.

Previously, the stabilization of natural extracts from grape seed and skin, high in PAs, has been reported in nanoparticles of biodegradable and biocompatible polymers by several techniques (Morales, 2014; Muñoz, 2015; Dumont, 2015). An alternative to stabilize those extracts is the incorporation of *País* grape extracts into GO aerogels, using a noncovalent method, which was done in this research. The morphologies of the typical GO-PVA-SK and GO-PVA-SD aerogels were characterized by SEM, as shown in figures 6.3c and 6.3d. They presented a similar internal structure to GO-PVA aerogels (fig. 6.3b), exhibiting a heterogeneous porous structure with a large number of openings, measuring from tens to hundreds of micrometers. This network maintained a strong interconnection between layers, suggesting that the *País* grape extracts may have been deposited on the surfaces of the GO sheets like the PVA chains. The GO-PVA aerogel presented a color that was slightly darker than GO-PVA-SK and GO-PVA-SD aerogels, due to the color of the extracts (photographs of powder extracts inserted in fig 6.2d), but a lighter color than lyophilized GO. Although in this study the mechanical properties of the aerogels

obtained were not studied, it was possible to verify, by simple inspection, that the incorporation of SK and SD extracts generated a harder and more resistant aerogel.

It is probably due to the deposition of PVA and/or SD or SK extract on the GO surface in the aerogels that the interlayer spacing increased and favored the exfoliation GO structure, as we observed in the SEM images (fig 6.3). This observation was corroborated by XRD measurements. It is known that the variation of the GO microstructure is dependent upon GO concentration and PVA content in PVA-supported GO aerogels (Dai, 2016). As seen in fig 6.4a, the GO presented a diffraction peak at 10.06° (d -spacing 0.879 nm), while the GO-PVA aerogel exhibited the characteristic peak at 6.67° , representing an interlayer spacing of 1.32 nm, calculating from the Bragg equation. The aerogels loaded with grape extracts showed the same characteristic peaks at 6.75° (d -spacing 1.31 nm) and 6.87° (d -spacing 1.29 nm), for GO-PVA-SD and GO-PVA-SK, respectively. The binding of GO with PVA or GO with grape extracts caused a decrease in the diffraction angle of the characteristic peak of GO, and a decrease in their intensity.

Degradation behavior for aerogels was observed from TGA curves (fig. 6.4b). The first weight loss of GO at $\sim 180^\circ\text{C}$ was attributed to the removal of the oxygen-containing groups, and the second steps of weight loss at $\sim 550^\circ\text{C}$ to the carbon oxidation (Wang, Yang, Park, et al., 2008). GO showed a mass loss of 22% at a temperature of 220°C , indicating a low thermal stability compared to the PVA (5%), but the PVA began to decay abruptly from $\sim 240^\circ\text{C}$ and it decomposed by 90% at $\sim 500^\circ\text{C}$, while GO only lost 32% of its weight, at the same temperature. Weight loss of GO at 600°C was about 32%, whereas for the GO-PVA, it was about 56%, so we inferred that there was about 36 wt % of PVA and 64 wt % of GO in GO-PVA, which coincides with the mixing ratio used in the preparation (34% of PVA and 66% of GO). We inferred an increase in thermal stability for the PVA/GO with respect to the PVA which loses about 90% of its weight at 500°C , while GO-PVA loses about 54 wt % at the same temperature. But we did not observe an effect on the thermal stability of GO-PVA aerogels with the incorporation of País grape extracts, since the same degradation is observed in aerogel with or without them, probably due to the low concentration of extracts used.

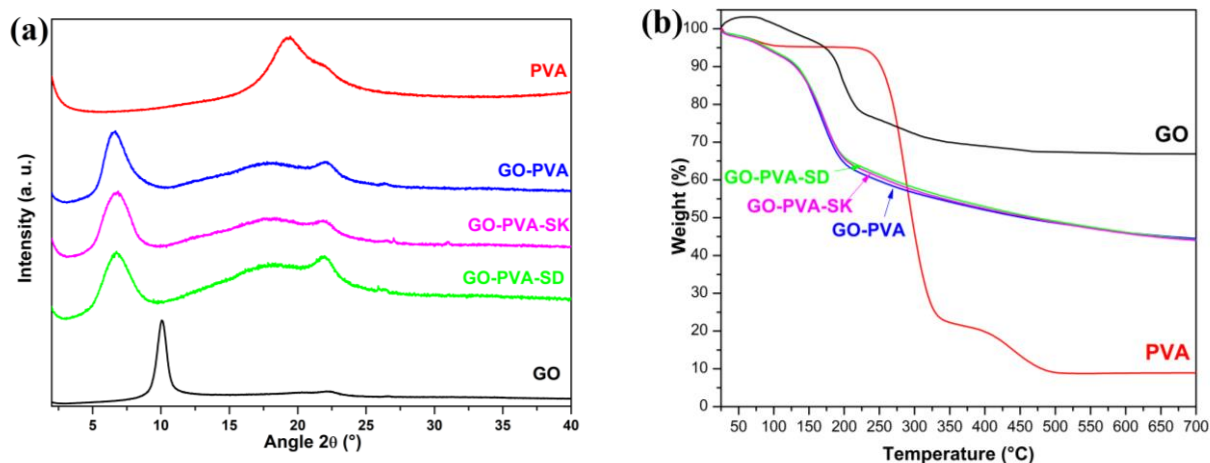


Figure 6.4. Characterization of Aerogels (a) FTIR spectra, (b) XRD patterns (c) Raman spectra, and (d) TGA curves (at a heating rate of $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ under nitrogen atmosphere) of GO, PVA and aerogels. Source: Own elaboration.

Figure 6.5 shows the Raman spectra of GO, PVA, SD, respectively. The Raman spectra of GO is characterized by bands D, G and region 2D as shown in figure 6.5a (Malard, 2009). The D peak is due to the breathing modes of sp^2 rings and it indicates a defect in the GO sheets (Popa, 2010). The G peak corresponds to the E_{2g} phonon at the Brillouin zone center (Ferrari, 2007). The band 2D is due to single layer graphene and it is the second order of the D peak (Popa, 2010; Ferrari, 2013). In figure 4b, in the low frequency region there are several strong characteristic scattering peaks for pure PVA, located at 853, 920, 1097, 1140, 1360, and 1440 cm^{-1} (Yang, 2010). On the other hand, in the height frequency region there is a vibration at $\sim 2904\text{ cm}^{-1}$ with maximal intensity with respect to a region between $853\text{--}1440\text{ cm}^{-1}$, which indicates in $\sim 2904\text{ cm}^{-1}$ a dominant vibration of PVA.

Figures 6.5c and 6.5d show the Raman spectra of SK and SD, respectively. They show the spectra superimposed on a broad ‘hump’ of active fluorescence, almost completely obscuring the Raman spectra of SD and SK. These effects are due to the fact that the wavelengths are specific in the laser, and generally fall between the mid-UV ($>200\text{ nm}$) and the NIR ($<1.1\text{ }\mu\text{m}$) regions. This gives fluorescence to a Raman spectrum, which can be avoided by exciting the sample with a wavelength that falls outside its fluorescence background profile (Butler, 2016).

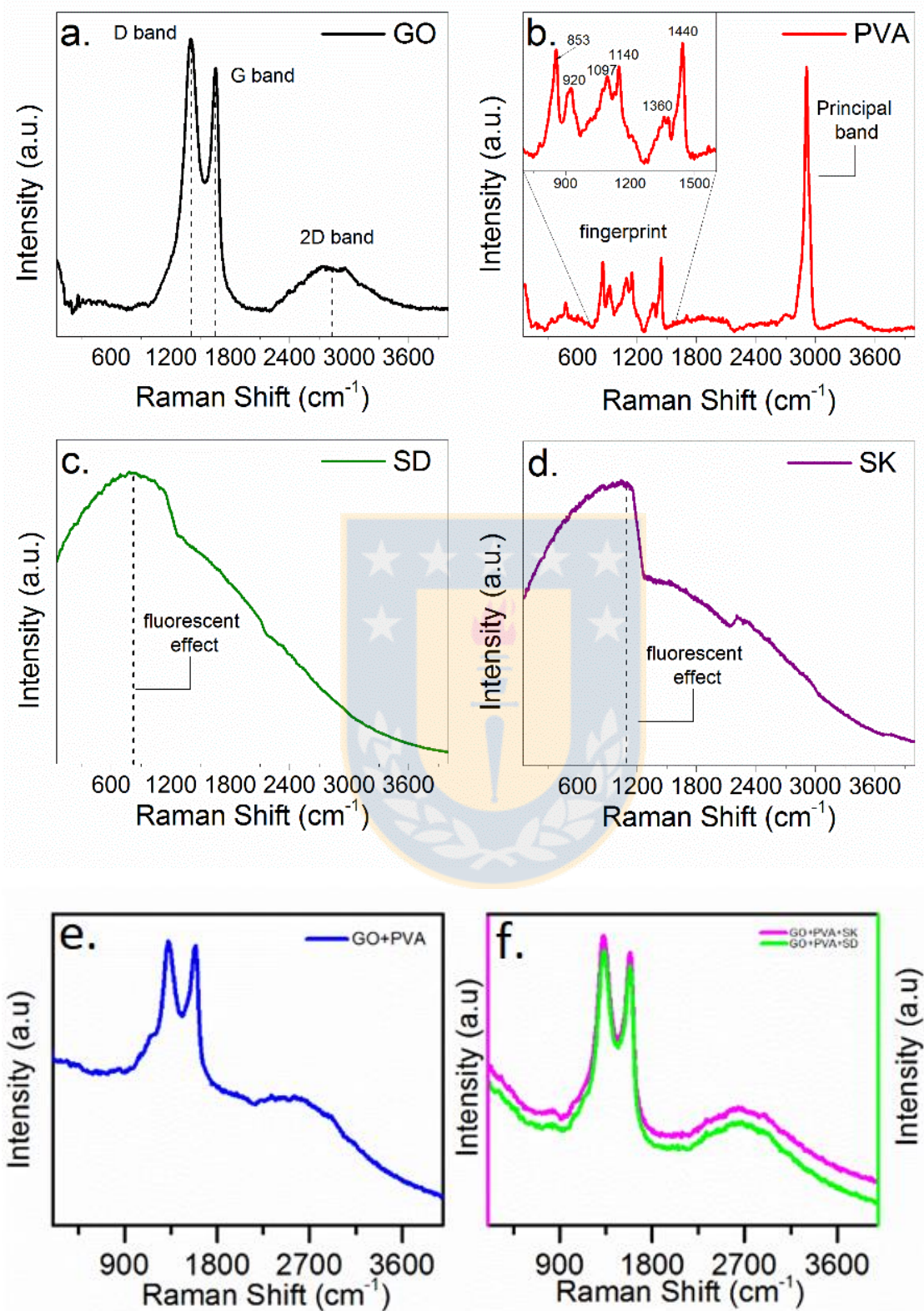


Figure 6.5. Raman Spectra of (a) GO, (b) PVA (c) SD, (d) SK, (e) GO-PVA, and (f) GO-PVA-SK and GO-PVA-SD, respectively. Source: Own elaboration.

Figure 6.5e shows the Raman spectrum of PVA-GO, displaying only two peaks close to D and G band of GO. The peak associated with PVA is not observed, indicating that a large amount of GO has accumulated on the surface of the sample (Tan, 2016). The same behavior is shown in figure 6.5f, which displays the Raman activity of PVA-GO-SK and PVA-GO-SD without peaks associated with vibrations from PVA, SD or SK (Linares, 2016). This indicates that it is due to the overlap of the GO sheets and the active fluorescence generated by the SD and SK almost completely obscuring the Raman spectra of the matrixes GO-PVA-SD and GO-PVA-SK (figure 2c and 2d) (Kundu, 2012). For this reason, it would be advantageous to work with near-infrared radiation, due to the lack of fluorescence that can seriously interfere with the quality of the resulting Raman Spectra (Peregrino, 2014). Thus, the near-infrared activity of each sample is show as follows.

