



ارزیابی ریزساختاری و خواص ضدباکتری گرافن اکسید سنتز شده به روش سبز

مژده عزیزی، مهدی کلانتر*

گروه مهندسی مواد، دانشکده مهندسی معدن و متالورژی، دانشگاه یزد، یزد، ایران

تاریخچه مقاله:

ثبت اولیه: ۱۳۹۸/۱۲/۱۲

دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۳۹۹/۰۴/۱۰

پذیرش قطعی: ۱۳۹۹/۱۰/۲۴

کلیدواژه‌ها:

گرافن اکسید،

سنتز،

روش سبز،

خواص ضدباکتری

چکیده در این پژوهش، از روشی سریع، سازگار با محیط زیست و کم هزینه، برای تولید انبوه گرافن اکسید استفاده شده است. در این فرآیند، گرافن اکسید، از باگاس نیشکر خوزستان (به عنوان ضایعات زراعی)، طی عملیات حرارتی تک مرحله‌ای، در کوره مافلی، در دمای ۳۵۰ درجه سلسیوس، به مدت ۱۵ دقیقه، در محیط اکسایشی، سنتز شد. نتایج حاصل از آزمون‌های طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز و پراش پرتو ایکس، تشکیل گرافن اکسید را به خوبی تأیید می‌کند. نتایج بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی و میکروسکوپ نیروی اتمی، نشان می‌دهد که میزان چین‌خوردگی‌های ورق‌های گرافن اکسید، کم، تعداد لایه‌ها، ۵ تا ۶ عدد، اندازه متوسط ضخامت صفحات، ۵ نانومتر و متوسط ابعاد جانبی صفحات، ۵۰۰ نانومتر است. آزمون سمیت این ماده سنتز شده، در غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر محیط کشت باکتری، روی باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس، سویه گرم منفی اشیریشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا، بررسی شد. نتایج، نشان می‌دهد که گرافن اکسید، در غلظت‌های ۴۰۰ و ۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، برای باکتری‌ها، نقش سمی و ضدباکتریایی داشته و میزان رشد باکتری‌ها، پایین است. همچنین، نانورقه‌های گرافن اکسید، اثر ضدباکتری بیشتری نسبت به باکتری گرم مثبت، در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی دارند. نتایج آنالیز حرارتی افتراقی روی باگاس نیشکر، در محیط هوا، نشان می‌دهد که شکل‌گیری گرافن اکسید، در محدوده دمایی ۳۵۰ درجه سلسیوس بوده اما در محیط آرگون، این دما بالاتر است. به علاوه، نتایج آنالیز حرارتی انجام شده روی محصول گرافن اکسید سنتز شده در محیط اکسیدی، نشان‌دهنده شروع ناپایداری آن از دمای ۶۰ درجه سلسیوس است.

<https://doi.org/10.30501/jamt.2020.221997.1075>URL: http://www.jamt.ir/article_122492.html

JAMT: Vol. 9, No. 3, (Autumn 2020), 51-61

Evaluation of Microstructural and Antibacterial Properties of Graphene Oxide Synthesized by Green Method

Mojdeh Azizi, Mehdi Kalantar*

Materials Engineering Group, Department of Mining and Metallurgical Engineering, Yazd University, Yazd, Yazd, Iran

Paper History:

Received: 2020-03-02

Revised in revised form: 2020-06-30

Accepted: 2021-01-13

Keywords:

Graphene Oxide,

Synthesis,

Green Method,

Antibacterial Properties

Abstract

In this research, a fast, environmentally friendly, and low-cost method has been used for the synthesis of large-scale production of graphene oxide. In this process, graphene oxide was synthesized via single-step reforming of sugarcane bagasse agricultural waste by oxidation under muffled atmosphere conditions at 350 °C and for 15 minutes. The results of Fourier transform infrared spectroscopy and X-ray diffraction analyses confirm the formation of graphene oxide. The results of scanning electron microscopy and atomic force microscopy studies show that the graphene oxide sheets are with few wrinkles, the number of layers is 5-6 layers, the average size of the plate thickness is 5 nm, and the average lateral dimensions of the plates is 500 nm. The synthesized graphene oxide was evaluated by the toxicity test at concentrations of 200, 400, and 600 µg/ml on Gram-positive bacteria, "Streptococcus iniae", and Gram-negative bacteria,

*عهده دار مکاتبات

نشانی: ایران، یزد، دانشگاه یزد، دانشکده مهندسی معدن و متالورژی، گروه مهندسی مواد، تلفن: ۰۹۱۳۳۵۱۳۴۱۸، دورنگار:-

پیام نگار: mkalantar@yazd.ac.ir

Please cite this article as: Azizi, M., Kalantar, M., "Evaluation of microstructural and antibacterial properties of graphene oxide synthesized by green method", *Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT)*, Vol. 9, No. 3, (2020), 51-61. (<https://doi.org/10.30501/jamt.2020.221997.1075>).



