



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNOLOGÍA Y MATERIALES

PREPARACIÓN DE PAPEL DE ÓXIDO DE GRAFENO PARA APLICACIONES EN TRATAMIENTO DE AGUAS

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL
QUÍMICO**

DIEGO MIGUEL CORTÍNEZ VILLALOBOS

PROFESOR GUÍA:

HUMBERTO PALZA CORDERO

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:

PATRICIA PALMA FLUXÁ

RAUL QUIJADA ABARCA

SANTIAGO DE CHILE

2018

**RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL
TÍTULO DE: INGENIERO CIVIL QUÍMICO
POR: DIEGO MIGUEL CORTÍNEZ VILLALOBOS
FECHA: 12 DE MARZO 2018
PROFESOR GUÍA: HUMBERTO PALZA CORDERO**

PREPARACIÓN DE PAPEL DE ÓXIDO DE GRAFENO PARA APLICACIONES EN TRATAMIENTO DE AGUAS

En el próximo siglo la falta de agua se hará presente en todo el mundo, provocado principalmente por un incremento en el consumo por parte de la agricultura, la industria y la producción de energía; causando un efecto dominó que incrementará los efluentes no tratados y acrecentando el riesgo de polución de las reservas de agua, lo que generará una mayor escasez de este recurso. Debido a lo anterior, se hace necesario elaborar nuevos materiales multifuncionales que puedan tratar el agua, evitando que la contaminación por microorganismos, orgánicos, iones de metales pesados, entre otros siga, aumentando. Un componente utilizado en estos nuevos materiales es el óxido de grafeno (GO), debido a sus buenos resultados en esta área.

El objetivo de este trabajo es preparar y caracterizar papel de GO y papel de GO con quitosano (CS) y estudiar sus estructuras, capacidades de adsorción de un contaminante soluble (azul de metileno, MB) y efecto antimicrobiano contra dos bacterias (*E. coli* y *S. aureus*). Para ello, se sintetiza GO mediante una modificación del método de Hummers y se preparan los papeles. La caracterización se realiza por los métodos de XRD, FTIR, espectroscopia Raman, SEM y EDS. Finalmente, se comparan las propiedades de adsorción y antimicrobianas.

Como resultado se logró preparar un papel de GO y uno híbrido, y a través de las caracterizaciones se observó que: tienen una estructura laminada ordenada y que el CS permea el acoplamiento de hojas de GO, uniéndose por medio de enlaces de hidrógeno, principalmente. Estas láminas poseen una capacidad máxima de adsorción del pigmento (q_m) de 370,4 y 103,1 [mg/g], respectivamente. Por otro lado, la reducción de colonias de *E. coli* a causa del contacto de estas con el papel de GO y el híbrido fue de 22 ± 5 y 30 ± 2 [%], respecto al control. Por otro parte, para *S. aureus* los valores fueron 56 ± 2 y 53 ± 5 [%]. Para las dos bacterias existieron diferencias significativas de los papeles respecto al control (sin material antimicrobiano), pero no entre ellos.

Se concluye que se pudieron desarrollar dos métodos simples para preparar papeles de GO y de GO/CS, los que pueden adsorber colorantes y tiene propiedades antimicrobianas. Sobre la primera función, el papel híbrido posee una capacidad de adsorción máxima menor de MB porque tiene menos GO por [mg] de material y por la protonación de grupos amino del CS, que repelen al colorante. Por otro lado, en el ensayo de microbiología se utilizaron láminas cuadradas de 1 [cm²], con las que el papel híbrido tuvo un [%] mayor o similar de reducción de colonias que el papel de GO, a pesar de que estos últimos tuviesen una masa ~ 40 [%] mayor que la de los de GO/CS. Como proyección, se podría utilizar grafito de láminas más grandes para comprobar si este facilita la preparación de láminas de papel de mayor tamaño.

DEDICATORIA

I'm finished!
Daniel Plainview

If I could sing a song about the way I feel right now... it'd be a hit.
Kit Carruthers

You can destroy your life every time you choose. But maybe you won't know for twenty years.
Pastor

Sometimes I go about in pity for myself, and all the while a great wind carries me across the sky.
Dicho ojibwa

A mi familia. Mis papás (Gloria y Miguel), mis hermanos (Victoria, Joaquín y José) y mi sobrina (*Yo, la Laura*), por la contención y ayuda durante el transcurso de mis estudios y la vida. A mis abuelos (Alfredo e Isabel) a quienes recuerdo constantemente y que fallecieron en el desarrollo de esta tesis, es una lástima que no pueda compartir con ustedes como me siento ahora.

A mis amigos: Joan Cornejo, Maximiliano Thiers, Arantxa González, Jonathan Ramírez, Eduardo Paradela, Diego Garrido, Ignacio Pérez, Vicente/Simón López y Tamara Coron. Gracias por dejarme compartir con ustedes la cotidianidad y parte de su vida (y de la mía). Sin ustedes no hubiese aguantado, por lo que estoy feliz y eternamente agradecido de conocerlos.

A mis profesores de química del colegio: Alejandra Huerta, Luis Romanque y Andrea Espinoza, ya que con docentes de menor calidad probablemente no me hubiera gustado la química.

A las personas que conocí en la Universidad, como Vicente Saavedra e Iván Quinteros. A la gente del departamento y mis compañeros de generación, como Hugo Alarcón y Ricardo Donaire, con quienes reprobamos de manera simbólica IQ4302... irresponsables. También a todas las personas que me apoyaron en mi sueño de sacar la carrera con la menor cantidad posible de asistencia a clases, como Tamara Faundez, Patricia Navarro y Sergio González. A los profes del CFG de cine, Víctor Muñoz y Víctor H. Ortega, por las películas recomendadas y por contestar mis dudas sobre cine. Además, al SEMDA y sus funcionarios por el gran trabajo que realizan, especialmente Mario Inostrosa, Javiera Teutsch y Humberto Valenzuela, a quienes vi seguido durante el 2017.

También le dedico este trabajo a todas las personas que he conocido durante mi vida. A las personas que admiro y que desprecio. A las que amo y odio. A quienes me caen bien y mal. Porque todas han contribuido a que yo sea yo, porque las campanas doblan por mí.

Todos ustedes viven dentro de mí. Los llevaré conmigo a donde quiera que vaya.

AGRADECIMIENTOS

Los agradecimientos son para todas las personas que contribuyeron de manera directa a esta tesis.

A Sergio González, por su ayuda inefable durante el primer año de especialidad. Por la paciencia para explicarme las cosas que no entendía y por pasarme sus apuntes. Sin él hubiese reprobado todo. Infinitas gracias y admiración de mi parte.

A los profesores miembros de la comisión. A Humberto Palza por sugerir un tema de tesis que me interesase, a Patricia Palma por explicar/enseñarme todo lo relacionado con microbiología y a Raúl Quijada por sus correcciones. A todos ellos por siempre tener la disposición a responder mis dudas.

A Juan *El Señor del Laboratorio* Benavides, por los días que madrugó y que hizo horas extras con el fin de asegurarse que no destruyese el laboratorio haciendo GO. Por su simpatía, preocupación, confianza y por contestar el teléfono el día de Navidad jajaja. También a Ricardo Silva, por cortar las placas de teflón y fabricar la espátula.

A toda la gente del Laboratorio de Polímeros, por la buena onda, apoyo y conversaciones durante este proceso. René C. por enseñarme a hacer GO y por prestarme su cámara. Felipe O. por su gran disposición a ayudarme en todo lo que le fuese posible y por responder mis dudas. Carolina A. por preocuparse por mi trabajo, ayudarme en todo lo que pudiese y por el Raman. Patricio B. por enseñarme a ocupar la centrífuga. Camilo Z. por explicarme lo de adsorción y otra síntesis de GO. Joseph G. por responder mis dudas sobre adsorción y ayudarme con el nitrógeno líquido. Carolina R. por el FTIR. A Rodrigo S. por los favores de laboratorio que le pedía por teléfono. Pablo C. por su ayuda en nuestros intentos de hacer papel por prensado. Al final (pero no menos importante) a Mauricio A., por bloquear el láser de mi mouse... todavía me sigo riendo de esa estupidez.

A las personas del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. A Darna, Carla, Carmen y Cris, por responder todas mis dudas sobre cómo se trabajaba en un laboratorio de ese tipo y por sacarme las muestras incubadas cuando yo no podía ir.

A Nancy Carrasco del CeBiB, por su buena voluntad para ayudarme en todo lo que necesitase. A la profe MEL y Allison Leyton, por enseñarme a trabajar en un laboratorio... gracias a ellas no hice explotar el de Polímeros. También al CeBiB por facilitar sus centrífugas y el hielo.

A Andrés Ibáñez del Laboratorio de Cristalografía y Difracción de Rayos-X de la FCFM, por su buena disposición para responder mis dudas sobre los difractogramas.

Al proyecto Fondecip EQM150101, por las imágenes SEM y el Análisis EDS. También al operador del equipo, José Galaz.

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción	1
1.1. Antecedentes generales y motivación	1
1.2. Contaminación del agua por orgánicos	1
1.2.1. Adsorción	2
1.3. Contaminación microbiana del agua	6
1.4. Grafeno	8
1.5. Óxido de grafeno	9
1.5.1. Óxido de grafeno para adsorción de pigmentos	11
1.5.2. Óxido de grafeno para aplicaciones antimicrobianas	13
1.5.3. Papel de óxido de grafeno	19
1.5.4. Compuestos de go con quitosano	27
2. Objetivos	35
2.1. Objetivo general	35
2.2. Objetivos específicos	35
3. Fase experimental	36
3.1. Materiales y equipos	36
3.1.1. Materiales	36
3.1.2. Equipos	36
3.2. Metodología	41
3.2.1. Producción de óxido de grafeno	41
3.2.2. Purificación de óxido de grafeno	42
3.2.3. Secado de óxido de grafeno	44
3.2.4. Preparación de la solución de quitosano	44
3.2.5. Preparación de papel	45
3.2.6. Adsorción de colorantes	47
3.2.7. Propiedades antimicrobianas	49
3.2.8. Caracterización	51
4. Resultados y discusiones	53
4.1. Preparación de papel	53
4.2. Caracterización	58
4.2.1. Difracción de rayos x (xrd)	58
4.2.2. Espectrofotometría infrarroja de transformada de fourier (ftir)	61
4.2.3. Espectroscopía raman	62
4.2.4. Microscopía electrónica de barrido (sem) y microanálisis de rayos x con dispersión de energía (eds)	64
4.3 Adsorción de colorantes	67
4.4 Propiedades antimicrobianas: ensayo de contacto	71

5. Conclusiones y proyecciones	77
6. Bibliografía	79
7. Anexos	88
7.1. Figuras adicionales	88
7.2 Tablas adicionales	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Términos básicos de adsorción ²⁰	3
Figura 2. Formas de las isotermas de adsorción indicadas con la constante de Langmuir (K_L) ²³ .	4
Figura 3. Influencia de los parámetros sobre la isoterma Freundlich a) K_L y b) n^{20}	5
Figura 4. Concentraciones estimadas de bacterias coliformes fecales en las aguas de los ríos en África, América Latina y Asia (febrero 2008-2020) ¹	7
Figura 5. Una breve línea de tiempo de grafeno post-2004 que representa el número de publicaciones académicas relacionadas con este material ³⁴	8
Figura 6. Estructuras alótropas a partir de grafeno, de IZQ. a DER.: Fullerenos, CNT y Grafito ³⁶	9
Figura 7. Estructura propuesta de GO basada en el modelo de Lerf-Klinowski. Grupos hidroxilo y epóxido en rosado, funcionalidades de oxígeno en azul y dominios aromáticos en verde ⁷⁴ .	10
Figura 8. Esquema de la interacción entre GO y MB ⁹³	11
Figura 9. (A) Número de artículos o revisiones con las palabras óxido de grafeno y bacterias en el título o resumen (Scopus). (B) Número de artículos enfocados en GO en solución: (rojo) artículos que reportan efecto inhibitorio, y (verde) falta de efecto o mejora ¹⁰² .	13
Figura 10. A) Actividad antibacteriana de 85 [$\mu\text{g} / \text{mL}$] de nanoláminas de GO contra <i>E. coli</i> . B) TEM imágenes de <i>E. coli</i> expuestas a nanoláminas de GO ⁸⁵ .	14
Figura 11. Citotoxicidad de GOWNs y RGNWs y concentraciones de RNA en el PBS de las bacterias A) <i>E. coli</i> y B) <i>S. aureus</i> expuestas a las nanoparedes ¹⁰⁶	15
Figura 12. A) Medición de viabilidad celular de <i>E. coli</i> en contacto con grafito, óxido de grafito, GO y rGO B-C) Influencia del tiempo de incubación en la viabilidad celular para GO y rGO ⁸⁶	15
Figura 13. Fotografías TEM A) morfología inicial de <i>E. coli</i> (control y etapa 1) B) Mecanismo Tipo A y B ⁸⁹ .	16
Figura 14. A) CFU después de que las células de <i>E. coli</i> estuvieron en contacto con las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente. B) Foto SEM que muestra células <i>E. coli</i> comprometidas indicadas con una flecha naranja ⁸⁷ .	17
Figura 15. CFU de <i>E. coli</i> después de 3 [h] de exposición a 200 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] de GO en suspensión de diferentes áreas de la lámina, antes y después de la sonicación ⁸⁸ .	17
Figura 16. Espectros de Raman de <i>E. coli</i> tratados con GO, hay un incremento de la concentración de Adenina (729 [cm^{-1}]) y proteínas (S-S de vibración de estiramiento a 490 [cm^{-1}]) y de banda Amida VI a 610 [cm^{-1}]) en <i>E. coli</i> cuando a medida que aumenta la concentración de GO ⁹² .	18
Figura 17. Filtros de Polifluoruro de vinilideno recubiertos con 0, 25 y 75 [μg] de GO se inocularon con <i>E. coli</i> y se incubaron a 37 [$^{\circ}\text{C}$] durante 18 [h] ⁷¹ .	19
Figura 18. Imágenes TEM antes y después del contacto de la bacterias 100 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] de GO purificado con A-B) <i>E. coli</i> C-D) <i>S. aureus</i> . Las líneas en la imagen B) y C) muestran a las hojuelas de GO ¹⁰¹	19

Figura 19. Esquema de la disposición de GO en polvo (izq.) y papel (der.) ¹²²	20
Figura 20. A-B) Morfología del papel de GO C-D) Fotografía SEM de la sección transversal ¹¹⁸	21
Figura 21. A) Barro de GO siendo esparcido sobre una placa de teflón mediante el uso de una barra del mismo material B) Levantamiento del papel de GO C-D) Fotografías SEM de un papel de 2,9 [µm] de ancho que posee rugosidades y este siendo enrollado en forma de fibra, respectivamente ¹⁴⁹ .	22
Figura 22. A) Papel de GO (arriba) y r-GO (abajo) B) Fotografía SEM del Papel de GO (arriba) y r-GO (abajo) C) Fotografías digitales del papel de GO y rGO, que muestran sus flexibilidades ¹²⁹	22
Figura 23. Esquema de la unión entre el Papel de GO y MCl_2 ($M = Mg$ y Ca) ¹⁵⁰	23
Figura 24. Imágenes FESEM de la superficie de fractura del papel de GO y el de PVA/GO (20 [% p / p] de PVA)	24
Figura 25. Sección transversal del Papel de GO con A) 50 [%p/p] de DA y B) 5 [%p/p] de DA	25
Figura 26. A). Actividad antibacteriana del papel GO B) Imágenes SEM de <i>E. coli</i> unidas al papel GO ⁸⁵ .	26
Figura 27. Número de células de <i>E. coli</i> viables después de 3 [h] de contacto el papel de GO ⁸⁸ .	26
Figura 28. Pequeñas piezas de ~ 1 [cm ²] de filtro de PVDF (f), papel GO (g) y papel Ag-GO se inocularon con <i>E. coli</i> y se cultivaron durante 18 [h] a 37 [°C]. El crecimiento bacteriano fue cuantificado por qPCR en tiempo real ⁷¹ .	27
Figura 29. Estructura de la quitina y el quitosano ¹⁵⁴	27
Figura 30. Representación esquemática del nanocompuesto bien disperso de GO en CS ¹⁵⁶ .	28
Figura 31. Mecanismo propuesto para bloques de construcción híbridos GO-CS con contenido de bajo y alto de CS ⁸¹	29
Figura 32. Ausencia de halo de inhibición por el papel de CS contra (a) <i>E. coli</i> , (b) <i>S. aureus</i> y (c) <i>B. subtilis</i> ¹⁶⁴	32
Figura 33. Zona de inhibición de <i>E. coli</i> para (a) control (b) 2 [%] de CS-GO (c) 1 [%] de CS (d) 0,01 [%] de GO.	32
Figura 34. Actividad antibacteriana del óxido de hierro, GO, CS y MCGO contra la bacteria <i>E. coli</i> , a la misma concentración de 100 [µg / mL] a 37 [°C] ⁶ .	34
Figura 35. Balanzas A) Precisa modelo 100A-300M y B) Ohaus modelo TS400S.	37
Figura 36. Agitador magnético con calefacción.	37
Figura 37. Termómetro infrarrojo.	38
Figura 38. Centrifugas A) Hanil modelo Supra22k B) Eppendorf modelo 5804 R y C) Eppendorf modelo 5403.	38
Figura 39. Espectrofotómetros UV-Visible A) Rayleigh modelo UV-1601 y B) Dynamica modelo HALO RB-10.	39
Figura 40. Incubadora con agitador.	39

Figura 41. Horno de vacío.	40
Figura 42. Secador de pelo.	40
Figura 43. Agitadores A) 3D, Sunflower Mini-Shaker, B) MS 3 digital y	41
Figura 44. Diagrama de la Purificación 2 del GO	44
Figura 45. Método A: preparación de papel de GO	45
Figura 46. Método B: preparación de papel de GO y papel de GO/CS	46
Figura 47. Método C: preparación de papel de GO, GO/CS y CS	47
Figura 48. Diagrama del ensayo de contacto (Kill kinetic assay)	50
Figura 49. Método A: A) pequeños trozos de papel fabricados, B) papel fallido y C) barra de teflón	53
Figura 50. GO A) de color café claro/naranja de la síntesis antigua B) de color marrón producido por la metodología de síntesis nueva	54
Figura 51. Método B, A) Papel exitoso y B) Papel fallido quebrado	54
Figura 52. Papeles compuestos preparados mediante Método A, A) GO/CuCl ₂ , B) GO/CaCl ₂ , C-D) GO/CS cara CS y cara GO, E) GO/CS bañado con hidróxido de sodio	55
Figura 53. Método C, Morfología de los papeles A) y B) papel de GO, C) y D) papel de GO/CS y E) Papel de CS	56
Figura 54. Papeles preparados a partir de Método B: A-B) Formación de estrías C) Papel con estrías a contraluz D) Lámina de papel con estrías (marcadas en azul) que no presentaron ruptura E) Presencia de estrías en lámina fabricada mediante recubrimiento de placa de vidrio	57
Figura 55. Patrones de XRD Papel de GO, Polvo de Grafito, Polvo de GO y Papel de GO/CS	58
Figura 56. Espectro infrarrojo de transformada de Fourier de papel GO	61
Figura 57. A) Espectro de Raman para Papel de GO y Papel de GO/CS B) Ajuste con funciones Lorentzianas de los picos D y G del Papel de GO C) Ajuste con funciones Lorentzianas de los picos D y G del Papel de GO /CS	62
Figura 58. Fotografía SEM de A-B) sección transversal y superficie C-D) de Papel de GO, Papel de GO/CS, respectivamente.	64
Figura 59. Fotografías SEM/EDS y gráfico de composición atómica del papel híbrido, A) Cara cubierta con CS, B) Cara GO, C) y D) Sección transversal zona 1 y 2, respectivamente. El área examinada por el EDS se encuentra marcada en rojo.	65
Figura 60. A) Isotherma de adsorción, B) Linealización de isotermas de Langmuir y C) Linealización de isotermas de Freundlich. Para MB utilizando Papel de GO, Polvo de GO y Papel de GO/CS.	67
Figura 61. A) Papel de GO B) Papel de GO/CS, tras el ensayo de adsorción.	68
Figura 62. Unidad Formado de Colonia por mililitro [CFU/mL] de los materiales indicados para A) <i>Staphylococcus aureus</i> y B) <i>Escherichia coli</i> (*, †, ‡, § y ¶ representan diferencias significativas respecto al Control, Papel de GO,	

Polvo de GO, Papel de GO/CS y Papel de Quitosano, respectivamente para $p > 0,05$). Los datos se expresaron como la media \pm desviación estándar de los tres experimentos independientes. _____ 71

Figura 63. Placas sembradas con 1 $[\mu\text{L}]$ del contenido de los tubos de ensayo, de arriba hacia abajo: Control, Papel de GO, Polvo de GO, Papel de GO/CS y Papel de CS, para A) *Staphylococcus aureus* y B) *Escherichia coli*. 72

Figura 64. Tubos luego del ensayo de contacto, de derecha a izquierda: medio original, Control, Polvo de GO, Papel de GO, Papel de CS y Papel de GO/CS, para A) *Staphylococcus aureus* y B) *Escherichia coli*. _____ 72

Figura 65. Curva de calibración de azul de metileno _____ 88

Figura 66. Muestras y porta muestras de vidrio utilizados para realizar las mediciones de XRD. _____ 88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Coeficientes de isothermas de Langmuir y Freundlich de la adsorción de MB por medio de Papel de GO, Polvo de GO y Papel de GO/CS..... 67

Tabla 2. Porcentaje de reducción de colonias para cada material, los valores son la media +- desviación estándar de los tres experimentos independientes..... 71

Tabla 3. Masas y concentraciones de las muestras utilizadas en el ensayo de contacto, para S. aureus. En la muestra de papel la masa equivalente a la de un cuadrado de papel de $1 \cdot 1$ [cm²]. 89

Tabla 4. Masas y concentraciones de las muestras utilizadas en el ensayo de contacto, para E. coli. En la muestra de papel la masa equivalente a la de un cuadrado de papel de $1 \cdot 1$ [cm²]. 89

1 INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES GENERALES Y MOTIVACIÓN

Actualmente, la escasez de agua afecta a 4 de cada 10 personas en el mundo¹, y en el próximo siglo se espera que este número aumente². Esto es preocupante, porque todos los organismos requieren de agua para su supervivencia, además de ser un recurso fundamental en el desarrollo sostenible, económico, social y ambiental. Por otro lado, sólo 2,5 [%] del agua es dulce, y una parte aún menor es accesible debido a que esta se encuentra mayoritariamente en glaciares o subterráneamente³. Además, se extraen 3.928 [km³/año] de agua dulce, en que ~70 [%] de esta es utilizada en la agricultura y una parte más reducida es para consumo humano.

Actualmente se estima que 2,1 mil millones de personas no tiene accesos a servicios de agua potable seguros¹. Además, la calidad del tratamiento de aguas residuales industriales y municipales de los países está directamente correlacionada con su nivel de ingresos. Se estima que las naciones desarrolladas tratan el 70 [%], las de ingresos medios-altos el 38 [%], y los países de ingresos bajos, el valor sólo llega a un 8 [%]. Lo anterior provoca que las personas más pobres sean las más afectadas. A futuro el panorama no es alentador, ya que se espera que el consumo de agua se incremente en las próximas décadas por parte de la agricultura, la industria y la producción de energía, causando un efecto dominó en la cantidad de efluentes no tratados, aumentando así el riesgo de contaminar las reservas de agua superficiales y subterráneas, lo que provocará una mayor escasez de este recurso.

Considerando que la contaminación del agua va en crecimiento, el riesgo de escasez se ha transformado en una preocupación ambiental de carácter global^{4,5}, provocando la necesidad de elaborar nuevos materiales multifuncionales que puedan tratar los contaminantes del agua que provienen de diversos orígenes (orgánicos, microorganismos, iones de metales pesados, entre otros ^{4,6}), desde diversas industrias (como la metalúrgica, química, minera, entre otras) y asentamientos humanos. Además, es necesario que estos materiales representen una alternativa ecológica y rentable.

1.2 CONTAMINACIÓN DEL AGUA POR ORGÁNICOS

La contaminación acuática causada por contaminantes orgánicos ha aumentado en conjunto con el desarrollo de la industria química⁷, donde el tratamiento de corrientes de efluentes ha cobrado mayor importancia debido a que se cuenta con estudios que indican que estos sus componentes son cancerígenos, mutagénicos y tóxicos⁸⁻¹⁰. Esta clase de contaminantes se puede dividir en colorantes, nitroaromáticos y clorofenoles. Estos últimos se han catalogados como contaminantes prioritarios por su alta toxicidad, fuerte potencial de bioacumulación y resistencia a

biodegradabilidad¹¹. A pesar de esto, son ampliamente utilizados en la industria farmacéutica como herbicidas, colorantes y pesticidas^{2,11}.

Por otra parte, los nitroaromáticos son utilizados en industrias similares a los clorofenoles¹⁰, con efectos mutagénicos y cancerígenos¹¹.

Finalmente se encuentran los colorantes, en que los de origen azoicos son los más numerosos (por ejemplo el azul de metileno (MB) y naranja de metilo (MO)) cuentan con una estructura aromática y un grupo cromóforo ($-N = N -$), usualmente no son biodegradables, son resistentes a la agente oxidantes y la luz, además de ser difíciles de remover^{12,13}, lo que ha provocado que ciertos de ellos sean prohibidos en Europa¹⁴. Estos pigmentos son ampliamente utilizados en la industria textil, pinturas, papel, imprenta y plásticos, y poseen efectos similares a los de las otras categorías⁹. Cabe recalcar que el agua residual de las plantas textiles se ha catalogado como la que más contamina de todos los sectores industriales, ponderando la composición y volumen del efluente generado¹⁵. Esto debido a que esta industria consume ~ 10.000 [ton/año] donde cerca del 1 [%] de su consumo (100 [ton/año]) son descargados como corrientes de efluentes¹³. Algunos pigmentos en estas corrientes, con una concentración menor a 1 [mg/L] afecta seriamente la calidad del agua y la transparencia de lagos y ríos, lo que se traduce en un daño al medio acuático¹⁵. Por ese motivo, se han desarrollado muchas tecnologías para remover pigmentos, entre las que se destaca: adsorción, sedimentación, osmosis, procesamientos por membrana e intercambio iónico^{4,9}. La adsorción es un método muy utilizado para remover pigmentos debido a su bajo costo, alta eficiencia y facilidad de operación¹⁶, por lo que algunas investigaciones se han enfocado en la elaboración de nuevos materiales que tengan esa capacidad¹⁷.

1.2.1 ADSORCIÓN

Este proceso (cuyo inverso se llama desorción) es un fenómeno de superficie que consiste en la retención de un contaminante soluble (adsorbato) en la interfaz de dos fases, una sólida y otra fluida. La primera (adsorbente) cuenta con sitios activos y distintos niveles de energía, lo que le permite interactuar con el adsorbato que se encuentra diluido en la fase fluida¹⁸. Esto se presenta en la **Figura 1**. El fenómeno puede ser físico (fisisorción) o químico (quimisorción), donde el primero es el más común y es provocado por fuerzas de Van de Waals y puentes de hidrógeno, lo que le confiere un carácter de reversible^{4,13,19,20}. Por otra lado, la adsorción química posee interacciones más fuertes que involucran fuerzas de valencia, por lo que puede formar enlaces que lo transforman en un proceso irreversible^{13,19,20}.

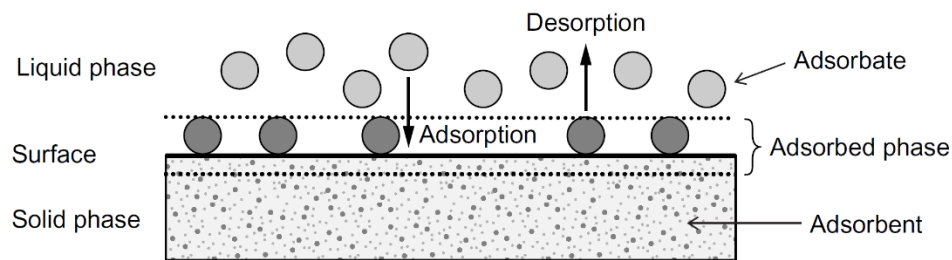


Figura 1. Términos básicos de adsorción²⁰

La cantidad de partículas que serán adsorbidas durante este proceso depende de las propiedades de ambas fases, ya sea el número de sitios activos, el área superficial del adsorbato, la concentración, temperatura o pH de la fase fluida o el estado de esta, que puede ser líquido o gaseoso²⁰. Con el fin de normalizar, poder cuantificar y entender el mecanismo de adsorción del colorante en el adsorbato²¹, se han elaborados modelos que describen este fenómeno, entre los que se describirán el de Langmuir y Freundlich, ambos isothermas de dos parámetros²⁰.

1.2.1.1 Isotherma de Langmuir

Este modelo explica el patrón de adsorción en los sitios activos homogéneos dentro del adsorbente por medio de tres supuestos²²:

- 1) La adsorción se lleva a cabo cuando las moléculas de adsorbato forman una monocapa saturada que posee el espesor de la molécula en la superficie del adsorbente.
- 2) Todos los sitios activos poseen igual energía y entalpía.
- 3) No existe interacción entre las moléculas del contaminante soluble tras ser adsorbidas.

El modelo puede ser expresado como^{20,22}:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_m \cdot K_L} + \left(\frac{1}{q_m}\right) \cdot C_e \quad (1)$$

Donde $C_e \left[\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right]$ es la concentración en el equilibrio, $K_L \left[\frac{\text{L}}{\text{mg}}\right]$ es la constante de Langmuir, recíproca de la concentración y relacionada con la energía de adsorción (entalpía de adsorción, que cambia en función de la temperatura), q_e y $q_m \left[\frac{\text{mg}}{\text{g}}\right]$ son la capacidad de adsorción en el equilibrio y la máxima, respectivamente. Esta última capacidad se considerada como el parámetro más importante para contrastar la adsorción de un adsorbato en dos adsorbentes

distintos. Por otro lado, sobre el segundo también se ha utilizado para mostrar el tipo de isoterma: desfavorable ($K_L < 0$), lineal ($K_L = 0$) y favorable ($K_L > 0$)^{20,23}, como se ve en la **Figura 2**. En que en este último caso se destaca que a medida que la constante aumenta y la capacidad máxima de adsorción se mantiene constante, esta última se alcanza a una concentración de equilibrio inferior debido a una mayor afinidad entre los componentes del fenómeno. En esa figura también se presenta el parámetro de equilibrio de Langmuir o factor de separación (R_L), constante adimensional que se relaciona con K_L y la concentración inicial de adsorbato. Debido a esto, al igual que la constante de Langmuir, se puede utilizar caracterizar la favorabilidad del proceso de adsorción²³.

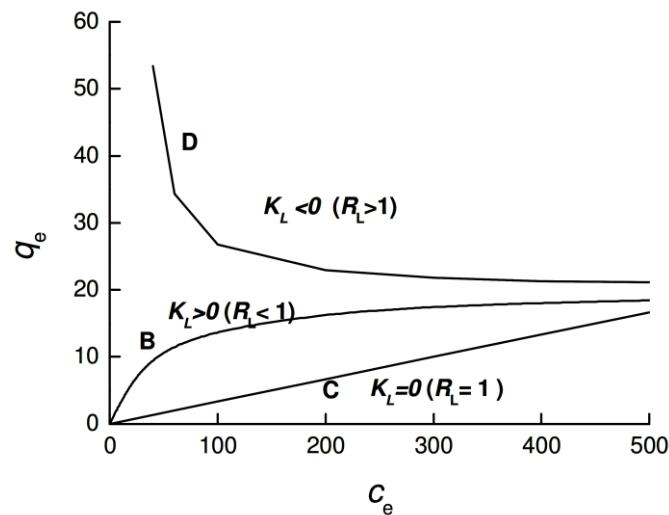


Figura 2. Formas de las isothermas de adsorción indicadas con la constante de Langmuir (K_L)²³.

La **ecuación 1** se puede expresar como una recta: $C_e/q_e = a \cdot C_e + b$, y con lo que se puede calcular q_m y K_L mediante las siguientes ecuaciones:

$$q_m = \frac{1}{a} \left[\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right] \quad (2)$$

$$K_L = \frac{a}{b} \left[\frac{\text{L}}{\text{mg}} \right] \quad (3)$$

Se destaca que, debido a la naturaleza de las suposiciones realizadas por este modelo, existen casos en que este no es adecuado para describir los datos de isothermas experimentales asociados a

soluciones acuosas. A pesar de esto, también se han encontrado escenarios en que el Langmuir se ha ajustado aunque los supuestos de la ecuación claramente no se cumplían²⁰.

1.2.1.2 Isoterma de Freundlich

Este modelo tiene un enfoque basado en una ecuación empírica, que supone que la adsorción ocurre en una superficie heterogénea que contiene sitios de adsorción que poseen diferentes energías y que sigue fenómenos en multicapas^{20,22}. Se ha señalado que esta ecuación está formada por una composición de isotermas de Langmuir con diferentes valores de K_L que representan sectores de sitios de adsorción que cuentan con distintas energías²⁰. Se considera que el modelo de Freundlich tiene un mal desempeño para concentraciones bajas y cuando ocurre el efecto de saturación a concentraciones muy alta, pero que se ajusta correctamente en concentraciones medias^{20,22}. Este modelo es ampliamente utilizado para caracterizar los procesos de adsorción de tratamiento de agua²⁰.

La ecuación de Freundlich puede ser expresada como²⁹:

$$\ln(q_e) = \ln(K_F) + \frac{1}{n} \cdot \ln(C_e) \quad (4)$$

Donde K_F $[(\text{mg/g}) \cdot (\text{L/mg})^{1/n}]$ y n $[-]$ son constantes de Freundlich que indican la capacidad de adsorción y los factores de intensidad asociados a la heterogeneidad de la superficie del adsorbente, respectivamente. En la **Figura 3** se observa la influencia de estos parámetros sobre la isoterma. A medida que aumenta el primero, mayor cantidad de adsorbente puede ser adsorbido. Por otro lado, cuando el segundo decrece, más cóncava (respecto a la concentración) es la isoterma. Si $1/n$ se encuentra entre 0,1 a 0,5, se considera que la adsorción es muy favorable y entre 0,5 a 1,0 significa que sigue siendo favorable pero tiene algunos problemas en la adsorción, para valores superiores 1,0 denota que este fenómeno se torna desfavorable^{20,21,24}.

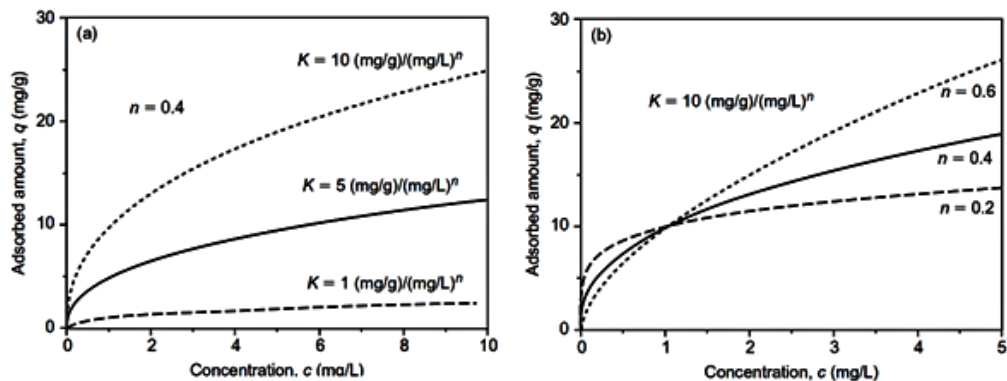


Figura 3. Influencia de los parámetros sobre la isoterma Freundlich a) K_L y b) n ²⁰

Al expresar la **ecuación 4** en la forma de una recta: $\ln(q_e) = a \cdot \ln(C_e) + b$, es posible determinar $1/n$ y K_F por medio las siguientes fórmulas:

$$\frac{1}{n} = a [-] \quad (5)$$

$$K_F = \exp(b) \left[\left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) \cdot \left(\frac{\text{L}}{\text{mg}} \right)^{\frac{1}{n}} \right] \quad (6)$$

1.3 CONTAMINACIÓN MICROBIANA DEL AGUA

La contaminación de origen microbiano del agua potable provocada por patógenos (hongos, virus, helmintos, protozoos y bacterias) transmitidos por este medio contribuye a brotes de enfermedades en países desarrollados y en vías de desarrollo^{25,26} provocando más de 3 millones de muertes e innumerables casos de enfermedades cada año²⁷. Además, se estima que 340.000 niños menores de 5 años mueren todos los años debido a padecimientos diarreicos²⁸.

Como indicador de la existencia de cualquier patógeno potencial en las aguas superficiales se utiliza la presencia de coliformes fecales provenientes de las fecas de animales y humanos. Se sabe que la contaminación grave causada por estos microorganismos afecta a 1 de cada 3 tramos fluviales en África, Asia y América Latina (ver **Figura 4**).