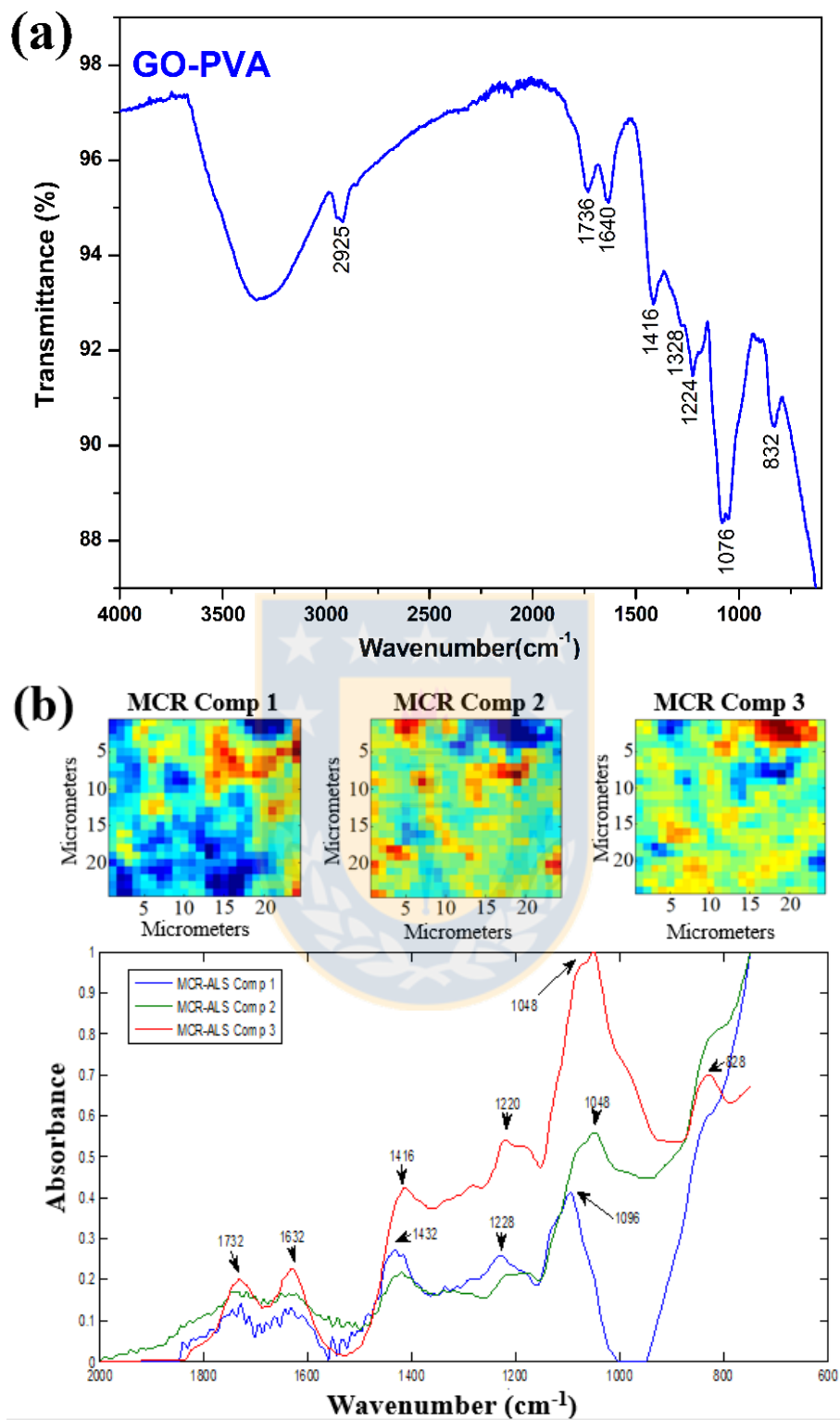
The figure 6.6a show the spectra of GO-PVA aerogel, which has combined bands of both GO and PVA (figure 6.2a), with a decrease in the intensity of the bands in 1732 cm^{-1} and 1624 cm^{-1} respect to GO, and one slight displacement to minor wavenumber of the characteristic bands of the PVA, so we inferred that hydrogen bonds have been formed between the PVA chains and specific GO sites (Dai, 2016; Wang, 2014).

When grape extracts, rich in polyphenols, were incorporated into aerogels, we investigated their bonding to the aerogel through of Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares (MCR-ALS) technique applied to attenuated total reflectance (ATR) – Fourier transform infrared microspectroscopy, which not only allows to identify functional groups in a sample, but also solving spectra of the pure components from a spectrum of a mixture sample. MCR-ALS is widely used in images and it has been used to evaluate the distribution patterns and to generate pure spectra of the plant components (Castillo, 2015). Figure 6.6b-c shows the results obtained by application of MCR-ALS on GO-PVA-SD and GO-PVA-SK aerogels samples, including the distribution maps of MCR components (relative concentrations) and the respective recovered spectra of three principal components.

From the figure 6.6b, we observed that the component 1 (blue spectrum) y 2 (green spectrum) were very similar between them, which appears to be only SD, there is a decrease or disappearance of bands at 1604 cm^{-1} and 1520 cm^{-1} con respect to the SD extract (figure 1d), probably these could be overlapping for the presence of GO-PVA. However, from the component 3 (red spectrum) we observed that it seems to be the majority in the sample, very similar to GO-PVA but an increase in the band at 1220 cm^{-1} with respect to 1328 cm^{-1} and 1224 cm^{-1} of GO-PVA (figure 6.6a), this may be due to the presence of the polyphenols. This major intensity of band at 1220 cm^{-1} , indicate the possibility of more C-O bond.

From the figure 6.6c, we observed that the component 1 (blue spectrum) y 2 (green spectrum) of GO-PVA-SK could be impurities because they have no coherent spectrum and their spectrum does not give relevant information; also, that is possibly due to poor contact of the ATR crystal with the sample or representing only the baseline deviation of the spectrum. The third component seems to be the majority (the color bar means little blue and much red of each component), and the MCR-ALS comp 3 (red line) shows that the only notable difference with respect to the GO-PVA spectrum, is the increase of the band at 1220 cm^{-1} with respect to 1328 cm^{-1} and 1224 cm^{-1} of GO-PVA.

Therefore, for both aerogels, the characteristic bands of grape extracts (figure 6.2d) between $1504\text{-}1620\text{ cm}^{-1}$ were not clearly observed, and it was not possible to distinguish other bands associated with the non-reactive structures of polyphenols in aerogels (figure 6.6.b-c). Since the aromatic rings present in the polyphenols are very stable groups, it is very difficult for a reaction to occur that causes the decomposition of these groups, and it is more probable that the spectrum of the extracts in the aerogels was overlapped by the presence of GO-PVA, and even this technique of high resolution cannot define an area rich in polyphenols. The increase of the band associated with the C-O bond, present in the polyphenols, could be indicative of its presence or could be due to the formation of this bond during the preparation of the aerogel. Both polyphenols and GO and PVA have hydroxyl groups (-OH), which are usually reactive and one possibility is that they have reacted to form carbonyl groups C=O (by Esterification), as well as the formation of C-O bonds between the same polyphenol chains by breaking the -OH bond of themselves (Salavagione, 2009; Linares, 2016); however, this reaction of Esterification is unlikely, because the reaction conditions between GO and PVA, were not adequate to reach the formation of this bond (Cheng, 2012). Thus, the major component in GO-PVA-SD and GO-PVA-SK aerogels was GO-PVA. It is possible that the low concentration of SD or SK extracts into aerogel ($\sim 12\%$) was not sufficient to distinguish the presence of polyphenolic compounds from the spectra of aerogels loaded with País grape extracts. It is unlikely that the extract was not found within $1\text{ }\mu\text{m}$ of depth, which was what the ATR technique allowed to investigate, since the analyzed samples were taken from the inside of the matrix of pieces of aerogels and these mixtures GO-PVA were sufficiently homogeneous to infer that all the compounds were present in each sample.



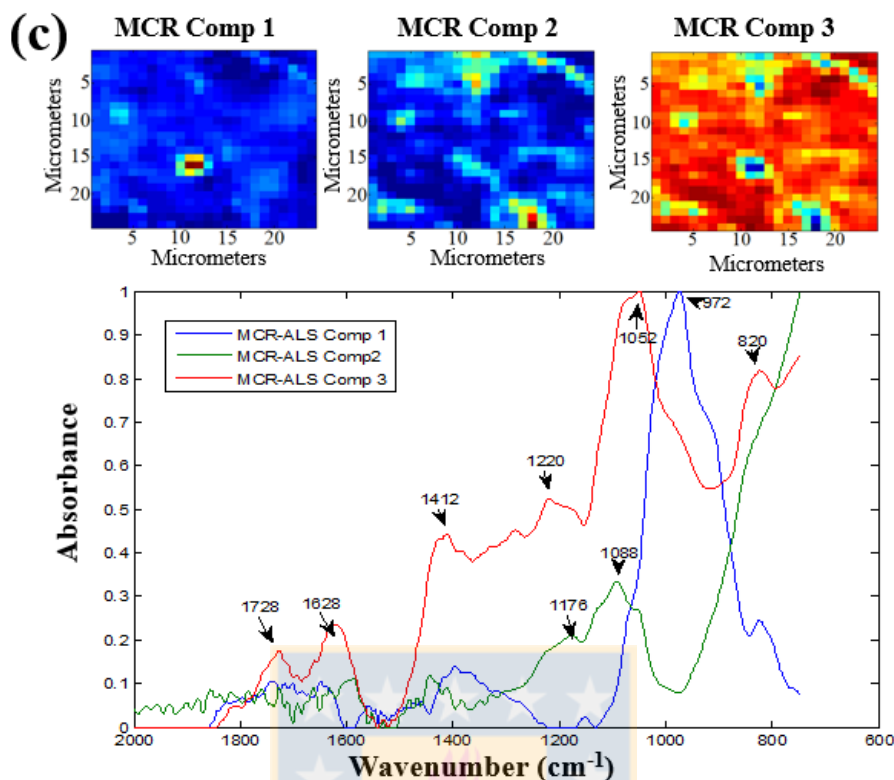


Figure 6.6. FTIR spectrum of (a) GO-PVA aerogel, and MCR-ALS relative concentration and recovered spectra of chemical components of (b) GO-PVA-SD, and (c) GO-PVA-SK aerogels sample. Source: Own elaboration.

The presence of the PAs linkers from the grape extract could be observed from the changes from in the elemental content of the samples (fig 6.7a). The amount of C element decreased slightly from GO-PVA (48.63%) to GO-PVA-SD and GO-PVA-SK (46.7% and 45.8%, respectively), while the O element content increased from 44.6% to 47.7% and 49.1% in GO-PVA-SD and GO-PVA-SK, respectively. In addition, the C/O ratio for GO-PVA was 1.09 whereas for GO-PVA-SD and GO-PVA-SK it was 0.98 and 0.93, respectively, indicating that the content of oxygenated groups was higher in aerogels with incorporated País grape extract. This agrees with the values of zeta potentials of -17.5 ± 0.13 and -18.3 ± 1.3 mV, in respect to GO-PVA with a value of -12 ± 0.07 mV (Figure 6.7b). These values are similar to those reported by other authors for graphene-based aerogels for hemostatic applications, with values of -18.7 ± 1.4 and -24.2 ± 1.3 mV (Quan, 2015; 2016), but lower than those obtained by Li, Quan et al. (2016) who incorporated Montmorillonite (MTT, with a high negative surface charge, -41.3 ± 1.3 mV) into the aerogel structure, obtaining values of zeta potential of -29.8 ± 1.5 mV.

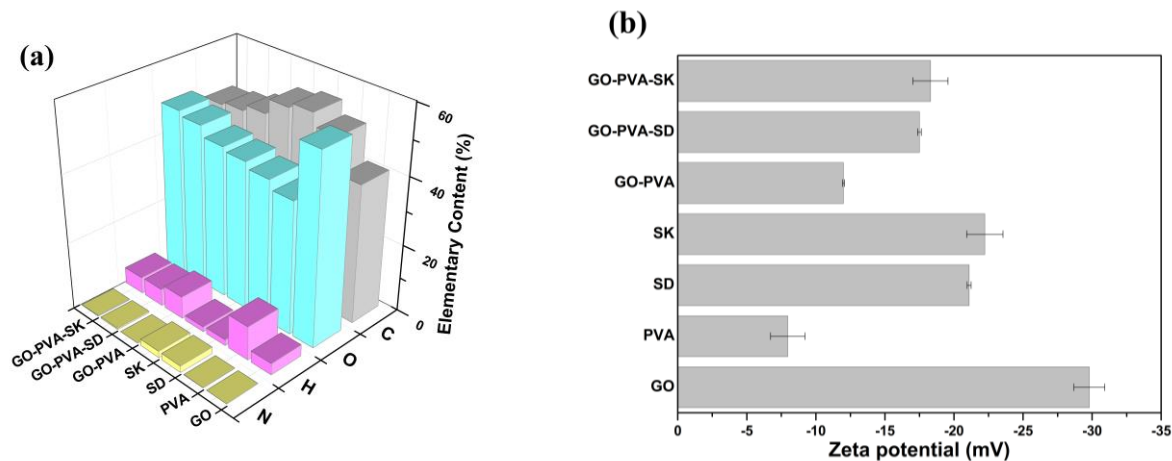


Figure 6.7. (a) Element analysis of the whole pieces of aerogels, (b) ζ -potential (in PBS solutions, $n = 3$, data values corresponded to mean \pm SD). Source: Own elaboration.