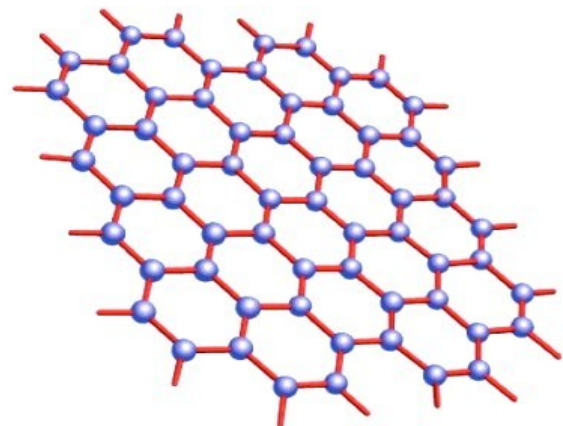
“Escherichia coli” and “Pseudomonas aeruginosa”. The results show that graphene oxide at concentrations of 400 and 600 $\mu\text{g} / \text{ml}$ has a toxic and an antibacterial agent for bacteria and it has reduced the growth rate of bacteria. In addition, graphene oxide nanosheets are more toxic to gram-positive bacteria than gram-negative bacteria. The results of differential thermal analysis on sugarcane bagasse show that the formation of graphene oxide in air is at a temperature of 350 °C but it is in argon atmosphere is higher. In addition, the results of the thermal analysis performed on the synthesized graphene oxide in the air atmosphere indicate that its instability begins at 60 °C.

<https://doi.org/10.30501/jamt.2020.221997.1075>

URL: http://www.jamt.ir/article_122492.html

۱- مقدمه

گرافن، تک‌لایه ای از اتم‌های کربن، با پیوند sp^2 ، به شکل شبکه‌ای لانه‌زنبوری و با ساختار بلوری دو بعدی است که نخستین بار، در سال ۲۰۰۴ میلادی، سنتز شد [۱]. براساس ساختار هندسی منحصر به فرد این ماده، انتظار می‌رود که گرافن، خواص فیزیکی و شیمیایی قابل توجهی، نظیر مدول یانگ و استحکام شکست بالا، هدایت الکتریکی و گرمایی بالا [۲ و ۳]، سطح ویژه و زیست‌سازگاری بالایی داشته باشد [۴-۷]. این ویژگی‌ها، گرافن را به‌عنوان ماده‌ای ایده‌آل، در زمینه‌های مختلفی، مانند فیزیک کوانتوم، نانو الکترونیک، انرژی، نانوکامپوزیت‌ها و مواد زیستی، مطرح می‌سازد [۸-۱۲]. گرافن، در قیاس با سایر مواد گرافیتی سه‌بعدی و سایر اشکال هندسی کربن (مثل فولرین^۱ کروی صفر بعدی و یا نانولوله‌های کربنی تک‌بعدی)، از لحاظ ساختاری، تفاوت اساسی دارد؛ زیرا از یک لایه با ساختار پای کونژوگه^۲ متشکل از حلقه ۶ ضلعی، تشکیل شده و به‌شکل ابرمولکول مسطح آروماتیک، مشاهده می‌شود (شکل ۱) [۱۳].



شکل ۱. ساختار دوبعدی گرافن [۱۳]

گرافن اکسید^۳ (GO)، همان ساختار لایه‌ای گرافیتی را دارد که فاصله بین این لایه‌ها، به‌مراتب بیشتر و رنگ آن، به-

دلیل اکسایش، روشن‌تر شده است. در واقع، گرافن اکسید، همان صفحه پایه گرافیت با عوامل آمیخته از گروه‌های اپوکسی و هیدروکسیل و نیز گروه‌های کربونیل^۴ و کربوکسیل^۵ در لبه‌ها است که وجود این گروه‌ها، منجر به آب‌دوستی ساختار گرافن اکسید می‌شود. این ماده، نارسای الکتریسیته است و حضور گروه‌های اکسیژن‌دار، آن را از نظر حرارتی، ناپایدار می‌کند. با این وجود، خاصیت رسانایی الکتریکی گرافن اکسید، می‌تواند با احیاء شیمیایی، تا حد رسانایی گرافیت اولیه در ساختار گرافن، بازیابی شود [۱۴].