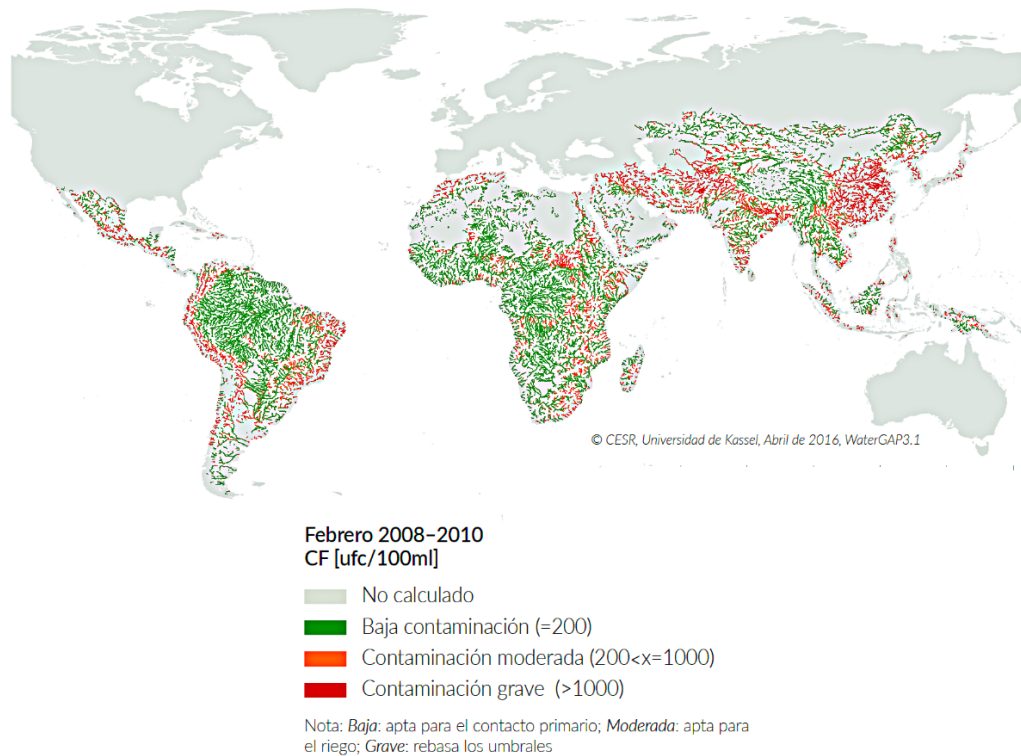


Figura 4. Concentraciones estimadas de bacterias coliformes fecales en las aguas de los ríos en África, América Latina y Asia (febrero 2008-2020)¹

Debido a lo anterior, con el fin de proteger a la población de estos patógenos, se han instaurado métodos para control microbiano y de desinfección del agua^{27,29}. Entre ellos se encuentran los tratamientos térmicos (calentamiento), ultravioleta (UV) y químicos (ozonación y cloración), estos últimos son los más utilizados debido a que poseen un bajo costo y una alta efectividad²⁷, sin embargo, los desinfectantes químicos pueden reaccionar con diversos componentes del agua, lo que lleva a la formación de subproductos de la desinfección (DBPs) que en muchos casos son cancerígenos^{27,29,30}.

Adicionalmente, algunos de estos patógenos son resistentes a los desinfectantes comunes, por lo que se requieren de dosis extremadamente altas provocando una mayor formación de DBPs²⁹. Por ese motivo, en los últimos años la tecnología de membrana se ha preferido por sobre otros tratamientos de agua como la desinfección, destilación o filtración de medios, debido a que no necesita de aditivos adicionales, entradas térmica y requerimientos de regeneración del medio utilizado^{31,32}. Estas membranas son comercializadas desde hace años para varios usos en tratamientos de agua, entre los que se incluye la remoción bacteriana³¹.

1.4 GRAFENO

Desde que por primera vez en el año 2004 el grafeno fuese separado y caracterizado mediante el método de la cinta de scotch de Geim y Novoselov, y que posteriormente se les entregase el Premio Nobel de Física en el 2010 a esos investigadores por su trabajo pionero sobre cristales atómicos en 2D, la investigación del grafeno ha crecido rápidamente para aplicaciones en la academia y en lo industrial debido a las propiedades excepcionales que posee³³⁻³⁵ (Ver **Figura 5**).

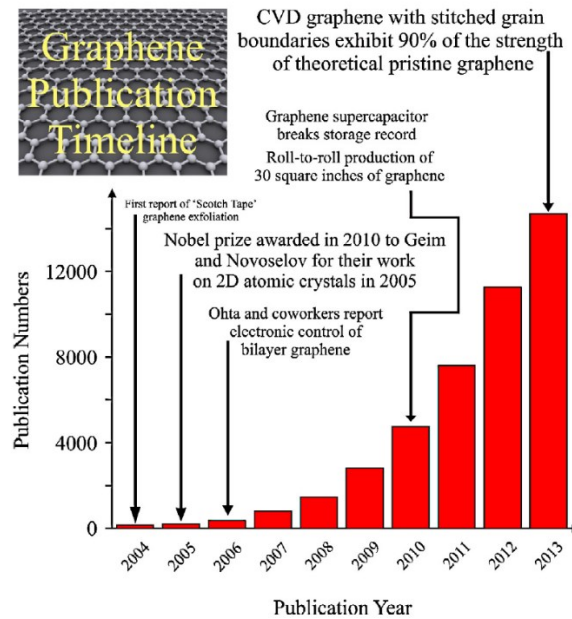


Figura 5. Una breve línea de tiempo de grafeno post-2004 que representa el número de publicaciones académicas relacionadas con este material³⁴

El grafeno es la unidad básica estructural de algunas alotropías del carbono, entre las que se incluye el grafito, nanotubos de carbonos (CNT) y fullerenos³⁶ (Ver **Figura 6**). Físicamente, es una lámina plana en 2D con forma de panal de abejas, que se beneficia de su red de hibridación pura sp^2 que la beneficia con el módulo elástico más elevado 1 [TPa]^{37} , una altísima conductividad térmica $5,1 \cdot 10^3 \text{ [W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}]^{38}$ y la conductividad eléctrica intrínseca más alta conocida de $6 \cdot 10^5 \text{ [S} \cdot \text{m}^{-1}]^{39}$. Otras propiedades interesantes son el espesor de sus láminas de $0,34 \text{ [nm]}$ (lo que lo convierte en el nanorelleno 2D más delgado a la fecha⁴⁰) y que su elevada área superficial^{41,42}.

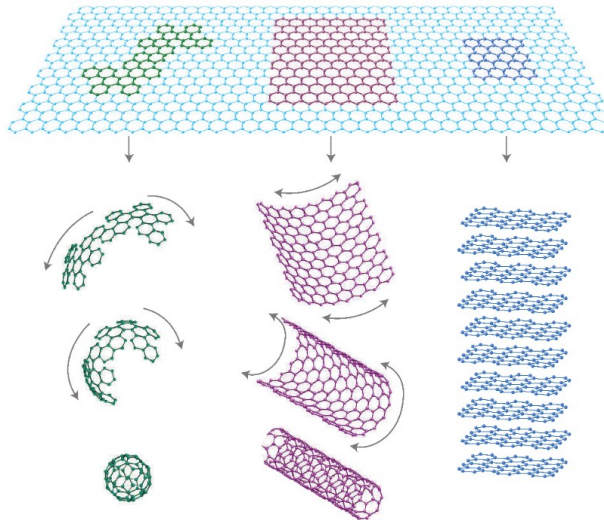


Figura 6. Estructuras alótropas a partir de grafeno, de IZQ. a DER.: Fullerenos, CNT y Grafito³⁶

El grafeno prístino se suele obtener a partir de exfoliación mecánica del grafito o por medio de síntesis por deposición química en fase vapor⁴⁰. El problema es que ambos métodos tienen como resultado estructuras defectuosas y heterogéneas, además de que el consumo de energía y tiempo requerido para su fabricación son altos, lo que dificulta una producción en masa de grafeno. Debido a lo anterior, se sintetizan derivados del grafeno que conservan algunas de las propiedades de este y además superan ciertas deficiencias, por ejemplo la de los volúmenes de producción^{42,43}. Algunos de estos derivados son: fluorografeno, óxido de grafeno y óxido de grafeno reducido⁴⁴. Entre las aplicaciones de los materiales de grafeno y sus varios derivados está el refuerzo de propiedades mecánicas, eléctricas, térmicas y químicas de materiales poliméricos⁴⁵⁻⁵²

1.5 ÓXIDO DE GRAFENO

Un derivado de grafeno es su forma oxidada (GO), que tiene una alta dispersabilidad y procesabilidad en medio acuoso⁵³⁻⁵⁵. Se produce desde escamas minerales de grafito por medio de métodos de oxidación química los cuales utilizan reactivos distintos: Brodie⁵⁶, Staundemaier⁵⁷ o Hummers⁵⁸ y las posteriores modificaciones del método de Hummers han sido utilizadas en diversos trabajos^{6,30,59-63,63-70}. Los primeros dos métodos utilizan una mezcla de ácido nítrico (HNO_3) y cloruro de potasio (KClO_3), por otro lado, el método de Hummers oxida al grafito por medio de una combinación de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y permanganato de potasio (KMnO_4). Las variaciones de este último método son las más ampliamente utilizadas⁷¹ debido a que son menos tóxicas que los dos primeros métodos⁷ y porque permiten obtener grafeno con cantidades significativas de grupos epoxi e hidroxilo en ambos lados del plano basal de carbono y carboxilo alrededor de los bordes^{35,72}. Estos grupos permiten exfoliar de manera más fácil el GO a

monoláminas por medio de agitación o sonicación y además le proporcionan propiedades hidrofílicas^{67,71,73}. Eso sí, es importante señalar que debido a la alta variación de parámetros que poseen estas modificaciones entre sí (como ejemplo: proporción entre grafito y permanganato de potasio⁷³, tipo de ácido⁵⁹, temperatura y tiempo de reacción⁴³), además de factores como la fuente del grafito⁶⁷ da como resultado que se produzcan óxidos de grafeno con distintas características, al igual que con los otros métodos de exfoliación antes mencionados³⁵. Debido a esto último, es que actualmente no existe un modelo estructural del GO que tenga apoyo unánime. A pesar de lo anterior, el modelo de Lerf-Klinowski (Ver **Figura 7**) es el más aceptado y señala que este material posee dos regiones: una con átomos de carbono altamente oxigenados en que predomina la hibridación sp^3 y otra con átomos de carbono levemente funcionalizado con hibridación $sp^{2.35}$.

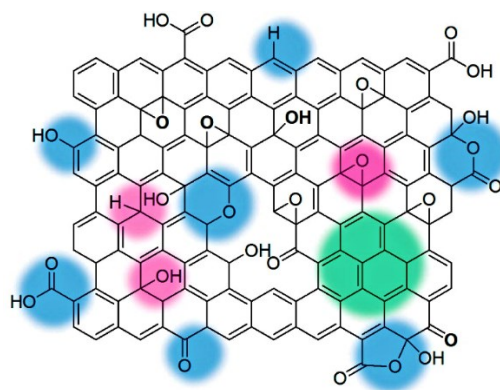


Figura 7. Estructura propuesta de GO basada en el modelo de Lerf-Klinowski. Grupos hidroxilo y epóxido en rosado, funcionalidades de oxígeno en azul y dominios aromáticos en verde⁷⁴.

La proporción usual de carbono y oxígeno en el GO es cercana a 2:1, donde el 60 – 70 [%] de la superficie está cubierta por regiones oxidadas y los defectos puntuales están presentes en toda la estructura, lo que refleja un proceso de oxidación intenso y altamente localizado⁷⁵⁻⁷⁸. Visualmente, la mayor cantidad de grupos funcionales de oxígeno se traduce en un cambio de color de un café oscuro a uno más claro⁷³. Por otro lado, el espesor teórico es de $2\theta = 0,7 - 0,8$ [nm] - casi el doble del grafeno prístino debido a la presencia de los grupos funcionales⁷⁵ y el espesor real puede ser levemente más elevado debido a la presencia de contaminantes superficiales, adsorbatos orgánicos, rugosidad de sustrato subyacente, o presencia ocasional de funcionalidades más voluminosas^{49,75}. A pesar de no poseer las propiedades eléctricas del grafeno y de tener un rendimiento mecánico inferior, sigue exhibiendo un alto potencial en diversas aplicaciones debido a sus propiedades mecánicas, alta flexibilidad, alto potencial de adherencia y relaciones de aspecto extremadamente altas. El módulo elástico de una lámina de GO es tan alto como 250 [GPa] a pesar de la alta concentración de defectos locales^{79,80} y se combina con una alta flexibilidad lateral. El GO se carga negativamente en condiciones levemente ácidas y básicas debido a la acción de los grupos carboxilos, lo que sumado a su elevada área superficial, le

proporciona buenas propiedades para ser aplicado en la adsorción de pigmentos⁸¹, lo que será explicado con mayor profundidad en la **Sección 1.5.1**. Además, estudios preliminares han demostrado que la biocompatibilidad del GO es buena en varios casos^{82,83}, pero aún se requiere investigar más a fondo con el fin de discriminar la citotoxicidad y la acumulación metabólica para posibles aplicaciones biomédicas⁸⁴. También se destacan algunos estudios sugieren que el GO posee propiedades antimicrobianas⁸⁵⁻⁹², debido a una acción sinérgica de mecanismos químicos y físicos de las láminas, que serán mencionadas más extensamente en la **Sección 1.5.2 y 1.5.3.2**.

1.5.1 ÓXIDO DE GRAFENO PARA ADSORCIÓN DE PIGMENTOS

Como se mencionó anteriormente, el área superficial del GO es elevada y asciende a 2.630 [m²/g], lo que en conjunto con la alta cantidad de grupos funciones y su capacidad de cargarse de forma negativa en condiciones ligeramente ácidas (debido a la acción de grupos carboxilo) le proporcionan a este material un gran número de sitios activos, lo que posibilita aplicaciones en la remoción de pigmentos orgánicos^{6,81}. Se ha utilizado en esta área por sí sólo o formando parte de compuestos, demostrando su capacidad de remover distintos tipos de pigmentos que tienen cargas y estructuras diferentes. Algunos de estos trabajos se mencionan a continuación.

Zhang et al. en el año 2011 adsorbieron azul de metileno en solución acuosa en GO⁹³. Los datos se adecuaron a la isoterma de Langmuir, obteniéndose una adsorción máxima de 1,939 [mg/mg] y una constante de equilibrio de adsorción de 18,486 [mL/mg]. Estos resultados se vincularon a la atracción electrostática favorable entre estos materiales, debido a la carga positiva del MB y la negativa de la superficie de GO, cuyo esquema de interacción se puede ver en la **Figura 8**.

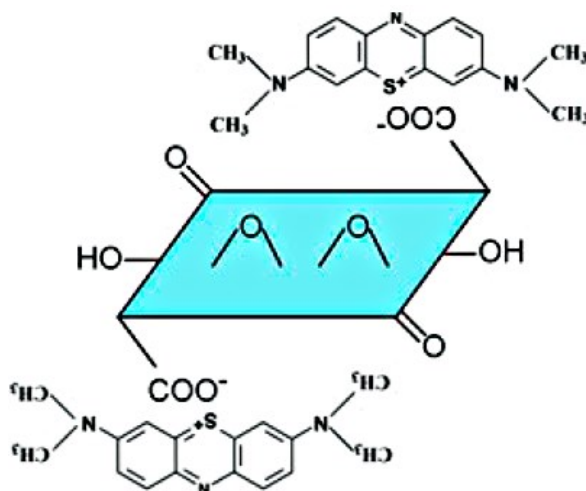


Figura 8. Esquema de la interacción entre GO y MB⁹³

También en el año 2011, Ramesha et al. estudiaron la adsorción de GO y rGO en MB, violeta de metileno (MV, catiónico), rodamina B (aniónico) y naranja G (aniónico) en solución acuosa⁹⁴. Se comprobó que la alta densidad negativa en la solución facilitó la adsorción de colorantes con carga positiva en el GO (llegando a un 95 [%] de eficiencia) y la de pigmentos aniónicos se consideró insignificante. Los datos de adsorción de MB y MV en GO se ajustaron a la ecuación de Langmuir y los valores de q_m fueron 17,3 y 2,47 [mg/g], correspondientemente.

Nuevamente en el año 2011, Bradder et al. probaron la adsorción de GO sobre los colorantes catiónicos MB y verde malaquita (MG)⁹⁵, ambos catiónicos. Para estos dos pigmentos los datos se ajustaron a la ecuación de Langmuir, cuyas q_m fueron de 351,1 y 248,1 [mg/g] para el MB y el MG, respectivamente. Estos valores son más altos que los obtenidos mediante el uso de carbón activado, que fueron de 189 [mg/g] para MB en el trabajo de Wang et al. en el 2005⁹⁶ y de 222 [mg/g] para MG obtenido por Malik en el 2007⁹⁷.

Robati et al. en el año 2016 utilizaron GO para adsorber rojo 12 (BR 12) y naranja de metilo (MO) desde una fase acuosa⁹⁸. Los valores se ajustaron al modelo de Langmuir para ambos pigmentos, obteniéndose capacidades máximas de adsorción de 63,69 y 16,83 [mg/g], respectivamente. La menor capacidad en el segundo colorante se asoció su naturaleza aniónica, la cual genera repulsión con la superficie del GO.

Konicki et al. en el 2017 estudiaron la adsorción de GO sobre los colorantes azoicos aniónicos Acid Orange 8 (AO8) y Direct Red 23 (DR23) desde soluciones acuosas⁹⁹. Los valores concordaron con el Modelo de Langmuir donde se obtuvieron las capacidades máximas de adsorción de 29,0 y 15,3 [mg/g] para el AO8 y DR23. Los resultados para K_L fueron: 0,139 y 0,201 [L/mg]. La justificación de estos valores radica en que tanto el colorante y el GO a pH bajo son de carácter aniónico, lo que genera repulsión que resulta en una inhibición de la adsorción. A pesar de eso, estas sustancias se interrelacionan debido a la capacidad del GO para interactuar con moléculas orgánicas a través de puentes de hidrógeno y enlaces $\pi - \pi$, y cuando disminuye el pH ocurre una protonación de los grupos carboxilo e hidroxilo, que permite que el colorante se una en esos sectores.

Nuevamente Konicki et al. en el año 2017 utilizó GO para adsorber los colorantes catiónicos Basic Yellow 28 (BY28) y Basic Red 46 (BR46)⁹⁹. Los datos de equilibrio fueron correctamente ajustados por el modelo de isoterma de Langmuir, obteniéndose las capacidades máximas de adsorción de 68,5 y 76,9 [mg/g], correspondientemente. Por otro lado, la constante de Langmuir fue 0,136 y 0,070 [L/mg], respectivamente.

Elsagh et al. en el año 2017 utilizaron nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT) y funcionalizados con grupos carboxilato (SWCNT-COOH), grafeno y GO como adsorbente para la eliminación del pigmento catiónico Basic Red 46 (BR 46), en solución acuosa¹⁰⁰. La adsorción de este colorante se ajusta al modelo de Langmuir y las capacidades máximas fueron: 38,35,

49,45, 30,52 y 55,57 [mg/g], respectivamente. Por otro lado, los valores de K_L determinados fueron: 1,71, 1,57, 2,24 y 1,25 [L/mg].

La ausencia de publicaciones sobre papeles, membranas o films de GO para aplicaciones en el área de adsorción de pigmentos se pueda relacionar con la pérdida del área superficial asociada al ensamblaje en esa forma. Debido a que el GO en forma de polvo posee una mayor área de contacto, lo que implica una mayor cantidad de sitios activos para realizar la remoción de los colorantes.

1.5.2 ÓXIDO DE GRAFENO PARA APLICACIONES ANTIMICROBIANAS

La pared bacteriana cumple la función de formar una barrera que protege a la bacteria del medioambiente y de mantener su morfología. Debido a esto, ha sido uno de los objetivos de estudio para examinar las propiedades antibacterianas de diversos materiales, entre los que se encuentra el óxido de grafeno, que se ha indicado que posee propiedades antimicrobianas^{85-92,101-106}.

Los reportes sobre esta propiedad del GO son disímiles, debido a que hay publicaciones donde se asegura esta capacidad, otras en que se menciona que el GO no posee dichas propiedades^{101,102,107}, e incluso hay publicaciones donde se afirma que este material potencia la actividad microbiana^{74,102}, como se puede observar en **Figura 9**.

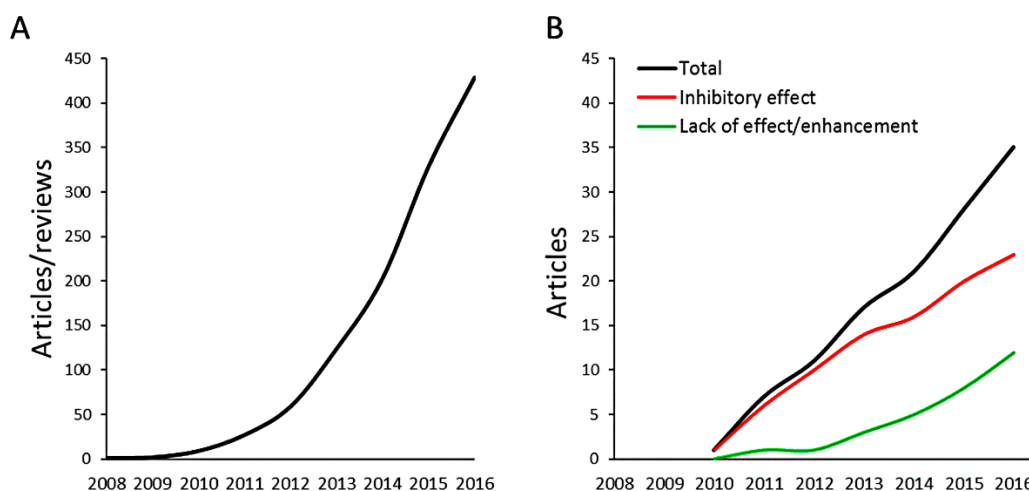


Figura 9. (A) Número de artículos o revisiones con las palabras óxido de grafeno y bacterias en el título o resumen (Scopus). (B) Número de artículos enfocados en GO en solución: (rojo) artículos que reportan efecto inhibitorio, y (verde) falta de efecto o mejora¹⁰².

Dentro de las publicaciones que avalan la capacidad antimicrobiana del GO se explican diversos mecanismos de acción, de naturaleza química y física, que actúan de forma sinérgica. Estos son

los bordes afilados del GO que interfieren con la actividad fisiológica de la bacteria, el estrés oxidativo provocado por las especies de oxígeno reactivas y la peroxidación de lípidos, entre otros mecanismos. Algunas de estos trabajos se presentan a continuación.

Hu et al. en el año 2010 reportaron las nanoláminas en suspensión de GO pueden inhibir el crecimiento de *E. coli* y que poseen una mínima citotoxicidad (Ver **Figura 10**)⁸⁵. Para esto se incubó durante 2 [h] esta bacteria con concentraciones de 20 y 85 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] de nanoláminas de GO en suspensión, lo que disminuyó la actividad metabólica de la célula en ~ 70 y ~ 13 [%], respectivamente. Además, por medio de un método de conteo de colonias se midió la viabilidad antimicrobiana de una suspensión con esta misma última concentración, también por 2 [h]. Esto tuvo como resultado una pérdida de viabilidad de *E. coli* que ascendió a 98,5 [%]. Estas últimas muestras fueron analizadas mediante fotografías tomadas por un microscopio electrónico de transmisión (TEM) con lo que se comprobó que la membrana celular fue severamente destruida y que el citoplasma fluyó hacia afuera. Este daño irreversible se asoció al estrés oxidativo o disrupción física que se había observado anteriormente en otros nanomateriales relacionados con el carbón: nanotubos de carbono y fullereno^{24,108–113}. Además, fabricaron un papel de GO y rGO por filtración al vacío,

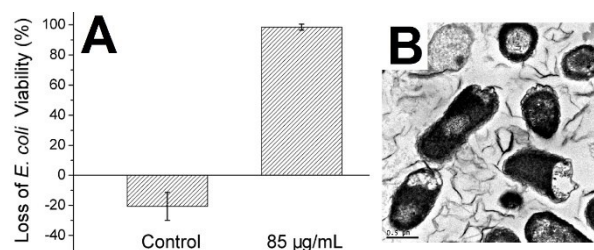


Figura 10. A) Actividad antibacteriana de 85 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] de nanoláminas de GO contra *E. coli*. B) TEM imágenes de *E. coli* expuestas a nanoláminas de GO⁸⁵.

También en el año 2010, Akhavan y Ghaderi estudiaron la toxicidad bacteriana de nanoláminas de GO y rGO depositadas en forma de nanoparedes (GONWs y RGNWs) en sustratos de acero inoxidable, las que fueron obtenidas por deposición electroforética de nanoláminas de GO – Mg^{+2} ¹⁰⁶. Se midió el efluente de RNA de las bacterias Gram-negativo (*E. coli*) y Gram-positivo (*Staphylococcus aureus*), las que fueron significativamente mayores en comparación al control y se encontró que el daño de la membrana había ocurrido por los bordes afilados de las nanoparedes, lo que tuvo como consecuencia la inactivación bacteriana. Las bacterias Gram-positivo fueron menos resistentes al daño de la membrana, lo que se asoció a que estas no poseen membrana externa (Ver **Figura 11**). Adicionalmente, se planteó que las nanoparedes de GO reducidas en hidracina fueron más tóxicas a las bacterias que sus contrapartes no reducidas, lo que fue justificado por una mejor transferencia de carga entre las bacterias y los bordes más afilados.

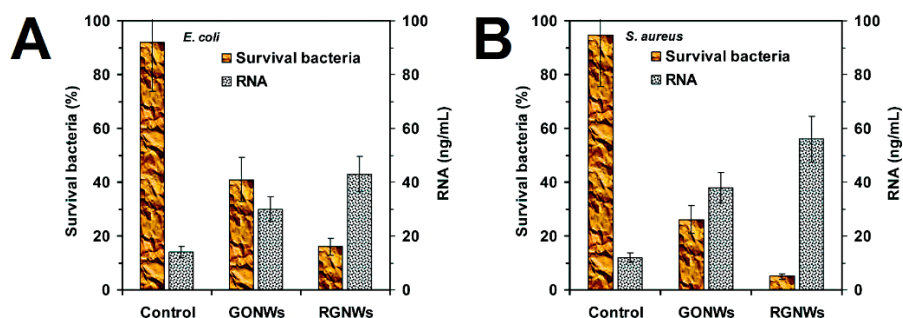


Figura 11. Citotoxicidad de GONWs y RGNWs y concentraciones de RNA en el PBS de las bacterias A) *E. coli* y B) *S. aureus* expuestas a las nanoparedes¹⁰⁶

Akhavan et al. en el año 2011 mostraron que las nanoláminas de GO podían atrapar a *E. coli* suspendida en una solución melatonina¹¹⁴. Este efecto era más pronunciado a medida que el GO poseía más grupos funcionales. Las bacterias retenidas eran inactivadas, lo que les impedía proliferar debido a su incapacidad de acceder a la glucosa presente en el medio. Tras sonicar la solución pudieron remover las bacterias de las láminas, y se probó que estas se podían reactivar, lo que fue medido por la disminución de glucosa y por la proliferación de estas. Con lo anterior, se comprobó que estas podían sobrevivir por lo menos durante 24 [h] encapsuladas por el GO.

Nuevamente en el año 2011, Liu et al. buscaron entender de forma más profunda el mecanismo antimicrobiano del GO disperso en agua, por medio de una comparación de la actividad antibacteriana en *E. coli* por parte de grafito, óxido de grafito, GO y rGO (Ver **Figura 12**)⁸⁶. En condiciones similares, el GO mostró la más alta actividad antimicrobiana y a medida que se aumentan las concentraciones y el tiempo de incubación, mayor era la pérdida de viabilidad de las bacterias. Los resultados sugirieron que la acción antimicrobiana está contribuida por el daño que provoca el contacto directo de las nanoláminas de GO con la membrana celular (comprobado mediante SEM) y por estrés oxidativo, ya que los cuatro tipos de materiales pueden oxidar el glutatión, que sirve de mediador del estado REDOX en bacterias. Debido a la anterior, se propuso un mecanismo antimicrobiano de tres pasos en que inicialmente las bacterias se depositan en las nanoláminas, luego ocurre un estrés en la membrana por el contacto directo con los bordes afilados y finalmente sucede una oxidación independiente del anión superóxido.

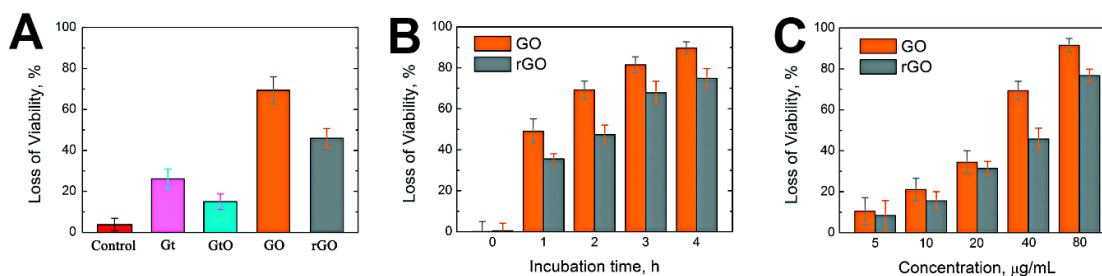


Figura 12. A) Medición de viabilidad celular de *E. coli* en contacto con grafito, óxido de grafito, GO y rGO B-C) Influencia del tiempo de incubación en la viabilidad celular para GO y rGO⁸⁶

Tu et al. en el año 2013 reportaron que las nanoláminas de GO degradan las membranas externas e internas de *E. coli* y reducen su viabilidad⁸⁹. Esto lo realizan por medio de una penetración en la membrana (mecanismo Tipo A) y una extracción de una gran cantidad de fosfolípidos desde esta, producto de interacciones de dispersión fuerte entre GO y moléculas de lípidos (Tipo B), facilitada por estructura 2D e hibridación sp^2 de los carbonos. Esto fue estudiado mediante una aproximación teórica (mediante una simulación computacional) y de forma experimental, mediante fotografías TEM (Ver **Figura 13**). Estas últimas permitieron validar el modelo teórico y permitieron identificar tres etapas durante la incubación de 2,5 [h] de *E. coli*. En la primera, las bacterias no sufren los efectos de las láminas de GO por un periodo corto al inicio y a bajas concentraciones, en la segunda etapa las membranas son parcialmente dañadas (pero no cortadas completamente) y muestran una menor superficie de fosfolípidos. En la tercera, las células pierden su integridad celular, debido a un daño severo en las membranas y a la pérdida de citoplasma. Adicionalmente, reportaron que un aumento en el tamaño lateral del GO y de concentración se traduce en una mayor actividad antibacteriana. Finalmente, plantean la posibilidad de extender estos mecanismos a otros tipos de bacterias.

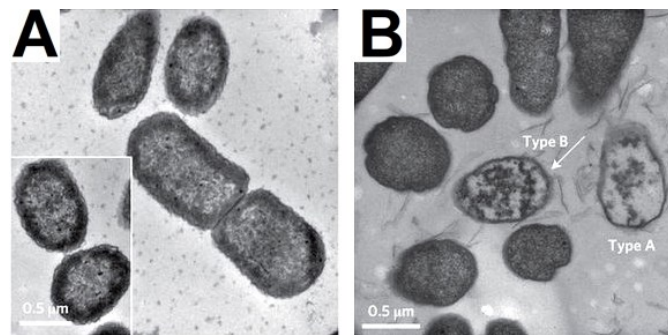


Figura 13. Fotografías TEM A) morfología inicial de *E. coli* (control y etapa 1) B) Mecanismo Tipo A y B⁸⁹.

Perreault et al. en el año 2014 le confirieron propiedades antibacterianas a una membrana delgada de poliamida por medio de una funcionalización irreversible con el GO (Ver **Figura 14**)⁸⁷. Esto ocurre por una amidación entre los grupos carboxilo del GO y los del mismo tipo presentes de la capa activa de poliamida. Al contactar directamente *E. coli* con la superficie de la membrana durante 1 [h] a temperatura ambiente, ocurrió un 64,5 [%] de inactivación bacteriana, lo que se asoció al daño de la membrana por factores físicos (que fue confirmado por SEM), transferencia y formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y por extracción de lípidos. El efecto bactericida proporcionado no tiene un resultado perjudicial para las propiedades intrínsecas de transporte de la membrana (permeabilidad al agua pura o sal, por ejemplo).

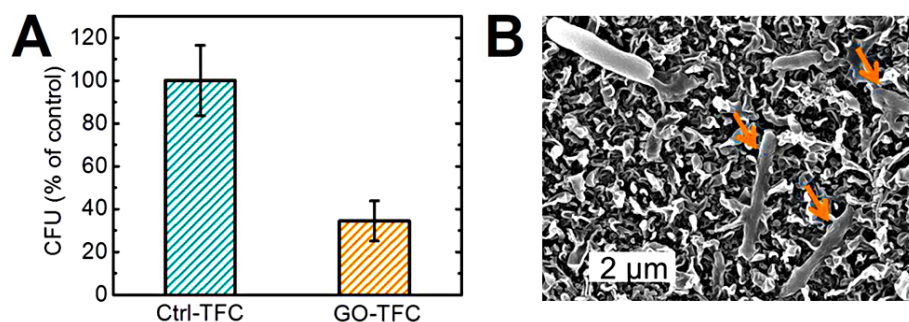


Figura 14. A) CFU después de que las células de *E. coli* estuvieron en contacto con las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente. B) Foto SEM que muestra células *E. coli* comprometidas indicadas con una flecha naranja⁸⁷.

Perreault et al. en el año 2015 investigaron la dependencia del tamaño de las láminas de GO con las propiedades antimicrobianas de esta sobre *E. coli* y las diferencias en el mecanismo de acción entre el GO en suspensión y en forma de papel fabricado por filtración al vacío (Ver **Figura 15**)⁸⁸. Por este motivo se sintetizó GO con nanoláminas de tamaño promedio 0,65 [μm^2] las que por medio de sonicación se disminuyeron de tamaño, formando un rango de muestras con valores hasta 0,01 [μm^2]. Cuando el GO se encuentra en suspensión a medida que disminuye el tamaño de las nanoláminas decrece la actividad antimicrobiana (se logró total inactivación con las de 0,65 [μm^2] en 3 [h]), lo que fue explicado debido a que en suspensión el mecanismo primario de acción es el de encapsulamiento, anteriormente reportado por Akhavan et al.¹¹⁴. También se comprobó que este mecanismo es reversible, tras recobrar las bacterias mediante sonicación.

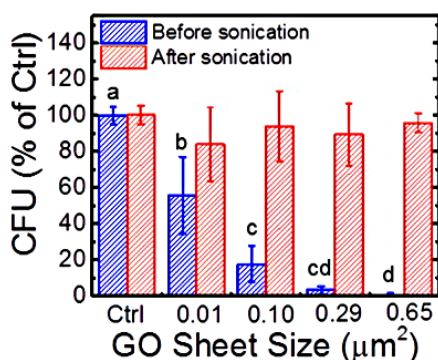


Figura 15. CFU de *E. coli* después de 3 [h] de exposición a 200 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] de GO en suspensión de diferentes áreas de la lámina, antes y después de la sonicación⁸⁸.

En el año 2016 Nanda et al. desarrollaron un enfoque para el estudio del mecanismo antibacteriano del GO a través espectroscopía de Raman⁹². Para esto, se obtuvieron espectros de biomoléculas (proteínas y adenina) de los cultivos bacterianos de *E. coli* y *E. faecalis* (Gram-positivo) en presencia de distintas concentraciones de GO. Observaron los picos de Raman más alto asociados a las biomoléculas en los cultivos en presencia de GO (Ver **Figura 16**), lo que fue

correlacionado con la muerte inducida debido a una degradación externa e interna de la membrana celular, lo que posteriormente fue confirmado por medio de fotografías SEM.

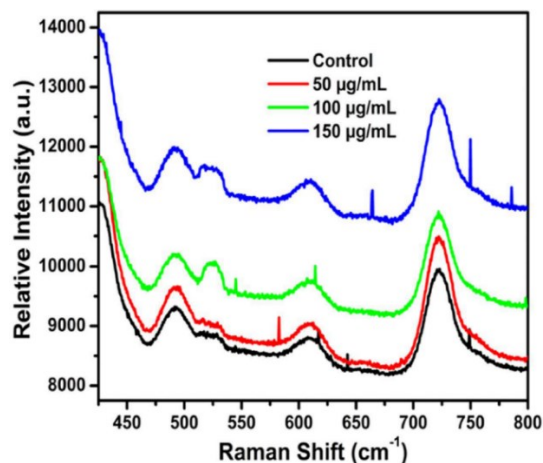


Figura 16. Espectros de Raman de E. coli tratados con GO, hay un incremento de la concentración de Adenina (729 [cm⁻¹]) y proteínas (S-S de vibración de estiramiento a 490 [cm⁻¹]) y de banda Amida VI a 610 [cm⁻¹]) en E. coli cuando a medida que aumenta la concentración de GO⁹².

Por otro lado, Ruiz et al. en el año 2011 estudiaron la biocompatibilidad del GO con células de mamífero *Colorectal adenocarcinoma* y toxicidad respecto a *E. coli* (Ver **Figura 17**)⁷¹. Para esto sintetizaron GO y lo sometieron a un proceso extenso de purificación en el que hay una diálisis, dilución y sonicación prolongada. Los resultados demostraron que este GO no posee propiedades antibacteriales, sino que promueve la adhesión y crecimiento de las células y las bacterias analizadas. Las supuestas propiedades antimicrobianas del GO reportadas en otros trabajos se asociaron a contaminantes residuales de la síntesis del material o subestimaciones de las concentraciones utilizadas en los ensayos. Por otro lado, cuando se agregó una solución de 25 [µg/mL] a un cultivo de bacterias, estas proliferaron y formaron un precipitado en el fondo de los tubos de ensayo, al que se le atribuyó el rol de un *scaffold* que potencia el crecimiento. Este comportamiento se repitió en filtros de Polifluoruro de vinilideno que fueron recubiertos con 25 y 75 [µg] de GO, donde el crecimiento fue dos y tres veces mayor en comparación al control.

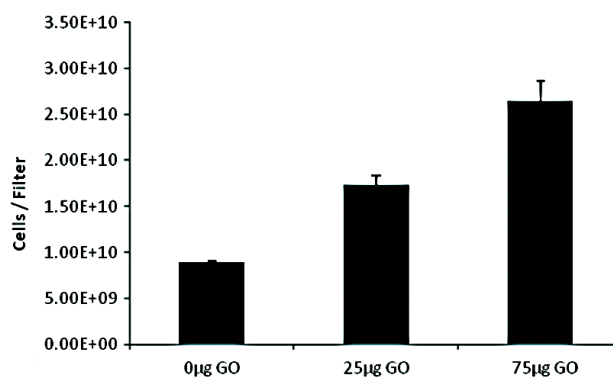


Figura 17. Filtros de Polifluoruro de vinilideno recubiertos con 0, 25 y 75 [µg] de GO se inocularon con *E. coli* y se incubaron a 37 [° C] durante 18 [h]⁷¹.