Therefore, the negative surface charge density present in the grape extracts allows an increase in the negative electrical potential and more hydrophilicity in the aerogels. This is a key factor for improving the hemostatic performance of the aerogels. The addition of grape extracts increases the negative charge of the aerogel, which could accelerate blood coagulation, since negative charges are known to be an effective strategy for interfacial stimulation, and are beneficial for the activation of platelet coagulation factors (Miyamoto, 1989) and because those oxygen polar groups can instantly stimulate erythrocytes and platelets when in contact with blood. It has been demonstrated that GO, rather than reduced graphene oxide (rGO) sheets, is highly thrombogenic in mice and evokes a strong aggregatory response in human platelets even on a scale comparable to that elicited by thrombin due to surface charge distribution (Singh, 2011). Therefore, the effect of a higher negative surface charge density of aerogels GO-PVA-SD and GO-PVA-SK, would allow the erythrocytes present in the blood to accumulate on the aerogel surface, forming a layer of blood clot, thus favoring blood coagulation, a phenomenon that has been observed and demonstrated in other aerogels based on graphene (Quan, 2015). Although PVA serves as a GO-binding agent by providing improvements in the mechanical properties of compounds based on GO (Dai, 2016; Li, 2013), PVA has a lower negative charge (-8.1 ± 1.3) than GO (-29.8 ± 3.3); thus, the grape extracts contributed the highest negative charge density to the aerogel. PVA is a synthetic polymer commonly employed in wound dressings. Its hydrophilic nature imparts important functional wound healing characteristics such as moisture absorption capacity and water vapor transmission, which allow the maintenance of a moist wound environment while avoiding the collection of excess exudate. In addition, PVA possesses good biocompatibility and higher mechanical strength than other natural bioactive polymers. In our case, the PVA served to improve the mechanical properties of the aerogel (with respect

to an aerogel only of GO). Often, synthetic materials are used in combination with natural or bioactive polymers to improve the mechanical properties of the final wound dressing, as in the case of electrospun polyurethane-dextran nanofiber mats (Unnithan, 2012) or poly(ethylene glycol)/chitosan (Sinha, 2012), both of which are dressings with antibacterial activity because of the presence of ciprofloxacin hydrochloride.

6.4.3. Evaluation of aerogels properties

It should be mentioned that in the preparation of the aerogels, using a small amount of linker (<10 wt% of PVA) produced an aerogel that was too loose to maintain its shape, and after the application of a small amount of force it was disarmed, which limits its practical application. In contrast, when a greater amount of linker was used (~50 wt% of PVA and the extracts incorporation) as with the aerogels prepared here, a material with a tight but firm structure was obtained, capable of absorbing liquids like water and blood. One of the main properties of aerogels is their absorption capacity. The GO-PVA aerogels showed a higher and faster water absorption ability, absorbing as much as 60 times their own weight of water, while GO-PVA-SD and GO-PVA-SK absorbed about 70 and 73 times their own weight of water, respectively (details of water absorption ability methodology in the S.I.). The absorbent capacity is relevant for wound dressing materials because it determines the volume of wound fluid absorbed by the dressing. However, it is important to mention that GO aerogel supported by PVA, as prepared here, had a higher structural stability than other GO-based aerogels reported, especially in no-polar solvents (Dai, 2016). Although the mechanical properties of the aerogels were not evaluated, it was observed that the grape extracts provided greater rigidity to the structure of the aerogels, while maintaining their lightness. Furthermore, the effect of the addition of SD and SK extracts on the structure and composition of the aerogels was significant, as it increased by ~20% their retention capacity (% retained water/aerogel) in comparison to aerogels without a load.

Coagulant potential of aerogels

The coagulant potential of aerogels was analyzed through an *in vitro* assay, which made it possible to evaluate the ability to coagulate blood. This was done through a dynamic whole-blood clotting assay (Behrens, 2014; Shih, 2006), in which the same amount of fresh blood without anticoagulant was dropped directly onto samples of aerogels and controls (gauze as negative control, Ca²⁺ coagulation factor as positive control). Test samples interacted with fresh blood for different periods, and we observed their performance as coagulant material (fig. 6.8a). We observed that during the first 30 seconds of contact with

the whole blood, GO-based aerogels coagulated more blood compared to the controls, so that the resulting supernatant showed a lower absorbance associated with a minor amount of free red blood cells in the solution. During the whole test the aerogels showed lower absorbance values than control groups (blood, blood+Ca²⁺, gauze) and thus more blood absorption. After 60 s the difference in hemoglobin concentration in the supernatant was clearly visible (fig. 6.8b). In the method used here, in the three control groups the blood began to coagulate from about 60 s; however, it did not completely coagulate even after 240 s. In contrast, the blood in aerogels with incorporated extract (GO-PVA-SD and GO-PVA-SK) almost completely coagulated after 240 s, and visually we observed a higher rate of absorption with respect to GO-PVA or gauze (fig. 6.8b). This would indicate that the incorporation of grape extracts into the aerogels could accelerate the coagulation of the blood during the first 4 minutes of contact. However, a deeper study is needed to understand the mechanism(s) by which grape extracts favor coagulation. In this study, Milli-Q water was directly used on the aerogel in contact with blood, unlike that performed by Quan et al. (2015), who applied water lightly to the edges of the sample vessel, obtaining a 90% decrease at 60 s in blood contact with its CGS aerogel (“cross-linked graphene sponge”). However, both results agree with respect to the ability of GO-based aerogels to favor blood coagulation. It is probable that aerogels synthesized in this research absorb plasma, as well as CGS, allowing the anticoagulant factors present in the plasma to separate from the whole blood, favoring a rapid coagulation of the cells, through the activation of the intrinsic coagulation system, that is independent of coagulation factors, such as the Ca²⁺ used in this study (Quan, 2015; 2016). Therefore, this assay (Figure 6.8) demonstrated that coagulation of whole blood, based on the absorbance of hemoglobin, increased with the incorporation of polyphenolic extracts into the aerogel, i.e. 12% (w/w) of polyphenolic extracts in the aerogel increased the negative charge of the material by about 33% and as a consequence an increase of up to 37% and 28% in coagulation time was generated, observed during the first 30 and 60 seconds of contact between the aerogel and the whole blood; 60 s was the time observed as the natural blood threshold in this type of assay, since its absorbance values decay after that point in time.

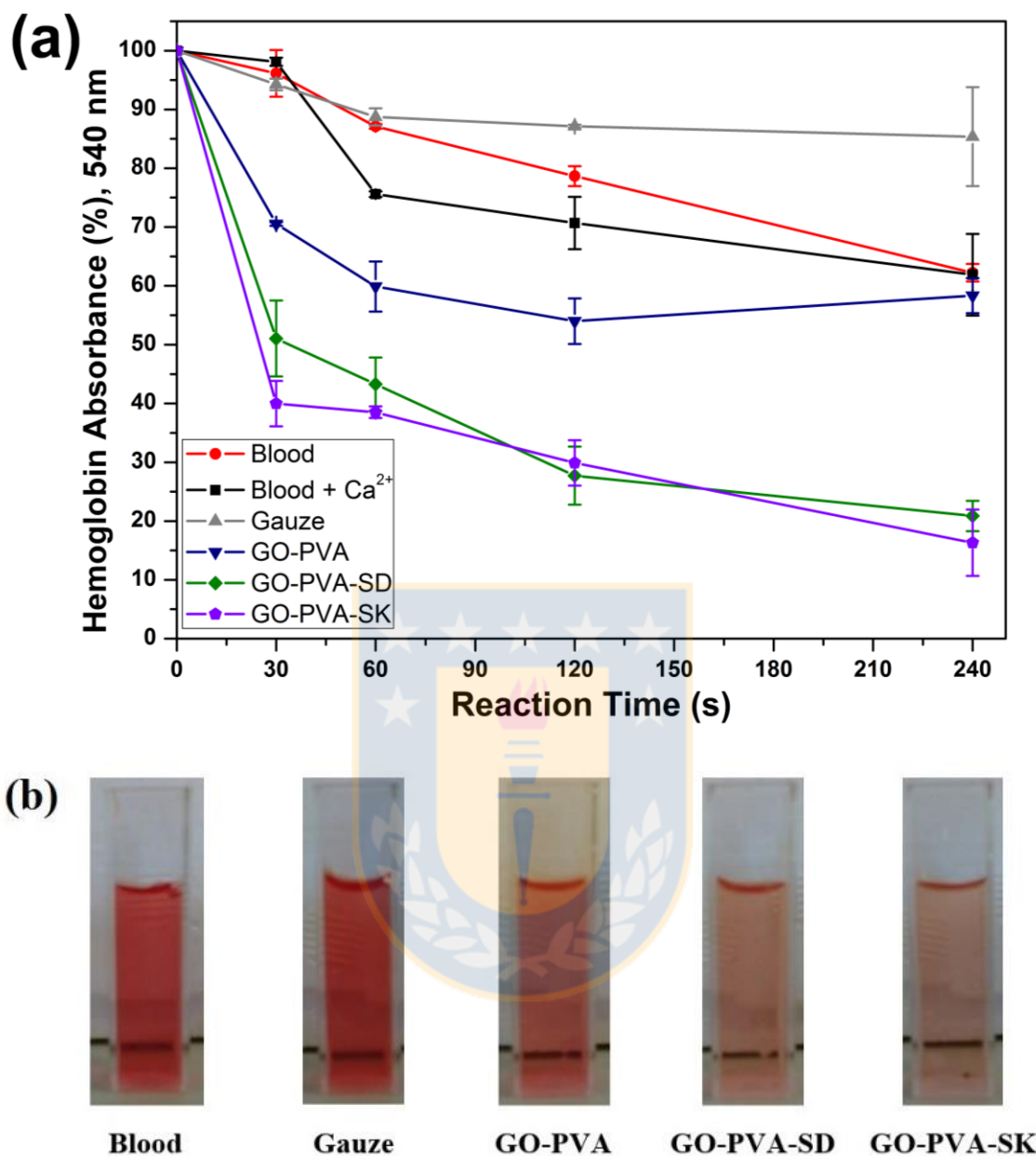


Figure 6.8. Whole blood clotting (a) In vitro dynamic whole-blood clotting evaluation of GO-PVA-extracts aerogels and control; values corresponded to mean \pm SD (n=3). (b) Photographs of the corresponding aqueous solutions of hemoglobin after 60 s. Source: Own elaboration.

GO-PVA-extract aerogels proved to be effective in coagulating blood (figure 6.8). Their coagulating potential, we believe, is due, on one hand, to its construction and structure generated by the crosslinking of the PVA binding agent with the GO sheets, generating electrostatic interactions and hydrogens between them, allowing the formation of a three-dimensional macroscopic matrix resistant and porous (figure 6.2 a-b). This structure allows a rapid plasma absorption capacity and retention of blood cells on the surface

of the aerogel (as was experimentally observed). On the other hand, the accumulation of blood cells at the surface is favored by the negative surface charge of aerogel, conferred by the oxygenated functional groups present in the GO (carboxyls, epoxides, hydroxyls) (Ostomel, 2007; Singh, 2012). In addition, GO has been reported to be highly thrombogenic in mice, evoking a strong aggregation response in human platelets, which play a central role in hemostasis and thrombus formation (Singh, 2011). In addition, surface blood coagulation increased by about 30% after 60 s in comparison with unloaded aerogels (Figure 6.8a). This greater accumulation of blood cells on the surface is favored by the effect of the negative charge of the aerogels loaded with extract, which could stimulate platelets and erythrocytes and favor coagulation. However, a more detailed study is necessary to understand the mechanism through which the extracts favor the coagulation process, reducing its time.