روش متداول برای سنتز گرافن اکسید، روش هامرز یا روش بهبود یافته هامرز است. در این روش، ابتدا صفحات گرافیتی را منبسط می‌کنند و در حضور اسیدهای غلیظ (مثل اسید نیتریک و اسید سولفوریک) و عوامل اکسیدکننده قوی، مانند پرمنگنات پتاسیم و نترات سدیم، آن را به اکسید گرافیت، تبدیل می‌کنند. این فرآیند، با افزایش فاصله بین‌لایه‌ای همراه است که مقدار آن، به میزان اکسایش و آب‌پوشانی^۶، بستگی دارد. فاصله زیاد بین لایه‌ها، موجب می‌شود که مولکول‌های آب، بتوانند در این فضا، نفوذ کنند و منجر به توزیع مناسب صفحات گرافن اکسید، در محیط آبی شوند [۱۵-۱۷].

در این روش‌ها، گازهای سمی و انفجاری دی اکسید نیتروژن (NO_2)، دی نیتروژن تتراکسید (N_2O_4) و دی اکسید کلر (ClO_2)، تولید می‌شود که برای محیط زیست، مضر است. در چند سال اخیر، روش‌های مختلفی، مانند لایه‌برداری مکانیکی، رسوب‌دهی شیمیایی بخار^۷ (CVD) و سایر روش‌های شیمیایی، برای سنتز گرافن و گرافن اکسید، اجرا شده است که پیچیده و گران‌قیمت هستند [۱۸]. اکثر نمونه‌های تجاری موجود در بازار، با هزینه گزافی، به‌روش هامرز یا هامرز اصلاح‌شده، سنتز می‌شوند. هزینه بالا و تولید گازهای

⁴ Carbonyl

⁵ Carboxyl

⁶ Hydration

⁷ Chemical Vapor Deposition

¹ Fullerene

² Conjugated

³ Graphene Oxide

فعالیت ضدباکتریایی نانوصفحات گرافن اکسید، ناشناخته است و فعالیت ضدباکتریایی این ماده، به‌عنوان یک فعالیت مورد توجه در پزشکی، جای بررسی دارد.

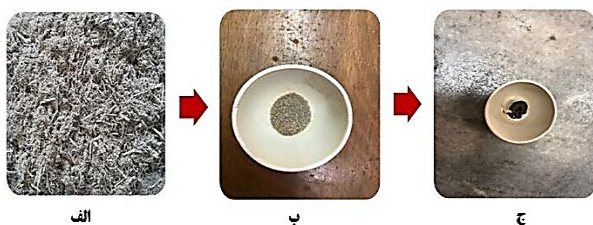
در این تحقیق، گرافن اکسید، با قابلیت تجاری‌سازی، از اکسایش باگاس نیشکر، طی یک مرحله و در کوره مافلی، سنتز شد و در نهایت، اثر ضدباکتری آن روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا، مورد بررسی قرار گرفت.

۲- روش تحقیق

۲-۱- سنتز گرافن اکسید از باگاس نیشکر

در این پژوهش، نانوصفحات گرافن اکسید، از اکسایش باگاس نیشکر، به‌عنوان ضایعات چغندر قند، سنتز شد. بدین منظور، باگاس نیشکر خوزستان و فروسن (برند تجاری سیگما آلدریج با خلوص ۹۸ درصد)، به‌عنوان مواد اولیه، مورد استفاده قرار گرفتند.

ابتدا، آب‌گیری از باگاس نیشکر، در خشک‌کن با دمای ۶۰ درجه سلسیوس، انجام شد و سپس، لیاف حاصل، آسیاب و به‌وسیله سرنده با مش ۴۰۰، دانه‌بندی شد. به‌منظور سنتز گرافن اکسید، ابتدا ۰/۵ گرم پودر باگاس نیشکر سرنده‌شده با اندازه ذرات زیر ۳۷ میکرون، با ۰/۱ گرم فروسن (به‌عنوان کاتالیست)، مخلوط شد و سپس، در کوره مافلی که به دمای ۳۵۰ درجه سلسیوس رسیده بود، در حدود ۱۵ دقیقه، قرار گرفت و پودر تقریباً سیاه‌رنگی، حاصل شد. در شکل ۲، نمای کلی مراحل تولید گرافن اکسید، از باگاس نیشکر، نشان داده شده است.



شکل ۲. نمای کلی مراحل سنتز گرافن اکسید از باگاس نیشکر، (الف) فیبرهای تهیه‌شده توسط آب‌گیری از باگاس نیشکر، (ب) پودر حاصل از مرحله آسیاب و سرنده‌کردن فیبرها با مش ۴۰۰ (ج) گرافن اکسید حاصل از واکنش اکسایش پودر باگاس نیشکر در کوره مافلی در دمای ۳۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه

سمی، سبب شد که در این پژوهش، روشی جدید، ساده و سازگار با محیط زیست، برای سنتز گرافن اکسید، پیشنهاد شود [۱۹ و ۲۰].