Barbolina et al. en el 2016 discutieron sobre si realmente el GO poseía propiedades antibacterianas¹⁰¹. Sintetizaron, luego purificaron y lavaron extensamente el GO, y posteriormente lo expusieron en una concentración de 1 [mg/mL] a bacterias *E. coli* y *S. aureus*, las que no experimentaron cambios de inhibición o estimulación de su crecimiento, lo que fue comprobado mediante fotografías TEM (Ver **Figura 18**). Por otro lado, se contactó a esas bacterias con una solución con GO insuficientemente purificado, la que sí tuvo efectos sobre la viabilidad de las bacterias. Por lo que el comportamiento antimicrobiano se atribuyó a la presencia de impurezas ácidas residuales de la síntesis del GO. Adicionalmente reportaron que las diferencias del tamaño lateral del GO no afecta su acción antimicrobiana. Considerando todo lo anterior, propusieron un protocolo de estandarización de la limpieza del GO con el fin de asegurar muestras impolutas, que permitiesen estudiar la actividad de biológica de manera más precisa.

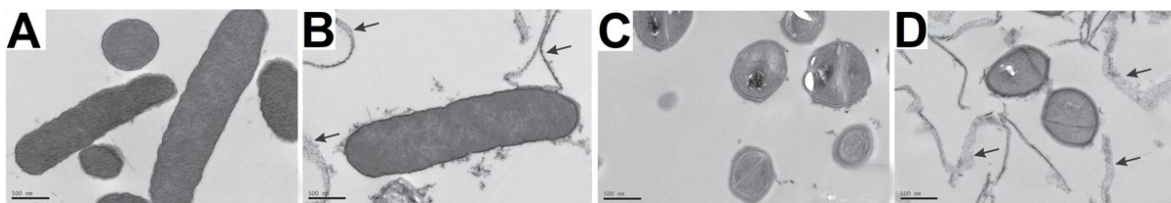


Figura 18. Imágenes TEM antes y después del contacto de la bacterias 100 [µg/mL] de GO purificado con A-B) *E.coli* C-D) *S. aureus*. Las líneas en la imagen B) y C) muestran a las hojuelas de GO¹⁰¹

1.5.3 PAPEL DE ÓXIDO DE GRAFENO

El papel de óxido de grafeno (también conocido como films o membranas de GO) es una macroestructura formada por el apilamiento ordenado de nanoláminas de GO. Este material ha atraído mucha atención debido a su flexibilidad y bajo peso, por lo que muestra gran potencial en numerosas áreas como supercapacitadores flexibles, membranas robustas y arquitecturas

bioactivas¹¹⁵⁻¹¹⁷. Se ha reportado que el GO es capaz de conformar esta macroestructura debido a la presencia de capas de agua submolecular confinadas entre las nanoláminas, las que las unen con sus vecinas por medio de la formación de puentes de hidrógeno entre moléculas de agua y las de los grupos funcionales presentes en la superficie del GO, lo que se brinda uniformidad al papel¹¹⁸⁻¹²⁰. A pesar de esto, los enlaces de hidrógenos son fuerzas débiles en comparación a las de naturaleza iónica o covalente⁴² e incluso una alta densidad de la red de puentes de hidrógeno puede romperse debido a una elevada movilidad de las moléculas pequeñas. Asimismo, un exceso de agua en el papel (por sobre 15 [%p/p]¹¹⁹) puede actuar como plastificante o lubricante entre las capas y una escasez de agua, bajo un 7 [%p/p] permite la formación de una red débil. En ambos casos, se dificulta la formación de esta estructura, en el primero debido al ensanchamiento del espacio en la galería que provoca que sólo se formen enlaces agua-agua y en el segundo por falta del adherente de las nanoláminas, lo que en ambos escenarios afecta la resistencia mecánica del papel^{119,121}.

Otra información interesante sobre el papel es que su comportamiento en solventes líquidos es distinto al que tiene el polvo de GO, debido a la geometría de sus esquinas¹²². Como se observa en la **Figura 19**, el polvo posee una estructura de los grupos funcionales de borde sobre borde, en contraste, el papel tiene una distribución donde los grupos de este lugar se unen a los grupos funcionales de la superficie de otra nanolámina. Esto les confiere distintas propiedades, ya que cuando el GO está sumergido en agua los grupos -OH se desprotonan parcialmente, lo que provoca que los bordes del polvo se repelan. Este efecto se disminuye con la disposición de las nanoláminas del papel, lo que dificulta la intercalación del agua que está en el medio dentro de las galerías del papel.

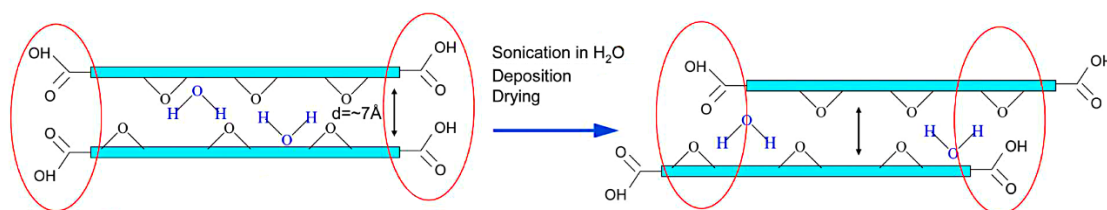


Figura 19. Esquema de la disposición de GO en polvo (izq.) y papel (der.)¹²²

Se han propuesto varias soluciones para fabricar el papel de GO, entre las que se incluye: filtración al vacío, métodos dirigidos por plantilla, casting-secado, ensamblaje o gelación interfacial, crecimiento/ensamblaje in situ¹²³. La primera es una técnica de separación de mezclas sólido-líquido, en que la solución se introduce en un embudo Büchner que contiene un papel filtro acoplado al fondo. Este embudo se une a un matraz Kitasato que tiene una salida donde se coloca la bomba de vacío, la que succiona la solución quedando atrapado el sólido en los poros del filtro y el resto queda depositado en el fondo del matraz. Esta fue la primera técnica ocupada para fabricar un papel de GO¹¹⁸ y actualmente sigue siendo la más utilizada^{30,71,81,85,88,91,121,122,124-146}, debido a que el espesor es fácilmente controlable y porque se obtienen películas que

usualmente exhiben estructuras de múltiples capas, debido al montaje espontáneo cara a cara por la interacción de la solución con la interfaz del filtro membrana¹²⁷. El módulo de Young de estos papeles de GO están usualmente en un rango de 23 – 42 [GPa]^{118,128}, resistencia a la tracción entre 15 – 526 [MPa]^{81,128,129} y tenacidad de 0,26 [MJ/m³]¹²¹, valores que se encuentran por debajo de los de grafeno prístino o de las predicciones realizadas por modelos mecánicos. Además, es importante señalar que las propiedades mecánicas reportadas para los papeles de GO son frecuentemente divergentes, inconsistentes, poco reproducibles y de difícil control^{118,144}. Otro inconveniente asociado a la utilización de esta técnica es la posible contaminación del papel por parte del filtro utilizado, por ejemplo los de óxido de aluminio anodizado pueden liberar iones Al⁺³^{123,147}. Por otro lado, se ha mencionado que es más fácil fabricar el papel utilizando láminas más grandes de GO, las cuales pueden ser obtenidas desde hojuelas de grafito de mayor tamaño, por medio de una pre-exfoliación del grafito, evitando utilizar sonicación y las reacciones fuertes, lo que en conjunto permite minimizar la ruptura de las láminas durante la reacción química¹⁴⁸.

Como se mencionó anteriormente, el primer papel lo fabricó Dikin et al.¹¹⁸ en el año 2007 por medio de filtración al vacío (Ver **Figura 20**). El papel obtenido fue de color café oscuro, tenía un módulo de Young de 32 [GPa] (superior al de las láminas flexibles de grafito y papeles Bucky, los que están formados por nanotubos de carbono) y una estructura estratificada en la que las hojas de GO se apilan de forma casi paralela. Mediante, la caracterización por Difracción de Rayos X (XRD) mostraron que la distancia entre capas era de $2\theta = 0,83$ [nm] y que el papel tenía un espesor de aproximadamente 6-7 nanoláminas de GO. Adicionalmente se probó que al humedecer este material, se pierde resistencia y rigidez.

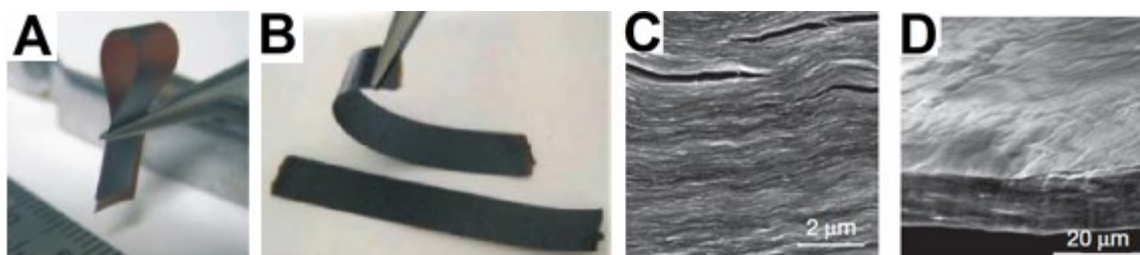


Figura 20. A-B) Morfología del papel de GO C-D) Fotografía SEM de la sección transversal¹¹⁸

Cruz-Silva et al.¹⁴⁹ en el año 2014 reportaron un método alternativo de fabricación de papel mediante la utilización de una barra de teflón para recubrir una placa de teflón con barro de GO, como se presenta en la **Figura 21**. Este método permitió obtener papeles altamente ordenados y similares a los obtenidos mediante filtración al vacío, con áreas de 800 – 1200 [cm²] o incluso más grandes, cuyo tamaño sólo fue limitado por el área de las placas de teflón. Estos materiales tenían un excelente comportamiento mecánico y resistencia al desgarro, debido a que la superficie de la placa y la barra poseen rugosidades microscópicas que le confiere una estructura ligeramente arrugada al papel, la que le proporciona una mayor capacidad de deformarse sin

romperse. Los papeles luego fueron enrollados para preparar fibras de GO con una elongación de fractura extremadamente grande (hasta el 76 [%]), alta tenacidad (hasta 17 [J/m³]) y propiedades macroscópicas atractivas, como sección transversal circular uniforme, superficie lisa, y gran capacidad para formar nudos¹⁴⁹.

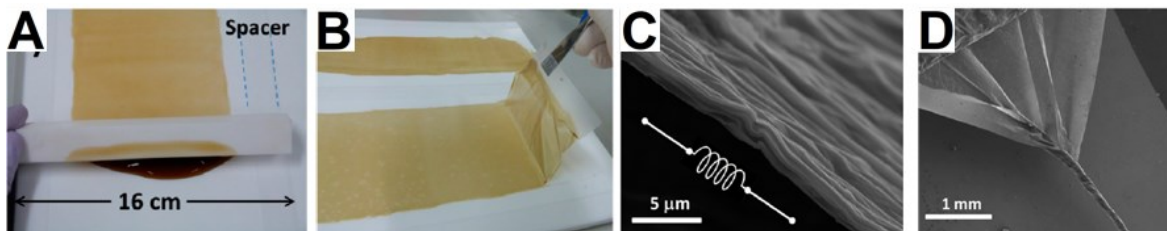


Figura 21. A) Barro de GO siendo esparcido sobre una placa de teflón mediante el uso de una barra del mismo material B) Levantamiento del papel de GO C-D) Fotografías SEM de un papel de 2,9 [μm] de ancho que posee rugosidades y este siendo enrollado en forma de fibra, respectivamente¹⁴⁹.

Por otro lado, Zhang et al. en el año 2015 fabricaron láminas por medio de un recubrimiento de una placa Petri de poliestireno con el barro de GO a 25 [°C], 50 [%] de humedad y durante un tiempo de 45 [h], las que se pueden ver en la **Figura 22**. Este papel tenía una resistencia a la tracción de 453 ± 17 [MPa] y tenacidad de $10,86 \pm 1,05$ [MJ/cm³], y tras su reducción alcanzó una resistencia a la tracción de 614 ± 12 [MPa] superior a los 585 [MPa] del acero inoxidable AISI 304¹²⁹.

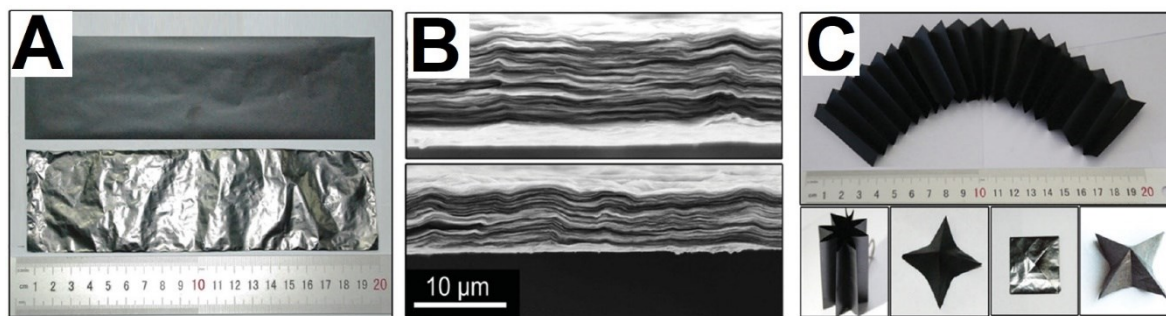


Figura 22. A) Papel de GO (arriba) y r-GO (abajo) B) Fotografía SEM del Papel de GO (arriba) y r-GO (abajo) C) Fotografías digitales del papel de GO y rGO, que muestran sus flexibilidades¹²⁹

1.5.3.1 PAPELES COMPUESTOS DE ÓXIDO DE GRAFENO

Considerando lo débil de las uniones por puentes de hidrógeno presentes y la abundancia de grupos funcionales en su superficie, los papeles de GO son un candidato ideal para la fabricación de materiales compuestos, lo que les brindan nuevas o mejoras en sus propiedades a través de interacciones del tipo de enlaces de hidrógeno, iónicas, covalentes y $\pi - \pi$ ^{81,88,123}. Para mejorar las propiedades mecánicas del papel, se ha sugerido utilizar borato para reticular este material y

así fabricar uno extremadamente fuerte, pero quebradizo¹³⁰. También una reticulación adicional de las capas de papel pueden mejorar las propiedades mecánicas de este, a través del uso de reticulación covalente¹²⁵ o por cationes divalentes (Mg^{2+} o Ca^{2+}) para unirlos a grupos de ácido carboxílico o hidroxilo del GO^{131,150}. Esto último fue realizado por Park et al. en el año 2008¹⁵⁰, donde la inclusión de iones divalentes de metales alcalinos térreos (Mg^{2+} o Ca^{2+}) en aproximadamente 1 [%p/p] incrementó la resistencia a la fractura en ~50 [%] y la rigidez entre 10 – 200 [%] en los papeles de GO fabricados mediante filtración al vacío. La explicación de esta mejora fue la unión de los iones con los grupos funcionales del plano basal y de los bordes de las láminas de GO (Ver **Figura 23**), donde estos últimos enlaces les permiten resistir de mejor forma la fuerza de tracción y contribuyen a la mejora de las propiedades mecánicas con mayor intensidad.

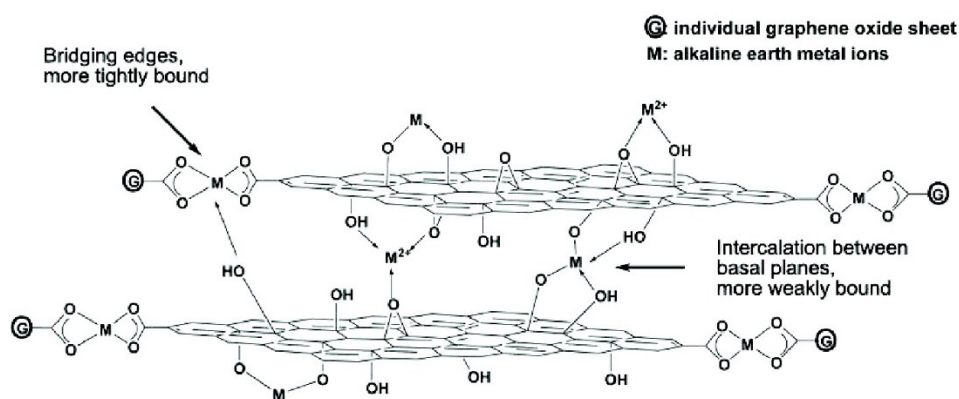


Figura 23. Esquema de la unión entre el Papel de GO y MCl_2 ($M = Mg$ y Ca)¹⁵⁰

Yan et al. en el año 2010 reportaron la fabricación de dos papeles híbridos, uno de polianilina/GO y el otro de polianilina/grafeno⁷⁰. El método simple y de bajo costo fue realizado a través de la polimerización de la anilina utilizando papel de GO fabricado mediante filtración al vacío como sustrato, el cual fue sumergido en una solución del polímero, donde se unió a los grupos carboxilo y hidroxilo por medio de fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno. Se obtuvo un papel híbrido delgado, ligero y que mantiene la flexibilidad del papel de GO prístino. Además, se estudió su biocompatibilidad, por medio de la línea celular de fibroblastos *L929* de ratón, donde la tasa de supervivencia tras 96 [h] fue 5 [%] superior a la del papel de GO, lo que se atribuyó a las propiedades intrínsecas de la polianilina.

Por otra parte, una categoría de materiales compuestos que ha generado bastante interés es la de los nácares sintéticos. Estos se inspiran en el nácar, considerado como uno de los estándares naturales a seguir por la biomimética (que se inspira en la naturaleza para desarrollar nuevos materiales), debido a que presenta dos características relevantes: tiene una estructura de “ladrillo y cemento” formada por 95 [%v/v] de placas de carbonato de calcio aragonito bidimensional, y 5 [%v] de quitina y proteína nanofibrilar unidimensional^{81,151,152}. Además, posee distintas

interacciones de interfaz entre la fase inorgánica y orgánico¹⁵³. A partir de esto, ciertas investigaciones se han centrado en crear materiales compuestos que poseen GO cumpliendo la función de matriz o refuerzo, para crear una estructura compleja y jerárquica. Los compuestos fabricados bajo este enfoque poseen una alta carga, dispersión y un excelente diseño de interacción de interfaz. Unos ejemplos de estos trabajos son:

Li et al. en el año 2012 prepararon un papel inspirado en el nácar a partir de acetato de polivinilo (PVA) y GO¹⁵¹, el que después redujeron utilizando ácido hidroyódico. La preparación del papel fue realizada al recubrir una placa de tereftalato de polietileno (PET) con la solución del compuesto, lo que es una metodología rápida, simple y escalable. Los híbridos con 20 [%p/p] de PVA tuvieron los mejores resultados en resistencia a la tracción y módulo de Young en comparación al papel de GO. Para GO/PVA fueron de 118 [MPa] y 11,4 [GPa], rGO/PVA 188,9 [MPa] y 10,4 [GPa], por otro lado, los del papel de GO fueron 5,71 [MPa] y 4,1 [GPa]. Por medio de fotos FESEM (**Figura 24**), se observó que los papeles compuestos poseían una estructura más compacta, lo que se asoció a un rol de “cemento” del polímero en los “ladrillos” de GO. Además, se reportó que los papeles de GO se dispersaban en agua tras 24 [h] de estar sumergidos en ese medio de manera estática o con una agitación leve. Por otro lado, los híbridos no pudieron ser dispersados con agitación ni con un baño de ultrasonido, lo que se vinculó nuevamente a una acción de PVA que impedía que el GO se dispersara en el medio acuoso.

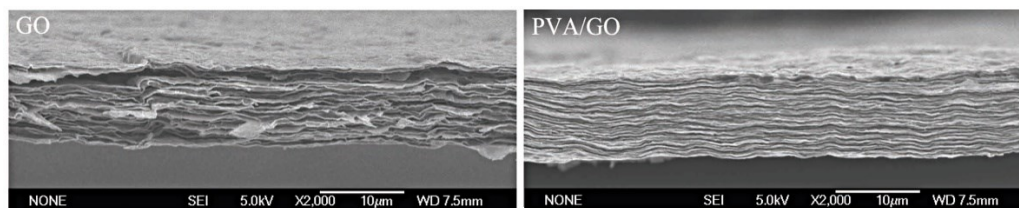


Figura 24. Imágenes FESEM de la superficie de fractura del papel de GO y el de PVA/GO (20 [% p / p] de PVA)

Cheng et al. en el año 2013 fabricaron un material compuesto utilizando GO y 10,12-pentacosadiyn-1-ol (PCDO), los que fueron reticulados con las láminas de GO¹²⁵. El porcentaje en peso de este polímero es de 6,5 [%] (comparable con el nácar natural) y fue determinado mediante un Análisis Termogravimétrico (TGA). El papel de GO fue preparado por filtración al vacío y luego fue remojado en una solución de PCDO y tetrahidrofurano, después varias horas la reacción de esterificación entre los grupos carboxilo del GO y los alcoholes en uno de los finales de PCDO terminó. Posteriormente, para mejorar su resistencia interfacial y conductividad, las moléculas de PCDO fueron reticuladas por medio de una polimerización con adición-1,4 sus unidades diacetilénicas mediante irradiación UV. Compararon la resistencia a la tracción y la tenacidad de un papel GO vs el híbrido. Para el primero los valores fueron $95,4 \pm 3,9$ [MPa] y $0,37 \pm 0,06$ [MJ/m³]. En el de GO/PCDO los valores aumentaron a $106,6 \pm 17,1$ [MPa] y $2,52 \pm 0,59$ [MJ/m³].

Cui et al. en el año 2014 prepararon un papel compuesto mediante la reticulación de dopamina (DA) en GO por medio de el recubrimiento de un recipiente de vidrio con una solución de la mezcla, y posteriormente secado durante 48 [h] a 45 [°C]¹⁵². Posteriormente, el papel se redujo mediante ácido hidroyódico, con el fin de mejorar su conductividad. Por otro lado, la razón para elegir este polímero es porque posee grupos funcionales catecol y amina, los que pueden reaccionar con la nanoláminas de GO y auto polimerizarse en cadenas largas de polidopamina (PDA). Mediante Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) confirmaron que ocurrió una reacción entre los grupos epoxi del GO y los amina del DA. A través de la preparación de muestras con distintas cantidades de DA, comprobaron que un mayor porcentaje de GO causa que la estructura del compuesto sea más ordenada, mejorando sus propiedades mecánicas. La justificación de esto radica en que el exceso de PDA actúa como impurezas que incrementan el área de la sección transversal del papel (ver **Figura 25**). Para el GO-PDA-VI (con 5 [%p/p] de DA) sus valores de resistencia a la tracción y tenacidad fueron 175.0 ± 14.3 [MPa] y 1.5 ± 0.6 [MJ/m³], correspondiente. Los que aumentaron respecto a los del papel de GO, 91.2 ± 1.6 [MPa] y 1.4 ± 0.1 [MJ/m³], respectivamente.

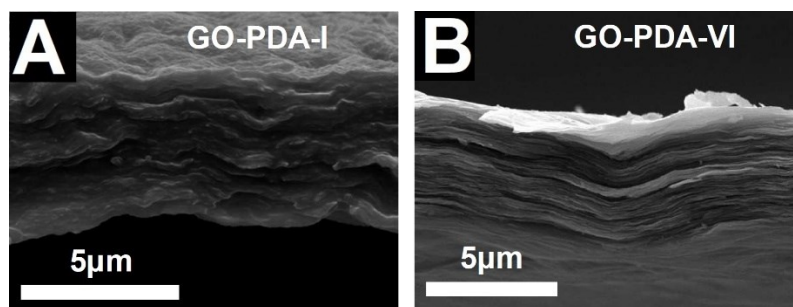


Figura 25. Sección transversal del Papel de GO con A) 50 [%p/p] de DA y B) 5 [%p/p] de DA

1.5.3.2 PAPELES DE ÓXIDO DE GRAFENO PARA APLICACIONES ANTIMICROBIANAS

El GO en esta morfología también se ha utilizado para aplicaciones antimicrobianas. Algunos de estos trabajos se muestran en esta sección.

Cómo se mencionó anteriormente, Hu et al. en el año 2010 fabricaron un papel de GO y rGO por filtración al vacío, señalando que pueden inhibir el crecimiento de *E. coli* y que poseen una mínima citotoxicidad (Ver **Figura 26**)⁸⁵. El papel de GO fue sometido a un ensayo de *bacterias en el aire* y luego de 12 [h] de incubación a 37 [°C] no hubo crecimiento de colonias en el papel y a través de fotografías tomadas con un microscopio electrónico de barrido (SEM) se observó que las bacterias presentes en el papel habían perdido su integridad, lo que se relacionó a la disrupción física o estrés oxidativo.

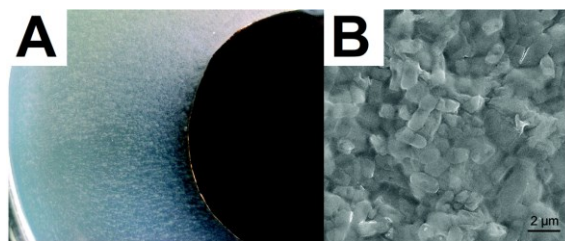


Figura 26. A). Actividad antibacteriana del papel GO B) Imágenes SEM de *E. coli* unidas al papel GO⁸⁵.

Como se habló anteriormente, Perreault et al. en el año 2015 investigaron la relación entre las propiedades antimicrobianas y el tamaño de las nanoláminas del GO sobre *E. coli*⁸⁸. Además, estudiaron las diferencias entre los mecanismos del GO en forma de papel preparado mediante filtración al vacío y GO en suspensión. El tamaño promedio de las nanoláminas del GO preparado fue 0,65 [μm^2] y tras la sonicación, se formó un rango de muestras con valores hasta 0,01 [μm^2]. Cuando el GO se encuentra en forma de papel, a menor tamaño de las láminas mayor es el efecto antimicrobiano (contrario al GO en polvo), bajando la viabilidad de las células de un ~75 [%] a un ~25 [%] en el rango de áreas. Este efecto no es reversible, y se asocia a una mayor cantidad de defectos presentes en las nanoláminas más pequeñas las que tienen una mayor acción oxidativa.

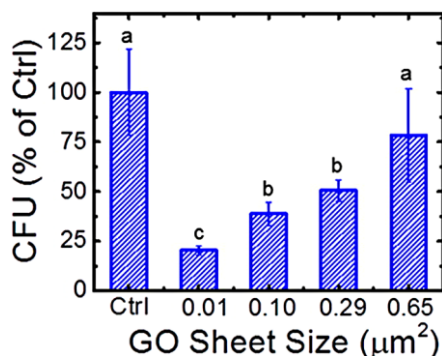


Figura 27. Número de células de *E. coli* viables después de 3 [h] de contacto el papel de GO⁸⁸.

Continuando con el trabajo de Ruiz et al. en el año 2011 en que estudiaron la toxicidad del GO respecto a *E. coli* y su biocompatibilidad con células de mamífero *Colorectal adenocarcinoma*⁷¹. El efecto del papel de GO en el crecimiento bacteriano se estudió inoculando papel de GO, papel de Ag-GO y piezas de filtro de PVDF con *E. coli*. Las muestras fueron colocadas placas de cultivo LB que habían sido inoculadas a una concentración de 10^6 bacterias por placa. Después 10^6 de *E. coli* fueron inoculadas directamente encima de los papeles y se dejaron secar. Luego de incubar no se observaron zonas de inhibición en el filtro ni en el papel de GO, pero sí en el papel de Ag-GO. Adicionalmente, se efectuó una *quantitative polymerase chain reaction* (qPCR) en tiempo real para determinar cuántas bacterias crecieron sobre los papeles. Los resultados

mostraron (ver Error! Reference source not found.) que el papel de GO promueve el crecimiento de bacterias de mejor manera, en comparación al filtro de PVDF. Por otro lado, el papel de Ag-GO logró la muerte de las células bacterianas, por lo que se concluyó que el GO no posee ningún efecto adverso o tóxico hacia las bacterias, si no que promueve el crecimiento bacteriano al mejorar la fijación, proliferación y formación de biopelículas.

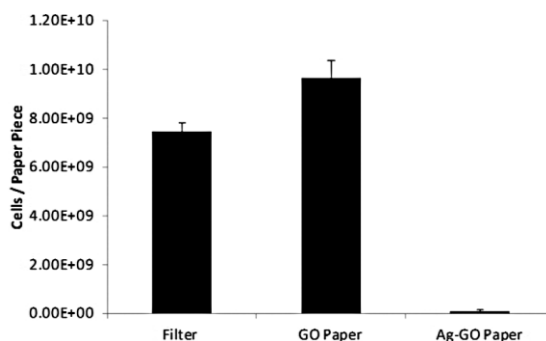


Figura 28. Pequeñas piezas de ~ 1 [cm²] de filtro de PVDF (f), papel GO (g) y papel Ag-GO se inocularon con *E. coli* y se cultivaron durante 18 [h] a 37 [°C]. El crecimiento bacteriano fue cuantificado por qPCR en tiempo real⁷¹.

1.5.4 COMPUESTOS DE GO CON QUITOSANO

Como se mencionó anteriormente, se han preparados papeles híbridos mediante la utilización de polímeros y metales. Un biopolímero que ha provocado cierto interés en ese punto es el quitosano (CS), material biodegradable y que posee muchos grupos funcionales hidroxilo y amino altamente reactivos^{6,81}. Proviene de la desacetilación de la quitina (en la **Figura 29**), el segundo polímero más abundante en la naturaleza tras la celulosa y que puede ser extraído desde hongos, levaduras, artrópodos y crustáceos⁶. El quitosano posee excelentes propiedades antimicrobianas, de biocompatibilidad, biodegradabilidad, adsorción y no es tóxico⁶. Debido a estas propiedades ha sido usado en aplicaciones de tratamiento de agua (asociado a la adsorción de colorantes y metales pesados), medicina, empaquetamiento de alimentos, como agentes quelantes, entre otras⁶.

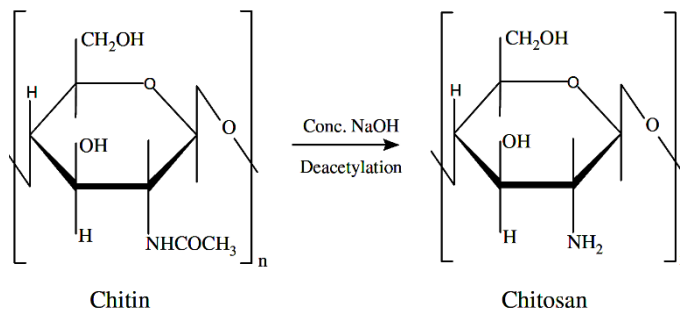


Figura 29. Estructura de la quitina y el quitosano¹⁵⁴

Considerando la gran cantidad de grupos funcionales que posee el GO, es posible formar biocompuestos con el quitosano a través de puentes de hidrógeno y enlaces químicos entre los grupos carboxilo de este y los amina del polímero^{6,155}.

Un ejemplo de la formación de enlaces entre esos materiales es el trabajo de Yang et al. en el año 2010, en que prepararon un compuesto donde la matriz fue de CS¹⁵⁶. Este nanocompuesto fue sintetizado mediante un auto-ensamblaje en medio acuoso de ambos componentes, hasta la formación de una solución homogénea la que fue vertida en una placa y posteriormente secada, hasta que se formase un papel. Se observó mediante fotografías SEM que el nanomaterial se había dispersado a un nivel molecular en la matriz. Esta buena dispersión provocó que se formasen interacciones GO-CS entre los grupos cargados negativamente del primero y los con carga positiva del polímero tras su protonación en medio ácido (estas interacciones se indican en **Figura 30**), los que generaron un aumento en las propiedades mecánicas del nanocompuesto con 1 [%p/p] de GO, cuya resistencia a la tracción y módulo de Young se incrementaron en un 122 y 64 [%] respecto al CS puro.

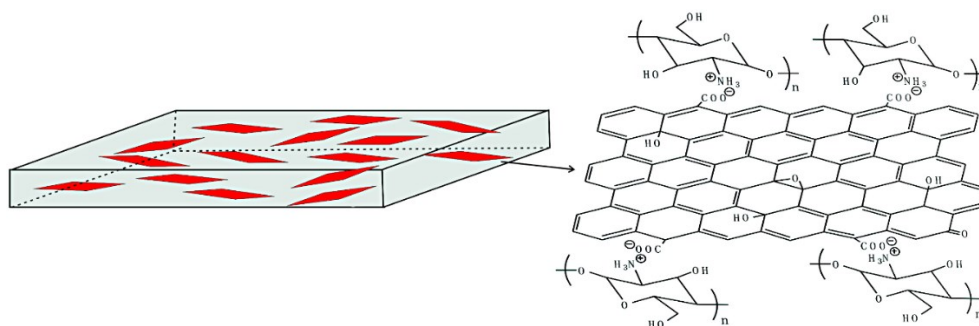


Figura 30. Representación esquemática del nanocompuesto bien disperso de GO en CS¹⁵⁶.

Por otro lado, Zuo et al. en el año 2013 dispersaron GO en una matriz de CS, en proporción 1:9 en peso y prepararon un papel con esa mezcla, por medio de un recubrimiento de una placa de teflón¹⁵⁷. La dispersión uniforme se logró por medio de la formación de enlaces amida entre los constituyentes (comprobados mediante Espectroscopía de Fotoelectrones de Rayos X (XPS)), lo que proveen una modificación en las propiedades mecánicas relacionado con una restricción del movimiento de las cadenas de CS por parte del nanorelleno, también por las interacciones electrostáticas debido a la naturaleza policatiónica del polímero y la aniónica del nanomaterial. Realizaron una comparación entre la resistencia a la tracción, módulo de Young y Elongación a la rotura. Los resultados para un papel de CS fueron 32,7 [MPa], 444,7 [MPa] y 71,3 [%], respectivamente. En cambio, para el híbrido fueron 82,0 [MPa], 2090,5 [MPa] y 42,5 [%].

Otra ejemplificación de la formación de enlaces entre estos materiales es el trabajo de Wan et al. en el año 2015 en que fabricaron compuesto de GO y Quitosano (CS) basándose en la inspiración proveída por el nácar y utilizando al GO como matriz⁸¹. Este papel híbrido, que posteriormente

fue reducido, poseía proporciones similares a la del nácar natural y es resistente, tenaz y conductivo, debido a la acción sinérgica entre los compuestos por medio de puentes de hidrógeno y enlaces covalentes. El resultado fue un compuesto que posee cuatro veces la resistencia a la tracción del nácar natural y diez veces su tenacidad. Inicialmente se mezcló una solución de GO con otra de CS, donde el volumen de esta última cambió entre las muestras (para formar compuestos con 30, 25, 20, 10 y 5 [%p/p]). Después se prepararon los papeles por medio de filtración al vacío y fueron reducidos utilizando ácido hidroyódico. Del análisis de las distintas muestras se propuso un mecanismo para justificar las mejores propiedades del papel híbrido con bajas concentraciones de CS (ver **Figura 31**). Este mecanismo explica que a concentraciones bajas efecto estérico es menor, permitiendo que ocurra la reacción química de amidación entre los grupos carboxilo del GO y los grupos amina del CS, lo que une más fuerte al compuesto. Por otro lado, a altas concentraciones el efecto estérico es grande, por lo que ocurre una elevada repulsión entre los componentes, por lo que la forma de interacción primaria se limita principalmente a puentes de hidrógeno.

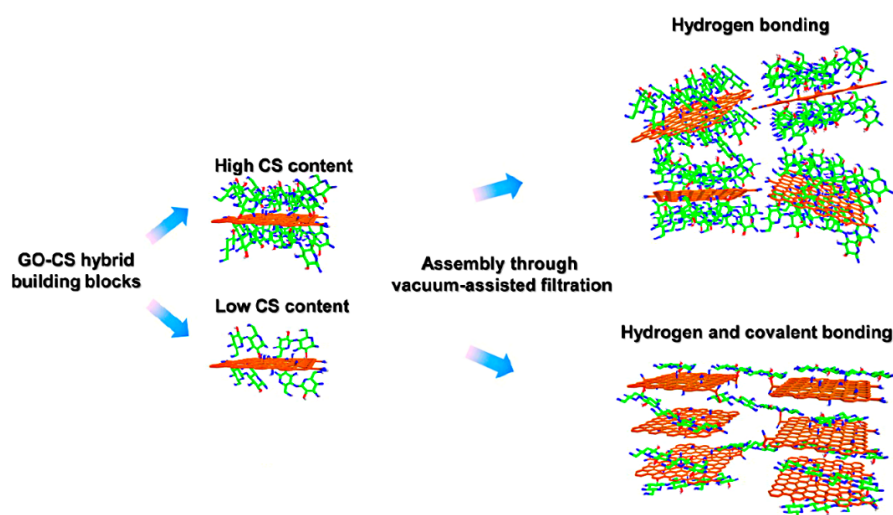


Figura 31. Mecanismo propuesto para bloques de construcción híbridos GO-CS con contenido de bajo y alto de CS⁸¹

1.5.4.1 Quitosano y compuestos de GO/CS para aplicaciones de adsorción

Bajo cierto pH el CS protona sus grupos amina, lo que se ha aprovechado para la utilización de este polímero en la adsorción de colorantes aniónicos^{158,159}, principalmente. Cuando se han fabricado compuestos entre GO y CS en esta aplicación, el polímero es usualmente usado como la matriz. Algunos de estos trabajos son:

Fan et al. en el año 2012 fabricaron compuesto magnético bioadsorbente a partir de CS, GO y nanopartículas de Fe_3O_4 ¹⁶⁰. Los dos primeros componentes se unieron por medio de una reacción de amidación. Por otro lado, el óxido de hierro le proporcionó al material las propiedades

magnéticas, que facilitan su separación. Los resultados de adsorción de MB se ajustaron a la isoterma de Langmuir, con capacidad de adsorción máxima de 180,83 [mg/g] y constante de 0,38 [L/mg].