Releasing of PA extracts from the aerogels

When the drugs are attached to drug carriers such as GO, via pH-sensitive linkers, it is possible to control the release of the drug by manipulating the pH value of environments. The controlled release behaviors of País grape extracts from GO-PVA aerogels was analyzed by an *in vitro* assay at PBS pH 7.4 and 37 °C (figure 6.9). We found that extracts exhibited low release from aerogels for about 9 h, reaching a final liberation of ~14% and ~20% of the entrapped SK and SD extracts, respectively. The shape of the release profile was similar for both extracts, with a rapid release at the beginning, without the presence of a lag time, followed by a slow release until stabilized at a maximum value. However, GO-PVA-SD reached its maximum release after one hour, unlike GO-PVA-SK which achieved maximum release at 3 h. SD and SK extracts present a polymer composition that is different from PAs, which could influence the different behavior. It is probable that the binding between PAs and GO-PVAs is strong enough and stable enough to avoid a greater release of PAs into the medium. Both are characterized by the presence of aromatic and hydroxyl groups that can form non-covalent bonds, such as π - π interactions between the aromatic structure present in the GO and the aromatic rings of the polyphenols, or hydrogen bonds between the hydroxyls of PAs and the hydroxyl groups of GO or PVA.

It is difficult to compare the loading capacity and/or release of incorporated components in a GO matrix, since these depend on the characteristics of the GO used, such as the level of oxidation, size and shape, or the form and medium of loading and/or release of the compound (Rahmanian et al., 2014). So the different loads and releases can be interpreted through the different degrees of GO used. Furthermore, the functionalization of the GO with polymers can generate a hindering effect, making it difficult both to incorporate the compound into a GO-polymer matrix and to release it. The extract release suggests a weak non-covalent binding of extract on GO sheets or polymeric PVA chains, which was confirmed by FTIR analysis associated with the presence of hydrogen bonding between the extracts and aerogel. However, the

release of extracts from the GO-PVA-SD and GO-PVA-SK aerogels was low. This phenomenon can be explained by the existence of some strong binding between aromatic PAs and GO-PVA, or via simple adsorption on the GO surface. According to the FTIR analysis of the main components, when grape extract rich in PAs was incorporated the GO-PVA compound continued to prevail, which overlapped the presence of these polyphenols. However, a small variation in the band at 1220 cm^{-1} would indicate that the extracts could be covalently bound, generating sufficiently stable C-O bonds to prevent their subsequent separation and release into the medium.

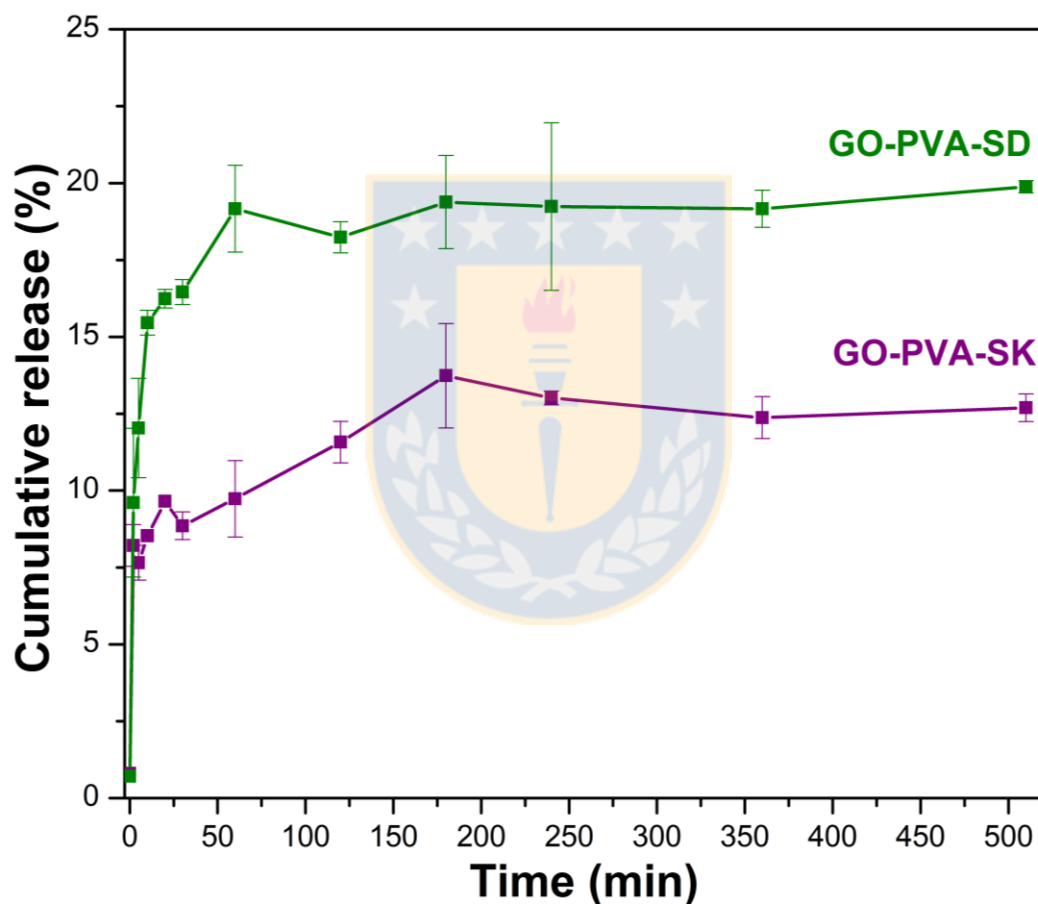


Figure 6.9. Cumulative release of País grape seed (SD) and skin (SK) extract from GO-PVA aerogel. Source: Own elaboration.

The synthetic materials used in the wound dressing formulation in combination with other bioactive or natural polymers improve both mechanical properties and antibacterial activity due to the presence of compounds. It is known that polyphenols are compounds produced by plants as secondary metabolites,

and various studies have shown that they have beneficial effects on health. For example, flavonoids, the largest group of polyphenols in grapes (but also present in other plants and fruits), have antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, anticancer, antibiotic, antiviral, cardioprotective, neuroprotective, hepatoprotective and even wound healing activities (Georgiev, 2014; Lodhi, 2013; Nayak, 2010; Jayaprakasha, 2003; Rhodes, 2006). Although polyphenolic compounds have been shown to inhibit platelet aggregation in plasma (Dohadwala, 2009), it has also been reported that this may depend on the concentration or dose (Conquer, 1998; Shanmuganayagam, 2002). In addition, the use of polyphenolic compounds extracted from the green tea plant (*Camellia sinensis*) was reported for bleeding arrest, significantly reducing bleeding in gum cavities caused by tooth extraction, as well as reducing subsequent secretion. Thus, the inclusion of País grape extracts, rich in polyphenolic compounds, could favor coagulation and wound healing; however, a deeper study is necessary to establish the reasons and to establish optimized doses. Extracts of País grape skin and seed have a potential use in wounds due to the properties mentioned and because they could contribute to decreasing the pH of a wound, a factor that would be controlling in its healing (Gethin, 2007).

Unlike traditional dressings such as gauze and cotton that are not actively involved in the wound healing process, advanced dressings are designed to have biological activity by themselves or produce the release of bioactive constituents (drugs) incorporated into the dressing. Embedded drugs may play an active role in the wound healing process, either directly as cleaning agents or through removal of necrotic tissue, or indirectly as antimicrobial drugs, which prevent or treat infections or growth agents (growth factors) to assist in tissue regeneration. The morphology, structure and physicochemical properties of GO based aerogels could provide them with interesting additional properties such as stimuli-triggered delivery or the ability to adjust the release profile of a drug. In this study, it was shown that GO-PVA aerogels loaded with natural compounds could release these compounds in response to an external stimulus, such as a change in pH. This is interesting for wound dressing, because they have been used to not only protect wounds and prevent contamination, but also as platforms to deliver bioactive molecules to the wound. For the exudative wounds, the use of topical bioactive agents, such as creams and ointments for drug delivery to a wound is not very effective, as they can absorb wound fluid, losing their rheological characteristics and becoming mobile. Under these circumstances, solid and absorbent wound dressings allow better management and prolonged residence in the wound. Thus, a formulation based on a GO-polymer, capable of forming a light, resistant and absorbent matrix, such as the one synthesized in this work, could be considered as a potential candidate to absorb liquids exuded from a wound and to maintain the necessary moisture level and the right environment.

6.5. Conclusion

Wound healing is one of the most complex mechanisms in the human body in that multiple cellular pathways are simultaneously activated by different molecules. For this reason, there is the need for the combined action in dressings of different factors that contribute to the reparative process in the wounded skin, such as protection, absorption, coagulation, release of components, resistance, duration, antimicrobial activity, among others. We have proposed a material (aerogels) based on GO, supported by PVA combined with natural extracts and rich in bioactive components, which is a potential candidate to be used as a dressing matrix in dermal, coagulant and healing applications. These aerogels were prepared through the simple and versatile sol-gel method of solution blending and a subsequent freeze-drying process. The results show that the incorporation of PVA could exfoliate GO layers and strengthen the 3D porous structure of aerogel, and the incorporation of polyphenolic País grape extracts exhibited a reinforcing effect on the structure of the aerogels. The presence of extracts strongly influenced the elemental O and C content and increased the negative zeta potential of the aerogels GO-PVA-SD and GO-PVA-SK. In addition, these aerogels exhibited greater stability and a high and rapid water absorption capacity, compared to GO-PVA aerogel.

The subsequent investigations on the properties of aerogels demonstrated that the aerogels exhibited coagulation and compounds delivery performance, showing that surface coagulation of whole blood was influenced by the incorporation of polyphenolic extracts in the aerogel, by decreasing the coagulation time. Visually, the loaded aerogels had a higher rate of absorption in comparison with GO-PVA or gauze. The release of extracts from GO-PVA was prolonged to 3 h but reached only ~14% and ~20% of the entrapped SK and SD extract, respectively, probably due to the existence of some strong binding between aromatic PAs and GO-PVA. According to the FTIR analysis of the main component, the GO-PVA prevails into the aerogel, which overlaps the presence of these polyphenols; a small variation in the band at 1220 cm^{-1} would indicate that the extracts could be covalently bound, generating sufficiently stable C-O bonds to prevent a major release into the medium. Considering the simple preparation method and the bioactive properties of PAs, these new GO-based aerogels have great potential use in the treatment of trauma bleeding, wound healing and/or dermal delivery.

6.6. References

- Alam, H., Burris, D., DaCorta, J., & Rhee, P. (2005). Hemorrhage Control in the Battlefield: Role of New Hemostatic Agents. *Military Medicine*, 170(1), 63-69. <http://dx.doi.org/10.7205/milmed.170.1.63>
- Alam, H., Koustova, E., & Rhee, P. (2005). Combat Casualty Care Research: From Bench to the Battlefield. *World Journal Of Surgery*, 29(S1), S7-S11. <http://dx.doi.org/10.1007/s00268-004-2052-4>
- Alexandre, N., Ribeiro, J., Gärtner, A., Pereira, T., Amorim, I., & Fragoso, J. et al. (2014). Biocompatibility and hemocompatibility of polyvinyl alcohol hydrogel used for vascular grafting-In vitroandin vivostudies. *Journal Of Biomedical Materials Research Part A*, n/a-n/a. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.35098>
- Bai, H., Li, C., Wang, X., & Shi, G. (2010). A pH-sensitive graphene oxide composite hydrogel. *Chemical Communications*, 46(14), 2376. <http://dx.doi.org/10.1039/c000051e>
- Bai, H., Li, C., Wang, X., & Shi, G. (2011). On the Gelation of Graphene Oxide. *The Journal Of Physical Chemistry C*, 115(13), 5545-5551. <http://dx.doi.org/10.1021/jp1120299>
- Behrens, A., Sikorski, M., Li, T., Wu, Z., Griffith, B., & Kofinas, P. (2014). Blood-aggregating hydrogel particles for use as a hemostatic agent. *Acta Biomaterialia*, 10(2), 701-708. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.10.029>
- Boateng, J., & Catanzano, O. (2015). Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing—A Review. *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 104(11), 3653-3680. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.24610>
- Butler, H., Ashton, L., Bird, B., Cinque, G., Curtis, K., & Dorney, J. et al. (2016). Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. *Nature Protocols*, 11(4), 664-687. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2016.036>
- Cai, M., Thorpe, D., Adamson, D., & Schniepp, H. (2012). Methods of graphite exfoliation. *Journal Of Materials Chemistry*, 22(48), 24992. <http://dx.doi.org/10.1039/c2jm34517j>
- Castillo, R., Araya, J., Troncoso, E., Vinet, S., & Freer, J. (2015). Fourier transform infrared imaging and microscopy studies of Pinus radiata pulps regarding the simultaneous saccharification and fermentation process. *Analytica Chimica Acta*, 866, 10-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.01.032>
- Cesteros, L. C. (2004). Aplicaciones de la FTIR al estudio de las interacciones polímero-polímero. *Revista Iberoamericana de polímeros*, 5(3), 111-132.
- Chen, J., Li, Y., Huang, L., Li, C., & Shi, G. (2015). High-yield preparation of graphene oxide from small graphite flakes via an improved Hummers method with a simple purification process. *Carbon*, 81, 826-834. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2014.10.033>
- Cheng, H., Sahoo, N., Tan, Y., Pan, Y., Bao, H., & Li, L. et al. (2012). Poly(vinyl alcohol) Nanocomposites Filled with Poly(vinyl alcohol)-Grafted Graphene Oxide. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 4(5), 2387-2394. <http://dx.doi.org/10.1021/am300550n>
- Conquer, J. A., Maiani, G., Azzini, E., Raguzzini, A., & Holub, B. J. (1998). Supplementation with Quercetin Markedly Increases Plasma Quercetin Concentration without Effect on Selected Risk Factors for Heart Disease in Healthy Subjects. *The Journal of Nutrition*, 128(3), 593-7. PMID: 9482769. PMID: 9482769