Wang et al. en el año 2014 doparon monolitos de CS esponjosos microporosos preparados mediante liofilización bajas cantidades de GO, para formar monolitos de CSGO para aplicaciones en adsorción de MO y de iones Cu^{+2} ⁴. La capacidad máxima de adsorción para el naranja de metilo fue de 567,07 [mg/g] y para los iones 53,69 [mg/g]. Adicionalmente se mostró que para este tipo de estructuras el modelo de Langmuir y de Freundlich no sirven para el ajuste, ya que se obtuvieron valores de R^2 de 0,8373 y 0,7260, respectivamente. Esto último fue justificado debido a las suposiciones realizadas por la primera ecuación y por qué la naturaleza empírica de la segunda puede no ser el enfoque adecuado para la adsorción de MO en los monolitos de CSGO.

Wang et al. en el año 2015 doparon aereogeles porosos de quitosano con una pequeña cantidad de GO¹⁶¹. Este material posee una capacidad de adsorción máxima de 686,89 [mg/g] para MO y de 573,47 [mg/g] respecto a Amido Black 10B (AB10B), que también es aniónico. El estudio también demostró que a medida que aumenta el pH disminuye las propiedades del material como adsorbente, lo que se correlacionó con la desprotonación de los grupos amino del CS a pH elevado.

Jian et al. en el año 2016 prepararon un compuesto de CS-GO con nanopartículas magnéticas de óxido de hierro (MCGO) para aplicaciones en remoción de pigmentos y antibacterianas ⁶. Los resultados asociados a las pruebas relacionadas a esta última aplicación son abordados en la **Sección Quitosano** y compuestos de GO/CS para aplicaciones antimicrobianas. El colorante aniónico utilizado fue MO, cuyos valores tuvieron mejores resultados de ajuste con el modelo de Langmuir y en donde la capacidad máxima de adsorción fue de 398,083 [mg/g] y la constante fue de 0,01222 [L/mg]. Estos resultados se asociaron a los grupos funcionales amina del CS y al aumento en el área superficial y de grupos funcionales provocado por el GO, lo que en conjunto incrementan el número de sitios de adsorción.

También en el año 2016, Gul et al. fabricaron un compuesto de Quitosano, nanopartículas de Fe_3O_4 y GO¹⁶². Se realizaron los experimentos con MV y Alizarina amarilla R (AY, aniónico). Se reportó que el material posee buenas propiedades para remover ambos colorantes, y que los datos se ajustaban a la ecuación de Langmuir, pero no fueron reportados los valores de q_m y K_L .

Kamal et al. en el año 2017 fabricaron una membrana formada por la reticulación de CS con una dispersión uniforme de GO, usando ortosilicato de tetraetilo (TEOS) como un agente de entrecruzamiento²². Se examinaron las muestras por SEM y Brunauer–Emmett–Teller (BET), con lo que se confirmó un mezclado uniforme en la matriz de CS y que la inclusión del GO en esta aumenta su área superficial, generando más sitios activos lo que se puede traducir en una mejora

de las propiedades de adsorción. Para esto se utilizó el pigmento aniónico Rojo Congo (CR) y sus valores de adsorción se ajustaron a la ecuación de Langmuir, con capacidad máxima de adsorción de 370,37 [mg/g].

De lo anteriormente expuesto resalta la ausencia de membranas compuestas o bifásicas de GO/CS en la bibliografía consultada. Esto se puede asociar a la disminución del área de contacto provocada por esa morfología.

1.5.4.2 Quitosano y compuestos de GO/CS para aplicaciones antimicrobianas

A lo largo de los años se ha generado mucho interés en las propiedades antimicrobianas del CS, cuyo mecanismo (o serie de mecanismos) es desconocido y en muchos casos, los propuestos se contradicen entre ellos^{154,161}. La razón de esto radica en que existe un gran número de factores microbianos, intrínsecos del CS y de las condiciones ambientales, entre otros que afectan al proceso.

Entre los factores microbianos influiría el tipo de pared que posea la bacteria (Gram-positivo o negativo). Sin embargo, la literatura es diversa y a veces contradictoria. Existe publicaciones que afirman que las Gram-positivo son las más afectadas por el CS^{154,155}, lo que era justificado porque estas no poseen una membrana externa, como sucede con las negativo. Otras publicaciones mencionan que el CS afecta en mayor medida a las Gram-negativo, argumentando que la carga negativa de la superficie celular era mayor, por lo que más CS es adsorbido y por ende, ocurre un mayor efecto antimicrobiano^{154,155}. Por otro lado, incluso hay algunos reportes en que mencionan que no existen diferencias en la actividad del CS en ambos tipos¹⁵⁵.

Dentro de los factores intrínsecos se encuentra la densidad de carga positiva, la que al incrementarse permite interacciones electrostáticas más fuertes. Además, está la capacidad quelante en condiciones ácidas del CS respecto a varios iones metálicos, algunos de los cuales se encuentran en la pared celular y son relevantes para la estabilidad de esta¹⁰⁷. Otro factor es el peso molecular, donde los reportes también son contradictorios¹⁵⁵, ya que no hay consenso sobre el efecto de este parámetro en la actividad antimicrobiana. Uno de los reportes más famosos en esta materia es el de Zheng y Zhu¹⁶³ del año 2003 quienes plantearon que los mecanismos de acción para ambos tipos de bacteria son diferentes. Ellos realizaron un estudio utilizando *E. coli* y *S. aureus*, donde mostraron que a medida que aumentaba el peso molecular del CS se incrementaba la actividad antimicrobiana contra esta última bacteria lo que justificaron mediante la proposición de un mecanismo en que el polímero forma una membrana que encapsula a la célula, impidiendo que los nutrientes entren a la bacteria. Por otro lado, a medida que decrece el peso molecular del polímero la actividad antimicrobiana era mayor en *E. coli*, sugiriendo que el mecanismo de acción del CS es que una vez ingresado a la bacteria absorbe las sustancias electronegativas de la célula, floculándolas y así alterando las actividades fisiológicas de la bacteria, lo que desencadena su muerte.

En los factores ambientales está el pH, ya que bajo el pKa de la molécula (6,3 – 6,5) la molécula de CS se vuelve policatiónica. Debido a lo anterior, la actividad inhibitoria disminuye con el aumento de pH¹⁵⁴. Una de las razones para explicar esto radica en las cargas positivas de los grupos amino, que interactúa con las membranas celulares cargadas negativamente, lo que causa una filtración del material intracelular que forma al microorganismo¹⁵⁴.

Adicionalmente, Tripathi et al. en el año 2008 evaluaron la actividad antimicrobiana de una película de quitosano-almidón sobre *E. coli*, *S. aureus* y *Bacillus subtilis*¹⁶⁴. Durante las pruebas de microbiología comprobaron que el papel compuesto presentaba un efecto inhibitorio, lo que no ocurrió para los papeles formados sólo por CS (en la **Figura 32**).

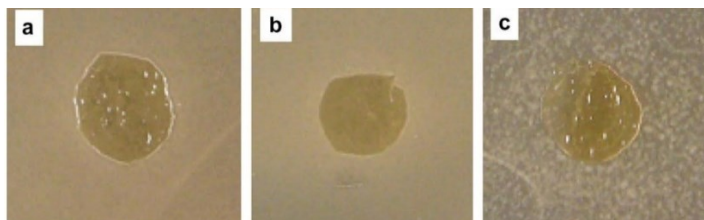


Figura 32. Ausencia de halo de inhibición por el papel de CS contra (a) *E. coli*, (b) *S. aureus* y (c) *B. subtilis*¹⁶⁴

Considerando las propiedades anteriormente mencionadas, se han preparado compuestos de CS con GO con el fin de potenciar sus propiedades antimicrobianas¹⁶⁵.

Sundar et al. en el año 2014 sintetizaron un papel formado por un nanocompuesto de CS-GO, preparado por el recubrimiento de una placa Petri con una solución que contenía a los componentes¹⁶⁵. Las pruebas de microbiología sobre *E. coli* y *B. subtilis* demostraron que este material con un 2 [%p/p] de GO posee mejores propiedades que ambos materiales por si solos, ya que presentaba un halo de inhibición de mayores dimensiones (ver **Figura 33**).

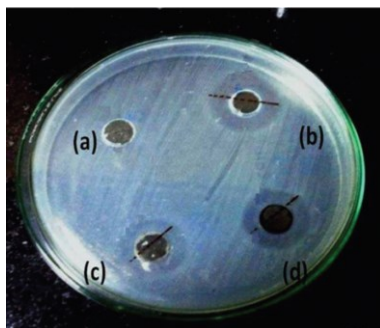


Figura 33. Zona de inhibición de *E. coli* para (a) control (b) 2 [%] de CS-GO (c) 1 [%] de CS (d) 0,01 [%] de GO.

En el año 2015, Marta et al. diseñaron un nuevo material híbrido que combinaba sinérgicamente las propiedades antibacterianas de nanopartículas de plata (AgNPs), GO y CS¹⁰⁷. Anteriormente se habían fabricado compuestos de GO-AgNPs que poseían mejores propiedades antimicrobianas, pero no se habían recubierto con quitosano con el objetivo de incrementar su estabilidad. Se probaron las propiedades antibacterianas ante dos cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina, determinando la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración bactericida mínima (MBC). En el ensayo, la concentración inicial de bacterias fue 10^5 [CFU/mL] y se probaron 6 muestras: GO, CS-GO, AgNPs-GO y CS-AgNPs-GO con distinta cantidad de CS). El resultado fue que el nanocompuesto de proporción 1:4 de CS:AgNPs – GO tuvo un mejor rendimiento que los materiales que lo formaban, por ejemplo, la MIC de este era 1,09 Ag+ y 1,35 GO en comparación a la $> 7,5$ del GO, 2,25 del CS-GO, 1,90 Ag+ y 1,5 GO del AgNPs-GO. Esto fue justificado debido a que el recubrimiento con quitosano facilitaba la unión del nanohíbrido con las paredes cargadas de las células bacterianas, el GO se encargaba de disminuir la permeabilidad de la célula y por las propiedades intrínsecas del AgNPs.

Cómo se adelantó anteriormente, Jian et al. en el año 2016 prepararon MCGO para aplicaciones en remoción de pigmentos y antibacterianas⁶. Las propiedades antimicrobianas contra *E. coli* a una concentración inicial de 10^6 [CFU/mL] de este material se evaluaron mediante una comparación con las nanopartículas de óxido de hierro, GO y CS, donde todos los materiales estaban a concentraciones de 50, 100 y 200 [μ g/mL] a 37 [°C] y a agitados a 150 [rpm]. Más tarde, se efectuaron una serie de diluciones con las células después de 0 – 120 [min] de exposición, en que se esparcieron 100 [mL] de muestras no diluidas y de todas las diluciones en placas de LB, para después ser incubadas a 37 [°C] durante la noche. Finalmente, el rendimiento antibacteriano se evaluó por la metodología de conteo por recuento. Los resultados obtenidos para el porcentaje de inactivación de nanopartículas de óxido de hierro, GO y CS (tras 2 [h] de exposición), fueron: $55,92 \pm 9,62$, $87,26 \pm 3,75$ y $99,91 \pm 0,2$ [%], respectivamente. Por otro lado, para el MCGO sólo bastaron 40 [min] para inactivar a la mayoría de las bacterias, como se ve en la **Figura 34**. A través de imágenes SEM se mostró que estas capacidades del material podían vincularse a daño en la membrana. Esto pudo ocurrir por una acción sinérgica entre los componentes, el CS provoca una alteración de la permeabilidad de la membrana celular causada por la carga negativa de esta y la carga positiva del polímero, lo que provoca una fuga de material intracelular que termina por matar a la bacteria. Por otra parte, el GO puede dañar la estructura de la membrana e inducir estrés oxidativo y finalmente, las nanopartículas de óxido de hierro pueden producir especies reactivas de oxígeno (ROS) que cuando interactúan con la bacteria generan daño del ADN, a través de la oxidación de las proteínas.

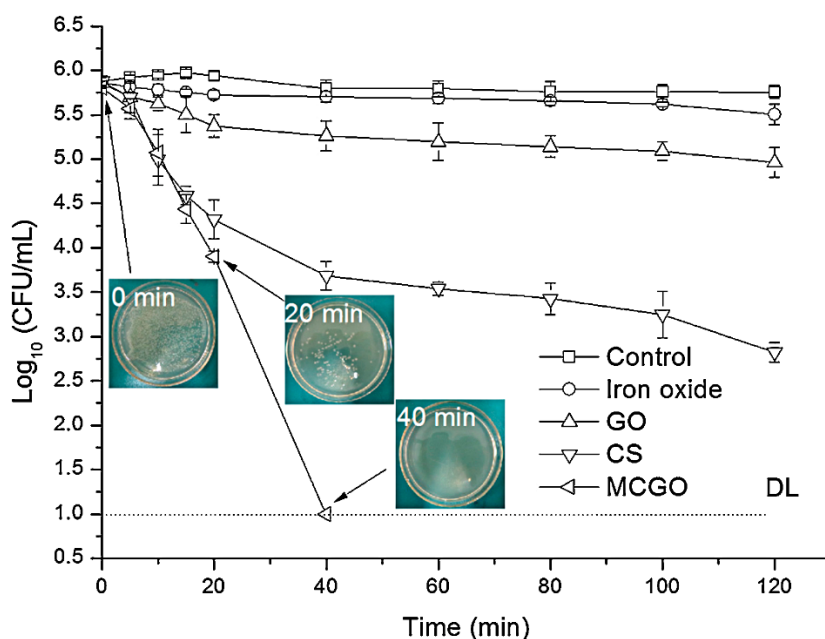


Figura 34. Actividad antibacteriana del óxido de hierro, GO, CS y MCGO contra la bacteria *E. coli*, a la misma concentración de 100 $[\mu\text{g} / \text{mL}]$ a 37 $[\text{°C}]$.

Grande et al. en el año 2017 prepararon un nanocompuesto en forma de papel por medio de la reticulación del GO con el CS a 120 $[\text{°C}]$ ¹⁶⁶. Estos enlaces fueron formados por medio de los grupos epoxi del GO y los amino e hidroxilo del CS. Se evaluaron las propiedades antimicrobianas respecto a *E. coli* y *B. subtilis*, por medio de mediciones de viabilidad usando un ensayo basado en fluorescencia. Se comparó CS con distinto porcentaje en peso de GO: 0, 0,1, 0,25, 0,4 y 0,6. El ensayo consistió en que portaobjetos circulares se recubrieron con películas delgadas CS-GO y fueron depositados en una placa de microtitulación de fondo plano, luego se añadieron alícuotas de 2 $[\text{mL}]$ de cultivo bacteriano a 0,5 OD600 $[\text{nm}]$ en PBS (pH 7,4) en cada pocillo y luego se incubaron durante 1 $[\text{h}]$ (sin agitación) a temperatura ambiente. Después de esto, se colocó una alícuota de 10 $[\mu\text{L}]$ de solución en un portaobjetos de vidrio, se tiñó y se obtuvieron imágenes bajo un microscopio de fluorescencia. Para determinar la cantidad total de células vivas y muertas en la suspensión, esta se tiñó con un kit de viabilidad bacteriana vivo/muerto de Baclight. El porcentaje de células inactivas se expresó como la relación porcentual entre el número total de células inactivas (rojas) y el número total de bacterias (verde). Los resultados fueron que el compuesto con 0,6 $[\% \text{p/p}]$ de GO presentó las mejores propiedades antibacterianas, con un 22,83 y 54,93 $[\%]$ de inactivación, respectivamente. Adicionalmente, la película de CS no mostró propiedades antibacterianas.

Dado que en las investigaciones mostradas anteriormente no hay publicaciones sobre papeles bifásicos de GO y CS, en este trabajo se proponen dos métodos de fabricación de estos materiales, los que pueden ser utilizados en aplicaciones de adsorción de un pigmento y como antimicrobiano.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Preparar y caracterizar papel de óxido de grafeno y papel de óxido de grafeno con quitosano, estudiando sus estructuras, capacidades de adsorción de un contaminante soluble y efecto antimicrobiano.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar láminas de papel a partir de GO y de GO cubierto en quitosano, sintetizado desde grafito por medio de una modificación del método de Hummers.
- Caracterizar los papeles fabricados a través de espectroscopia IR (FTIR) y Raman, Difracción de Rayos X (XRD), microscopía electrónica de barrido (SEM) y Espectroscopía de energía dispersiva (EDS).
- Analizar y comparar las propiedades de adsorción sobre el pigmento orgánico catiónico azul de metileno (MB) y antimicrobianas versus bacterias *S. aureus* (Gram-positivo) y *E. coli* (Gram-negativo) entre ambos papeles.

3 FASE EXPERIMENTAL

En esta sección se describen los reactivos, materiales, procedimientos y técnicas empleados para la preparación y caracterización de las muestras estudiadas en el trabajo, además se detallan los métodos utilizados en el estudio de propiedades.

3.1 MATERIALES Y EQUIPOS

3.1.1 MATERIALES

Los materiales utilizados para la síntesis del Óxido de Grafeno fueron de grado analítico y no se purificaron más extensamente. De la marca Merck se adquirieron los siguientes: Polvo de grafito extra puro (tamaño de partícula menor a 50 [µm]), Ácido sulfúrico con pureza del 95 – 97 [%] (H_2SO_4), Permanganato de potasio con pureza del 99 [%] ($KMnO_4$), Ácido clorhídrico en concentración 37% (HCl) y Nitrato de sodio con pureza del 99,5 [%] ($NaNO_3$). También se utilizó Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) de la marca Kadus S.A y Agua destilada producida en el Laboratorio de Polímeros de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile. Por otra parte, los materiales para la preparación de los papeles (de GO, CS y GO/CS) fueron: papel lija de grano 1200, placas y espátula de teflón, scotch, Quitosano de peso molecular medio (50.000 – 190.000 [Da]) y con un 75 – 85 [%] de desacetilación fabricado por Sigma-Aldrich y Ácido Acético al 100 [%] de la marca Merck. Adicionalmente, para los ensayos de adsorción se empleó una solución de azul de metileno a concentración 1,5 [%p/v] fabricado por Sigma-Aldrich, Agua Desionizada producida en el laboratorio de Ingeniería de Polímeros de la FCFM y cubetas de plástico de la marca Ratiolab. En los ensayos de microbiología se utilizaron medios ya preparados de Luria Bertani (LB) y Caldo de soja tréptico (TSB).

3.1.2 EQUIPOS

3.1.2.1 Balanzas

Con el objetivo de pesar los reactivos para la preparación de GO, los papeles y las muestras usadas para los distintos experimentos se ocupó una balanza analítica marca Precisa modelo 100A-300M, en la **Figura 35A**, que posee una precisión de $\pm 0,1$ [mg]. Por otro lado, para pesar los componentes para fabricar los medios de cultivo se ocupó la balanza Ohaus modelo TS400S, **Figura 35B**.

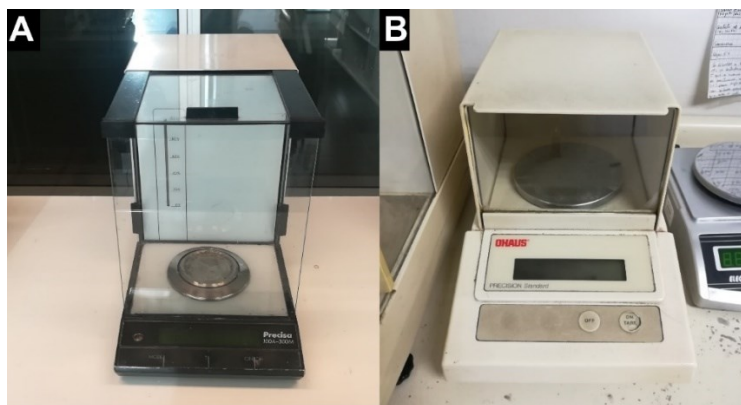


Figura 35. Balanzas A) Precisa modelo 100A-300M y B) Ohaus modelo TS400S.

3.1.2.2 Agitador magnético con calefacción

Para agitar la solución con el objetivo de disolver el CS y de también calentar la mezcla durante la síntesis de GO se utilizó un agitador magnético con calefacción marca Dragon Lab modelo MS-H280-Pro, en la **Figura 36**.



Figura 36. Agitador magnético con calefacción.

3.1.2.3 Termómetro infrarrojo

Para hacer seguimiento de la temperatura durante la preparación del Óxido de Grafeno y así poder ajustarla, se ocupó un termómetro infrarrojo doble laser marca Extech modelo 42509, en la **Figura 37**.



Figura 37. Termómetro infrarrojo.

3.1.2.4 Centrífugas

Con el fin objetivo de purificar el GO de los residuos remanentes de la síntesis se usó una centrífuga marca HANIL modelo Supra22k. Por otro lado, para evitar que las soluciones de azul de metileno contuviesen partículas que afectase las mediciones de absorbancia se utilizaron las centrífugas de la marca Eppendorf 5804 R (para tubos Falcon de 15 [mL]) y modelo 5403 (para tubos Eppendorf de 2 [mL]). Estas se pueden ver en la **Figura 38**.

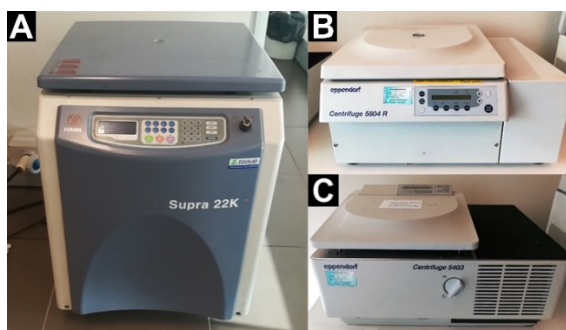


Figura 38. Centrifugas A) Hanil modelo Supra22k B) Eppendorf modelo 5804 R y C) Eppendorf modelo 5403.

3.1.2.5 Espectrofotómetro UV-Visible

Para caracterizar los materiales por medio de la medición de absorbancia y transmitancia se ocuparon espectrofotómetros UV-Visible marca Rayleigh modelo UV-1601, en el caso de los ensayos de adsorción de azul de metileno (el cual se muestra en la **Figura 39A**) y uno de marca Dinamica modelo HALO RB-10, para calibrar la concentración de bacterias durante los experimentos de microbiología (en la **Figura 39B**). El primero se realizó por medio de cubetas de plástico y utilizando como referencia agua desionizada. Por otra parte, el segundo se efectuó utilizando tubos de ensayo de vidrio y la referencia fueron los caldos estériles.

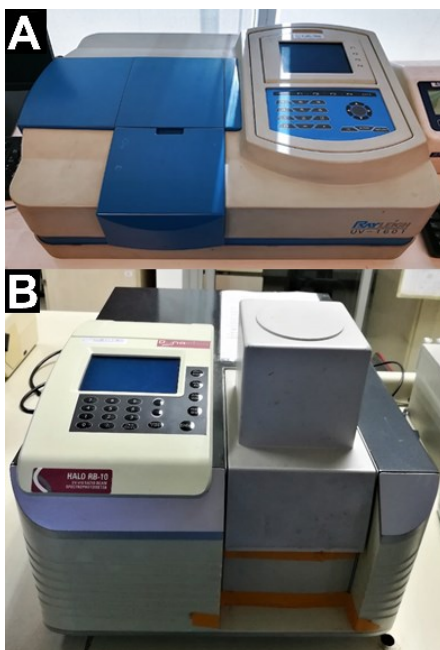


Figura 39. Espectrofotómetros UV-Visible A) Rayleigh modelo UV-1601 y B) Dynamica modelo HALO RB-10.

3.1.2.6 Incubadora con agitador

Para agitar las muestras y mantenerlas a una temperatura en específico durante los ensayos de adsorción se usó una incubadora con agitador marca Labwit modelo ZHWY-100B, la que se ve en la **Figura 40**.



Figura 40. Incubadora con agitador.

3.1.2.7 Horno de vacío

Con el objetivo de secar el barro de GO a 60 [°C] se ocupó un Horno de vacío de marca Heraeus Instruments modelo VTR 5036, en la **Figura 41**.



Figura 41. Horno de vacío.

3.1.2.8 Secador de pelo

Con el fin de secar el barro de GO esparcido sobre las placas de teflón en el *Método A* se utilizó un secador de pelo de la marca SIEGEN modelo SG-3042, en la **Figura 42**.



Figura 42. Secador de pelo.

3.1.2.9 Agitadores

Durante los ensayos en microbiología se ocuparon diversos agitadores presentes en la **Figura 43**. Para la gradilla que contenía los tubos de ensayo se utilizó el de la marca Biosan modelo 3D, Sunflower Mini-Shaker. Por otra parte, los tubos Eppendorf fueron agitados utilizando el vórtex de la marca IKA modelo MS 3 digital. Finalmente, para la redispersión del contenido de los tubos de ensayo se realizó por medio del modelo Maxi Mix II de la marca Thermolyne.

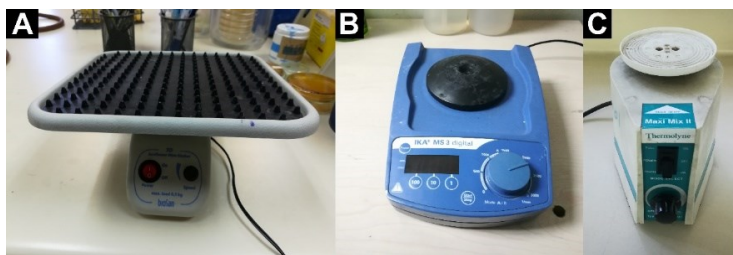


Figura 43. Agitadores A) 3D, Sunflower Mini-Shaker, B) MS 3 digital y

3.2 METODOLOGÍA

3.2.1 PRODUCCIÓN DE ÓXIDO DE GRAFENO

3.2.1.1 Síntesis 1

El *Método mejorado para obtener óxido de grafeno (GO) a partir de láminas de grafito* fue desarrollado por René Castro Cid, Doctorado en Ciencias de los Materiales de la Universidad de Chile, con el fin de producir y purificar GO. La síntesis fue inspirada en las técnicas propuestas por Marcano et al.⁵⁹. Por otro lado, la purificación se inspiró en la metodología de Cruz Silva et al.¹⁴⁹. Esta preparación de GO se inició con la dosificación de una solución de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ en una proporción de 9:1 (360:40 [mL]) en un vaso de precipitado de 1 [L], al cual se le agregaron 3,0 [g] de grafito y luego se agitó toda la mezcla durante 15 [min] a 200 [rpm], con el fin de asegurar la dispersión homogénea del grafito. Posteriormente se agregó un total de 18,0 [g] de KMnO_4 en un lapso de 60 [min], produciéndose una leve reacción exotérmica a 35 – 40 [°C]. Luego de terminar esa etapa, se elevó la temperatura del agitador magnético con calefacción hasta 50 [°C] y se agitó la mezcla a 200 [rpm] por 12 [h]. Posteriormente, se sacó el vaso del agitador y se permitió que la solución se enfriase hasta llegar a temperatura ambiente, tras lo que se vertió la mezcla en un vaso precipitado de 2 [L] que tenía en su interior ~400 [mL] de hielo con 3 [mL] de H_2O_2 al 30 [%]. Finalmente, se dejó la dispersión de GO (de color amarillo brillante) reposando en la noche para permitir que se neutralizase completamente el KMnO_4 y para permitir la sedimentación de las partículas de GO, que luego ingresan a la etapa de *Purificación 1*.

3.2.1.2 Síntesis 2

Esta síntesis de GO se realizó mediante una modificación del método de Hummers y Offeman⁵⁸. Para empezar, se agregaron 250 [mL] de ácido sulfúrico, 10 [g] de grafito y 5 [g] de nitrato de sodio a un vaso de precipitado de 1 [L]. Esta solución se agitó a 200 [rpm] en un baño de hielo (Temperatura < 10 [°C]) por 30 [min]), con el fin de dispersar los sólidos en el ácido.

Posteriormente, se comenzó a agregar $\sim 0,75$ [g] de permanganato de potasio cada 6 [min] (30 [g] en 240 [min]) utilizando una cuchara (lo que se realizó lentamente) procurando mantener un baño de hielo durante todo el transcurso de este proceso. Esta tasa de adición lenta evita el aumento de temperatura de la reacción de oxidación (de carácter exotérmica) y la formación de aglomeraciones de permanganato, que dificultan su dispersión en la mezcla evitando así que ocurriesen una reacción fuerte en ciertos focos⁶⁷. Tras finalizar el periodo de agregación de permanganato, se quitó el baño de hielo, la temperatura de la placa fue modificada a 35 [°C] y la solución se agitó durante 90 [min], ocurriendo ahí la reacción principal de oxidación del grafito. Después de esta etapa, la solución se trasvasó lentamente a un vaso precipitado de 2 [L] que contenía 500 [mL] de agua destilada. Tras la adición la mezcla se calentó hasta aproximadamente 100 [°C] y se agitó por 30 [min] a 95 [°C] en la placa calefactora, produciéndose la hidratación y una reacción secundaria de oxidación del GO. Más tarde, se agregó paulatinamente 400 [mL] de peróxido de hidrógeno al 10 [%] con el objetivo de retirar el exceso de permanganato que no reaccionó y se dejó agitar por 30 [min] a 60 [°C]. Finalmente, al terminar este periodo se cesó la agitación, se retiró el vaso de la placa y se dejó reposar 24 [h] para permitir la sedimentación del GO que posteriormente entraría a la etapa de *Purificación 2*.

3.2.2 PURIFICACIÓN DE ÓXIDO DE GRAFENO

3.2.2.1 Purificación 1

Continuando con el *Método mejorado para obtener óxido de grafeno (GO) a partir de láminas de grafito* se realizó la purificación inspirada en Cruz Silva et al.¹⁴⁹. Luego de la noche de reposo, se eliminó el sobrenadante de la mezcla de GO más impurezas producida por la *Síntesis 1*. El barro presente en el fondo del vaso se dispersó en una solución de 1 [L] de H₂SO₄ a 5 [%p/p], por medio de un mezclador de rodillos aplicado durante 15 [min]. Luego se centrifugó la dispersión de GO a 4000 [rpm] por 5 [min] y se desechó el sobrenadante, conservando el barro de color anaranjado pegado en las paredes de los vasos de centrifugación. Todo lo anterior se realizó con el objetivo de eliminar los restos de ácidos presentes en el GO, donde la centrifugación era el último paso del primer ciclo de lavado. Posteriormente se realizaron 3 lavados más, pero utilizando 1 [L] de agua destilada en vez de la solución de H₂SO₄. Tras finalizado el cuarto lavado, se obtuvo una capa homogénea color marrón anaranjado con aspecto de hidrogel, que se extrajo utilizando una espátula y se dispersó en 1 [L] de agua destilada. La solución se centrifugó a 4000 [rpm] por 3 [min] y se rescató el sobrenadante, el cual fue sometido a un ciclo de centrifugación por 3 [h] a 6000 [rpm]. Finalmente se rescató el producto final, el GO purificado pegado en las paredes de los vasos de centrifugación. Este barro de GO se utilizó para preparar papel mediante el *Método A*.

3.2.2.2 Purificación 2

Este paso (ver **Figura 44**) se realizó para remover impurezas producidas durante la síntesis del óxido de grafeno. El proceso se puede dividir en dos etapas, lavado con ácido para retirar los subproductos de la oxidación basada en la modificación del método de Hummers y Offeman⁵⁸ y una limpieza del exceso de ácido utilizando agua destilada, inspirada en la metodología de purificación de Cruz Silva et al.¹⁴⁹. Tras la finalización del periodo de sedimentación del GO producido mediante la *Síntesis 2*, se obtuvo una fase con barro y otra con sobrenadante claro, esta última fue eliminada. Luego se lavó el sedimento mediante filtración al vacío utilizando un filtro de papel, una bomba de vacío, una malla de 5 [μm] y una solución de 400 [mL] de ácido clorhídrico 16 [%]. Al terminar esta etapa, se pudo apreciar una torta de GO, la cual fue dispersada en un vaso precipitado de 2 [L] que contenía 1 [L] de agua destilada por medio agitación magnética a 200 [rpm] durante 15 [min]. El contenido del vaso se dejó sedimentar durante una noche, para permitir la formación de 2 fases, un sobrenadante café claro con óxido de grafeno altamente exfoliado¹⁴⁹ y una con barro de GO de menor exfoliación que se encontraba en el fondo del vaso. La primera fase fue separada y sometida a 4 ciclos de centrifugación de 6000 [rpm] durante 4 [min], en donde sólo se conservó el barro altamente exfoliado que se pegaba en las paredes de los vasos de centrifugación y se eliminó el sobrenadante. Los dos primeros ciclos se realizan sólo ocupando el sobrenadante y en los siguientes se utilizó agua destilada para realizar la dispersión del barro altamente exfoliado. Posteriormente, se efectuó una última centrifugación, a 9000 [rpm] durante 20 [min] y nuevamente se eliminó el sobrenadante formado por una fase líquida transparente. Por último, el barro altamente exfoliado fue recuperado utilizando una cuchara y almacenado en una placa Petri. Por otro lado, el sedimento con el barro de GO de baja exfoliación se dispersó en 1 [L] de agua destilada, se dejó reposar durante una noche, después se separó el sobrenadante que contenía las partículas con mayor exfoliación las que fueron sometidas a los mismos ciclos de centrifugación descritos anteriormente, con el fin de recuperar más barro de GO altamente exfoliado. Finalmente, el barro de GO altamente exfoliado almacenado en las placas Petri pasó a la siguiente etapa, donde pudo ser ocupado para la preparación de papel mediante los *Métodos B,C* o ser secado para obtener polvo de GO. Por otro lado, el barro de GO de baja exfoliación se almacena.

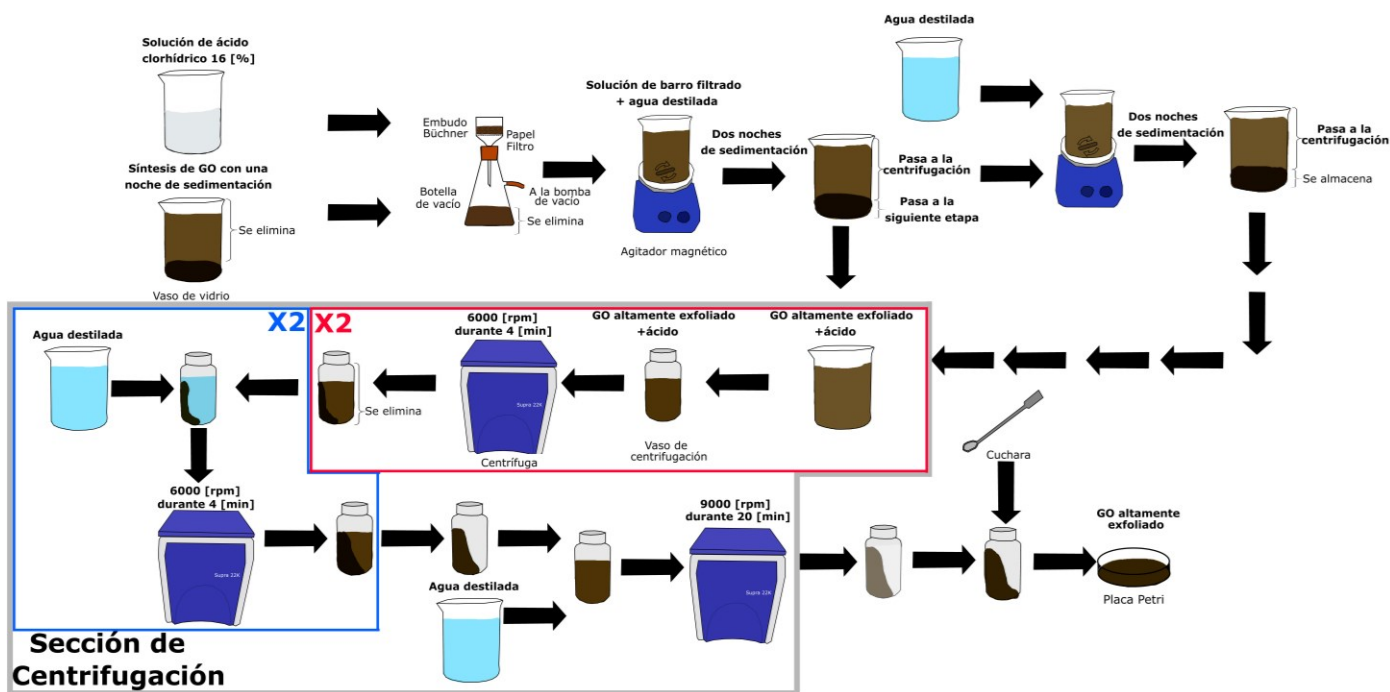


Figura 44. Diagrama de la Purificación 2 del GO

3.2.3 SECADO DE ÓXIDO DE GRAFENO

Una parte del barro de GO altamente exfoliado producto de la *Síntesis 2* y *Purificación 2* fue secado mediante calor durante 24 [h] en el horno de vacío a baja temperatura (60 [°C]) para prevenir la descomposición térmica del GO⁶⁷, formándose así unas estructuras como piedrecillas de GO. Estas fueron molidas ocupando un mortero de ágata, hasta la obtención de un polvo de tamaño uniforme.

3.2.4 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE QUITOSANO

Esta metodología fue propuesta por Wan et al., 2015⁸¹. Para comenzar, se prepararon 100 [mL] de una solución al 2 [%v/v] de ácido acético (98 [mL] de agua desionizada y 2 [mL] de ácido acético) en un vaso de 2 [L]. Después se agregó 1 [g] de quitosano para obtener una concentración de 10 [mg/mL] y se agitó la solución a 400 [rpm] durante 24 [h], procurando que el agitador estuviese funcionando correctamente durante las horas iniciales en que la viscosidad de la solución aumenta. Finalmente, la solución fue almacenada en tubos Falcon de 50 [mL].

3.2.5 PREPARACIÓN DE PAPEL

3.2.5.1 Método A: Papel GO

Este método (**Figura 45**) fue ocupado por Cruz-Silva et al., 2014¹⁴⁹. El barro de GO producido por medio de la *Síntesis 1* y *Purificación 1* fue esparcido en una placa de teflón pulida con un papel lija de grano 1200, utilizando una barra de teflón. El área del papel se delimitó por 2 o más capas de cinta scotch que además cumplieron la función de regular el grosor de este. Luego la muestra se secó por una noche mediante el flujo de aire de una campana de extracción de gases. Finalmente, se levantó el scotch y se sacó el papel.

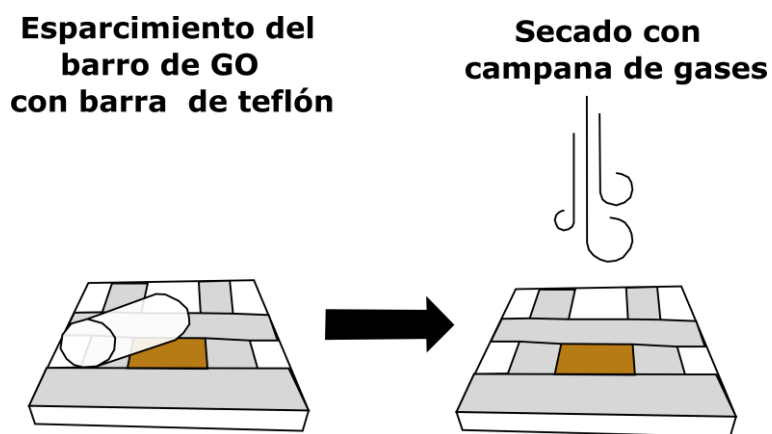


Figura 45. Método A: preparación de papel de GO

3.2.5.2 Método B: Papel GO y de GO/CS

Esta metodología (**Figura 46**) es una modificación de la utilizado por Cruz-Silva et al., 2014¹⁴⁹. Consistió en dispersar el GO producto de la *Síntesis 2* y *Purificación 2* de forma homogénea por medio de una espátula de teflón en una placa de teflón recientemente pulida (mediante papel de lija de grano 1200), en la cual se encontraban 2 o más capas de cinta scotch. Luego a esta sección se le aplicó aire caliente a través de la utilización de un secador de pelo por 10 [s], hasta que ocurriese la formación de una película homogénea de GO. Por otra parte, en el caso del papel híbrido luego de esparcir el barro de GO (mientras aún se encontraba húmedo) este fue cubierto con 0,0625 [mL] por cada [cm²] de papel de GO, con una solución de quitosano dispersado en 2 [%v/v] de ácido acético a una concentración de 10 [mg/mL] y después de eso se utilizó el secador. Finalmente, para ambos casos se retiró el papel al sacar los scotchs.

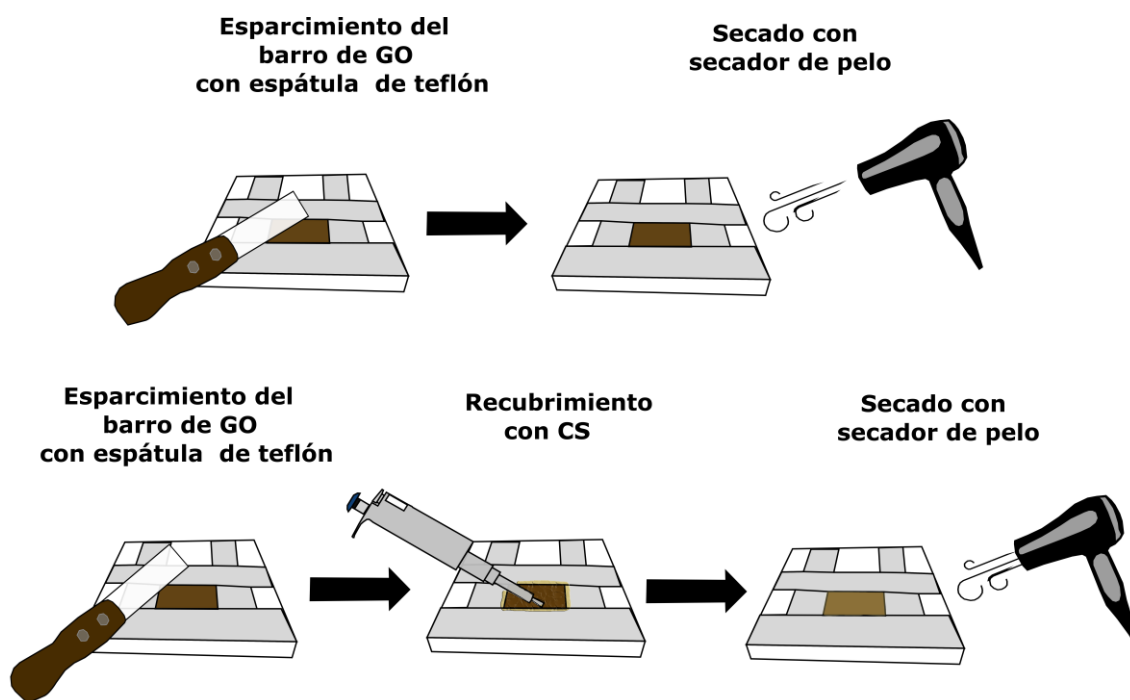


Figura 46. Método B: preparación de papel de GO y papel de GO/CS

3.2.5.3 Método C: Papel de GO, CS y de GO/CS

La tercera metodología, en la **Figura 47** es una combinación del *Método B* con el mostrado por Han et al.¹⁶⁷. En esta, el barro GO producto de la *Síntesis 2* y *Purificación 2* fue esparcido mediante la espátula sobre la placa de teflón que podía o no estar delimitada por scotchs. Posteriormente, sobre él se lanzó barro de GO más húmedo por medio de una micropipeta, hasta cubrirlo completamente. Luego se dejó secar por más de 24 [h] a temperatura ambiente hasta que se formase el papel, el que fue retirado por medio de una espátula de metal. Por otro lado, para el papel híbrido (al igual que en el método anterior), se esperó que se secase un poco el papel GO pero que aún estuviese húmedo, luego se recubrió con una solución de quitosano dispersado en 2 [%v/v] de ácido acético a una concentración de 10 [mg/mL] y se dejó secar por 24 [h]. Finalmente, para preparar el papel de CS no fue necesario utilizar la espátula, sólo se ocupó la micropipeta lanzar la solución y posteriormente se dejó secar esta sobre la placa de teflón, lo que tenía como objetivo la eliminación de agua y ácido acético.

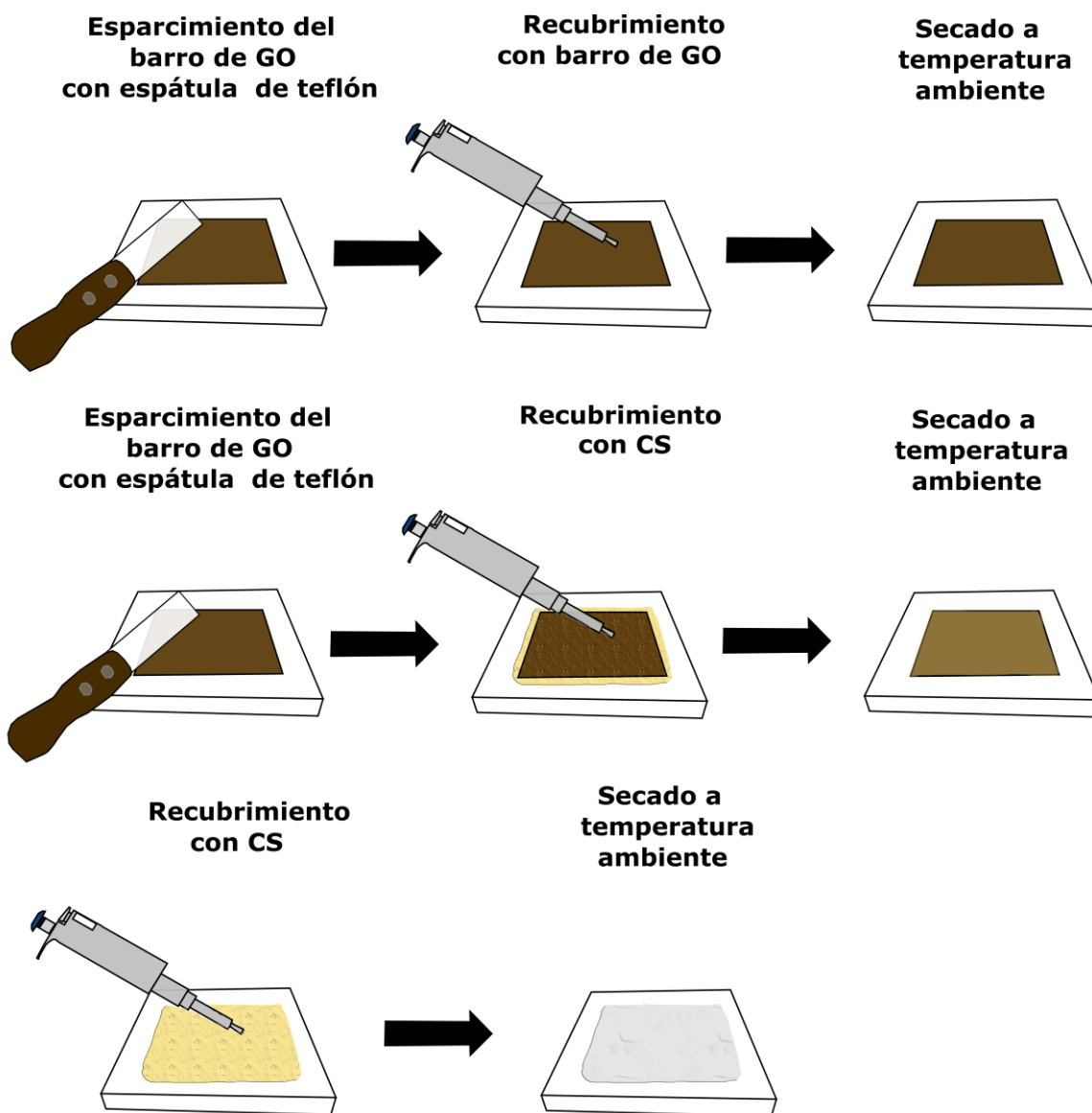


Figura 47. Método C: preparación de papel de GO, GO/CS y CS

3.2.6 ADSORCIÓN DE COLORANTES

Los ensayos de adsorción fueron efectuados ocupando el polvo de GO obtenido tras el secado del producto obtenido de la *Síntesis 2* y *Purificación 2*, papel de GO y el papel híbrido preparados mediante el *Método C*. Para las pruebas con papeles se utilizaron concentraciones de 200 – 800 [mg/L] de adsorbente (2 – 8 [mg] en 10 [mL]). Por otro lado, para las de polvo esta fue entre 600 – 1.600 [mg/L] (6 – 16 [mg] en 10 [mL]). El colorante utilizado fue azul de metileno (MB) en diferentes concentraciones (entre 50 – 600 [mg/L]), con el fin de elaborar las isotermas de adsorción para cada muestra. La razón tras la elección de este pigmento radica en que es un contaminante de aguas representativo, ampliamente utilizado en varias industrias⁹. Las pruebas se

realizaron en triplicado para volúmenes de 10 [mL] depositados en tubos Falcon de 15 [mL], los cuales fueron posicionados horizontalmente (para evitar que el adsorbente quedase retenido en el fondo del tubo) y agitados a 140 [rpm] por 1440 [min] a 30 [°C] en la incubadora con agitación, para asegurar que la adsorción llegase a su equilibrio (es decir, que la concentración se mantuviese constante). Tras terminar esta etapa, los tubos fueron centrifugados a 8.000 [rpm] durante 8 [min] para extraer el líquido claro sin partículas en suspensión cuando se hace el traspaso de 4 [mL] de solución a dos tubos Eppendorf de 2 [mL], los después también fueron centrifugados en las mismas condiciones para eliminar totalmente la fase sólido y así evitar que partículas de polvo o papel afectasen las mediciones en el espectrofotómetro UV-Visible. La longitud de onda ocupada para la determinación de la absorbancia en el azul de metilo fue de 665 [nm], fue obtenida a partir de un barrido espectral de una muestra de colorante a una concentración de 50 [mg/mL]. Por otra parte, anteriormente se construyó una curva de calibración entre absorbancia y concentración (Ver **Figura 65** en el **Anexo FIGURAS ADICIONALES**), cuya ecuación de la recta ($R^2 = 0,99$) es:

$$C_e = \frac{\text{Abs}}{0,2995} \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right] \quad (7)$$

Donde C_e es concentración de equilibrio y Abs es la absorbancia.

Los valores calculados fueron utilizados para determinar la capacidad de adsorción en el equilibrio, definida por⁶⁶:

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e) \cdot v}{m} \left[\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right] \quad (8)$$

En donde C_0 es la concentración inicial de MB [mg/L], v al volumen de solución [L] y m es la masa de adsorbente utilizado [g].

Finalmente, el valor de q_e (cantidad de azul catiónico adsorbido) se ingresó en las linealizaciones de Langmuir y de Freundlich (**ecuaciones 2-3** y **5-6**, respectivamente) para determinar sus parámetros y así poder entender de mejor forma el comportamiento entre el adsorbato y el adsorbente⁶.

3.2.7 PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS

Para determinar las propiedades antimicrobianas del polvo de GO (producido por medio de la *Síntesis 2* y *Purificación 2*) y de los papeles fabricados mediante el *Método C*, se utilizaron cepas de las especies *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), como bacterias modelo debido a que son Gram-negativo y Gram-positivo, respectivamente. Una razón para escoger estas bacterias es porque están presentes en aguas contaminadas⁶. Se realizó el ensayo en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. La esterilización de los materiales de laboratorio fue mediante autoclave y de las muestras de los materiales a evaluar se hizo través de 15 [min] de exposición a UV por cada cara. Por otro lado, las cepas bacterianas de *S. aureus* se cultivaron en Caldo de triptona de soja (TSB) y *E. coli* en Luria–Bertani (LB) y fueron incubadas a 37 [°C] durante 24 [h].

El Ensayo de contacto (*Kill kinetic assay*) se encuentra en la **Figura 48**. Este se inició tras cultivar las bacterias, cuando se inocularon 10 [mL] de medio en tubos de ensayo a una concentración de células de partida de $\sim 1,5 \cdot 10^8$ [CFU/mL] equivalente a McFarland 0,5 de bacterias, previamente calibrado mediante la utilización del espectrofotómetro UV vis a una longitud de onda de 600 [nm] para llegar a una absorbancia de 0,065 [–]. Posteriormente, se ingresaron en los tubos las muestras de papeles cortadas previamente en piezas cuadradas $1 \cdot 1$ [cm²] y de polvo de GO a una masa similar a las de papel de GO de esas dimensiones. Para calibrar la tasa de supervivencia celular se establecieron grupos de control (sin material antimicrobiano) y blanco, en que solo se agregaron medios de cultivo. Todas las pruebas antibacterianas se llevaron a cabo por triplicado, a los cuales se les calcularon los promedios y las desviaciones estándar. Los tubos fueron incubados durante 24 [h] a 37 [°C], y con agitación constante provista por el agitador del tipo *SunFlower* a la gradilla que contenía a los tubos en orientación vertical. Tras finalizar esta etapa, se dispersó el contenido de los tubos mediante la utilización de un agitador vórtex y se efectuaron diluciones de las muestras en Suero Fisiológico Estéril (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} para *E. coli* y 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} en *S. aureus*). Después se sembró 1 [μL] de cada dilución en placas, por medio de una micropipeta, y este volumen se dispersó uniformemente mediante un rastrillo. Las placas fueron incubadas nuevamente a las mismas condiciones y posteriormente se evaluó el rendimiento antibacteriano realizando un conteo del número de colonias.

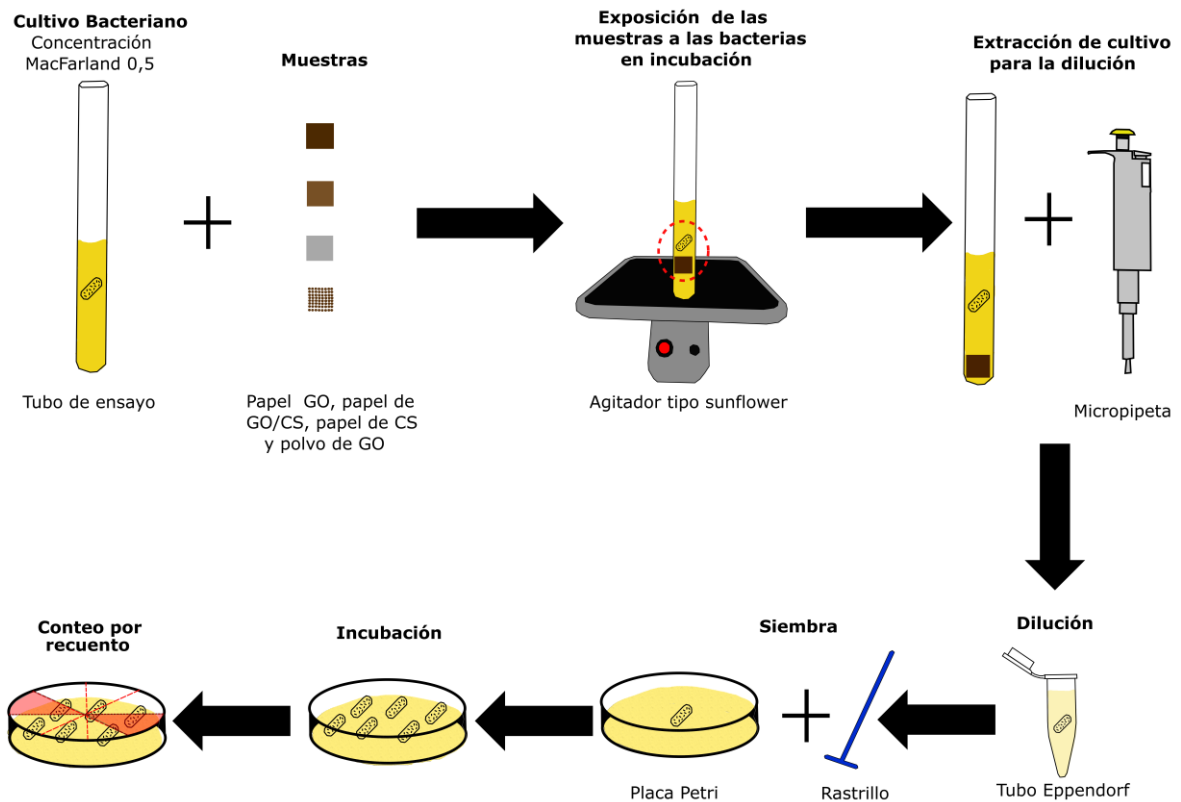


Figura 48. Diagrama del ensayo de contacto (Kill kinetic assay)

Se utilizó la siguiente fórmula para calcular las unidades formadoras de colonias por cada mililitro de solución:

$$\frac{\text{CFU}}{\text{mL}} = \frac{N_c}{v_i \cdot \text{FD}} \quad (9)$$

Donde N_c es el número de colonias en la placa, v_i el volumen inicial sembrado y FD el factor de dilución.

Más adelante a estos resultados se les realizó un análisis estadístico mediante el software Excel utilizando una prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales, en que se consideraron las muestras significativamente diferentes cuando $p < 0,05$.

Adicionalmente, se calculó el porcentaje de reducción de colonias a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de reducción [\%]} = \frac{N_{\text{control}} - N_{\text{muestra}}}{N_{\text{control}}} \cdot 100 \text{ [\%]} \quad (10)$$

Donde N_{control} y N_{muestra} corresponden al número de colonias calculado del experimento de control y de los materiales ensayados, respectivamente.

3.2.8 CARACTERIZACIÓN

3.2.8.1 Espectrofotometría infrarroja (FTIR)

El papel de GO fue caracterizado por medio de espectrofotómetro infrarrojo marca *Agilent* modelo *Cary 630* asistido con un accesorio reflectancia total atenuada (ATR) para comprobar que el material fuese GO, mediante la observación de los picos asociados a los enlaces característicos de este. El ensayo fue realizado en el Laboratorio de Nanobiomateriales de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y el espectro fue tomado en un rango de 500 – 4000 [cm⁻¹] a partir de una muestra de papel de GO.

3.2.8.2 Difracción de rayos X (XRD)

Esta metodología fue utilizada para el polvo de GO, papel de GO y de GO/CS, con el fin de determinar las estructuras presentes en las muestras y encontrar el ángulo de difracción característico. Los difractogramas fueron obtenidos desde un difractómetro de rayos X marca *Bruker* modelo *D8 Advance* con una radiación de CuK α ($\lambda = 1,56$ [Å]). Los ensayos fueron realizados en el Laboratorio de Cristalografía y Difracción de Rayos-X de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile.

Las distancias interplanares (d) de las estructuras analizadas se calcularon por medio de la ley de Bragg:

$$n\lambda = 2d \cdot \text{sen}(\theta) \quad (11)$$

Donde: n es el orden de reflexión (usualmente es utilizado como 1), λ es la longitud de onda del rayo incidente ($\lambda = 0,156$ [nm]) y θ es el ángulo de difracción característico, el cual se obtiene directamente del difractograma.

3.2.8.3 Espectroscopia RAMAN

Se utilizó la Espectroscopia Raman con el fin de dilucidar la estructura de los papeles y por ser una técnica de caracterización no destructiva. Para esto se ocupó un equipo de Imagen confocal de Raman de la marca *WITEC* modelo *Alpha 300* utilizando un láser verde de 532 [nm] como fuente de excitación. Este equipo pertenece al Laboratorio de AFM-Raman de la Universidad de Santiago de Chile.

Por otra parte, la determinación de la fracción I_D/I_G se realizó mediante la división de las áreas asociadas a las curvas de ajuste Lorenziano de los picos, efectuado mediante el software OriginPro.

3.2.8.4 Microscopia electrónica de barrido (SEM) y microanálisis de rayos x con dispersión de energía (EDS)

Para las imágenes SEM se utilizó el equipo de microscopio de barrido electrónico con cátodo de emisión de campo *FESEM Quanta 250 FEG* ubicado en el Centro UC de Investigación en Nanotecnología y Materiales Avanzados. Este equipo estaba equipado con Octane Pro de EDAX, dispositivo que se incorpora al microscopio para brindarle la capacidad de realizar análisis EDS. El papel de GO/CS fue congelado en nitrógeno líquido e inmediatamente quebrado. Todas las muestras fueron recubiertas con oro en el Laboratorio Microscopio de Transmisión de Alta Resolución (HR-TEM) de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile, previo a la toma de fotografías.

4 RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 PREPARACIÓN DE PAPEL

Los papeles fabricados son presentados en la **Figura 53**. Inicialmente para la preparación del papel se ocupaba el GO de la *Síntesis 1*, que es una modificación del método de Marcano et al.⁵⁹ y luego se le aplicaba la *Purificación 1* partir de un proceso inspirado por el reportado Cruz Silva et al.¹⁴⁹. Posteriormente el papel se fabricaba con el *Método A* inspirado en el trabajo de Cruz Silva et al.¹⁴⁹. De este procedimiento sólo se pudo obtener en una ocasión papel, en pequeños trozos y que eran muy frágiles al tacto, ver **Figura 49A**. Cabe destacar que se realizaron aproximadamente 20 experimentos y los resultados fueron usualmente el de pequeñas islas de GO (**Figura 49B**), lo que puede ser explicado por problemas asociados a la barra de teflón porque esta poseía defectos macroscópicos (ver **Figura 49C**), a diferencia de la que ocupaban en el trabajo mencionado anteriormente, la que sólo tenía defectos microscópicos¹⁴⁹. Esto pudo haber provocado que los trazos no fuesen del todo uniforme lo que sumado con la pérdida de agua asociada al secado y al bajo tamaño de las nanoláminas de GO producidas por el método de síntesis (debido a las 12 [h] de oxidación proceso¹⁴⁸), provocasen que no se pudiese formar una lámina uniforme, lo que se puede observar a simple vista en las islas de GO que se ven en el resultado fallido.

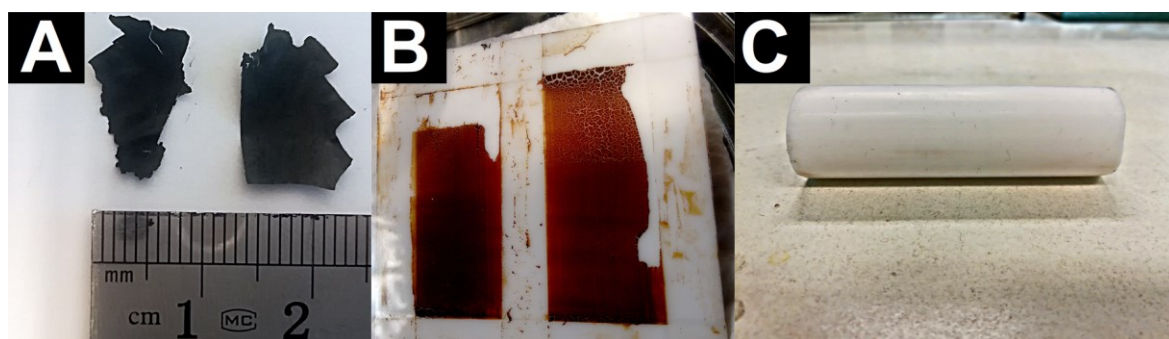


Figura 49. Método A: A) pequeños trozos de papel fabricados, B) papel fallido y C) barra de teflón

Debido a lo anterior y a la imposibilidad de conseguir hojuelas de grafito de mayor tamaño, se utilizó otro método de síntesis de GO que asegurase láminas más grandes^{59,88,148}, pasando de un tiempo de oxidación de 12 [h] a uno 7 [h] lo que implica menos reacciones fuertes, permitiendo disminuir la ruptura de las láminas de GO durante el proceso¹⁴⁸. La razón de la vinculación de este nuevo método con reacciones de menor intensidad, y dicho de otra manera a una menor oxidación⁷³, es por el color marrón del GO obtenido en vez del color café claro/anaranjado de la síntesis utilizada anteriormente, lo que se puede ver en la **Figura 50**. Considerando que se necesitan láminas de GO de mayor tamaño, debido a que esto está asociado a una mayor facilidad de acoplarse entre ellas para la formación del papel¹⁴⁸. Este comportamiento se podría

explicar debido a que un incremento del tamaño de las láminas provoca una disminución en las fuerzas de repulsión vinculadas a sus esquinas¹²², ya que habría un menor número de estas últimas. Adicionalmente, se ocupó una espátula de teflón, porque permitía eliminar de manera más fácil sus defectos mediante un lijado y posibilitaba mantener un trazo uniforme. De esta forma se desarrolló el *Método B* en el que se utilizó un secador de pelo para quitar el exceso de agua en la lámina, causando la formación del papel.

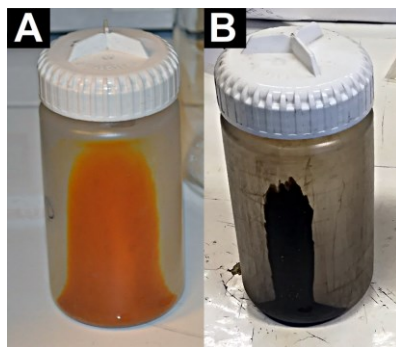


Figura 50. GO A) de color café claro/naranja de la síntesis antigua B) de color marrón producido por la metodología de síntesis nueva

El problema asociado a esta metodología fue que se obtuvo un papel poco resistente al tacto y translúcido. A pesar de esto, en muchas ocasiones las muestras al ser secadas se quebraron, provocando que sólo una pequeña porción uniforme de la lámina pudiese ser recuperada, ver **Figura 51A.B.**

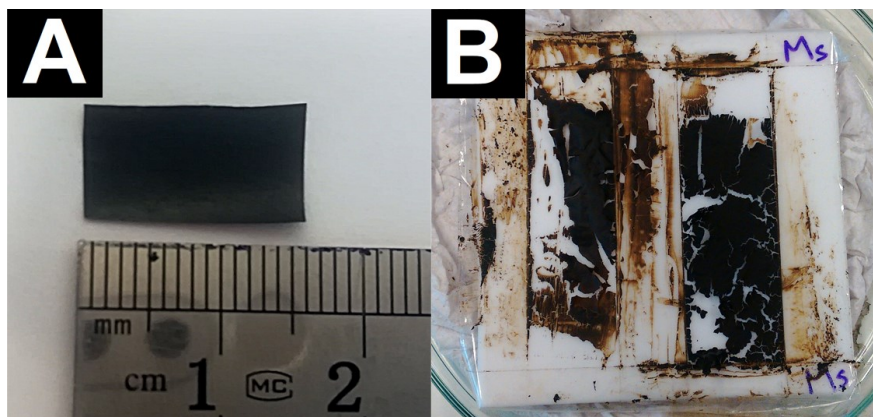


Figura 51. Método B, A) Papel exitoso y B) Papel fallido quebrado

En paralelo a estas pruebas, se comenzó a utilizar el *Método B* en conjunto con otros componentes, para así formar un material híbrido que tuviese propiedades de ambos. Se utilizó cloruro de cobre (CuCl_2), cloruro de calcio (CaCl_2) y quitosano, ver **Figura 52**. Los primeros dos componentes fueron inspirados por el trabajo de Park et al.¹⁵⁰ asociado a la mejora de propiedades del

papel de GO mediante la utilización de iones divalentes y de donde se inspiró la etapa de unir los compuestos cuando el papel se encuentra húmedo, debido a que aquello permite que el refuerzo permee con mayor facilidad versus la estructura de láminas ya apiladas de los papeles secos. Con los dos primeros materiales no se obtuvieron mejoras significativas, los iones divalentes no proporcionaron la capacidad de obtener láminas más grandes cuando se aplicaba el secador o cuando se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, con el quitosano se tuvo una mejora en las propiedades, ya que permitió obtener láminas más grandes, homogéneas, más flexibles y resistentes al tacto que su contraparte de GO prístino. El aumento en las propiedades mecánicas se pudo notar inmediatamente al aplicar el secador de pelo, debido a que el papel se rompía en pedazos más grandes en contraste a la ausencia del polímero. A pesar de esto, sólo se consiguieron láminas de $2,0 \cdot 1,5$ [cm²], por lo que se siguió buscando la forma de elevar esas dimensiones. Adicionalmente con este polímero, se probó agregando 1 [mL] de una solución 6 [%p/v] Hidróxido de sodio sobre el papel híbrido húmedo (como recomendaba Wan et al.⁸¹) para ajustar la distribución de cargas entre los componentes, lo que provocó la formación de “cráteres” en el papel, los que le restaban uniformidad a las muestras, por lo que se omitió el uso de este compuesto, ver **Figura 52F**.

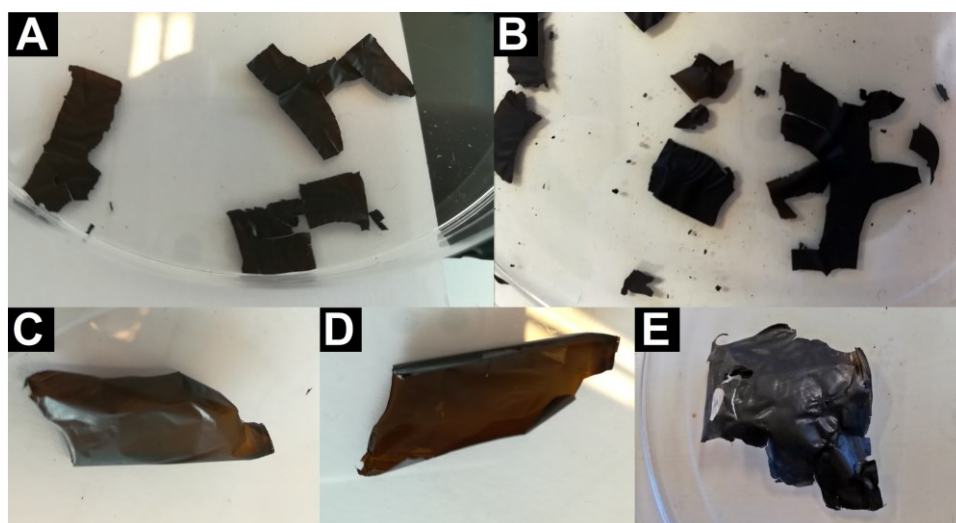


Figura 52. Papeles compuestos preparados mediante Método A, A) GO/CuCl₂, B) GO/CaCl₂, C-D) GO/CS cara CS y cara GO, E) GO/CS bañado con hidróxido de sodio

Posteriormente, se realizaron modificaciones al *Método B* las que consistieron en que después realizar el trazo de barro de GO, el área cubierta por este fue mojada con unos pocos mililitros de un barro más húmedo y además se modificó la forma de secado, el cual se realizó a temperatura ambiente durante 24 [h]. Estos cambios cumplían el propósito de humectar al papel y permitir un secado más paulatino, reduciendo la tasa de evaporación del agua. La razón de esto radica en que la cantidad de agua se ha asociado reiteradamente con las propiedades mecánicas del papel de GO^{118,120,128} debido a que las moléculas forman puentes entre las nanoláminas adyacentes de la estructura (convirtiéndose en una red de enlaces de hidrógeno) lo que se traduce en un

incremento de la transferencia de tensión. A partir de esto se preparó la muestra de la **Figura 53A,B** por medio del *Método C*, en que se observa un papel de GO uniforme, color café oscuro y de 7 [μm] de espesor (mayor que los espesores de 2,9 y 5,4 [μm] señalados por Cruz Silva et al.¹⁴⁹ y 4 – 7 [μm] usualmente reportado para los fabricados por medio de filtración al vacío^{70,81}, y menor que los de 9 – 11 [μm] fabricados por Zhang et al.¹²⁹), de morfología similar a los fabricados mediante filtración al vacío^{30,85,118}, que posee una excelente flexibilidad y que pueden llegar a tener dimensiones de hasta 3 · 2 [cm²]. Los papeles fabricados mediante este método fueron posteriormente utilizados en las pruebas de caracterización, adsorción y antimicrobianas.

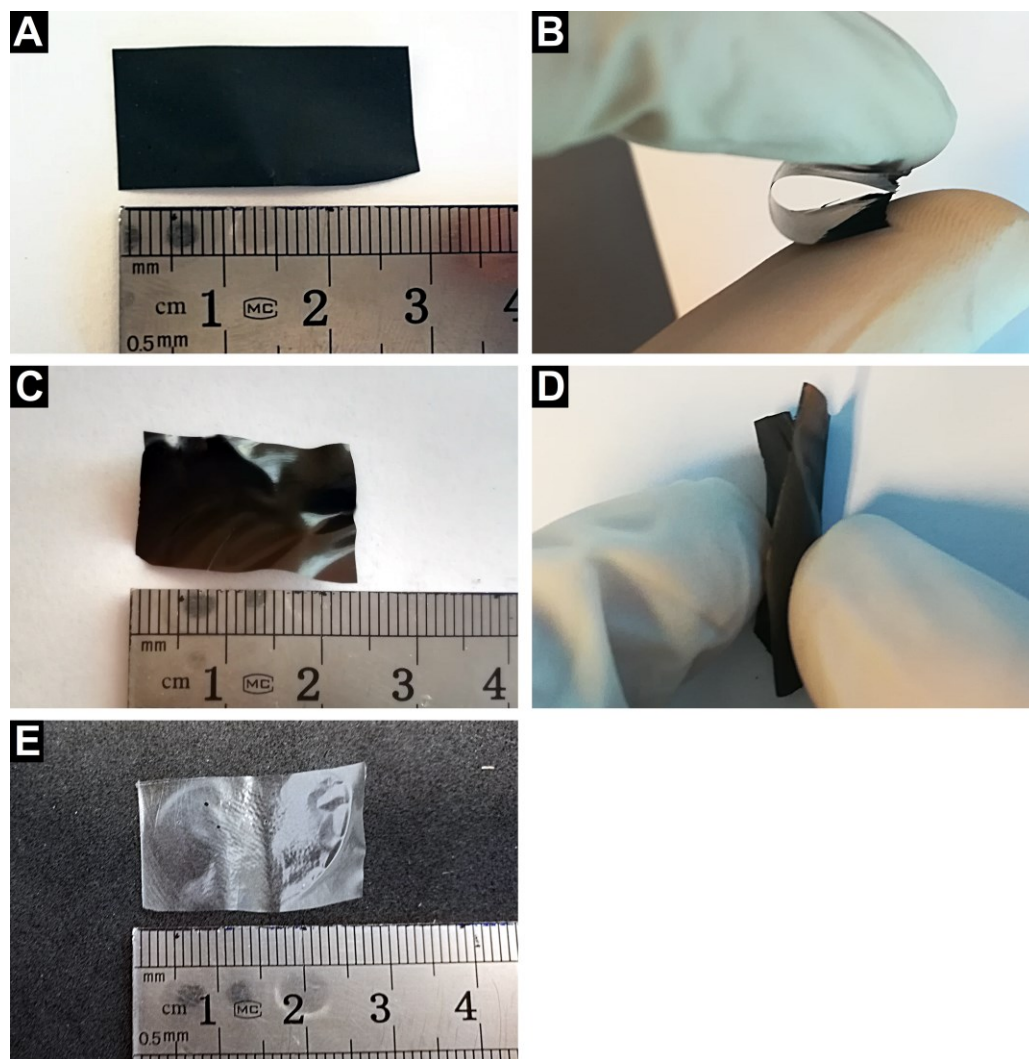


Figura 53. Método C, Morfología de los papeles A) y B) papel de GO, C) y D) papel de GO/CS y E) Papel de CS

A pesar de las mejoras obtenidas por esta metodología, esta no estuvo exenta de problemas, debido a que el control del secado no es el ideal, ya que no se puede obtener deliberadamente un papel con la concentración óptima de agua de un 7 [%p/p]¹²⁸. Este método requiere de un monitoreo constante de las condiciones de secado para evitar la formación de “estrías” en el papel

que desencadenan su ruptura, lo que se puede ver en la **Figura 54**. En las imágenes a contraluz de la imagen **D** se revelan que incluso los papeles de GO que no se quebraron también presentan estrías (marcadas en óvalos azules), las cuales no alcanzaron a generar rupturas. Adicionalmente, en esas imágenes muestran que el trazo no es del todo uniforme, lo que se asocia principalmente a irregularidades de la placa y de la espátula de teflón. Se ha de destacar que las “estrías” no son provocadas por la acción de la espátula, debido a que una placa de vidrio que fue recubierta con una solución de GO y que se formó un papel delgado también las presenta. Por otra parte, las ventajas de este método es que es simple y menos costoso que el de filtración al vacío, ya que se hubiese requerido comprar filtros de membrana de *Anodisc Alumina*, los cuales puede ser adquiridos desde *Sigma Aldrich* a un valor en el rango de 700.600 – 1.601.660 [CLP]¹⁶⁸, con los que además se corre el riesgo de contaminar el papel por medio de iones Al^{+3} ^{123,147}.