- Cote, L., Kim, J., Tung, V., Luo, J., Kim, F., & Huang, J. (2010). Graphene oxide as surfactant sheets. *Pure And Applied Chemistry*, 83(1). <http://dx.doi.org/10.1351/pac-con-10-10-25>
- Dai, C., Liu, C., Wei, J., Hong, H., & Zhao, Q. (2010). Molecular imprinted macroporous chitosan coated mesoporous silica xerogels for hemorrhage control. *Biomaterials*, 31(30), 7620-7630. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.06.049>
- Dai, C., Yuan, Y., Liu, C., Wei, J., Hong, H., Li, X., & Pan, X. (2009). Degradable, antibacterial silver exchanged mesoporous silica spheres for hemorrhage control. *Biomaterials*, 30(29), 5364-5375. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.06.052>
- Dai, J., Huang, T., Tian, S., Xiao, Y., Yang, J., & Zhang, N. et al. (2016). High structure stability and outstanding adsorption performance of graphene oxide aerogel supported by polyvinyl alcohol for waste water treatment. *Materials & Design*, 107, 187-197. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matdes.2016.06.039>
- Del Gaudio, P., Auriemma, G., Mencherini, T., Porta, G., Reverchon, E., & Aquino, R. (2013). Design of Alginate-Based Aerogel for Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Controlled Delivery Systems Using Prilling and Supercritical-Assisted Drying. *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 102(1), 185-194. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.23361>
- Dohadwala, M., & Vita, J. (2009). Grapes and Cardiovascular Disease. *Journal Of Nutrition*, 139(9), 1788S-1793S. <http://dx.doi.org/10.3945/jn.109.107474>
- Dumont, J. (2015). Modelación matemática de la absorción intestinal de extractos de uva País. Tesis en Ingeniería Química, Universidad de Concepción. Concepción. Chile.
- Fernández, K., & Agosin, E. (2007). Quantitative Analysis of Red Wine Tannins Using Fourier-Transform Mid-Infrared Spectrometry. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 55(18), 7294-7300. <http://dx.doi.org/10.1021/jf071193d>
- Ferrari, A. (2007). Raman spectroscopy of graphene and graphite: Disorder, electron-phonon coupling, doping and nonadiabatic effects. *Solid State Communications*, 143(1-2), 47-57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ssc.2007.03.052>
- Ferrari, A., & Basko, D. (2013). Raman spectroscopy as a versatile tool for studying the properties of graphene. *Nature Nanotechnology*, 8(4), 235-246. <http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2013.46>
- García-González, C., Jin, M., Gerth, J., Alvarez-Lorenzo, C., & Smirnova, I. (2015). Polysaccharide-based aerogel microspheres for oral drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 117, 797-806. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.045>
- Georgakilas, V., Otyepka, M., Bourlinos, A., Chandra, V., Kim, N., & Kemp, K. et al. (2012). Functionalization of Graphene: Covalent and Non-Covalent Approaches, Derivatives and Applications. *Chemical Reviews*, 112(11), 6156-6214. <http://dx.doi.org/10.1021/cr3000412>
- Georgiev, V., Ananga, A., & Tsoleva, V. (2014). Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals. *Nutrients*, 6(1), 391-415. <http://dx.doi.org/10.3390/nu6010391>
- Gethin, G. (2007). The significance of surface pH in chronic wounds. *Wounds UK*, 3(3), 52-56.
- Godoy, S., Roeckel, M., & Fernández, K. (2012). Influence of the structure and composition of the País grape proanthocyanidins on the inhibition of angiotensin I-converting enzyme (ACE). *Food Chemistry*, 134(1), 346-350. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.171>

- Goenka, S., Sant, V., & Sant, S. (2014). Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering. *Journal Of Controlled Release*, 173, 75-88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.10.017>
- Gu, R., Sun, W., Zhou, H., Wu, Z., Meng, Z., & Zhu, X. et al. (2010). The performance of a fly-larva shell-derived chitosan sponge as an absorbable surgical hemostatic agent. *Biomaterials*, 31(6), 1270-1277. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.10.023>
- Hummers, W., & Offeman, R. (1958). Preparation of Graphitic Oxide. *Journal Of The American Chemical Society*, 80(6), 1339-1339. <http://dx.doi.org/10.1021/ja01539a017>
- Jayaprakasha, G., Selvi, T., & Sakariah, K. (2003). Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Research International*, 36(2), 117-122. [http://dx.doi.org/10.1016/s0963-9969\(02\)00116-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0963-9969(02)00116-3)
- Kim, H., & Kim, W. (2014). Graphene Oxide: Photothermally Controlled Gene Delivery by Reduced Graphene Oxide-Polyethylenimine Nanocomposite (Small 1/2014). *Small*, 10(1), 212-212. <http://dx.doi.org/10.1002/sml.201470008>
- Kozen, B., Kircher, S., Henao, J., Godinez, F., & Johnson, A. (2008). An Alternative Hemostatic Dressing: Comparison of CELOX, HemCon, and QuikClot. *Academic Emergency Medicine*, 15(1), 74-81. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1553-2712.2007.00009.x>
- Kumar, A., & Han, S. (2016). PVA-based hydrogels for tissue engineering: A review. *International Journal Of Polymeric Materials And Polymeric Biomaterials*, 66(4), 159-182. <http://dx.doi.org/10.1080/00914037.2016.1190930>
- Kundu, A., Layek, R., Kuila, A., & Nandi, A. (2012). Highly Fluorescent Graphene Oxide-Poly(vinyl alcohol) Hybrid: An Effective Material for Specific Au³⁺-Ion Sensors. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 4(10), 5576-5582. <http://dx.doi.org/10.1021/am301467z>
- Lee, D., De Los Santos V., L., Seo, J., Felix, L., Bustamante D., A., Cole, J., & Barnes, C. (2010). The Structure of Graphite Oxide: Investigation of Its Surface Chemical Groups. *The Journal Of Physical Chemistry B*, 114(17), 5723-5728. <http://dx.doi.org/10.1021/jp1002275>
- Lee, H., Choi, T., Lee, Y., Cho, H., Ghaffari, R., & Wang, L. et al. (2016). A graphene-based electrochemical device with thermoresponsive microneedles for diabetes monitoring and therapy. *Nature Nanotechnology*, 11(6), 566-572. <http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2016.38>
- Li, G., Quan, K., Liang, Y., Li, T., Yuan, Q., & Tao, L. et al. (2016). Graphene-Montmorillonite Composite Sponge for Safe and Effective Hemostasis. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(51), 35071-35080. <http://dx.doi.org/10.1021/acsami.6b13302>
- Li, Y., Umer, R., Samad, Y., Zheng, L., & Liao, K. (2013). The effect of the ultrasonication pre-treatment of graphene oxide (GO) on the mechanical properties of GO/polyvinyl alcohol composites. *Carbon*, 55, 321-327. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2012.12.071>
- Liao, K., Lin, Y., Macosko, C., & Haynes, C. (2011). Cytotoxicity of Graphene Oxide and Graphene in Human Erythrocytes and Skin Fibroblasts. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 3(7), 2607-2615. <http://dx.doi.org/10.1021/am200428v>
- Linares, J., Matesanz, M., Feito, M., Salavagione, H., Martínez, G., Gómez-Fatou, M., & Portolés, M. (2016). Influence of the covalent immobilization of graphene oxide in poly(vinyl alcohol) on human osteoblast response. *Colloids And Surfaces B: Biointerfaces*, 138, 50-59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.11.035>

- Linares, J., Matesanz, M., Feito, M., Salavagione, H., Martínez, G., Gómez-Fatou, M., & Portolés, M. (2016). Influence of the covalent immobilization of graphene oxide in poly(vinyl alcohol) on human osteoblast response. *Colloids And Surfaces B: Biointerfaces*, 138, 50-59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.11.035>
- Liu, J., Cui, L., & Losic, D. (2013). Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications. *Acta Biomaterialia*, 9(12), 9243-9257. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.08.016>
- Liu, Z., Robinson, J. T., Sun, X., & Dai, H. (2008). Pegylated nano-graphene oxide for delivery of insoluble cancer drug. *Journal of American Chemical Society*, 130(33), 10876-10877. <http://dx.doi.org/10.1021/ja803688x>
- Lodhi, S., & Singhai, A. (2013). Wound healing effect of flavonoid rich fraction and luteolin isolated from *Martynia annua* Linn. on streptozotocin induced diabetic rats. *Asian Pacific Journal Of Tropical Medicine*, 6(4), 253-259. [http://dx.doi.org/10.1016/s1995-7645\(13\)60053-x](http://dx.doi.org/10.1016/s1995-7645(13)60053-x)
- Malard, L. M., Pimenta, M. A. A., Dresselhaus, G., & Dresselhaus, M. S. (2009). Raman spectroscopy in graphene. *Physics Reports*, 473(5), 51-87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.physrep.2009.02.003>
- Mallepally, R., Bernard, I., Marin, M., Ward, K., & McHugh, M. (2013). Superabsorbent alginate aerogels. *The Journal Of Supercritical Fluids*, 79, 202-208. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2012.11.024>
- Mansur, H., Sadahira, C., Souza, A., & Mansur, A. (2008). FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. *Materials Science And Engineering: C*, 28(4), 539-548. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2007.10.088>
- Marcano, D., Kosynkin, D., Berlin, J., Sinitskii, A., Sun, Z., & Slesarev, A. et al. (2010). Improved Synthesis of Graphene Oxide. *ACS Nano*, 4(8), 4806-4814. <http://dx.doi.org/10.1021/nn1006368>
- Miyamoto, M., Sasakawa, S., Ozawa, T., Kawaguchi, H., & Ohtsuka, Y. (1989). Platelet aggregation induced by latex particles. *Biomaterials*, 10(4), 251-257. [http://dx.doi.org/10.1016/0142-9612\(89\)90101-4](http://dx.doi.org/10.1016/0142-9612(89)90101-4)
- Morales, C., Roeckel, M., & Fernández, K. (2013). Microscopic Modeling of País Grape Seed Extract Absorption in the Small Intestine. *AAPS Pharmscitech*, 15(1), 103-110. <http://dx.doi.org/10.1208/s12249-013-0045-z>
- Muñoz, V. (2015) “Síntesis y evaluación fisicoquímica y biológica de nanopartículas de lauril succinil quitosano (LSC) para la nanoencapsulación de Proantocianidinas (PAs) de extractos de semilla de uva.” Memoria de Título, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
- Nayak, B., Ramdath, D., Marshall, J., Isitor, G., Eversley, M., Xue, S., & Shi, J. (2009). Wound-healing activity of the skin of the common grape (*Vitis Vinifera*) variant, cabernet sauvignon. *Phytotherapy Research*, n/a-n/a. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.2999>
- Ostomel, T., Shi, Q., Stoimenov, P., & Stucky, G. (2007). Metal Oxide Surface Charge Mediated Hemostasis. *Langmuir*, 23(22), 11233-11238. <http://dx.doi.org/10.1021/la701281t>
- Peregrino, P., Sales, M., da Silva, M., Soler, M., da Silva, L., Moreira, S., & Paterno, L. (2014). Thermal and electrical properties of starch-graphene oxide nanocomposites improved by photochemical treatment. *Carbohydrate Polymers*, 106, 305-311. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.008>

- Pinto, A., Gonçalves, I., & Magalhães, F. (2013). Graphene-based materials biocompatibility: A review. *Colloids And Surfaces B: Biointerfaces*, *111*, 188-202. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.05.022>
- Popa, D., Sun, Z., Torrisi, F., Hasan, T., Wang, F., & Ferrari, A. (2010). Sub 200 fs pulse generation from a graphene mode-locked fiber laser. *Applied Physics Letters*, *97*(20), 203106. <http://dx.doi.org/10.1063/1.3517251>
- Quan, K., Li, G., Luan, D., Yuan, Q., Tao, L., & Wang, X. (2015). Black hemostatic sponge based on facile prepared cross-linked graphene. *Colloids And Surfaces B: Biointerfaces*, *132*, 27-33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.04.067>
- Quan, K., Li, G., Tao, L., Xie, Q., Yuan, Q., & Wang, X. (2016). Diaminopropionic Acid Reinforced Graphene Sponge and Its Use for Hemostasis. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *8*(12), 7666-7673. <http://dx.doi.org/10.1021/acsami.5b12715>
- Rahmanian, N., Hamishehkar, H., Dolatabadi, J., & Arsalani, N. (2014). Nano graphene oxide: A novel carrier for oral delivery of flavonoids. *Colloids And Surfaces B: Biointerfaces*, *123*, 331-338. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.09.036>
- Rhodes, P., Mitchell, J., Wilson, M., & Melton, L. (2006). Antilisterial activity of grape juice and grape extracts derived from *Vitis vinifera* variety Ribier. *International Journal Of Food Microbiology*, *107*(3), 281-286. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.022>
- Salavagione, H., Gómez, M., & Martínez, G. (2009). Polymeric Modification of Graphene through Esterification of Graphite Oxide and Poly(vinyl alcohol). *Macromolecules*, *42*(17), 6331-6334. <http://dx.doi.org/10.1021/ma900845w>
- Salavagione, H., Gómez, M., & Martínez, G. (2009). Polymeric Modification of Graphene through Esterification of Graphite Oxide and Poly(vinyl alcohol). *Macromolecules*, *42*(17), 6331-6334. <http://dx.doi.org/10.1021/ma900845w>
- Sedlarik, V., Galya, T., Emri, I., & Saha, P. (2009). Structure and conditioning effect on mechanical behavior of poly(vinyl alcohol)/calcium lactate biocomposites. *Polymer Composites*, *30*(8), 1158-1165. <http://dx.doi.org/10.1002/pc.20672>
- Shanmuganayagam, D., Beahm, M. R., Osman, H. E., Krueger, C. G., Reed, J. D., & Folts, J. D. (2002). Grape Seed and Grape Skin Extracts Elicit a Greater Antiplatelet Effect When Used in Combination than When Used Individually in Dogs and Humans. *The Journal of Nutrition*, *132*(12), 3592-8. PMID: 12468593. PMID: 12468593
- Shih, M., Shau, M., Chang, M., Chiou, S., Chang, J., & Cherng, J. (2006). Platelet adsorption and hemolytic properties of liquid crystal/composite polymers. *International Journal Of Pharmaceutics*, *327*(1-2), 117-125. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.07.043>
- Shukla, A., Fang, J., Puranam, S., Jensen, F., & Hammond, P. (2011). Hemostatic Multilayer Coatings. *Advanced Materials*, *24*(4), 492-496. <http://dx.doi.org/10.1002/adma.201103794>
- Singh, S., Singh, M., Kulkarni, P., Sonkar, V., Grácio, J., & Dash, D. (2012). Amine-Modified Graphene: Thrombo-Protective Safer Alternative to Graphene Oxide for Biomedical Applications. *ACS Nano*, *6*(3), 2731-2740. <http://dx.doi.org/10.1021/nn300172t>
- Singh, S., Singh, M., Nayak, M., Kumari, S., Shrivastava, S., Grácio, J., & Dash, D. (2011). Thrombus Inducing Property of Atomically Thin Graphene Oxide Sheets. *ACS Nano*, *5*(6), 4987-4996. <http://dx.doi.org/10.1021/nn201092p>

- Sinha, M., Banik, R., Haldar, C., & Maiti, P. (2012). Development of ciprofloxacin hydrochloride loaded poly(ethylene glycol)/chitosan scaffold as wound dressing. *Journal Of Porous Materials*, 20(4), 799-807. <http://dx.doi.org/10.1007/s10934-012-9655-1>
- Solaro, R., Corti, A., & Chiellini, E. (2000). Biodegradation of poly(vinyl alcohol) with different molecular weights and degree of hydrolysis. *Polymers For Advanced Technologies*, 11(812), 873-878. [http://dx.doi.org/10.1002/1099-1581\(200008/12\)11:8/12<873::aid-pat35>3.3.co;2-m](http://dx.doi.org/10.1002/1099-1581(200008/12)11:8/12<873::aid-pat35>3.3.co;2-m)
- Tan, P., Wen, J., Hu, Y., & Tan, X. (2016). Adsorption of Cu²⁺ and Cd²⁺ from aqueous solution by novel electrospun poly(vinyl alcohol)/graphene oxide nanofibers. *RSC Adv.*, 6(83), 79641-79650. <http://dx.doi.org/10.1039/c6ra18052c>
- Turcheniuk, K., Khanal, M., Motorina, A., Subramanian, P., Barras, A., & Zaitsev, V. et al. (2014). Insulin loaded iron magnetic nanoparticle-graphene oxide composites: synthesis, characterization and application for in vivo delivery of insulin. *RSC Adv.*, 4(2), 865-875. <http://dx.doi.org/10.1039/c3ra46307a>
- Unnithan, A., Barakat, N., Tirupathi Pichiah, P., Gnanasekaran, G., Nirmala, R., & Cha, Y. et al. (2012). Wound-dressing materials with antibacterial activity from electrospun polyurethane-dextran nanofiber mats containing ciprofloxacin HCl. *Carbohydrate Polymers*, 90(4), 1786-1793. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.071>
- Wang, J. & Ellsworth, M. W. (2009). Graphene Aerogels. *ECS Transactions*, 19(5), 241-247. <http://dx.doi.org/10.1149/1.3119548>
- Wang, J., Liu, C., Shuai, Y., Cui, X., & Nie, L. (2014). Controlled release of anticancer drug using graphene oxide as a drug-binding effector in konjac glucomannan/sodium alginate hydrogels. *Colloids And Surfaces B: Biointerfaces*, 113, 223-229. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.09.009>
- Weaver, C., LaRosa, J., Luo, X., & Cui, X. (2014). Electrically Controlled Drug Delivery from Graphene Oxide Nanocomposite Films. *ACS Nano*, 8(2), 1834-1843. <http://dx.doi.org/10.1021/nn406223e>
- Wen, H., Dong, C., Dong, H., Shen, A., Xia, W., & Cai, X. et al. (2012). Engineered Redox-Responsive PEG Detachment Mechanism in PEGylated Nano-Graphene Oxide for Intracellular Drug Delivery. *Small*, 8(5), 760-769. <http://dx.doi.org/10.1002/smll.201101613>
- Wu, J., Wang, Y., Yang, X., Liu, Y., Yang, J., Yang, R., & Zhang, N. (2012). Graphene oxide used as a carrier for adriamycin can reverse drug resistance in breast cancer cells. *Nanotechnology*, 23(35), 355101. <http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/23/35/355101>
- Yang, C., Chiu, S., Chien, W., & Chiu, S. (2010). Quaternized poly(vinyl alcohol)/alumina composite polymer membranes for alkaline direct methanol fuel cells. *Journal Of Power Sources*, 195(8), 2212-2219. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpowsour.2009.10.091>
- Yang, X., Zhang, X., Liu, Z., Ma, Y., Huang, Y., & Chen, Y. (2008). High-Efficiency Loading and Controlled Release of Doxorubicin Hydrochloride on Graphene Oxide. *The Journal Of Physical Chemistry C*, 112(45), 17554-17558. <http://dx.doi.org/10.1021/jp806751k>
- Yin, P., Shah, S., Chhowalla, M., & Lee, K. (2015). Design, Synthesis, and Characterization of Graphene-Nanoparticle Hybrid Materials for Bioapplications. *Chemical Reviews*, 115(7), 2483-2531. <http://dx.doi.org/10.1021/cr500537t>

7. CONCLUSIÓN

El objetivo central de este trabajo fue desarrollar un material compuesto, aerogel, de óxido de grafeno (GO) y polivinil alcohol (PVA), con propiedades absorbentes y de liberación de compuesto, mediante la incorporación de extractos de semilla y piel de uva País (*Vitis vinífera L.*), ricos en Proantocianidinas (PAs o taninos condensados), enfocando su potencial uso en aplicaciones dérmicas, hemostáticas y/o cicatrizantes. Los resultados obtenidos a partir de las temáticas desarrolladas en esta investigación permiten extraer las siguientes conclusiones generales y perspectivas:

En primer lugar, dado que las características del GO son cruciales para la fabricación de los aerogeles y que la exfoliación es un paso clave para obtener nanoláminas de GO totalmente exfoliadas y con características adecuadas para la posterior formación de ellos, se comparó el efecto de utilizar dos equipos de ultrasonido (Sonda y Baño) como métodos de exfoliación del óxido de grafeno (GfO) en las características de las láminas de GO obtenidas susceptibles de ser funcionalizadas, y se propuso que los aerogeles, sintetizados fuesen capaces de absorber líquidos tales como agua y sangre, así como también de incorporar extractos polifenólicos (PAs) en ellos.

- Fue posible sintetizar exitosamente óxido de grafeno (GO) a partir de escamas de grafito, de alta pureza y cristalinidad, mediante el método de Hummers, utilizando H_2SO_4 , $NaNO_3$ como agentes intercalantes y $KMnO_4$ como oxidante. Las muestras de GfO sometidas a tratamientos de exfoliación mecánica directa (Sonicador de sonda) o indirecta (Sonicador de baño) durante diferentes intervalos de tiempo, mostraron ser eficaces para la exfoliación, fragmentaron las láminas GO, disminuyendo así el tamaño y aumentando el espacio entre capas, obteniéndose una mayor cantidad de 1 o 2 capas de GO; esto permitió obtener un amplio rango de tamaños de GO de ordenes nanométricos. Sin embargo, se demostró que los incrementos en el tiempo de sonicación y la potencia del equipo causaron un daño sustancial a la estructura y morfología de las láminas de GO. La sonda requirió menos tiempo, pero causó más daño y arrugas en las láminas de GO, mostrando una reducción más notable en la cantidad de grupos funcionales disponibles para transformaciones químicas adicionales, lo cual no es deseable para una posterior funcionalización de GO.
- Debido a lo anterior, para las posteriores síntesis de aerogeles se utilizó un tratamiento de Baño de ultrasonido en lugar de la Sonda con bajos de tiempo de sonicación, ya que es menos invasivo, no requiere contacto directo con las muestras y permite un fácil control de la temperatura de la muestra, factor importante para evitar los efectos térmicos que generan deformaciones en las hojas GO, y causa menos arrugas y menos daño a la estructura y la morfología de la lámina.

- Se logró preparar aerogeles mediante una unión de tipo no covalente, utilizando un sencillo y versátil método sol-gel de mezcla en solución y posterior liofilización. Los resultados muestran que la incorporación de PVA podría exfoliar las capas de GO y reforzar la estructura porosa 3D del aerogel, mientras que la incorporación de extractos de uva de País polifenólicos mostró un efecto de refuerzo en la estructura de los aerogeles manteniendo su morfología. Además, la presencia de extractos influyó fuertemente en el contenido elemental de O y C y aumentó el potencial zeta negativo de los aerogeles GO-PVA-SD y GO-PVA-SK. Estos aerogeles mostraron mayor estabilidad y una mayor capacidad y rapidez de absorción de agua, en comparación con el aerogel GO-PVA.

En segundo lugar, se propuso que estos mismos aerogeles podría no sólo actuar como agentes hemostáticos, sino también ser capaces de liberar los extractos polifenólicos incorporados en su matriz, en respuesta a la presencia de sangre (un cambio de pH en el medio).