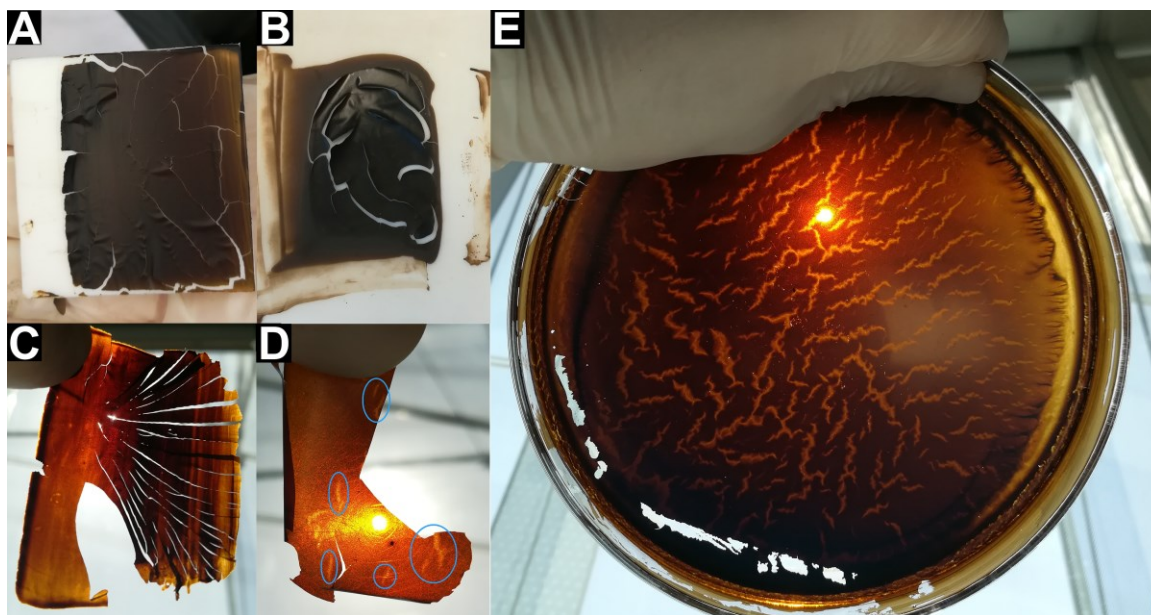


Figura 54. Papeles preparados a partir de Método B: A-B) Formación de estrías C) Papel con estrías a contraluz D) Lámina de papel con estrías (marcadas en azul) que no presentaron ruptura E) Presencia de estrías en lámina fabricada mediante recubrimiento de placa de vidrio

Por otra parte, siguiendo con la búsqueda de láminas de papel híbrido de mayor tamaño respecto al *Método B*, se aplicó la nueva metodología *C*. Con esta se obtuvo el papel de la **Figura 53C,D**, que comparado con el de sólo GO tiene un color café más claro, posee brillo en la cara bañada en quitosano, tiene ~ 13 [μm] de espesor (mayor que el rango de $4,7 - 6,0$ [μm] reportado por Wan et al.⁸¹ que fabricaron mediante filtración al vacío), posee una mayor flexibilidad (puede ser doblado extensamente con facilidad) y resistencia al tacto que la otra muestra. Es último punto podría ser justificado debido a interacción entre el CS con la matriz del nanomaterial, lo que dificultaría la ruptura del material. Este comportamiento fue observado por Zuo et al.¹⁵⁷ cuando

fabricó un nanocompósito en que la matriz era de CS y el GO cumplía el rol de refuerzo, además de los otros trabajos mencionados para compuestos de GO y CS en el estado del arte. Por otra parte, es importante mencionar que con este método se obtuvieron muestras con las mismas dimensiones, pero con masas distintas, lo que indica que no se pudo obtener un papel estandarizado a lo largo del procedimiento. A pesar de esto, se ha de destacar que la fabricación de compuestos híbridos de GO/CS con alto contenido del primero es difícil de obtener⁸¹, por lo que la fabricación del papel en sí ya se puede considerar como un logro.

Finalmente, se preparó un papel de quitosano en la **Figura 53E** mediante el *Método B*, obteniéndose así una película dura, flexible, transparente y con imperfecciones asociadas a la placa de teflón. Las propiedades de este papel se deben a la estructura lineal de los polisacáridos¹⁵⁴. Este papel es similar al preparado por Zuo et al. en el año 2013 mediante el recubrimiento de una placa Petri de plástico¹⁵⁷.

4.2 CARACTERIZACIÓN

4.2.1 DIFRACCIÓN DE RAYOS X (XRD)

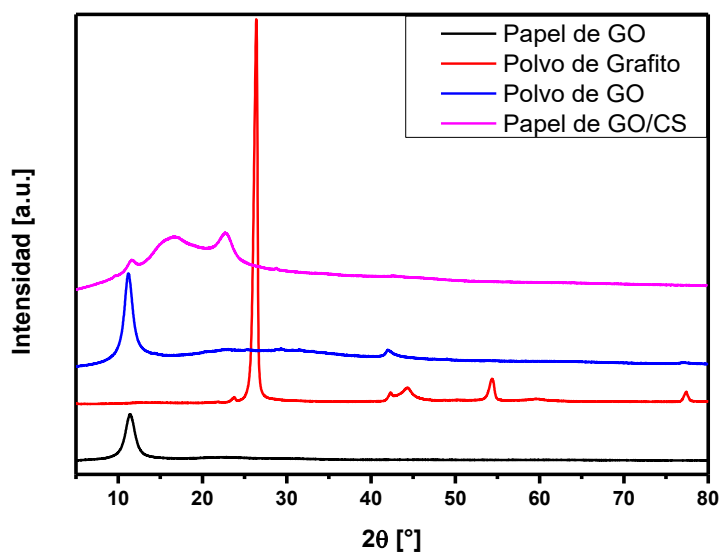


Figura 55. Patrones de XRD Papel de GO, Polvo de Grafito, Polvo de GO y Papel de GO/CS

Se realizó Difracción de Rayos X con el fin de analizar las fases cristalinas de los materiales, como se muestra en la **Figura 55**. Comparando el difractograma del Polvo de Grafito con el del Papel de GO fabricado por medio del *Método C*, el primero muestra unos agudos y fuertes picos cercanos a $2\theta = 26,34$ [°] y $54,34$ [°], los que corresponden a los planos reflectivos (002) y (004) del grafito^{21,43,67}, correspondientemente. Estos picos se ubican en ángulos similares a los

reportados en la literatura^{66,67,70,73,92,169,169,170}. Por otro lado, en el difractograma del Papel de GO se puede observar un pico en el $2\theta = 11,43$ [°], el cual se asocia al plano (002)^{21,41,63,66,67} o (001)^{6,68,149,169-171} (lo que depende de la bibliografía consultada) y que indica que este mantiene la estructura laminar del grafito, confirmando así que el compuesto sintetizado es GO^{41,73}. Adicionalmente, en este difractograma o se presenta un remanente del pico característico del grafito en el $2\theta = 22,50$ [°] correspondiente a dominios sp^2 aún presentes^{67,68}. Este pico es bastante leve por lo que se puede comprobar que el GO fue altamente oxidado^{43,66,73}.

Además, se calcularon las distancias interplanares para el polvo de grafito y este papel de GO, por medio de la ecuación de Bragg (**ecuación 11**), las cuales fueron de aproximadamente 0,35 [nm] y 0,79 [nm]. Estos valores se explican debido a que tras la oxidación del grafito, la distancia d se incrementa como resultado de la intercalación de grupos funcionales que contienen oxígeno en las capas^{21,43,66,73,171}, además son consistentes con lo reportado anteriormente^{21,41,43,66,68,73,170}. A pesar de esto, la distancia para las láminas de GO inferior al publicado en otros trabajos, que está dentro de un rango de 0,83 – 0,89 [nm]^{63,67,73,81,118,167,169,170} lo que se puede asociar a un menor grado de oxidación (donde abrían menos grupos funcionales⁶⁸) o porque esa distancia se ha asociado a una capa de una molécula de agua de ancho que se encuentra unida mediante enlaces de hidrógeno en las capas de óxido de grafeno¹¹⁸, por lo que puede que la muestra de GO evaluada en este trabajo puede que tuviese una menor cantidad de agua⁶⁸.

En segundo lugar, comparando el difractograma del Papel de GO fabricado por el *Método C* y en su forma de polvo, en este último aparece un nuevo pico amorfo entre $2\theta = 17,50 - 39,28$ [°] el que puede corresponder a la suma del plano reflectivo (002) del grafito con el halo amorfo del vidrio^{172,173} que se utilizó como porta muestra (Ver **Figura 66** en el **Anexo FIGURAS ADICIONALES**). Por otro lado, el pico característico del GO en polvo cambia de posición a $2\theta = 11,17$ [°], lo que da como resultado un incremento en la distancia entre planos a 0,81 [nm] (en comparación al 0,79 [nm] del papel). Este aumento puede ser justificado por una mayor presencia de agua en el polvo (lo que sería consistente con la mayor intensidad de este pico, ya que se ha reportado que a mayor cantidad de agua entre las capas la distancia d aumenta¹⁷¹), debido a que este sólo se secó a 60 [°C] durante 24 [h] y existen referencias en que se recomienda posteriormente realizar un secado adicional a 120 [°C]⁶⁸ (no más temperatura, para evitar la descomposición de los grupos funcionales del GO⁶⁸) para eliminar los restos de agua. Otra razón para poder justificar esta modificación de los picos puede ser debido a un error del equipo utilizado para medir, vinculado con la posición/altura/cantidad de muestra ocupada en la prueba. Por otro lado, el polvo de GO presenta un pico adicional en $2\theta = 41,98$ [°], el que se asocia a al plano (100)^{43,63,67}, representa a un remanente de la estructura del grafito no completamente distorsionada por medio de la oxidación⁴³, y que también se ha reportado en los difractogramas de rGO¹⁷⁴. Ese pico desaparece en el papel de GO lo que se puede deber a un cambio en el orden de las láminas (explicado anteriormente por la interacción de las esquinas en

esta morfología) o debido a contaminación de las muestras, lo que puede alterar la cristalinidad provocando los difractogramas se alteren.

En el transcurso de la revisión bibliográfica se buscó algún trabajo en donde se comparasen los difractogramas del GO en estas dos morfologías. Lamentablemente no se encontró nada, lo más similar fue el trabajo de He et al.¹⁷⁵ en el año 2015 donde compararon papel y polvo de grafeno. En el difractograma del primero encontró un pico que no estaba presente en el segundo, asociado al $2\theta = 23,7$ [°] y que sugería un apilamiento $\pi - \pi$ entre las láminas de grafeno en el papel, presumiblemente inducido por la presión capilar durante la evaporación del agua. Volviendo a los difractograma mostrado en esta sección, ese pico no se observa en ninguna de las muestras que contienen GO.

En tercer y último lugar, se comparó el difractograma del papel de GO y del Papel Híbrido, ambos preparados mediante el *Método C*. En el del segundo material hay un pico en $2\theta = 11,60$ [°], lo que puede representar un remanente de la estructura del óxido de grafeno, cuya distancia entre planos es de 0,78 [nm]. Esto se podría tomar como una evidencia de que el CS no se haya insertado entre las láminas o que esto fuese en baja cantidad. En las referencias se ha reportado que cuando un polímero se inserta entre las nanoláminas el espacio entre estas aumenta^{125,152}, como en el caso de Wan et al. en el año 2015⁸¹ cuando insertó CS en las nanoláminas de GO. Por otra parte, los picos en $2\theta = 16,71$ y $22,79$ [°] se asocian al quitosano y son similares a los presentes en las películas de quitosano puro^{4,161,167}, por lo que el papel híbrido presenta un estado generalmente amorfo de este polímero¹⁶⁷ y una estructura desordenada⁸¹, debido a la influencia del CS en las propiedades cristalinas. Por medio de estos resultados se comprobó que se fabricó un material bifásico que posee una mezcla de las estructuras del GO y del CS y que el difractograma obtenido es similar al mostrado para los compuestos de GO/CS en el trabajo de Wan et al. 2014⁸¹ y al de los compuestos de CS/GO Wang et al.^{4,161} en el 2014 y 2015.

4.2.2 ESPECTROFOTOMETRÍA INFRARROJA DE TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

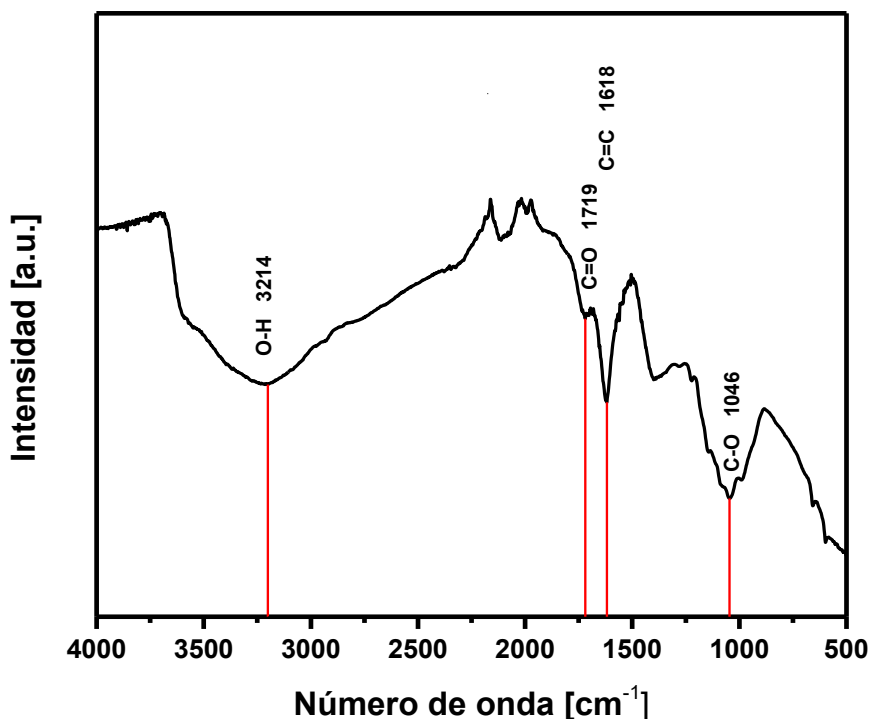


Figura 56. Espectro infrarrojo de transformada de Fourier de papel GO

Se ocupó este análisis obtener un espectro del papel de GO fabricado mediante el *Método C*, ver **Figura 56**, que permitiese confirmar la exitosa oxidación de grafito a GO y para estudiar los distintos tipos de grupos funcionales en un rango de 4000 – 500 [cm⁻¹], señalando las bandas más representativas. El FTIR muestra un pico en 3214 [cm⁻¹] se asocia a la vibración de estiramiento de O-H de las moléculas de agua intercaladas y de los grupos hidroxilo del GO^{21,41,66-68,70,167,169}, presentes en los ácidos carboxílicos (-COOH) y alcoholes (-COH) en los extremos y base de las hojas de GO⁶⁷. Por otro lado, la banda del 1719 [cm⁻¹] se debe a las vibraciones de estiramiento de C=O de los grupos de ácido carboxílico y carbonilo^{21,41,70,73,169}. También se observa una banda en 1618 [cm⁻¹] debido a la presencia de un estiramiento en los enlaces aromáticos de la estructura⁶⁷, C=C en los dominios de grafiticos no oxidados^{21,41,66,70,73,167,169}, una resonancia debido al estiramiento y absorción de grupos hidroxilo en el GO⁷³ o incluso se ha asociado a la deformación moléculas de aguas adsorbidas^{21,70}. Finalmente, está la banda en 1046 [cm⁻¹] asociada a las vibraciones de estiramiento de CO^{66,67,70,73,169}. Cabe destacar que uno de los problemas de la caracterización mediante FTIR es que ocurre una superposición de picos asociados a las moléculas de agua y grupos funcionales que poseen oxígeno⁶⁸, por lo que se hace necesario aplicar un método de secado más efectivo y otros métodos de caracterización para complementar los resultados obtenidos por este.

4.2.3 ESPECTROSCOPIA RAMAN

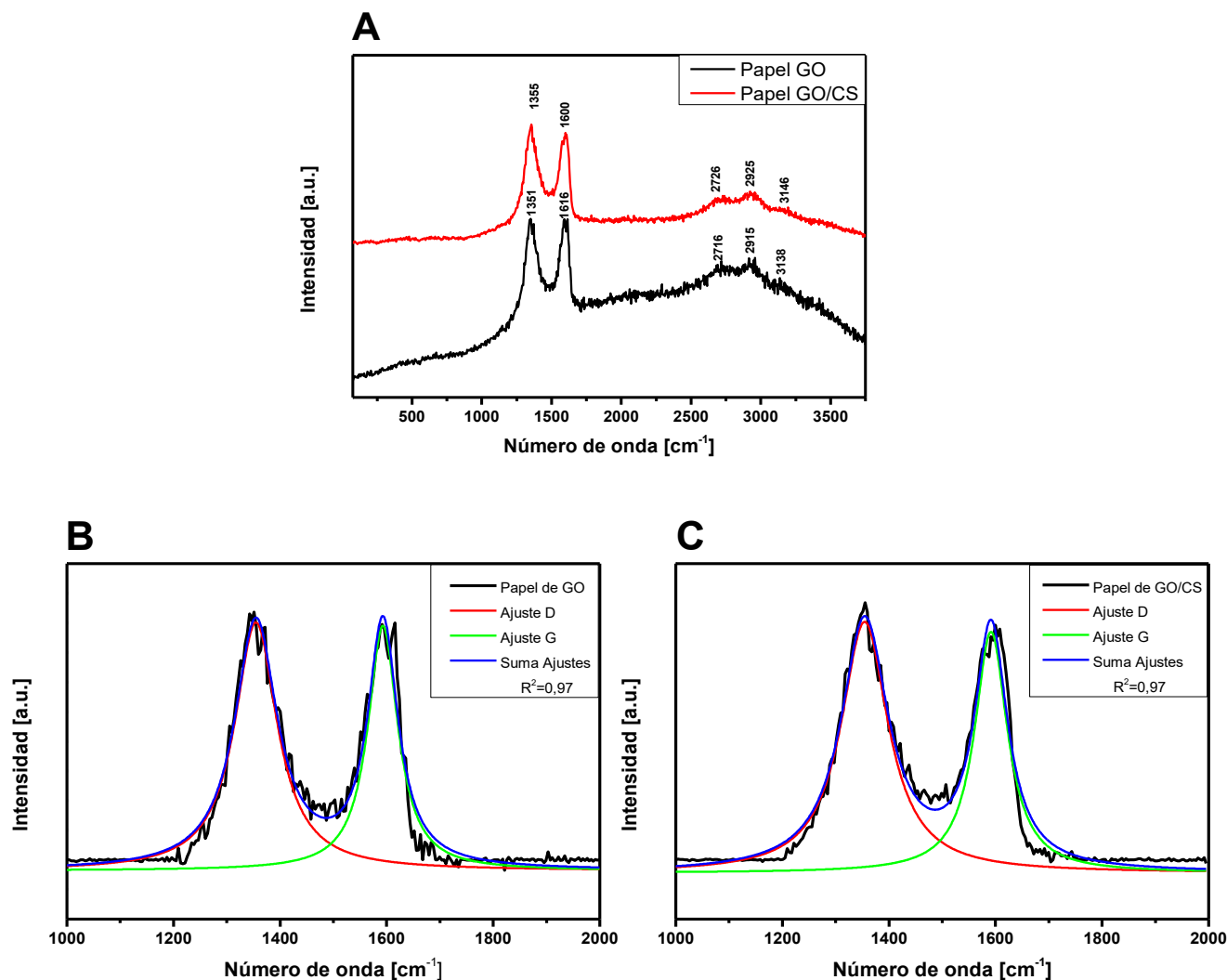


Figura 57. A) Espectro de Raman para Papel de GO y Papel de GO/CS B) Ajuste con funciones Lorentzianas de los picos D y G del Papel de GO C) Ajuste con funciones Lorentzianas de los picos D y G del Papel de GO/CS

Se utilizó la Espectroscopia Raman con el fin de dilucidar la estructura de los papeles y porque es una herramienta estándar rápida, sensible y no destructiva para la caracterización de materiales basados en carbono y polímeros^{70,73,92,169,176}. Las características principales presentes en los espectros asociados a materiales basados en grafito son las bandas D, G y 2D¹⁷⁶. Los resultados se pueden ver en la **Figura 57**.

En el papel de GO la banda D ($1351 \text{ [cm}^{-1}\text{]}$) está asociada a imperfecciones estructurales (como vacancias, por ejemplo) generadas por los grupos funcionales^{41,69,87,87,92,169,176}, por otra parte la G ($1616 \text{ [cm}^{-1}\text{]}$) se asocia al estiramiento del enlace C-C en los materiales de grafito y está en

todos los sistemas de carbono sp^2 ^{41,87,92,169}. Estas bandas se pueden descomponer en siete más, que se pueden atribuir a los modos de Raman que son activados por vacancias, defectos y distorsiones, provocado por los grupos funcionales a la hoja de grafeno⁶⁷. Por otra parte, la forma de estos picos y ubicación se asemeja a los de GO's altamente oxidados encontrados en la bibliografía consultada^{41,67,69,70,73,81,87,92}, lo que coincide los resultados del FTIR y XRD. Adicionalmente, las bandas 2D (2.716 [cm^{-1}]), D+G (2.915 [cm^{-1}]) y 2G (3.146 [cm^{-1}]), cuyas intensidades son leves en comparación a la D y G, poseen la forma asociada a un GO con alto grado de oxidación, que muestra la ruptura del orden de apilamiento grafitico AB en GO⁷³. La banda 2D es muy sensible a los cambios en el número de capas de GO¹⁷⁷.

Por otro lado, en el espectro del híbrido también se puede ver las características principales de los espectros de materiales de grafito, donde la banda D aumentó a 1.355 [cm^{-1}] y la G disminuyó a 1.600 [cm^{-1}], lo que se puede relacionar con un error en la medición del equipo o a una alteración de la superficie del GO debido a enlaces químicos entre los grupos funcionales del CS con los carbonos del GO¹⁷⁸. Un comportamiento similar ocurrió con la bandas 2D en 2.726 [cm^{-1}], lo que puede denotar una modificación en las capas del GO luego de la unión con el polímero, lo que en conjunto con lo escrito anteriormente indica que los componentes están unidos¹⁷⁸, lo que es consistente con lo obtenido con uno de los escenarios planteados tras analizar el difractograma del papel híbrido en los resultados de XRD.

Por otra parte, para calcular la fracción I_D/I_G asociada al papel de GO y al híbrido (y que usualmente se aplica para evaluar el desorden de la red cristalina de los derivados de grafito⁶⁶) se ajustaron los picos D y G por medio de funciones Lorentzianas. Los valores obtenidos fueron 1,44 [-] y 1,50 [-], los que implican una gran presencia de grupos funcionales. Ya que a medida que aumenta la fracción I_D/I_G implica que se incrementan los defectos presentes en el papel híbrido debido a la mezcla de componentes^{88,178}. Esto refuerza los resultados obtenidos de las caracterizaciones previamente expuestas y que son bastante similares a los reportados el trabajo de Wan et al.⁸¹ que para un papel de GO obtuvo un valor de $1,41 \pm 0,08$ [-] y en el caso de un papel con matriz de GO y 5 [%p/p] de CS fue de $1,52 \pm 0,26$ [-].

4.2.4 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM) Y MICROANÁLISIS DE RAYOS X CON DISPERSIÓN DE ENERGÍA (EDS)

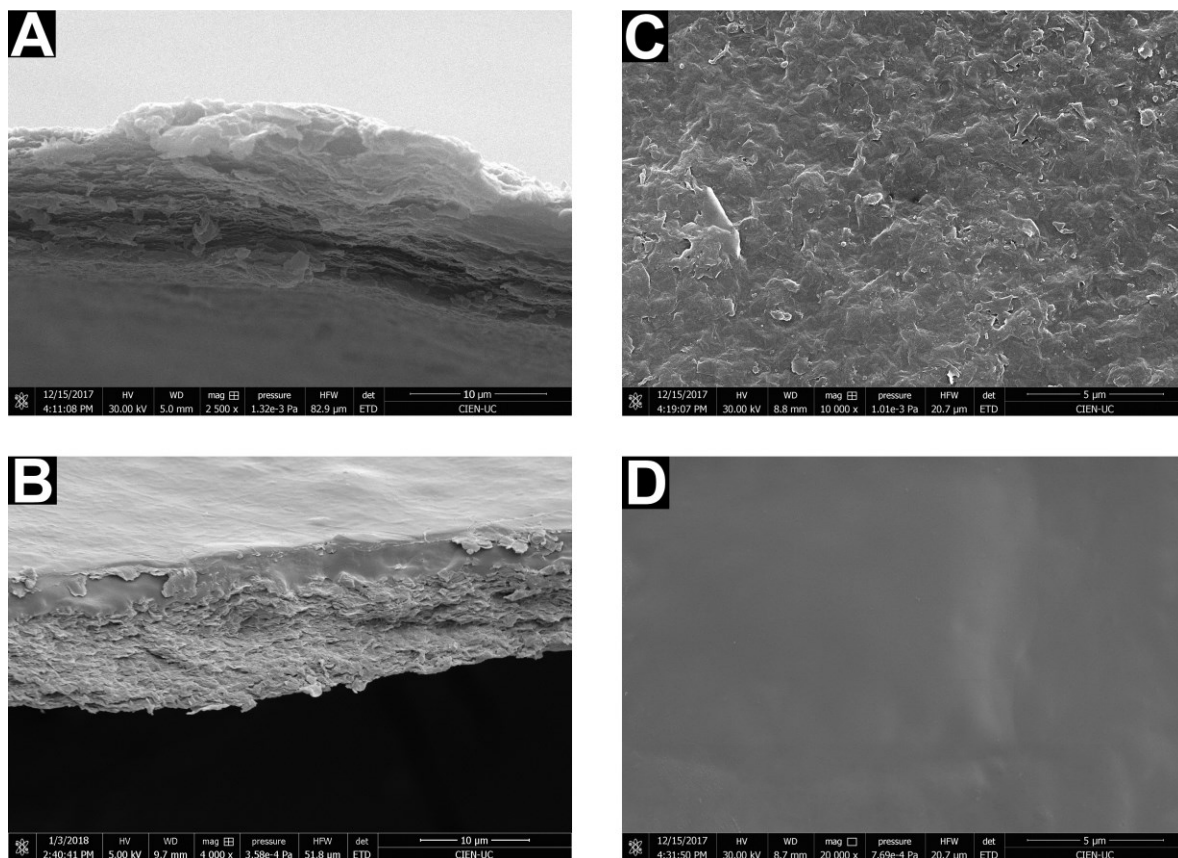


Figura 58. Fotografía SEM de A-B) sección transversal y superficie C-D) de Papel de GO, Papel de GO/CS, respectivamente.

Se sacaron fotografías SEM, en la **Figura 58**, con el objetivo de estudiar la morfología de los papeles. En primer lugar, en la **Figura 58A,C** se muestra las capturas fotográficas de la sección transversal y superficial del papel de GO. En la primera se observan láminas bien empaquetadas a través de la sección transversal que tiene un ancho de 7 [μm], también observable en reportes sobre papel de GO^{30,81,118}. Adicionalmente, se debe destacar que el orden de las capas presente en esta muestra es menor a los reportados en otros trabajos^{30,70,85,118,129,151}, lo que puede ser justificado debido a que la espátula y la placa de teflón posee ciertas defectos y rugosidades que impiden efectuar un trazo completamente uniforme¹⁴⁹, lo que posiblemente cause esta distribución menos ordenada a diferencia de lo que ocurre mediante la filtración al vacío o por recubrimiento de placas, por nombrar algunos. El argumento asociado a los implementos de teflón cobra más fuerza al observar la imagen C, debido a que la superficie del papel no es regular, ya que tiene láminas de GO orientadas de distinta forma y en diferentes profundidades (lo que se puede notar por el contraste de la superficie).

En segundo lugar, en la **Figura 58B,D** se ve la sección transversal y la superficie del papel de híbrido por la cara bañada en quitosano. En la primera imagen se logra apreciar 2 zonas, la capa de CS que tiene morfología suave y la otra que posee la misma estructura del papel de GO sólo, que también se observa en la imagen **A**. Esto es importante, debido a que según lo reportado por Li et al. el año 2012, cuando ocurrió la permeación de PVA en la matriz de GO, las láminas de este se compactaron, lo que vinculó a una buena dispersión y permeación del polímero¹⁵¹. Por el contrario, la zona de GO en el papel híbrido a la vista es similar en términos de compactación a la del Papel de GO. Por otro lado, en la **Figura 58D** también se ve la superficie es suave y regular del CS (similar a las mostrada por Yang et al.¹⁵⁶ o la reportada por Zuo et al.¹⁵⁷ en un compuesto de CS con GO al 10 [%p/p] bien dispersado en la matriz) con pequeñas islas de irregulares que pueden ser justificar por la tendencia de auto agregación que posee este polímero en solución¹⁶⁷. Además, en esta superficie lisa no se aprecian señales de la textura superficial del papel de GO vista en la **B** (y que se puede ver claramente por la otra cara del papel híbrido **Figura 59B**), por lo que se podría pensar que sólo hay CS en esa capa o que si es que hay GO, este se encuentra altamente dispersado en esa zona^{156,157}.

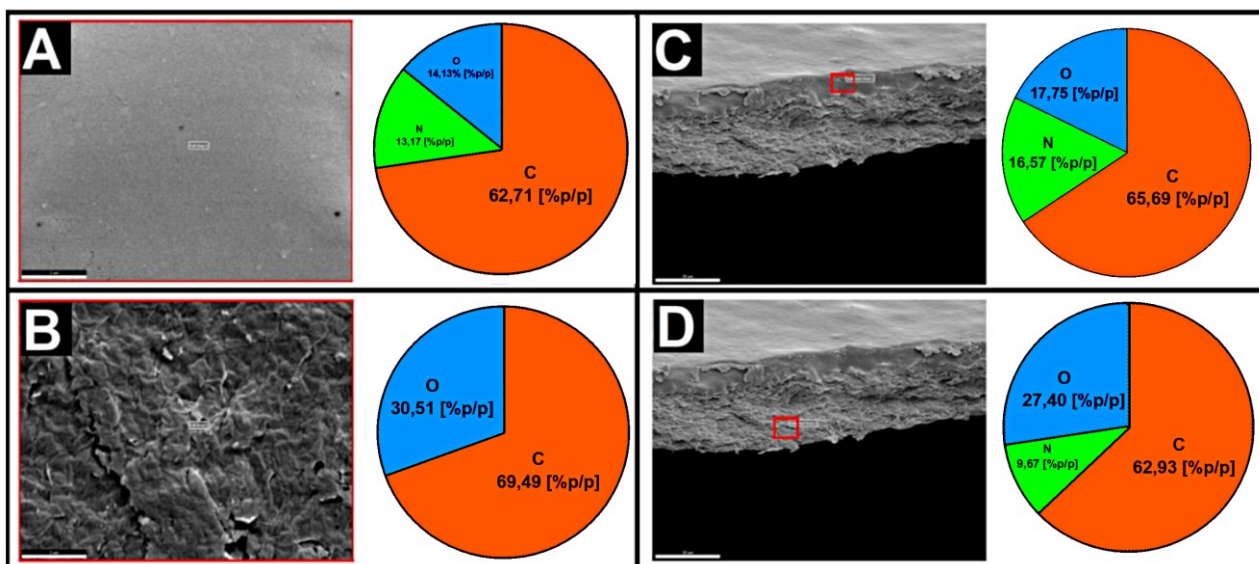


Figura 59. Fotografías SEM/EDS y gráfico de composición atómica del papel híbrido, A) Cara cubierta con CS, B) Cara GO, C) y D) Sección transversal zona 1 y 2, respectivamente. El área examinada por el EDS se encuentra marcada en rojo.

Considerando que a partir estas fotografías no se podía concluir si el papel está formado por CS y GO unidos débilmente o si ocurrió una interacción más a fondo, se realizó EDS a la muestra híbrida (ver **Figura 59**). Es importante mencionar que debido a limitaciones del equipo este no se pudo determinar la cantidad de hidrógeno presente en ese papel. El EDS mostró la composición de la cara cubierta con CS en la **Figura 59A**, la que cuenta con elementos C (62,71 [%p/p]), O (14,13 [%p/p]) y N (13,17 [%p/p]), lo que era esperable considerando que son los componentes principales de ese polímero. Estos resultados son similares a los de la primera zona en la foto transversal **Figura 59C** (C, N y O en 65,69, 17,75 y 16,57 [%p/p],

correspondientemente), por lo que se puede comprobar que la primera zona está compuesta casi íntegramente por el polímero, y que si realmente hay GO en esa ubicación, está en cantidades despreciables. Por otro lado, el análisis químico reveló que en la otra cara del papel híbrido, **Figura 59B**, el GO todavía existe en su estado prístino, ya que sólo hay presencia de C en un 69,49 [%p/p] y O en 30,51 [%p/p], valores que son similares a los obtenidos por otros trabajos asociados a GO^{21,67}. Finalmente, el análisis en la segunda zona, en la **Figura 59D**, cuya estructura es similar a la del papel tiene siguientes componentes: C (62,93 [%p/p]), O (27,40 [%p/p]) y N (9,67 [%p/p]), donde la presencia de este último elemento prueba que el polímero permeó la estructura laminar del papel de GO y formó una mezcla, lo que es consistente con los resultados de las caracterizaciones de XRD y Raman. A pesar de lo anterior, la permeación parece ser leve, lo que puede ser justificado debido a que el papel de GO es grueso y apilado, lo que provoca que el polímero no pueda entrar completamente en su interior^{70,150}, lo cual se debe recordar que fue el motivo para agregar el refuerzo mientras las láminas estuviesen húmedas. A partir de lo anterior, se puede explicar mayor maleabilidad y flexibilidad al tacto del papel de GO/CS vs el de GO, debido a la generación de enlaces entre los componentes del papel. Se ha reportado la formación de enlaces de hidrógeno (entre GO y CS, e intramolecular entre las cadenas del polímero) y entrecruzamientos covalentes entre estos, debido a los grupos hidroxilo y amina, que poseen interacciones sinérgicas que incrementan sus propiedades mecánicas^{81,156,157}.

Es importante recalcar, que los enlaces covalentes entre GO y CS solamente se manifestaban cuando existe una baja concentración del polímero ~5 [%p/p], porque el impedimento estérico (efecto producido cuando el volumen ocupado por un grupo funcional impide la reacción de otro sector de la molécula) es debilitado, provocando que los grupos amina estén expuestos y libres para reaccionar con los grupos carbonilo del GO, dándose lugar a una amidación^{22,81}. Como se explicó antes, debido a la baja concentración de CS presente en el papel híbrido y que pudo haber permeado en las nanoláminas de GO, este efecto puede que no ocurriese en gran medida, debido a que la fuerte repulsión entre los componentes dificulta que ocurra una reacción química entre ellos, y por ende, sólo se formen principalmente puentes de hidrógeno, que son interacciones más débiles^{81,152}. A pesar de lo anterior, estos últimos enlaces poseen mecanismos que posibilitan que tras su ruptura por estiramiento puedan reformarse, lo que permite que el papel absorba más energía⁸¹.

4.3 ADSORCIÓN DE COLORANTES

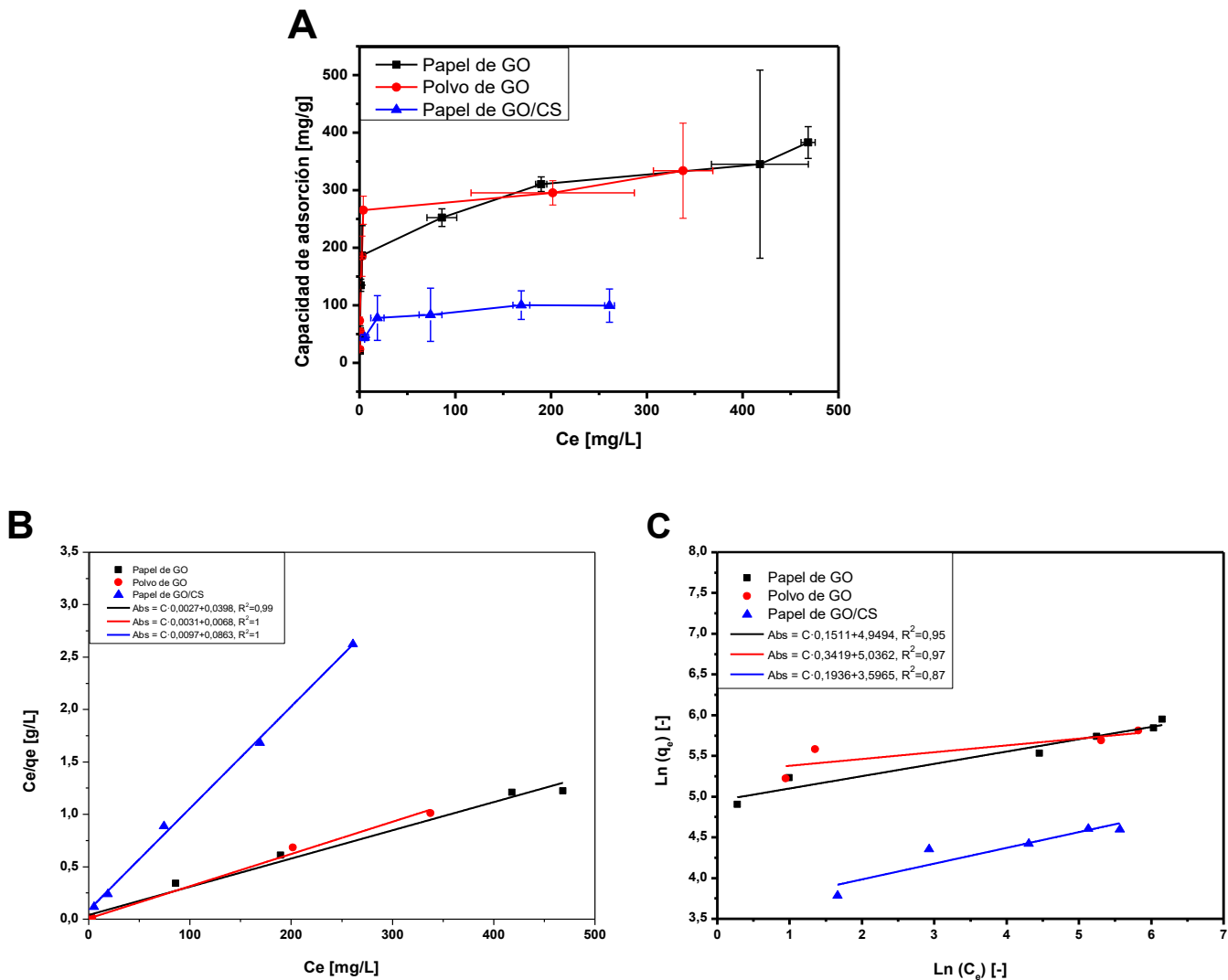


Figura 60. A) Isoterma de adsorción, B) Linealización de isothermas de Langmuir y C) Linealización de isothermas de Freundlich. Para MB utilizando Papel de GO, Polvo de GO y Papel de GO/CS.

Tabla 1. Coeficientes de isothermas de Langmuir y Freundlich de la adsorción de MB por medio de Papel de GO, Polvo de GO y Papel de GO/CS.

	Langmuir			Freundlich		
	q_m [mg/g]	K_L [L/mg]	R^2	K_F [(mg/g) · (L/mg) ^{1/n}]	1/n [-]	R^2
Papel de GO	370,4	0,07	0,99	141,1	0,15	0,95
Polvo de GO	322,6	0,46	1,00	200,8	0,08	0,97

Papel de GO/CS	103,1	0,11	1,00	36,5	0,19	0,87
----------------	-------	------	------	------	------	------

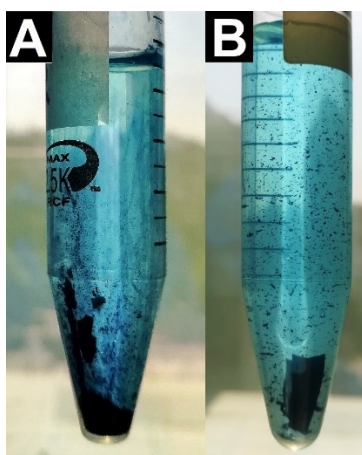


Figura 61. A) Papel de GO B) Papel de GO/CS, tras el ensayo de adsorción.

En la **Figura 60A** se presentan las isotermas de adsorción determinadas a partir de las **ecuaciones 7 y 8**, donde se destaca que las curvas asociadas al papel de GO y polvo de GO poseen una alta afinidad con el MB, lo que se puede notar por la alta pendiente inicial de las curvas⁴. Además, desde la concentración de equilibrio 200 [mg/L], ambos materiales poseen el mismo comportamiento. La justificación de esto es que ambas muestras son del mismo material, pero inicialmente el polvo adsorbe más rápido debido a que posee una mayor área de contacto en comparación al papel⁶. Posteriormente, este último se deshace (**Figura 61A**) debido a la agitación y a sus bajas propiedades físicas, las cuales empeoran luego del contacto con el agua por el ensanchamiento del espacio de la galería de la nanoláminas de GO, provocando que el agua se enlace entre ella y no forme una red de puentes de hidrógeno con las nanoláminas^{118,119}. Adicionalmente, durante este tipo de ensayos, se han reportado la formación de aglomerados de GO, los que debido a la reducción de la fuerza repulsiva electrostática compartida con el azul de metileno precipita⁶⁶, lo que se podría traducir en un separación del aglomerado en el papel. Al disolverse el papel de GO desde un poco después del inicio del experimento este se dispersó y tomó una morfología igual a la del polvo, equiparando así su área de contacto, lo que le confirió una mayor capacidad de remoción del pigmento.

Cabe señalar que la pérdida de la morfología del papel producto de la alta agitación no fue una sorpresa, debido a las bajas propiedades mecánicas al tacto y a la naturaleza de enlaces. Anteriormente, Li et al.¹⁵¹ en el año 2012 mostró que el papel de GO se re-dispersa en agua después de 24 [h] tras agitarlo levemente o mantenerlo inmóvil, pero cuando preparó el compuesto de GO con PVA este papel ya no se dispersaba aunque hubiese agitación e incluso bajo sonicación, debido a que este polímero actuaba como un pegamento entre las nanoláminas de GO. Por último, sobre la alta dispersión de datos presentes en el Papel de GO y polvo de GO en las isotermas de adsorción, esta se puede deber a la presencia de restos de estos durante las

mediciones de absorbancia, lo que no ocurrió con el papel híbrido debido a que tenía partículas sólidas de mayor tamaño.

Por otro lado, el papel híbrido posee una capacidad de adsorción más baja que el papel y polvo de GO, debido a la cobertura de una cara en CS. Este polímero posee una menor área superficial que el GO y tiene una tendencia a protonar sus grupos amino en medio ácido (pH por debajo del pKa de la molécula entre 6,3 – 6,5¹⁵⁵) generando grupos catiónicos, lo que causan una repulsión con el MB^{4,154}. Adicionalmente, debido al refuerzo polimérico el papel de GO/CS no se disolvió completamente en la solución, sino que solamente unos pequeños trozos (ver **Figura 61B**) lo que se puede explicar por las mismas razones expuestas anteriormente para el papel de GO o porque las moléculas de agua interactúan fuertemente con los grupos hidroxilo del CS, lo que provoca su hinchamiento¹⁶⁷ y por consiguiente, una disminución de la fuerza de los enlaces de hidrógeno formados entre el polímero y el GO¹⁶⁷, causando su ruptura. De todas formas, al contrastar las imágenes de la **Figura 61** se puede ver que la evidencia de las mejores propiedades mecánicas del papel híbrido, ya que una fracción importante de él no se disuelve, por lo que su área de contacto fue menor a la de las otras muestras durante todo el transcurso del experimento. Por otra parte, considerando que el papel híbrido conservó gran parte de su morfología, abre la posibilidad de realizar reparaciones utilizando GO como pegamento de nuevas láminas de GO, como lo reportó recientemente Luo et al. en el año 2018¹⁴⁷. Lo anterior, se podría traducir en un incremento del potencial de reutilización del material.

Respecto a los valores obtenidos para la concentración de equilibrio, estos permiten comprobar que el GO sintetizado tienen una gran cantidad de grupos funcionales. Esto ocurre cuando se logra una alta exfoliación en las láminas, lo que le brinda una mayor área superficial para realizar la adsorción^{43,99} y porque los grupos funcionales presentes en la superficie del GO generan sitios activos muy negativos, que le permiten interactuar electrostáticamente de manera muy fuerte con las moléculas de colorante catiónico^{35,43}, las que se añaden de forma vertical causando que la repulsión con las otras moléculas de MB en solución se disminuya⁹⁹.

En la **Figura 60B,C** se presentan los ajustes de isothermas de Langmuir (que se determinada a partir de las **ecuaciones 4 y 5**) y Freundlich (calculada en base a las **ecuaciones 7 y 8**) las cuales se aplicaron para entender el mecanismo de adsorción del colorante en el GO²¹. La **Tabla 1** presenta los coeficientes obtenidos tras la utilización de estos modelos. De ésta se puede notar que los datos de equilibrio se ajustan de mejor manera al modelo de Langmuir en comparación a Freundlich, ya que el coeficiente de determinación (R^2) para los tres materiales se aproxima a 1, por lo que se puede asumir que la adsorción de azul de metileno ocurre como monocapa^{21,94,95}, lo que permite asumir que toda la superficie de adsorbente es homogénea y que todos los sitios de adsorción poseían igual afinidad ante el adsorbato⁶. Este modelo ha sido el con mejores resultados para cierto trabajos donde hay nanocompuesto de GO y CS^{4,6,22,160–162,179}, donde se utiliza CS como matriz y que usualmente se utilizan colorantes aniónicos en los ensayos, para aprovechar la protonación de CS.

La capacidad máxima de adsorción de azul de metileno por los materiales papel de GO, polvo de GO y Papel de GO/CS son 370,4, 322,6 y 103,1 [mg/g] respectivamente. Comparando los valores obtenidos para los materiales de GO que también se ajustaron a la ecuación de Langmuir, se obtuvieron resultados menores que los 1.939 [mg/g] obtenidos por Zhang et al.⁹³, similares a los 351,1 [mg/g] de Bradder et al.⁹⁵, mayores que los 17,3 [mg/g] de Ramesha et al.⁹⁴. Es importante mencionar que es difícil tener una discusión válida sobre los resultados obtenidos para todas las muestras, considerando que en cada trabajo ocurren variaciones al método de Hummers, lo que causa que se obtengan GO's con distintas propiedades³⁵. Por otra parte, comparando los valores del híbrido con el compuesto de CS,GO y nanopartículas de Fe₃O₄ que fabricaron Fan et al. en el año 2012¹⁶⁰ con el que obtuvo una capacidad máxima de 180,83 [mg/g] de MB, lo que puede asociarse al efecto sinérgico entre los componentes y a la morfología de esferas, que le brinda mayor área superficial que al papel. Comparando con otras referencias de materiales que también contienen GO como refuerzo y CS como molde (en donde no se encontraron membranas), los valores obtenidos para los pigmentos aniónicos evaluados son mayores que los del pigmento catiónico de este trabajo, por ejemplo: Wang et al.^{4,161} en el año 2014 usó un monolito de CS esponjoso preparado por medio de liofilización de GO obtuvo un 567,07 [mg/g] y el 2015 usó un aerogel dopado poroso con una pequeña cantidad de GO fue de 686,89 [mg/g] para MO y 573,47 [mg/g] para Amido Black. Estos resultados son casi seis veces mayores que la adsorción del MB catiónico obtenida en este estudio, lo que puede ser explicado nuevamente por el mecanismo de protonación de CS.

Volviendo a los resultados obtenidos por este trabajo, el papel de GO adsorbe ~3,36 veces más de MB que el material híbrido. Lo anterior se puede explicar por: la alta área superficial de GO²¹ y la presencia de grupos funcionales que contienen oxígeno⁶⁶. La protonación del CS explicada debido a que por cada gramo de material híbrido hay menor cantidad de GO en contraposición a un papel de GO prístino. Los resultados disímiles obtenidos para el polvo y papel de GO se pueden asociar a un error experimental que impidió determinar los valores de adsorción para el polvo de GO en una solución a concentración de 600 [mg/L] de MB o al error en la medición de absorbancia explicado anteriormente (asociado a restos de sólidos que quedan en las cubetas), lo que justificaría porque ambos papeles tienen una q_m similar. Por otra parte, al observar los valores de la constante de Langmuir (K_L) se puede notar que el polvo de GO posee la mayor afinidad 6 y 4 veces superiores al del Papel de GO y GO/CS respectivamente, lo que puede ser explicado por las mismas razones expuestas antes y además por las diferencias morfológicas asociadas a la interacción entre los ejes de cada estructura. Por otra parte, analizando los parámetros de Freundlich, se puede notar que los valores de $1/n$ cae dentro de la zona (entre 0,1 a 1^{21,180}) de adsorción favorable bajo las condiciones de estudio, donde el polvo de GO es el que posee una adsorción más favorable, seguido del papel de GO y finalmente por el híbrido. Estos resultados coinciden con el análisis realizado mediante el modelo de Langmuir, lo que le brinda más peso a las observaciones obtenidas de esa ecuación.

4.4 PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS: ENSAYO DE CONTACTO

Este ensayo se efectuó para evaluar si los materiales tenían algún efecto sobre viabilidad de las bacterias en condiciones dinámicas. Para esto se inocularon las bacterias a cierta concentración, luego se pusieron en contacto con muestras de los materiales a evaluar y fueron incubadas con agitación por 1 [día]. Posteriormente se sembraron diluciones en placas de agar, estas se incubaron durante 24 [h] para finalmente realizar un conteo por recuento. Los resultados se presentan en la **Figura 62** (determinados por medio de la **ecuación 9**), **Tabla 2** (calculado a través de la **ecuación 10**), **Figura 63** y **Figura 64**:

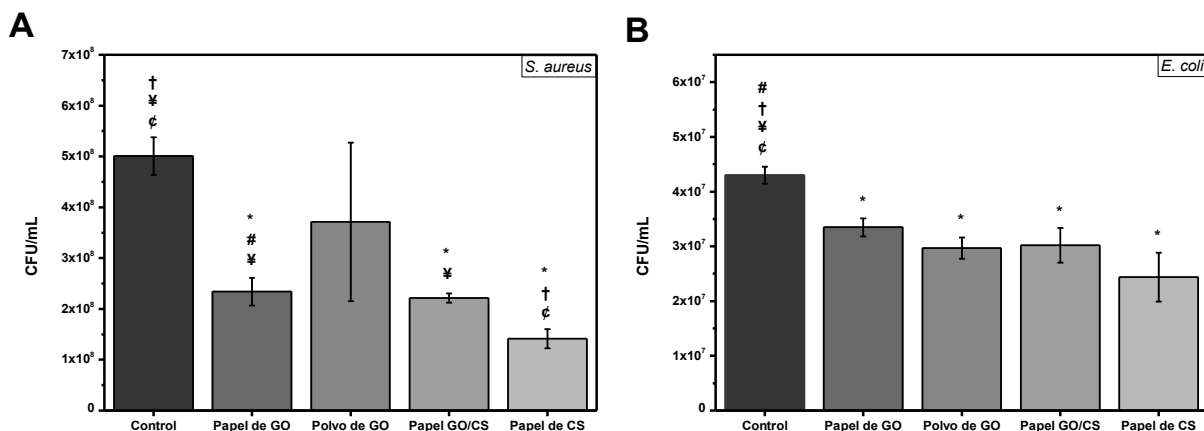


Figura 62. Unidad Formado de Colonia por mililitro [CFU/mL] de los materiales indicados para A) *Staphylococcus aureus* y B) *Escherichia coli* (*, †, #, ‡ y § representan diferencias significativas respecto al Control, Papel de GO, Polvo de GO, Papel de GO/CS y Papel de Qitosano, respectivamente para $p > 0,05$). Los datos se expresaron como la media +- desviación estándar de los tres experimentos independientes.

Tabla 2. Porcentaje de reducción de colonias para cada material, los valores son la media +- desviación estándar de los tres experimentos independientes.

	Porcentaje de reducción [%]			
	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	Media	Desviación Estándar	Media	Desviación Estándar
Papel de GO	56	2	22	5
Polvo de GO	26	31	31	5
Papel de GO/CS	53	5	30	2
Papel de CS	72	4	43	10

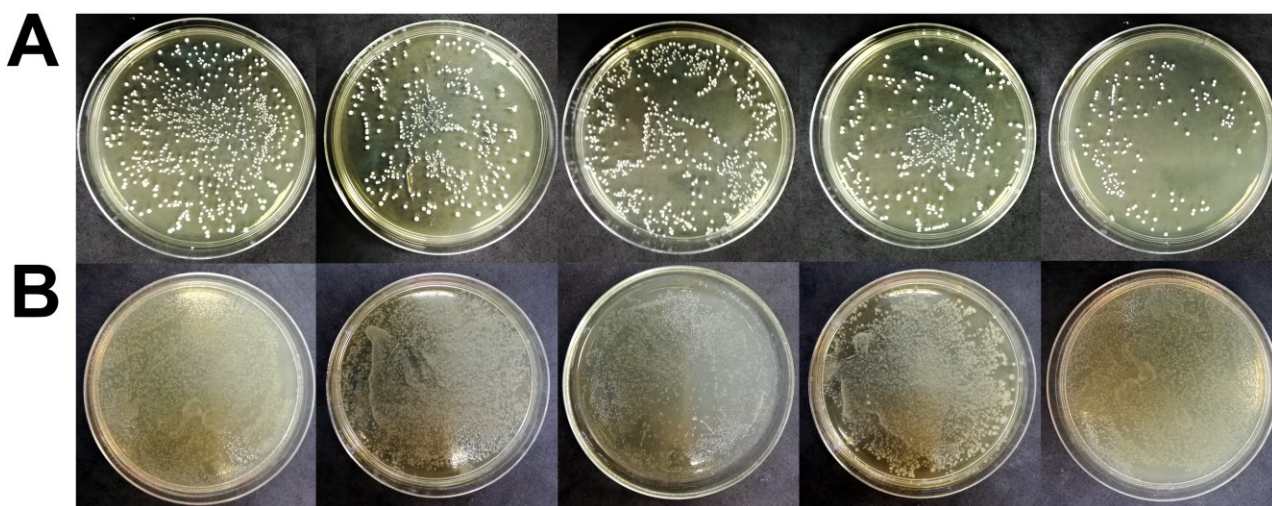


Figura 63. Placas sembradas con 1 [μL] del contenido de los tubos de ensayo, de arriba hacia abajo: Control, Papel de GO, Polvo de GO, Papel de GO/CS y Papel de CS, para A) Staphylococcus aureus y B) Escherichia coli.

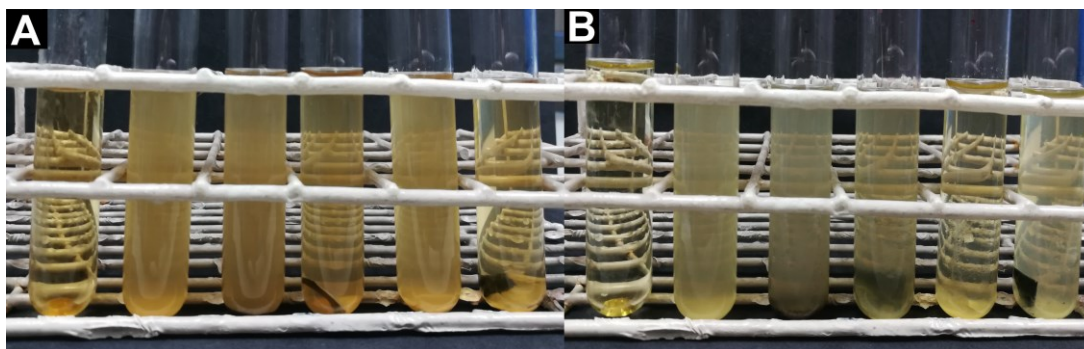


Figura 64. Tubos luego del ensayo de contacto, de derecha a izquierda: medio original, Control, Polvo de GO, Papel de GO, Papel de CS y Papel de GO/CS, para A) Staphylococcus aureus y B) Escherichia coli.

En primer lugar se debe destacar que debido a la variabilidad de los papeles obtenidos por el método de preparación existieron diferencias entre las masas de láminas que tenían las mismas dimensiones de $1 \cdot 1$ [cm²] (Tabla 3 y Tabla 4 en el Anexo 7.2 TABLAS ADICIONALES), debido a las dificultades de estandarización de la metodología. Esto provocó que las concentraciones utilizadas variaron entre los ensayos realizados en triplicados. Esto último puede acarrear errores al análisis de datos. Por otra parte, realizar una comparación bibliográfica también se dificulta debido a los reportes incongruentes, los distintos GO³⁵ sintetizados por medio de métodos de preparación diferentes (al igual que los reportes sobre adsorción) y por las distintas metodologías para analizar las propiedades presente en las referencias consultadas. Todo lo anterior genera dificultades al realizar contraposiciones entre esos resultados y los obtenidos en esta memoria.

Como se puede observar todos los materiales mostraron actividad antimicrobiana, pero en diferentes magnitudes y dependiendo del tipo de bacteria (ver **Figura 63**).

Para *S. aureus* el Polvo de GO tuvo un rendimiento de reducción de colonias respecto al control de 26 ± 31 [%], el del Papel de GO fue de 56 ± 2 [%], el del papel híbrido fue 53 ± 5 [%] y el del papel de quitosano fue 72 ± 4 [%], teniendo este último tuvo un mejor rendimiento antimicrobiano. Tras un análisis estadístico se comprobó que todas las muestras, excepto el polvo de GO, tuvieron diferencias significativas en comparación el control. Por otro lado, no existieron diferencias significativas entre el papel de GO y el híbrido. Además, el papel de CS tenía diferencias significantes a los papeles mencionados anteriormente, lo que coincide con la diferencia de ~ 15 [%].

La justificación de los resultados obtenidos para el polvo de GO radica en el mecanismo sinérgicos antimicrobianos de este, los que son mediados por interacciones físicas y químicas. Los primeros se asocian a la penetración de la pared y/o membrana celular por medio de las bordes atómicamente puntiagudos de grafeno^{85,89,106} que se encargan de disminuir la barrera de energía necesaria para la penetración en la membrana. Los químicos se vinculan al estrés oxidativo inducido a las bacterias^{64,86,88,181-183} o por la extracción de fosfolípidos desde la membrana debido a las altas interacción entre las moléculas de lípidos y el GO⁸⁹. Debido a lo anterior, este material no tendría efecto en condiciones estáticas y tampoco cuando no se encuentra en contacto directo con las células^{86,88,89,106}, por lo que se requieren condiciones dinámicas⁸⁸. El mecanismo primordial de acción del GO en su morfología de polvo es mediante sus láminas, las que disueltas en solución provoca que las de mayor tamaño recubran a las bacterias y eviten la proliferación de estas^{88,114,114,184}. Este mecanismo es reversible (ya que no mata bacterias, sólo las encapsula), lo que puede explicar el bajo porcentaje de reducción y la alta dispersión asociada al polvo de GO. Un argumento a favor de esto último es que tras la finalización del ensayo se observó que los tubos que tenían polvo de GO estaban menos turbios en comparación al control (ver **Figura 64A**). El nivel de turbidez de los tubos de ensayo se puede ocupar para observar el efecto antimicrobiano del material de manera visual. Considerando lo anterior, la liberación de las bacterias (inactivas, pero no muertas) desde su contención de GO pudo ser producto de la agitación por vórtex a la que se sometieron los tubos de ensayo, con el objetivo de dispersar la solución y homogenizarlas, previo al sembrado en placas. Una vez liberadas y estar en contacto con el medio nutritivo, volvieron a crecer. Los valores obtenidos son menores al 61,30 [%] reportado por Bao et al.³⁰ cuando incubó durante 4 [h] a 37 [°C] en un agitador rotatorio una solución con concentración de GO de 500 [mg/L] y 10^5 – 10^6 [CFU/mL]. Esto abre la posibilidad de explicar los resultados debido a que utilizaron otro tipo de GO mediante otra síntesis o porque los problemas del diseño experimental relacionados con la orientación vertical de los tubos y el posterior hundimiento de todos los materiales ocupados. El polvo decantó y se mantuvo adherido en las paredes a causa de la leve agitación lo que redujo su área de movimiento, posiblemente limitando la acción de su mecanismo antimicrobiano. Adicionalmente, no se observó ningún tipo de proliferación generada por el polvo de GO, debido

a la formación de un precipitado negro en el fondo de los tubos (que actuaba como un *scaffold* que inducía el crecimiento celular masivo), como lo plantearon Ruiz et al.⁷¹.

Por otro lado, los resultados obtenidos para el papel del GO son distintos para *S. aureus*. Esto se puede justificar debido a que existen matices entre los mecanismos del GO en polvo y en papel⁸⁸, porque en este último las nanoláminas están inmóviles. Debido a esto, la acción antimicrobiana ocurre principalmente por estrés oxidativo y por acción de los bordes afilados. Por esta razón se prefieren láminas de menor tamaño, ya que estas tienen una densidad de defectos más alta que las grandes, lo que potencia este modo de acción⁸⁸. Por ese motivo, se podría considerar que se obtuvo un mejor rendimiento del GO en forma de papel debido a que sus mecanismos de acción no están tan críticamente relacionados con la movilidad del material (como es la encapsulación por parte de las láminas en el polvo), porque solamente bastaría que las bacterias circulen y se acerquen a la superficie del papel (lo que se logró con la agitación y disposición de los tubos de ensayo utilizadas) para disminuir su viabilidad al entrar ellas en contacto con el material³⁰.

Respecto al papel híbrido, este inhibió un 53 ± 5 [%] de las colonias de *S. aureus*, respecto al control. Este rendimiento fue similar o mejor que el del papel de GO, lo que se considera como un buen resultado ya que las muestras de papel híbrido utilizadas para esta bacteria tenían un promedio menor de masa (4,2 [mg]) que la del papel de GO prístino (5,0 [mg]), por lo que se necesita menos material híbrido para provocar el mismo [%] de reducción colonias que el otro papel. Lo anterior, se puede relacionar con la sinergia de mecanismos de los materiales que forman al híbrido, la que ya fue reportada por Jian et al.⁶ para un compuesto de CS-GO con nanopartículas magnéticas del óxido de hierro, en que el CS (con carga positiva) alteraba la permeabilidad de la membrana celular (con carga negativa), lo que provoca una fuga de material intracelular que en conjunto con el daño provocado por el GO por sus mecanismo químicos y físicos, tienen como resultado la muerte de la bacteria.

Sobre el CS, efectuar una explicación certera de cómo es su mecanismo antimicrobiano es difícil, debido a que existe gran cantidad de información que se contradice sobre la forma en que el CS inhibe a las bacterias¹⁵⁵. Las razones que se ha provisto están relacionadas con sus grupos amina cargados positivamente (lo que se potencia debido al alto grado de desacetilación de la muestra utilizada, ya que se incrementa la solubilidad y densidad de carga^{154,185}) que interactúan con las membranas celulares, provocando una filtración del material intracelular¹⁵⁴. Los mecanismos para las bacterias Gram-positivo y Gram-negativo se ha mencionado en ciertas publicaciones que son diferentes¹⁶³. Considerando esto último como cierto, para las primeras bacterias el efecto aumenta a medida que se incrementa el peso molecular del quitosano (lo que contradice ciertos estudios^{155,163}), debido a que el CS en la superficie de la célula puede formar una membrana polimérica que impide que la bacteria ingrese nutrientes. Esto último podría justificar el mayor porcentaje obtenido por el papel de CS (72 ± 4 [%]).

Por otro lado, los resultados obtenidos para *E. coli* por el Polvo de GO fue de un 31 ± 5 [%] de reducción de colonias en comparación al control, para el Papel de GO fue 22 ± 5 [%], el papel de GO/CS tuvo un 30 ± 2 [%] y finalmente, el papel de CS fue el que obtuvo mejores resultados con un 43 ± 10 [%]. Se destaca que todos los materiales tuvieron diferencias significativas respecto al control, pero no entre ellos. La ausencia de diferencias significativas para *E. coli* entre el papel y polvo de GO e puede explicar debido a que el polvo tenía una masa promedio mayor 8,4 [mg] que la del papel de 6,6 [mg], lo que no le impidió a este último tener resultados similares en la reducción de colonias. Por otra parte, la falta de diferencias significativas entre los demás materiales respecto a ellos puede haber ocurrido debido a los problemas con el diseño del experimento que se mencionaron antes.

Los resultados para el polvo de GO para la bacteria Gram-negativo pueden ser explicados por los mismos argumentos planteado para el Gram-positivo. Además, el mayor porcentaje de reducción en *E. coli* coinciden con lo reportado por Nanda et al.⁹² en que el GO en polvo es más efectivo en bacterias Gram-negativo, lo que justificó en base a las diferencias entre las estructuras de la membrana de las bacterias respecto a las Gram-positivo, específicamente sobre el espesor de la capa de peptidoglicano en que las primeras tienen una más delgada (7-8 [nm] aproximadamente) en contraste a las segundas (aproximadamente 20-80 [nm])³⁰, lo que le brindaría una mayor protección frente a los mecanismos de acción del GO. Este argumento se contradice con lo publicado por Akhavan y Ghaderi¹⁰⁶, que argumentó *S. aureus* era menos resistente a la acción del GO, debido a que no poseía una membrana externa, a diferencia de la *E. coli*. Por otra parte, el porcentaje obtenido es menor que el 51,90 [%] reportado por Bao et al.³⁰ (conseguidos en condiciones similares a los de este trabajo) y del $87,26 \pm 3,75$ [%] de Jiang et al.⁶ logrado con una concentración ~ 8 menor, pero inoculando las bacterias en agua destilada estéril. Esto podría ser explicado nuevamente por las características del GO sintetizado en cada trabajo o por el mecanismo reversible explicado antes (ver **Figura 64B**). Además, en este tipo de bacteria tampoco ocurrió la proliferación planteada por Ruiz et al.⁷¹.

Por otro lado, los resultados obtenidos para el papel del GO (22 ± 5 [%]) son distintos a los del polvo, lo que puede ser explicado nuevamente por los matices entre los mecanismos. Respecto al papel híbrido, este inhibió un 30 ± 2 [%] de las colonias de *E. coli* con una masa promedio de las muestras de 3,0 [mg], menos de la mitad que la de las muestras de papel de GO que fue de 6,6 [mg]. Esto muestra nuevamente que se necesita menos masa de material híbrido para provocar un efecto igual o superior que el del papel de GO prístino, debido al efecto sinérgico entre los componentes explicado antes.

El papel de CS, el efecto antimicrobiano es distinto para las bacterias Gram-negativo. Donde el quitosano de bajo peso molecular ingresa a la célula por medio de impregnación, adsorbiendo y floculando las sustancias electronegativas de la célula¹⁶³. Lo anterior puede justificar el porqué de los mejores resultados obtenidos para *S. aureus*, debido a que el CS utilizado era de medio peso molecular y con un alta desacetilación. De todas formas, se ha de señalar que existen reportes que

muestran que no existen diferencia entre la actividad antimicrobiana del CS en ambos tipos de bacterias e incluso otros donde este inhibe más Gram-negativo y en que se reporta que a mayor peso molecular aumenta el efecto en *E. coli*¹⁵⁵, por lo que es difícil ser tajante respecto a las justificaciones tras los resultados obtenidos. A pesar de esto, el porcentaje se considera bajo al ser contrastado con lo reportado por Jiang et al.⁶ en que los valores de inhibición de *E. coli* ascienden a $99,91 \pm 0,02$ [%] a una concentración de 100 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] (aproximadamente 3 veces menor que la utilizada, ver **Tabla 3** y **Tabla 4** en el **Anexo 7.2 TABLAS ADICIONALES**) durante 2 [h] de exposición, pero donde la concentración de bacterias fueron expuestas a los materiales en agua destilada estéril. Una razón de la diferencia entre los porcentajes puede deberse a la metodología experimental, especialmente a la orientación vertical en que se encontraban los tubos durante la agitación y al posterior hundimiento del papel de CS, que fue explicado antes para el polvo de GO. Por otro lado, los resultados tampoco calzan con lo reportado por Grande et al. en el año 2017, en que la película de CS no mostró propiedades antibacterianas sobre *E. coli*.

Por otro lado, sobre la metodología de conteo de colonias, de destaca que esta posee problemas para predecir el crecimiento de bacterias, ya que se han dado casos en que hay bacterias viables que no forman colonias, debido a que se encuentran inactivas a la espera de condiciones más favorables^{106,183}. Adicionalmente, los papeles de GO no se rompieron durante el ensayo, ver **Figura 64**, lo que le brinda mayor fuerza al argumento de que el tipo de agitación fue insuficiente en el experimento (a diferencia de los experimentos de adsorción, donde los tubos estaban orientados horizontalmente y se tenía una mayor agitación).

Para finalizar, no se conoce si los bajos resultados obtenidos para las muestras (en comparación a lo contrastado con literatura) se debe al distinto método de síntesis del GO utilizado o a dificultades relacionadas con el diseño experimental. Para comprobar si es producto de esto último sería recomendable repetir el experimento utilizando una menor cantidad de medio (< 10 [mL]) o posicionando los tubos de ensayo de forma horizontal, para asegurar el desplazamiento de las muestras.

5 CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

Se desarrollaron dos métodos simples para la preparación de papeles de GO y papel de GO/CS, con los que se obtienen láminas flexibles de hasta $3 \cdot 2$ [cm²] y que poseen características multifuncionales de adsorbente de pigmentos y antimicrobianos. La caracterización mediante XRD y FTIR del papel comprueba su estructura y detecta las bandas características del GO. Por otra parte, los espectros Raman de ambos papeles presentan los picos típicos asociados a los materiales de grafito, pero los del híbrido cambiaron levemente de posición lo que se vincula a una posible unión entre el CS y GO. Por otro lado, las fotografías SEM permitieron ver la orientación ordenada de las nanoláminas y la morfología irregular de la superficie del papel de GO y suave de la cara cubierta con CS en el híbrido. Lo desordenado de la superficie del papel de GO se asoció a los defectos presentes en la espátula y placa de teflón. Continuando, por medio de EDS se comprobó la presencia de que el CS permea las nanoláminas de GO, formando puentes de hidrógeno y menos probablemente, enlaces covalentes, la conformación de estos últimos no pudo ser comprobado durante el trabajo. A pesar de esto, el papel de GO se rompe con facilidad al tacto lo que puede estar relacionado con el porcentaje de agua entre las nanoláminas, por lo que se requiere mayor control sobre el secado. A futuro, con el fin de asegurar una mayor formación de enlaces covalentes podría ser recomendable agregar un agente reticulador en alguna etapa de la preparación del papel.

Respecto a la adsorción del colorante catiónico MB, los valores son: 370,4, 322,6 y 103,1 [mg/g] para el papel de GO, polvo de GO y Papel de GO/CS, respectivamente. Los resultados para los dos primeros materiales son similares debido a que el papel modificó su morfología durante el transcurso del experimento, dispersándose en la solución. Los valores menores del papel híbrido pueden ser explicados debido al rol del CS, que tiene una menor área superficial y porque ocurre protonación en pH ácido. Lo anterior provoca que existan menos sitios activos para la adsorción del pigmento y que estos repelan al MB de carga positiva. El análisis de estas propiedades del papel híbrido se podría extender utilizando un colorante aniónico (naranja de metilo) e incluyendo en el análisis a la isoterma de Temkin.

Sobre los ensayos microbiológico en la bacteria *S. aureus*, los resultados obtenidos para los papeles de GO, GO/CS y CS son: 56 ± 2 , 53 ± 5 y 72 ± 4 [%], en que todos tienen diferencias significativas respecto al control, pero no existen diferencias significativas entre los dos primeros materiales. Este resultado es elevado para los híbridos considerando que tienen una masa ~ 40 [%] menor que la de papeles de GO prístino, lo que puede ser explicado mediante una sinergia entre los mecanismos antibacterianos del CS y GO. Por otro lado, para *E. coli* los valores son: 22 ± 5 , 30 ± 2 y 43 ± 10 [%], donde todos los materiales tuvieron diferencias significativas respecto al control, pero no entre ellos, lo que apuntó a problemas en el diseño del experimento. El menor efecto de la bacteria Gram-negativo comparado con *S. aureus* se vinculó a las diferencias fisiológicas de estas y al modo de acción de los materiales. A pesar de lo anterior, la naturaleza contradictoria de la información disponible sobre este punto dificulta la posibilidad

de realizar conclusiones tajantes respecto a los mecanismos de acción de los materiales. Considerando todo lo anterior, sería recomendable repetir el ensayo posicionado los tubos de manera horizontal, para asegurar una mayor libertad de movimiento de los materiales en el interior.

Para finalizar, en trabajos posteriores se pueden explorar las propiedades mecánicas de los papeles para contrastar de mejor forma con la información bibliográfica y caracterizar el GO mediante Microscopio de fuerza atómica (AFM), para comprobar si una de las razones tras los bajos valores de inhibición del material en los ensayos microbiológicos (comparado con la literatura consultada) está asociado al tamaño de las láminas. También puede ser útil realizarle XPS o FTIR a las muestras de papel híbrido, para comprobar si ocurrió amidación en el papel híbrido. Otra proyección sería conseguir un grafito de láminas más grandes o pre-exfoliarlo (como recomienda Aboutaleb et al.¹⁴⁸), sintetizar GO a partir de él y luego preparar papel, evaluando su desempeño en las mismas pruebas de este trabajo. También puede ser útil ocupar el trabajo recientemente publicado por Luo et al. en el año 2018¹⁴⁷, para ver si es posible reparar el papel híbrido, después de su ruptura, utilizando GO como pegamento. Esto último mejoraría las posibilidades de que este material se utilizado (y reutilizado) en aplicaciones de tratamiento de aguas.