- Se demostró que los aerogeles permitieron la coagulación de sangre y permitieron la liberación de compuestos polifenólicos, mostrando que la coagulación superficial de la sangre entera se ve favorecida por la incorporación de PAs en el aerogel, aumentando del potencial zeta negativo del material alrededor del 33% y generando hasta un 40% y un aumento del 55% en el tiempo de coagulación durante el primer y segundo minuto de contacto entre el aerogel y la sangre entera, siendo visible una velocidad de absorción más alta con respecto a GO-PVA o Gasa.
- La liberación de extractos de GO-PVA (en un medio que simula el pH de la sangre) se prolongó hasta 3 h, pero sólo ~14% y ~20% del extracto SK y SD, respectivamente, probablemente debido a la existencia de una fuerte unión entre PAs aromáticos y GO-PVA. Una pequeña variación de la banda a 1220 cm^{-1} de los espectros FTIR indicaría que los extractos podrían unirse covalentemente generando suficiente estabilidad (enlaces C-O) para evitar su mayor liberación en el medio. GO-PVA-SD alcanza su máxima liberación después de una hora, a diferencia de GO-PVA-SK que a las 3 horas logra su liberación más alta. Análisis elementales y de potencial zeta demuestran la presencia de los extractos de uva en los aerogeles, sin embargo, de acuerdo con los análisis FTIR y Raman, es GO-PVA el componente principal que prevalece en los aerogeles, el cual solapa la presencia de estos polifenoles.

Se propuesto un material (aerogeles) en base a GO y PVA, combinado con extractos naturales, ricos en componentes bioactivos, que es un candidato potencial para ser utilizado como matriz de apósitos en aplicaciones dermicas, coagulantes y/o cicatrizantes. A pesar de que los efectos hemostáticos, de

liberación y las propias características estructurales de los aerogeles deben ser mejorados, considerando su fácil preparación y las propiedades bioactivas de los extractos de uva País, ellos exhiben un potencial para ser usado en tratamientos, tales como heridas o control de sangrado. Sin embargo, análisis *in vitro* e *in vivo* de biocompatibilidad y toxicidad de este material, son necesarios para asegurar su uso.



8. ANEXOS

Anexo I: Supporting information of “Study of the influence of ultrasonic treatments using probe or bath on the graphene oxide structure by Raman spectroscopy”

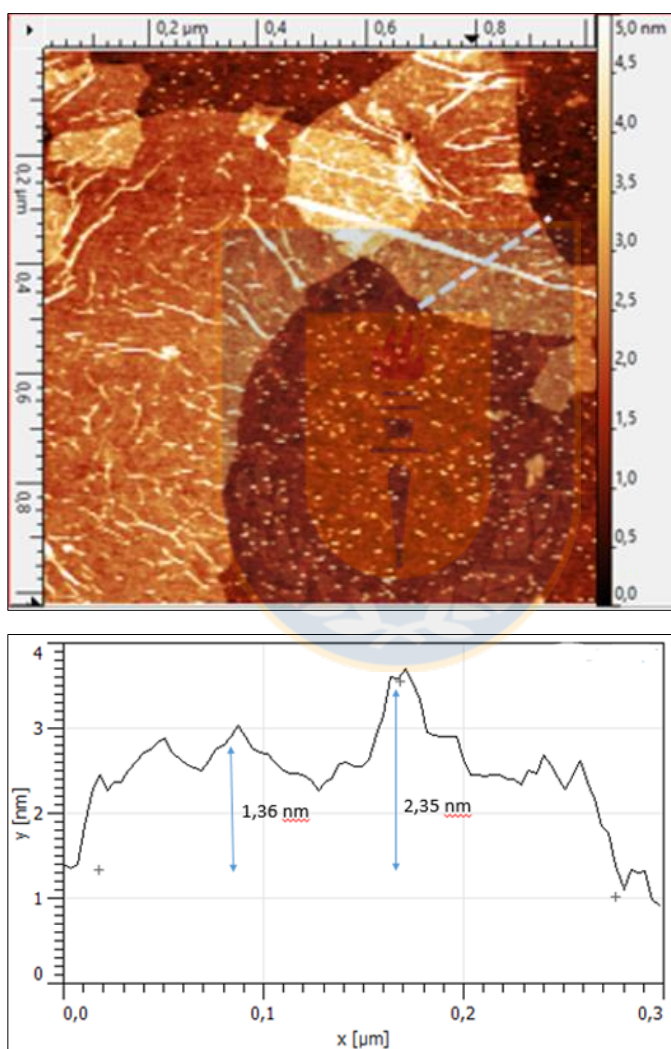


Figure SI-8.1. AFM image showing wrinkles in the edges and on the surface of GO sheets p-5 and the height profile of it. Source: Own elaboration.

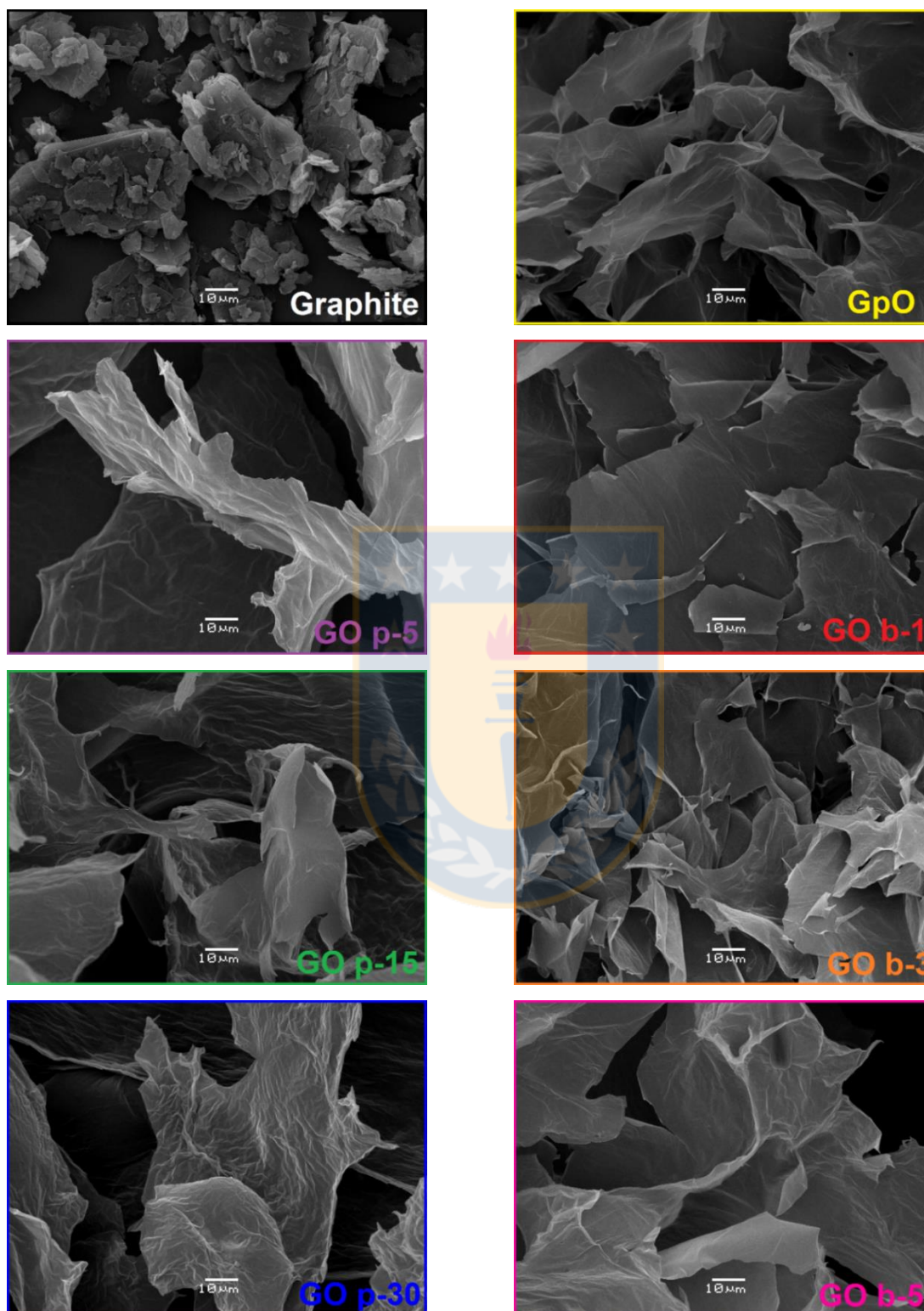


Figure SI-8.2. SEM images of graphite flakes (GF), and graphite oxide (GpO) and graphene oxide (GO) lyophilized samples, sonicated with Probe (p - min) or Bath (b - hours) Sonicator. Source: Own elaboration.

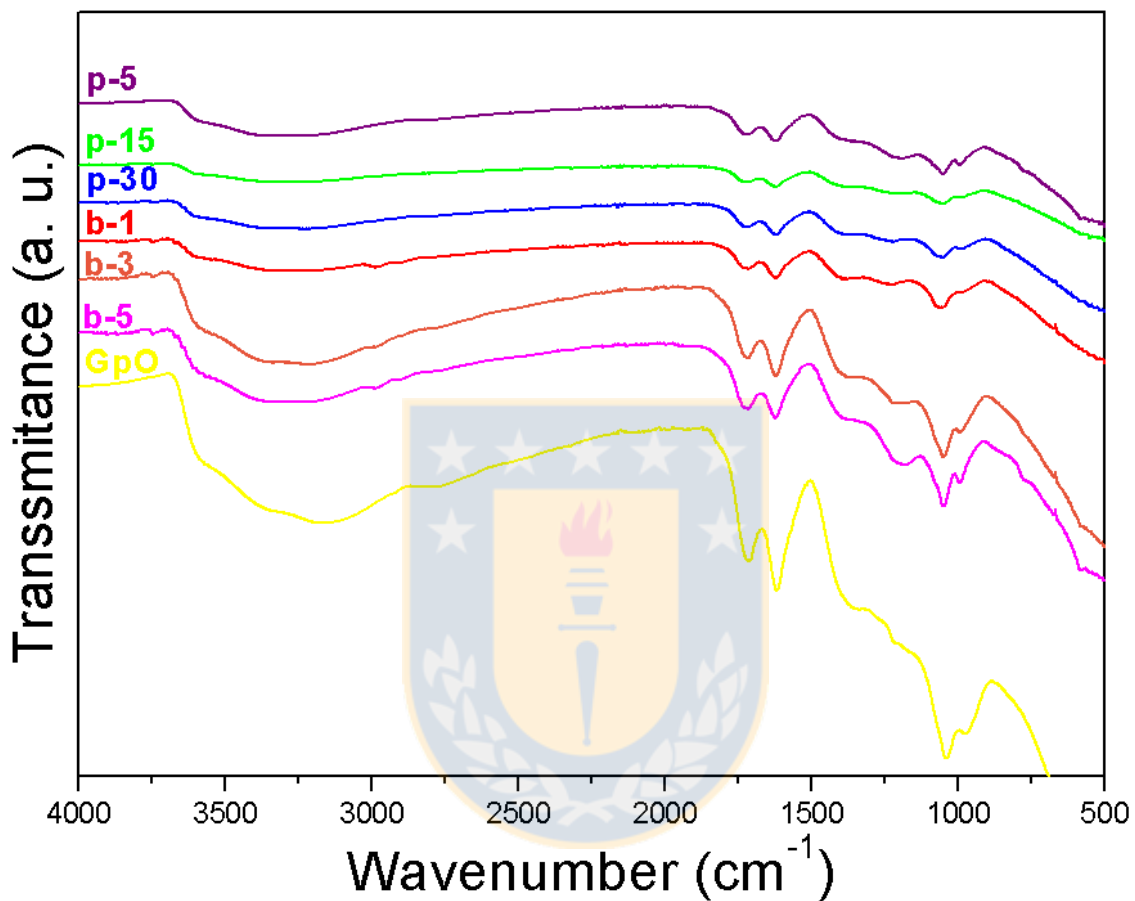


Figure SI-8.3. FTIR spectra of graphite oxide (GpO) and graphene oxide (GO) lyophilized samples, sonicated with Probe (p - min) or Bath (b - hours) Sonicator. Source: Own elaboration.