6 BIBLIOGRAFÍA

1. OMS. Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos 2017: AGUAS RESIDUALES EL RECURSO DESAPROVECHADO. (Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura, 2017).
2. Manna, S., Gopakumar, D. A., Roy, D., Saha, P. & Thomas, S. 20 - Nanobiomaterials for removal of fluoride and chlorophenols from water. in *New Polymer Nanocomposites for Environmental Remediation* (eds. Hussain, C. M. & Mishra, A. K.) 487–498 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-811033-1.00020-2
3. Oki, T. & Kanae, S. Global Hydrological Cycles and World Water Resources. *Science* **313**, 1068–1072 (2006).
4. Wang, Y. et al. Microporous spongy chitosan monoliths doped with graphene oxide as highly effective adsorbent for methyl orange and copper nitrate (Cu(NO₃)₂) ions. *J. Colloid Interface Sci.* **416**, 243–251 (2014).
5. Sheet, I., Holail, H., Olama, Z., Kabbani, A. & Hines, M. The Antibacterial Activity of Graphite Oxide, Silver, Impregnated Graphite Oxide with Silver and Go-Coated Sand Nanoparticles Against Waterborne Pathogenic E. coli B121. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2**, 1–11 (2013).
6. Jiang, Y. et al. Magnetic chitosan–graphene oxide composite for anti-microbial and dye removal applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **82**, 702–710 (2016).
7. Kadirvelu, K. et al. Utilization of various agricultural wastes for activated carbon preparation and application for the removal of dyes and metal ions from aqueous solutions. *Bioresour. Technol.* **87**, 129–132 (2003).
8. Chatterjee, S., Chatterjee, T., Lim, S.-R. & Woo, S. H. Effect of the addition mode of carbon nanotubes for the production of chitosan hydrogel core–shell beads on adsorption of Congo red from aqueous solution. *Bioresour. Technol.* **102**, 4402–4409 (2011).
9. Cui, X., Zheng, Y., Tian, M. & Dong, Z. Palladium nanoparticles supported on SiO₂@Fe₃O₄@m-MnO₂ mesoporous microspheres as a highly efficient and recyclable catalyst for hydrodechlorination of 2,4-dichlorophenol and reduction of nitroaromatic compounds and organic dyes. *Mol. Catal.* **433**, 202–211 (2017).
10. Chattopadhyay, T. et al. Fluorometric detection of nitroaromatics by fluorescent lead complexes: A spectroscopic assessment of detection mechanism. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **194**, 222–229 (2018).
11. Wang, X. et al. Preparation of magnetic mesoporous poly-melamine-formaldehyde composite for efficient extraction of chlorophenols. *Talanta* **179**, 676–684 (2018).
12. Cheah, W., Hosseini, S., Khan, M. A., Chuah, T. G. & Choong, T. S. Y. Acid modified carbon coated monolith for methyl orange adsorption. *Chem. Eng. J.* **215–216**, 747–754 (2013).
13. Yagub, M. T., Sen, T. K., Afroze, S. & Ang, H. M. Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: A review. *Adv. Colloid Interface Sci.* **209**, 172–184 (2014).
14. Ahlström, L.-H., Sparr Eskilsson, C. & Björklund, E. Determination of banned azo dyes in consumer goods. *TrAC Trends Anal. Chem.* **24**, 49–56 (2005).
15. Chequer, F. M. D. et al. *Textile Dyes: Dyeing Process and Environmental Impact. Eco-Friendly Text. Dye. Finish.* (2013). doi:10.5772/53659
16. Vimonses, V., Lei, S., Jin, B., Chow, C. W. K. & Saint, C. Adsorption of congo red by three Australian kaolins. *Appl. Clay Sci.* **43**, 465–472 (2009).
17. Ali, I. & Gupta, V. K. Advances in water treatment by adsorption technology. *Nat. Protoc.* **1**, 2661–2667 (2006).

18. Largitte, L. & Pasquier, R. A review of the kinetics adsorption models and their application to the adsorption of lead by an activated carbon. *Chem. Eng. Res. Des.* **109**, 495–504 (2016).
19. Srivastava, N. C. & Eames, I. W. A review of adsorbents and adsorbates in solid–vapour adsorption heat pump systems. *Appl. Therm. Eng.* **18**, 707–714 (1998).
20. Eckhard Worch. *Adsorption Technology in Water Treatment*. (DE GRUYTER, 2012).
21. Sitko, R. et al. Adsorption of divalent metal ions from aqueous solutions using graphene oxide. *Dalton Trans.* **42**, 5682–5689 (2013).
22. Kamal, M. A., Bibi, S., Bokhari, S. W., Siddique, A. H. & Yasin, T. Synthesis and adsorptive characteristics of novel chitosan/graphene oxide nanocomposite for dye uptake. *React. Funct. Polym.* **110**, 21–29 (2017).
23. Sun, X. Graphical Evaluation of the Favorability of Adsorption Processes by Using Conditional Langmuir Constant. *Ind Eng Chem Res* **52**, 14251–14260 (2013).
24. Tang, Y. J. et al. Charge-associated effects of fullerene derivatives on microbial structural integrity and central metabolism. *Nano Lett.* **7**, 754–760 (2007).
25. LeChevallier, M. W. & Au, K.-K. *Water Treatment and Pathogen Control*. (IWA Publishing, 2004).
26. Cabral, J. P. S. Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **7**, 3657–3703 (2010).
27. Seo, Y. I. et al. Removal of bacterial pathogen from wastewater using Al filter with Ag-containing nanocomposite film by in situ dispersion involving polyol process. *J. Hazard. Mater.* **227–228**, 469–473 (2012).
28. UNITED NATIONS. *Water*. <http://www.un.org/en/sections/issues-depth/water/> (2015). Available at: <http://www.un.org/en/sections/issues-depth/water/>. (Accessed: 11th March 2018)
29. Li, Q. et al. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. *Water Res.* **42**, 4591–4602 (2008).
30. Bao, Q., Zhang, D. & Qi, P. Synthesis and characterization of silver nanoparticle and graphene oxide nanosheet composites as a bactericidal agent for water disinfection. *J. Colloid Interface Sci.* **360**, 463–470 (2011).
31. Pendergast, M. M. & Hoek, E. M. V. A review of water treatment membrane nanotechnologies. *Energy Environ. Sci.* **4**, 1946–1971 (2011).
32. Ulbricht, M. Advanced functional polymer membranes. *Polymer* **47**, 2217–2262 (2006).
33. Sengupta, R., Bhattacharya, M., Bandyopadhyay, S. & Bhowmick, A. K. A review on the mechanical and electrical properties of graphite and modified graphite reinforced polymer composites. *Prog. Polym. Sci.* **36**, 638–670 (2011).
34. Randviir, E. P., Brownson, D. A. C. & Banks, C. E. A decade of graphene research: production, applications and outlook. *Mater. Today* **17**, 426–432 (2014).
35. Dreyer, D. R., Park, S., Bielawski, C. W. & Ruoff, R. S. The chemistry of graphene oxide. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 228–240 (2009).
36. Geim, A. K. & Novoselov, K. S. The rise of graphene. *Nat. Mater.* **6**, 183–191 (2007).
37. Lee, C., Wei, X., Kysar, J. W. & Hone, J. Measurement of the Elastic Properties and Intrinsic Strength of Monolayer Graphene. *Science* **321**, 385–388 (2008).
38. Balandin, A. A. et al. Superior Thermal Conductivity of Single-Layer Graphene. *Nano Lett.* **8**, 902–907 (2008).
39. Du, X., Skachko, I., Barker, A. & Andrei, E. Y. Approaching ballistic transport in suspended graphene. *Nat. Nanotechnol.* **3**, 491–495 (2008).
40. Allen, M. J., Tung, V. C. & Kaner, R. B. Honeycomb carbon: a review of graphene. *Chem. Rev.* **110**, 132–145 (2010).

41. Somanathan, T., Prasad, K., Ostrikov, K. K., Saravanan, A. & Krishna, V. M. Graphene Oxide Synthesis from Agro Waste. *Nanomater. Basel Switz.* **5**, 826–834 (2015).
42. Hu, K., Kulkarni, D. D., Choi, I. & Tsukruk, V. V. Graphene-polymer nanocomposites for structural and functional applications. *Prog. Polym. Sci.* **39**, 1934–1972 (2014).
43. Jeong, H. K., Jin, M. H., So, K. P., Lim, S. C. & Lee, Y. H. Tailoring the characteristics of graphite oxides by different oxidation times. *J. Phys. Appl. Phys.* **42**, 065418 (2009).
44. Inagaki, M. & Kang, F. Graphene derivatives: graphane, fluorographene, graphene oxide, graphyne and graphdiyne. *J. Mater. Chem. A* **2**, 13193–13206 (2014).
45. Britnell, L. et al. Strong Light-Matter Interactions in Heterostructures of Atomically Thin Films. *Science* **340**, 1311–1314 (2013).
46. El-Kady, M. F. & Kaner, R. B. Scalable fabrication of high-power graphene micro-supercapacitors for flexible and on-chip energy storage. *Nat. Commun.* **4**, ncomms2446 (2013).
47. Kim, K. S. et al. Large-scale pattern growth of graphene films for stretchable transparent electrodes. *Nature* **457**, 706–710 (2009).
48. Tetsuka, H. et al. Optically Tunable Amino-Functionalized Graphene Quantum Dots. *Adv. Mater.* **24**, 5333–5338 (2012).
49. Hu, K., Gupta, M. K., Kulkarni, D. D. & Tsukruk, V. V. Ultra-Robust Graphene Oxide-Silk Fibroin Nanocomposite Membranes. *Adv. Mater.* **25**, 2301–2307 (2013).
50. Mannoor, M. S. et al. Graphene-based wireless bacteria detection on tooth enamel. *Nat. Commun.* **3**, ncomms1767 (2012).
51. Guo, W. et al. Bio-Inspired Two-Dimensional Nanofluidic Generators Based on a Layered Graphene Hydrogel Membrane. *Adv. Mater.* **25**, 6064–6068 (2013).
52. Shahil, K. M. F. & Balandin, A. A. Thermal properties of graphene and multilayer graphene: Applications in thermal interface materials. *Solid State Commun.* **152**, 1331–1340 (2012).
53. Li, C., Adamcik, J. & Mezzenga, R. Biodegradable nanocomposites of amyloid fibrils and graphene with shape-memory and enzyme-sensing properties. *Nat. Nanotechnol.* **7**, 421–427 (2012).
54. Compton, O. C. et al. Additive-free hydrogelation of graphene oxide by ultrasonication. *Carbon* **50**, 3399–3406 (2012).
55. Li, D., Müller, M. B., Gilje, S., Kaner, R. B. & Wallace, G. G. Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets. *Nat. Nanotechnol.* **3**, 101–105 (2008).
56. Brodie, B.C. Sur le poids atomique du graphite. *Ann. Chim. Phys.* **59**, 466–472 (1860).
57. Staudenmaier, L. Verfahren zur Darstellung der Graphitsäure. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **31**, 1481–1487 (1898).
58. Hummers, W. S. & Offeman, R. E. Preparation of Graphitic Oxide. *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 1339–1339 (1958).
59. Marcano, D. C. et al. Improved Synthesis of Graphene Oxide. *ACS Nano* **4**, 4806–4814 (2010).
60. Jia, B. & Zou, L. Graphene nanosheets reduced by a multi-step process as high-performance electrode material for capacitive deionisation. *Carbon* **50**, 2315–2321 (2012).
61. Wimalasiri, Y. & Zou, L. Carbon nanotube/graphene composite for enhanced capacitive deionization performance. *Carbon* **59**, 464–471 (2013).
62. Li, H., Zou, L., Pan, L. & Sun, Z. Novel Graphene-Like Electrodes for Capacitive Deionization. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 8692–8697 (2010).
63. Begum, H., Ahmed, M. S., Cho, S. & Jeon, S. Simultaneous reduction and nitrogen functionalization of graphene oxide using lemon for metal-free oxygen reduction reaction. *J. Power Sources* **372**, 116–124 (2017).

64. Krishnamoorthy, K., Veerapandian, M., Zhang, L.-H., Yun, K. & Kim, S. J. Antibacterial Efficiency of Graphene Nanosheets against Pathogenic Bacteria via Lipid Peroxidation. *J. Phys. Chem. C* **116**, 17280–17287 (2012).
65. Das, M. R. et al. Synthesis of silver nanoparticles in an aqueous suspension of graphene oxide sheets and its antimicrobial activity. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **83**, 16–22 (2011).
66. Jiao, X., Zhang, L., Qiu, Y. & Guan, J. Comparison of the adsorption of cationic blue onto graphene oxides prepared from natural graphites with different graphitization degrees. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **529**, 292–301 (2017).
67. Guerrero-Contreras, J. & Caballero-Briones, F. Graphene oxide powders with different oxidation degree, prepared by synthesis variations of the Hummers method. *Mater. Chem. Phys.* **153**, 209–220 (2015).
68. Hu, Z. et al. Characterization of graphite oxide after heat treatment. *New J. Chem.* **36**, 1373–1377 (2012).
69. Yang, D. et al. Chemical analysis of graphene oxide films after heat and chemical treatments by X-ray photoelectron and Micro-Raman spectroscopy. *Carbon* **47**, 145–152 (2009).
70. Yan, X., Chen, J., Yang, J., Xue, Q. & Miele, P. Fabrication of Free-Standing, Electrochemically Active, and Biocompatible Graphene Oxide–Polyaniline and Graphene–Polyaniline Hybrid Papers. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2**, 2521–2529 (2010).
71. Ruiz, O. N. et al. Graphene Oxide: A Nonspecific Enhancer of Cellular Growth. *ACS Nano* **5**, 8100–8107 (2011).
72. Sun, Z., James, D. K. & Tour, J. M. Graphene Chemistry: Synthesis and Manipulation. *J. Phys. Chem. Lett.* **2**, 2425–2432 (2011).
73. Krishnamoorthy, K., Veerapandian, M., Yun, K. & Kim, S.-J. The chemical and structural analysis of graphene oxide with different degrees of oxidation. *Carbon* **53**, 38–49 (2013).
74. Su, C. & Loh, K. P. Carbocatalysts: Graphene Oxide and Its Derivatives. *Acc. Chem. Res.* **46**, 2275–2285 (2013).
75. Kulkarni, D. D., Choi, I., Singamaneni, S. S. & Tsukruk, V. V. Graphene Oxide–Polyelectrolyte Nanomembranes. *ACS Nano* **4**, 4667–4676 (2010).
76. Kuilla, T. et al. Recent advances in graphene based polymer composites. *Prog. Polym. Sci.* (2010). doi:10.1016/j.progpolymsci.2010.07.005
77. Compton, O. C. & Nguyen, S. T. Graphene oxide, highly reduced graphene oxide, and graphene: versatile building blocks for carbon-based materials. *Small* **6**, 711–723 (2010).
78. Loh, K. P., Bao, Q., Eda, G. & Chhowalla, M. Graphene oxide as a chemically tunable platform for optical applications. *Nat. Chem.* **2**, 1015–1024 (2010).
79. Gómez-Navarro, C., Burghard, M. & Kern, K. Elastic Properties of Chemically Derived Single Graphene Sheets. *Nano Lett.* **8**, 2045–2049 (2008).
80. Suk, J. W., Piner, R. D., An, J. & Ruoff, R. S. Mechanical Properties of Monolayer Graphene Oxide. *ACS Nano* **4**, 6557–6564 (2010).
81. Wan, S. et al. Use of Synergistic Interactions to Fabricate Strong, Tough, and Conductive Artificial Nacre Based on Graphene Oxide and Chitosan. *ACS Nano* **9**, 9830–9836 (2015).
82. Liu, Y., Yu, D., Zeng, C., Miao, Z. & Dai, L. Biocompatible Graphene Oxide-Based Glucose Biosensors. *Langmuir* **26**, 6158–6160 (2010).
83. Wang, K. et al. Biocompatibility of Graphene Oxide. *Nanoscale Res. Lett.* **6**, 8 (2010).
84. Zhang, X. et al. Distribution and biocompatibility studies of graphene oxide in mice after intravenous administration. *Carbon* **49**, 986–995 (2011).
85. Hu, W. et al. Graphene-Based Antibacterial Paper. *ACS Nano* **4**, 4317–4323 (2010).

86. Liu, S. et al. Antibacterial Activity of Graphite, Graphite Oxide, Graphene Oxide, and Reduced Graphene Oxide: Membrane and Oxidative Stress. *ACS Nano* **5**, 6971–6980 (2011).
87. Perreault, F., Tousley, M. E. & Elimelech, M. Thin-Film Composite Polyamide Membranes Functionalized with Biocidal Graphene Oxide Nanosheets. *Environ. Sci. Technol. Lett.* **1**, 71–76 (2014).
88. Perreault, F., de Faria, A. F., Nejati, S. & Elimelech, M. Antimicrobial Properties of Graphene Oxide Nanosheets: Why Size Matters. *ACS Nano* **9**, 7226–7236 (2015).
89. Tu, Y. et al. Destructive extraction of phospholipids from *Escherichia coli* membranes by graphene nanosheets. *Nat. Nanotechnol.* **8**, 968–968 (2013).
90. Chen, J. et al. Graphene oxide exhibits broad-spectrum antimicrobial activity against bacterial phytopathogens and fungal conidia by intertwining and membrane perturbation. *Nanoscale* **6**, 1879–1889 (2014).
91. Musico, Y. L. F., Santos, C. M., Dalida, M. L. P. & Rodrigues, D. F. Surface Modification of Membrane Filters Using Graphene and Graphene Oxide-Based Nanomaterials for Bacterial Inactivation and Removal. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2**, 1559–1565 (2014).
92. Nanda, S. S., Yi, D. K. & Kim, K. Study of antibacterial mechanism of graphene oxide using Raman spectroscopy. *Sci. Rep.* **6**, srep28443 (2016).
93. Zhang, W. et al. Fast and Considerable Adsorption of Methylene Blue Dye onto Graphene Oxide. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **87**, 86 (2011).
94. Ramesha, G. K., Vijaya Kumara, A., Muralidhara, H. B. & Sampath, S. Graphene and graphene oxide as effective adsorbents toward anionic and cationic dyes. *J. Colloid Interface Sci.* **361**, 270–277 (2011).
95. Bradder, P., Ling, S. K., Wang, S. & Liu, S. Dye Adsorption on Layered Graphite Oxide. *J. Chem. Eng. Data* **56**, 138–141 (2011).
96. Wang, S., Zhu, Z. H., Coomes, A., Haghseresht, F. & Lu, G. Q. The physical and surface chemical characteristics of activated carbons and the adsorption of methylene blue from wastewater. *J. Colloid Interface Sci.* **284**, 440–446 (2005).
97. Malik, R., Ramteke, D. S. & Wate, S. R. Adsorption of malachite green on groundnut shell waste based powdered activated carbon. *Waste Manag.* **27**, 1129–1138 (2007).
98. Robati, D. et al. Removal of hazardous dyes-BR 12 and methyl orange using graphene oxide as an adsorbent from aqueous phase. *Chem. Eng. J.* **284**, 687–697 (2016).
99. Konicki, W., Aleksandrak, M. & Mijowska, E. Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies on adsorption of cationic dyes from aqueous solutions using graphene oxide. *Chem. Eng. Res. Des.* **123**, 35–49 (2017).
100. Elsagh, A. et al. Evaluation of the potential cationic dye removal using adsorption by graphene and carbon nanotubes as adsorbents surfaces. *Arab. J. Chem.* **10**, S2862–S2869 (2017).
101. Barbolina, I. et al. Purity of graphene oxide determines its antibacterial activity. *2D Mater.* **3**, 025025 (2016).
102. Palmieri, V. et al. The graphene oxide contradictory effects against human pathogens. *Nanotechnology* **28**, 152001 (2017).
103. Lee, J. et al. Graphene oxide nanoplatelets composite membrane with hydrophilic and antifouling properties for wastewater treatment. *J. Membr. Sci.* **448**, 223–230 (2013).
104. Mural, P. K. S. et al. Polyolefin based antibacterial membranes derived from PE/PEO blends compatibilized with amine terminated graphene oxide and maleated PE. *J. Mater. Chem. A* **2**, 17635–17648 (2014).
105. Kanchanapally, R. et al. Antimicrobial peptide-conjugated graphene oxide membrane for efficient removal and effective killing of multiple drug resistant bacteria. *RSC Adv.* **5**, 18881–18887 (2015).

106. Akhavan, O. & Ghaderi, E. Toxicity of Graphene and Graphene Oxide Nanowalls Against Bacteria. *ACS Nano* **4**, 5731–5736 (2010).
107. Marta, B. et al. Designing chitosan–silver nanoparticles–graphene oxide nanohybrids with enhanced antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **487**, 113–120 (2015).
108. Kang, S., Pinault, M., Pfefferle, L. D. & Elimelech, M. Single-Walled Carbon Nanotubes Exhibit Strong Antimicrobial Activity. *Langmuir* **23**, 8670–8673 (2007).
109. Kang, S., Herzberg, M., Rodrigues, D. F. & Elimelech, M. Antibacterial Effects of Carbon Nanotubes: Size Does Matter! *Langmuir* **24**, 6409–6413 (2008).
110. Manna, S. K. et al. Single-walled carbon nanotube induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor-kappaB in human keratinocytes. *Nano Lett.* **5**, 1676–1684 (2005).
111. Nel, A., Xia, T., Mädler, L. & Li, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* **311**, 622–627 (2006).
112. Ding, L. et al. Molecular characterization of the cytotoxic mechanism of multiwall carbon nanotubes and nano-onions on human skin fibroblast. *Nano Lett.* **5**, 2448–2464 (2005).
113. Narayan, R. J., Berry, C. J. & Brigmon, R. L. Structural and biological properties of carbon nanotube composite films. *Mater. Sci. Eng. B* **123**, 123–129 (2005).
114. Akhavan, O., Ghaderi, E. & Esfandiari, A. Wrapping Bacteria by Graphene Nanosheets for Isolation from Environment, Reactivation by Sonication, and Inactivation by Near-Infrared Irradiation. *J. Phys. Chem. B* **115**, 6279–6288 (2011).
115. Li, S. et al. Polyaniline-Coupled Multifunctional 2D Metal Oxide/Hydroxide Graphene Nanohybrids. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 12105–12109 (2013).
116. Criado, A., Melchionna, M., Marchesan, S. & Prato, M. The Covalent Functionalization of Graphene on Substrates. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 10734–10750 (2015).
117. Chen, Y., Tan, C., Zhang, H. & Wang, L. Two-dimensional graphene analogues for biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 2681–2701 (2015).
118. Dikin, D. A. et al. Preparation and characterization of graphene oxide paper. *Nature* **448**, 457–460 (2007).
119. Compton, O. C. et al. Tuning the Mechanical Properties of Graphene Oxide Paper and Its Associated Polymer Nanocomposites by Controlling Cooperative Intersheet Hydrogen Bonding. *ACS Nano* **6**, 2008–2019 (2012).
120. Acik, M. et al. The Role of Intercalated Water in Multilayered Graphene Oxide. *ACS Nano* **4**, 5861–8 (2010).
121. Stankovich, S. et al. Graphene-based composite materials. *Nature* **442**, 282–286 (2006).
122. Talyzin, A. V., Hausmaninger, T., You, S. & Szabó, T. The structure of graphene oxide membranes in liquid water, ethanol and water-ethanol mixtures. *Nanoscale* **6**, 272–281 (2014).
123. Cheng, C., Li, S., Thomas, A., Kotov, N. & Haag, R. Functional Graphene Nanomaterials Based Architectures: Biointeractions, Fabrications, and Emerging Biological Applications. *Chem. Rev.* **117**, (2017).
124. Park, S., Dikin, D. A., Nguyen, S. T. & Ruoff, R. S. Graphene Oxide Sheets Chemically Cross-Linked by Polyallylamine. *J. Phys. Chem. C* **113**, 15801–15804 (2009).
125. Cheng, Q., Wu, M., Li, M., Jiang, L. & Tang, Z. Ultratough Artificial Nacre Based on Conjugated Cross-linked Graphene Oxide. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 3750–3755 (2013).
126. Abraham, J. et al. Tunable sieving of ions using graphene oxide membranes. *Nat. Nanotechnol.* **12**, 546–550 (2017).
127. Yang, X. et al. Ordered Gelation of Chemically Converted Graphene for Next-Generation Electroconductive Hydrogel Films. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 7325–7328 (2011).

128. Compton, O. C., Dikin, D. A., Putz, K. W., Brinson, L. C. & Nguyen, S. T. Electrically Conductive “Alkylated” Graphene Paper via Chemical Reduction of Amine-Functionalized Graphene Oxide Paper. *Adv. Mater.* **22**, 892–896 (2010).
129. Zhang, M. et al. Multifunctional Pristine Chemically Modified Graphene Films as Strong as Stainless Steel. *Adv. Mater.* **27**, 6708–6713 (2015).
130. An, Z., Compton, O. C., Putz, K. W., Brinson, L. C. & Nguyen, S. T. Bio-Inspired Borate Cross-Linking in Ultra-Stiff Graphene Oxide Thin Films. *Adv. Mater.* **23**, 3842–3846 (2011).
131. Lai, C.-L. et al. Bio-inspired cross-linking with borate for enhancing gas-barrier properties of poly(vinyl alcohol)/graphene oxide composite films. *Carbon* **82**, 513–522 (2015).
132. Xu, Y., Hong, W., Bai, H., Li, C. & Shi, G. Strong and ductile poly(vinyl alcohol)/graphene oxide composite films with a layered structure. *Carbon* **47**, 3538–3543 (2009).
133. Wang, X., Bai, H., Yao, Z., Liu, A. & Shi, G. Electrically conductive and mechanically strong biomimetic chitosan/reduced graphene oxide composite films. *J. Mater. Chem.* **20**, 9032–9036 (2010).
134. Wu, Q., Xu, Y., Yao, Z., Liu, A. & Shi, G. Supercapacitors Based on Flexible Graphene/Polyaniline Nanofiber Composite Films. *ACS Nano* **4**, 1963–1970 (2010).
135. Chen, K., Shi, B., Yue, Y., Qi, J. & Guo, L. Binary Synergy Strengthening and Toughening of Bio-Inspired Nacre-like Graphene Oxide/Sodium Alginate Composite Paper. *ACS Nano* **9**, 8165–8175 (2015).
136. Xu, Y., Bai, H., Lu, G., Li, C. & Shi, G. Flexible Graphene Films via the Filtration of Water-Soluble Noncovalent Functionalized Graphene Sheets. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 5856–5857 (2008).
137. Kang, D., Cai, Z., Jin, Q. & Zhang, H. Bio-inspired composite films with integrative properties based on the self-assembly of gellan gum–graphene oxide crosslinked nanohybrid building blocks. *Carbon* **91**, 445–457 (2015).
138. Joshi, R. K. et al. Precise and Ultrafast Molecular Sieving Through Graphene Oxide Membranes. *Science* **343**, 752–754 (2014).
139. Li, H. et al. Ultrathin, Molecular-Sieving Graphene Oxide Membranes for Selective Hydrogen Separation. *Science* **342**, 95–98 (2013).
140. Xu, C., Cui, A., Xu, Y. & Fu, X. Graphene oxide–TiO₂ composite filtration membranes and their potential application for water purification. *Carbon* **62**, 465–471 (2013).
141. Jang, J. H., Woo, J. Y., Lee, J. & Han, C.-S. Ultrathin graphene oxide membranes for water purification. in 2015 IEEE 15th International Conference on Nanotechnology (IEEE-NANO) 212–215 (2015). doi:10.1109/NANO.2015.7388960
142. Tian, Y., Cao, Y., Wang, Y., Yang, W. & Feng, J. Realizing Ultrahigh Modulus and High Strength of Macroscopic Graphene Oxide Papers Through Crosslinking of Mussel-Inspired Polymers. *Adv. Mater.* **25**, 2980–2983 (2013).
143. Chen, H., Müller, M. B., Gilmore, K. J., Wallace, G. G. & Li, D. Mechanically Strong, Electrically Conductive, and Biocompatible Graphene Paper. *Adv. Mater.* **20**, 3557–3561 (2008).
144. Gao, Y. et al. The Effect of Interlayer Adhesion on the Mechanical Behaviors of Macroscopic Graphene Oxide Papers. *ACS Nano* **5**, 2134–2141 (2011).
145. Nair, R. R., Wu, H. A., Jayaram, P. N., Grigorieva, I. V. & Geim, A. K. Unimpeded Permeation of Water Through Helium-Leak-Tight Graphene-Based Membranes. *Science* **335**, 442–444 (2012).
146. Rouzière, S. et al. Intercalated water in multi-layered graphene oxide paper: an X-ray scattering study. *J. Appl. Crystallogr.* **50**, 876–884 (2017).

147. Luo, C., Yeh, C.-N., Baltazar, J. M. L., Tsai, C.-L. & Huang, J. A Cut-and-Paste Approach to 3D Graphene-Oxide-Based Architectures. *Adv. Mater.* Deerfield Beach Fla (2018). doi:10.1002/adma.201706229
148. Aboutalebi, S. H., Gudarzi, M. M., Zheng, Q. B. & Kim, J.-K. Spontaneous Formation of Liquid Crystals in Ultralarge Graphene Oxide Dispersions. *Adv. Funct. Mater.* **21**, 2978–2988 (2011).
149. Cruz-Silva, R. et al. Super-stretchable Graphene Oxide Macroscopic Fibers with Outstanding Knotability Fabricated by Dry Film Scrolling. *ACS Nano* **8**, 5959–5967 (2014).
150. Park, S. et al. Graphene Oxide Papers Modified by Divalent Ions—Enhancing Mechanical Properties via Chemical Cross-Linking. *ACS Nano* **2**, 572–578 (2008).
151. Li, Y.-Q., Yu, T., Yang, T.-Y., Zheng, L.-X. & Liao, K. Bio-Inspired Nacre-like Composite Films Based on Graphene with Superior Mechanical, Electrical, and Biocompatible Properties. *Adv. Mater.* **24**, 3426–3431 (2012).
152. Cui, W. et al. A Strong Integrated Strength and Toughness Artificial Nacre Based on Dopamine Cross-Linked Graphene Oxide. *ACS Nano* **8**, 9511–9517 (2014).
153. Zhang, Y. et al. Graphene-based artificial nacre nanocomposites. *Chem. Soc. Rev.* **45**, 2378–2395 (2016).
154. Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K. & Dutta, J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chem.* **114**, 1173–1182 (2009).
155. Kong, M., Chen, X. G., Xing, K. & Park, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *Int. J. Food Microbiol.* **144**, 51–63 (2010).
156. Yang, X., Tu, Y., Li, L., Shang, S. & Tao, X. Well-Dispersed Chitosan/Graphene Oxide Nanocomposites. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2**, 1707–1713 (2010).
157. Zuo, P.-P. et al. Fabrication of biocompatible and mechanically reinforced graphene oxide-chitosan nanocomposite films. *Chem. Cent. J.* **7**, 39 (2013).
158. Kyzas, G. Z., Bikiaris, D. N. & Mitropoulos, A. C. Chitosan adsorbents for dye removal: a review. *Polym. Int.* **66**, 1800–1811 (2017).
159. Vakili, M. et al. Application of chitosan and its derivatives as adsorbents for dye removal from water and wastewater: A review. *Carbohydr. Polym.* **113**, 115–130 (2014).
160. Fan, L. et al. Preparation of novel magnetic chitosan/graphene oxide composite as effective adsorbents toward methylene blue. *Bioresour. Technol.* **114**, 703–706 (2012).
161. Wang, Y. et al. Porous chitosan doped with graphene oxide as highly effective adsorbent for methyl orange and amido black 10B. *Carbohydr. Polym.* **115**, 686–693 (2015).
162. Gul, K. et al. Functionalization of magnetic chitosan with graphene oxide for removal of cationic and anionic dyes from aqueous solution. *Carbohydr. Polym.* **152**, 520–531 (2016).
163. Zheng, L.-Y. & Zhu, J.-F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydr. Polym.* **54**, 527–530 (2003).
164. Tripathi, S. et al. Chitosan based bioactive film: Functional properties towards biotechnological needs. *Asian Chitin J.* **4**, 429–436 (2008).
165. Sundar, K., Harikarthick, V., Swarna Karthika, V. & R, A. Preparation of Chitosan-Graphene Oxide Nanocomposite and Evaluation of Its Antimicrobial Activity. *J. Bionanoscience* **8**, (2014).
166. Grande, C. D. et al. Chitosan Cross-Linked Graphene Oxide Nanocomposite Films with Antimicrobial Activity for Application in Food Industry. *Macromol. Symp.* **374**, n/a-n/a (2017).
167. Han, D., Yan, L., Chen, W. & Li, W. Preparation of chitosan/graphene oxide composite film with enhanced mechanical strength in the wet state. *Carbohydr. Polym.* **83**, 653–658 (2011).

168. Whatman® Anodisc Inorganic Membranes - Whatman® Membrane Filtration. Sigma-Aldrich Available at: <http://www.sigmaaldrich.com/labware/labware-products.html?TablePage=109501875>. (Accessed: 1st July 2017)
169. Sookhakian, M. et al. Layer-by-Layer Electrodeposited Reduced Graphene Oxide-Copper Nanopolyhedra Films as Efficient Platinum-Free Counter Electrodes in High Efficiency Dye-Sensitized Solar Cells. *J. Electrochem. Soc.* **163**, D154–D159 (2016).
170. Sookhakian, M. et al. Enhanced Photovoltaic Performance of Polymer Hybrid Nanostructure Heterojunction Solar Cells Based on Poly(3-hexylthiophene)/ZnS/ZnO/Reduced Graphene Oxide Shell–Core Nanorod Arrays. (2014). doi:10.1021/ie501677r
171. Blanton, T. N. & Majumdar, D. X-ray diffraction characterization of polymer intercalated graphite oxide. *Powder Diffr.* **27**, 104–107 (2012).
172. Warren, B. E. X-Ray Determination of the Structure of Glass*. *J. Am. Ceram. Soc.* **17**, 249–254 (1934).
173. Chakraborty, R., Dey, A. & Mukhopadhyay, A. K. Loading Rate Effect on Nanohardness of Soda-Lime-Silica Glass. *Metall. Mater. Trans. A* **41**, 1301–1312 (2010).
174. Prasad, K. et al. Synergic bactericidal effects of reduced graphene oxide and silver nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Sci. Rep.* **7**, 1591 (2017).
175. He, P. et al. Processable Aqueous Dispersions of Graphene Stabilized by Graphene Quantum Dots. *Chem. Mater.* **27**, 218–226 (2015).
176. Hao, Y. et al. Probing Layer Number and Stacking Order of Few-Layer Graphene by Raman Spectroscopy. *Small* **6**, 195–200 (2010).
177. Ferrari, A. et al. Raman Spectrum of Graphene and Graphene Layers. *Phys. Rev. Lett.* **97**, 187401 (2006).
178. Emadi, F., Amini, A., Gholami, A. & Ghasemi, Y. Functionalized Graphene Oxide with Chitosan for Protein Nanocarriers to Protect against Enzymatic Cleavage and Retain Collagenase Activity. *Sci. Rep.* **7**, 42258 (2017).
179. Li, Y. et al. Mechanical and dye adsorption properties of graphene oxide/chitosan composite fibers prepared by wet spinning. *Carbohydr. Polym.* **102**, 755–761 (2014).
180. Konicki, W., Aleksandrzak, M., Moszyński, D. & Mijowska, E. Adsorption of anionic azo-dyes from aqueous solutions onto graphene oxide: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *J. Colloid Interface Sci.* **496**, 188–200 (2017).
181. Romero-Vargas Castrillón, S., Perreault, F., de Faria, A. F. & Elimelech, M. Interaction of Graphene Oxide with Bacterial Cell Membranes: Insights from Force Spectroscopy. *Environ. Sci. Technol. Lett.* **2**, 112–117 (2015).
182. Gurunathan, S., Han, J. W., Dayem, A. A., Eppakayala, V. & Kim, J.-H. Oxidative stress-mediated antibacterial activity of graphene oxide and reduced graphene oxide in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Nanomedicine* **7**, 5901–5914 (2012).
183. Panda, S., Rout, T. K., Prusty, A. D., Ajayan, P. M. & Nayak, S. Electron Transfer Directed Antibacterial Properties of Graphene Oxide on Metals. *Adv. Mater.* **30**, n/a-n/a (2018).
184. Liu, S. et al. Lateral Dimension-Dependent Antibacterial Activity of Graphene Oxide Sheets. *Langmuir* **28**, 12364–12372 (2012).
185. Takahashi, T., Imai, M., Suzuki, I. & Sawai, J. Growth inhibitory effect on bacteria of chitosan membranes regulated with deacetylation degree. *Biochem. Eng. J.* **40**, 485–491 (2008).

7 ANEXOS

7.1 FIGURAS ADICIONALES

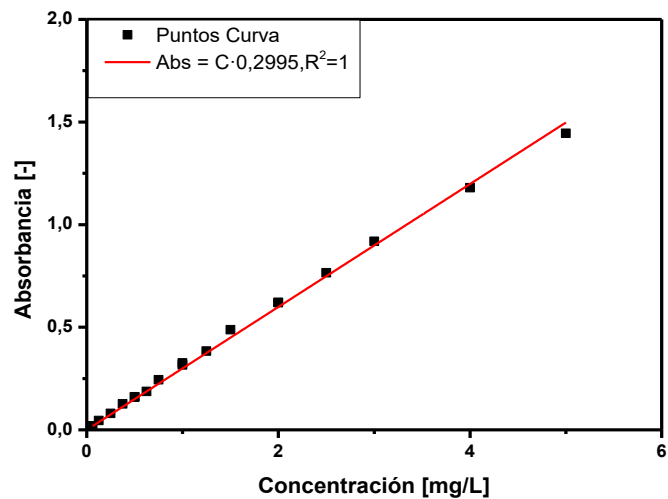


Figura 65. Curva de calibración de azul de metileno



Figura 66. Muestras y porta muestras de vidrio utilizados para realizar las mediciones de XRD.

7.2 TABLAS ADICIONALES

Tabla 3. Masas y concentraciones de las muestras utilizadas en el ensayo de contacto, para S. aureus. En la muestra de papel la masa equivalente a la de un cuadrado de papel de 1 · 1 [cm²].

Muestra	Masa [mg]	Masa promedio [mg]		Concentración [mg/mL]	Concentración promedio [mg/mL]	
Papel de GO	5,80	5,03	±0,82	0,58	0,50	±0,08
	5,40			0,54		
	3,90			0,39		
Polvo de GO	8,30	8,33	±0,05	0,83	0,83	±0,00
	8,30			0,83		
	8,40			0,84		
Papel de GO/CS	4,90	4,20	±0,50	0,49	0,42	±0,05
	3,90			0,39		
	3,80			0,38		
Papel de CS	3,10	2,93	±0,17	0,31	0,29	±0,02
	3,00			0,3		
	2,70			0,27		

Tabla 4. Masas y concentraciones de las muestras utilizadas en el ensayo de contacto, para E. coli. En la muestra de papel la masa equivalente a la de un cuadrado de papel de 1 · 1 [cm²].

Muestra	Masa [mg]	Masa promedio [mg]		Concentración [mg/mL]	Concentración promedio [mg/mL]	
Papel de GO	5,0	6,6	±1,1	0,5	0,7	±0,1
	7,3			0,7		
	7,5			0,8		
Polvo de GO	8,1	8,4	±0,3	0,8	0,8	±0,0
	8,8			0,9		
	8,2			0,8		
Papel de GO/CS	2,5	3,0	±0,5	0,3	0,3	±0,0
	3,0			0,3		
	3,6			0,4		
Papel de CS	2,3	3,0	±0,5	0,2	0,3	±0,1
	3,1			0,3		
	3,6			0,4		