Anexo II: Supporting information of “Development of graphene oxide composite aerogel with Proanthocyanidins (PAs) with hemostatic properties as delivery system”

EXPERIMENTS

Determination of the Total Concentration of the Phenols: The total phenolic content of each sample was analyzed following the procedure reported (Jerez, Sineiro, & Nuñez, 2009). First, 2.5 mL of the Folin–Ciocalteu reagent was diluted with 2 mL of a 7.5% (w/v) sodium carbonate solution and 0.5 mL of the sample. Then, the solution was heated for 15 min at 45°C, and the solution's absorbance was measured at 765 nm (Techcomp spectrophotometer, UV-2300, China). The total concentration of the phenols was expressed in units of milligram equivalent gallic acid per milligram of extract using Eq. (1):

$$F_t = f_c \cdot A_{bs} \cdot D_i \quad (1)$$

where A_{bs} is the absorbance (nanometer) of the sample, D_i is the sample dissolution, f_c is an equivalence factor (0.0116 L solution/mg eq. gallic acid) and F_t is the total concentration of the phenols (gram equivalent gallic acid per gram of extract).

Material characterization: Elemental Analysis (EA): Elemental analysis (EA) was conducted in a Leco TrueSpec CHN to analyze the elementary composition difference between GO, PVA, extracts, and GO-PVA, GO-PVA-SK, GO-PVA-SD aerogel samples. They were analyzed as they were synthesized. ζ -

Potential Measurements: The zeta potential was determined using dynamic light scattering principle (Zetasizer III, Malvern Instruments, UK), to detect the negative potential of the GO and aerogels; All samples were prepared in PBS solution (pH=7.4) at a concentration of 0.5 g/L, and each samples was repeated at least 3 times to take the average value. ***Fourier Transform Infrared microspectroscopy (micro FTIR):*** FT-IR spectra and images of aerogels were analyzed by micro FT-IR using an FT-IR Spectrum Frontier/Spotlight 400 Microscopy System (PerkinElmer, Inc.) with a linear array of MCT detectors. Areas between 150 $\mu\text{m} \times 150 \mu\text{m}$ of aerogels sample (freeze-dried) were scanned by attenuated total reflectance (ATR) using a germanium crystal as the high reflective material, a pixel size of 6.25 $\mu\text{m} \times$

6.25 μm and a spectral range from 4000 to 748 cm^{-1} with a spectral resolution of 8 cm^{-1} and 16 scans per spectra. The spectra extracted from the images were submitted to ATR correction, removal of atmospheric noise, baseline correction and transformed to absorbance before imaging and chemometric analyses.

Multivariate image analysis (MIA): MIA was applied to evaluate the distribution of grape extract components on aerogels through of principal component analysis (PCA) using SpectrumIMAGE Software (PerkinElmer, Inc.). Then, MCR-ALS was performed on the area of acquired images through of the “Graphic User Friendly Interface” developed by Jaumot et al. (Jaumot, 2005) in MATLAB R2013a (Mathworks, Inc.). The interactive self-modeling mixture analysis method “Pure”, which is focused on selecting and using purest variables as initial estimates, was employed for the ALS procedure using concentration as direction of the variable selection. Non-negativity in both, spectra and concentrations, were used as constraints, with 50 iterations and tolerance criterion for convergence of 0.1. The pure recovered spectra were then normalized by height.

Atomic Force Microscopy (AFM): The Atomic Force Microscopy (AFM) measurements were performed in AC mode using OmegaScope 1000 (AIST-NT inc., USA); the GO sample was prepared by dropping the solutions onto the silica wafer (≈ 0.01 mg/mL) for 20 minutes, followed by washing the samples with Mili-Q water and drying them under ambient conditions for 2 hrs. **Scanning Electron Microscopy (SEM):** Scanning Electron Microscopy (SEM) was carried out using a JEOL JSM-6380LV model microscope at 10 kV. The aqueous suspensions of GO, PVA and País grape extracts (SD and SK) were freeze-dried for 2 days. These lyophilized samples and the aerogels were coated using a gold sputter coater and the surfaces were observed with different resolutions to compare their internal structure, before and after the binding of PVA and/or extracts to GO. **X-ray diffraction**

(XRD): The X-ray diffraction spectra of the lyophilized GO, PVA, and aerogels were measured using an X-ray diffractometer (Bruke Axs, D4 Endeavor) with reference target: Cu $K\alpha$ radiation ($\lambda=1,541841$ Å; 2,2 kW), voltage: 40 kV, and current: 20 mA. The samples for XRD analysis were measured from 2 to 50° (2 θ) with steps of 0.02° and a measuring time of 141 s per step. **Raman Spectroscopy (Raman):** Raman spectroscopy was used for characterize the structure of GO and aerogel samples, and was acquired using a

high-resolution confocal LabRamHR Evolution Horiba Jobin Yvon microscope with a 633-nm Edge lase

line excitation source at a power of 13.3mW. The laser spot was focused on the sample using an optic Objective Olympus 100x VIS and NUV camera (B/S UV 50/50+Lens F125 D25). ***Thermogravimetric analysis (TGA)***: The thermal stability of the GO, PVA and aerogels was analyzed by TGA using a NETZSCH STA 409 PC/PG at a heating rate of 10°C/min; the temperature was scanned from room temperature to 800°C under nitrogen atmosphere (100 mL/min).

Water absorption capability: In order to estimate the absorption capacity of the aerogels, a test was carried out in which the aerogels samples were equilibrated in water so that the aerogel completely absorbed the liquid; then they were placed with tweezers on a paper filter to remove some excess liquid and then weighed. The aerogels were weighed twice before and after dipping to determine the weight of absorbed water. The water absorption capability of the aerogels was presented as the mass ratio of water and aerogels (water weight / aerogel weight), as Mean value \pm Standard Deviation (n=6).



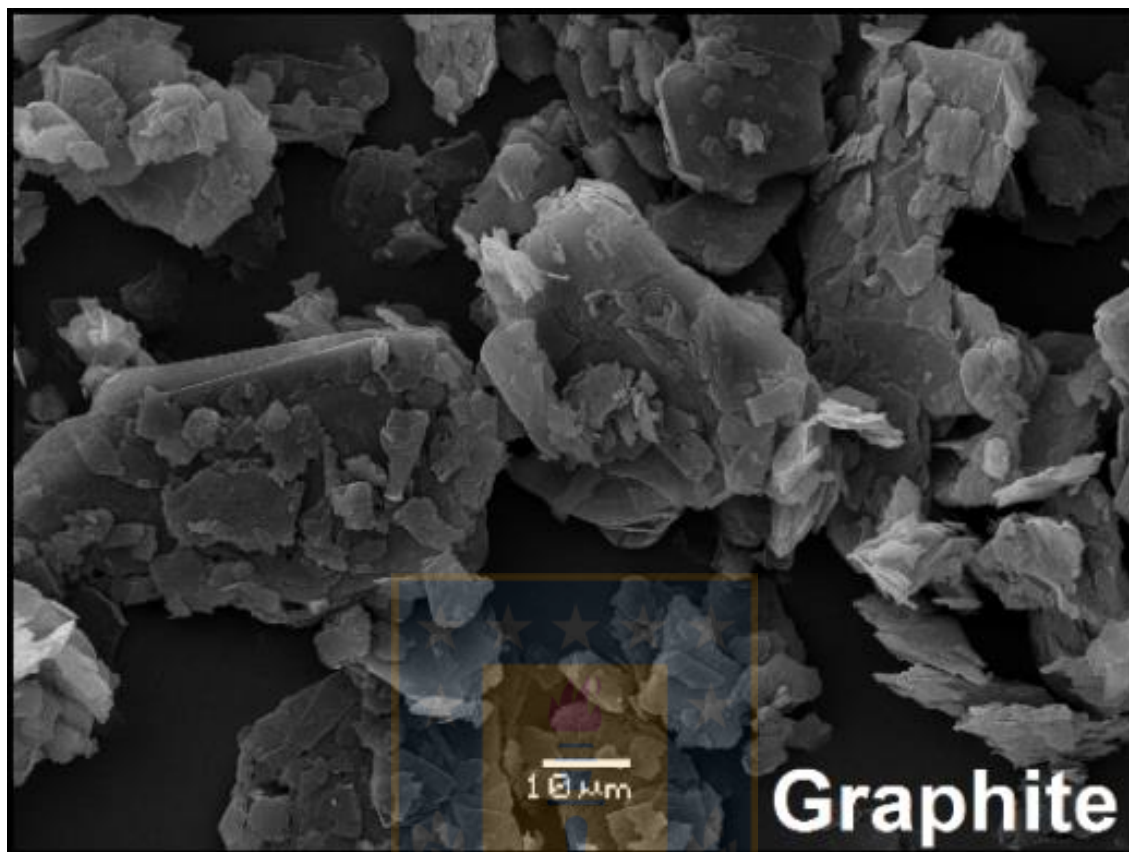
RESULTS

Figure SI-8.4. SEM images showing the morphology of graphite flakes (GF). Source: Own elaboration.

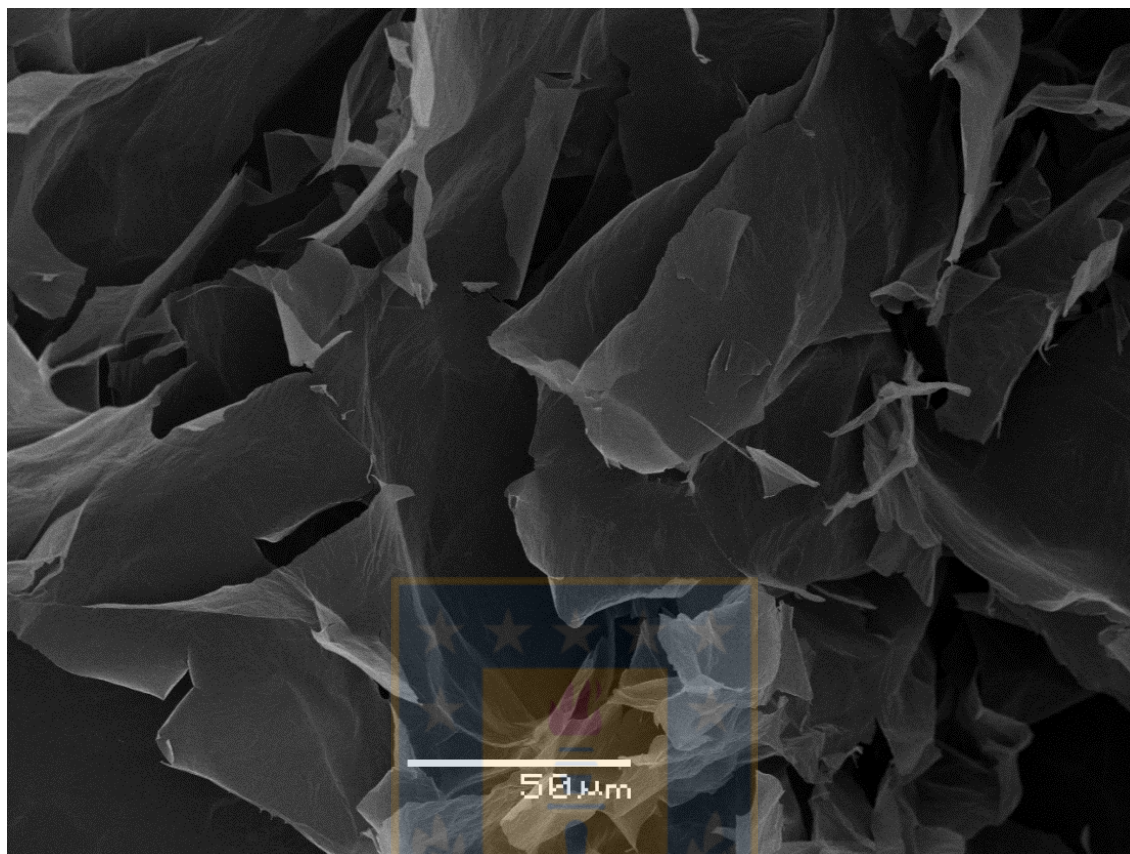


Figure SI-8.5. SEM image of GO. Source: Own elaboration.

REFERENCE

- Jaumot, J., Gargallo, R., de Juan, A., & Tauler, R. (2005). A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB. *Chemometrics And Intelligent Laboratory Systems*, 76(1), 101-110. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemolab.2004.12.007>
- Jerez, M., Sineiro, J., & Nuñez, M. J. (2009). Fractionation of pine bark extracts: Selecting procyanidins. *European Food Research and Technology*, 229(4), 651–659. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1096-y>