در سال‌های اخیر، مواد نانوساختار، به‌دلیل مقاومت چندارویی باکتری‌ها، به‌عنوان داروهای ضدباکتریایی، بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند [۲۱]. مواد بر پایه گرافن نیز، خاصیت ضدباکتریایی دارند که علت آن، تعامل قوی بین لبه‌های بسیار تیز نانودیواره‌ها، با غشای سلول باکتری است. طی این تعامل، انتقال بار، بین باکتری و لبه‌های بسیار تیز این نانودیواره‌ها، اتفاق می‌افتد [۲۲]. با توجه به تلاش‌های انجام‌شده در مورد فعالیت ضدباکتریایی نانولوله‌های گرافن اکسید، هو و همکارانش^۱، فعالیت ضدباکتریایی گرافن و گرافن اکسید را در برابر باکتری ای کولی (E. coli)^۲ گزارش دادند [۲۳]. اخوان و همکارانش، بر فعالیت ضدباکتریایی نانولوله‌های گرافن اکسید و گرافن اکسید رسوب داده‌شده روی بستر فولاد ضدزنگ تأکید کردند [۲۴]. به‌تازگی، گرافن‌های عامل‌دارشده با پپتیدهای ضد میکروبی، برای تشخیص زیست‌انتخابی باکتری‌ها، در سطح سلولی، استفاده می‌شوند [۲۵]. به‌همین ترتیب، گزارش‌هایی در مورد خواص ضد میکروبی

نانوکامپوزیت‌های نقره- گرافن اکسید، منتشرشده است [۲۶]. از گرافن اکسید کاهش‌یافته روی فیلم‌های نازک دی‌اکسید تیتانیوم، به‌عنوان فوتوکاتالیست مؤثر برای تخریب باکتری ای کولی (E. coli)، در زیر تابش نور خورشید، استفاده شد [۲۷]. همچنین، عوامل زیادی ممکن است فعالیت ضدباکتری نانومواد کربنی را تحت تأثیر قرار دهند که از میان آنها، می‌توان به اندازه، ساختار الکترونی، خواص شیمیایی سطح و شرایط تعامل بین نانومواد کربنی و سلول‌های باکتری (زمان انکوباسیون، غلظت و محیط کشت) اشاره کرد [۲۸]. شایان ذکر است که فعالیت ضدباکتری این مواد، به قابلیت پراکندگی آنها نیز، بستگی دارد. در واقع، قابلیت پراکندگی، وابسته به گروه‌های عاملی موجود روی این ورقه‌ها است که به‌دلیل حضور گروه‌های اپوکسی، هیدروکسیل و کربوکسیل، قادرند پراکندگی‌های پایدار را در مقایسه با مواد کربنی آب‌گریز، تشکیل دهند [۲۹]. با این وجود، هنوز سازوکار حاکم بر

¹ Huh et al.

² Escherichia Coli

۲-۲- مشخصه‌یابی گرافن اکسید سنتز شده

بررسی فازی نمونه سنتز شده، با استفاده از دستگاه آنالیز پراش پرتو ایکس^۱ (XRD) (ساخت شرکت Philips، مدل PW1730، کشور هلند)، بر مبنای پرتو $\text{Cu K}\alpha$ ، در شرایط کاری ۴۰ کیلوولت و ۳۰ میلی‌آمپر، انجام گرفت. به منظور مطالعه پیوندها و گروه‌های شیمیایی موجود در نمونه سنتز شده، ۱۰ میلی‌گرم از پودر مورد نظر، با ۸۰۰ میلی‌گرم پتاسیم برمید (KBr)، مخلوط و به شکل قرص شفاف، پرس شد. طیف فرسرخ، در گستره عدد موج $4000-600 \text{ cm}^{-1}$ ، با تفکیک^۲ 2 cm^{-1} ، با استفاده از طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز^۳ (FTIR) (مدل FTIR-uinox 55, Bruker, USA)، اندازه‌گیری شد. جهت بررسی ریخت‌شناسی، میکروسکوپ الکترونی روبشی^۴ (SEM) (مدل ProX, Phenom, Netherland)، با ولتاژ شتاب دهنده ۲۰ کیلوولت، استفاده شد. لایه بسیار نازکی از طلا، به روش کندوپاش، توسط دستگاه پوشش‌دهی (DSR1, Nano-structured Coatings, Iran)، به دلیل هدایت الکتریکی ضعیف نمونه، روی نمونه نشانده شد و سپس، مشاهدات ریزساختاری، صورت گرفت. همچنین، از میکروسکوپ نیروی اتمی^۵ (AFM) (مدل easyscan 2, Nanosurf, Switzerland)، با وضعیت کاری تماسی، برای بررسی ساختار نمونه سنتز شده، استفاده شد. لازم به ذکر است که قبل از انجام آزمایش، باگاس نیشکر، توسط دستگاه آنالیز حرارتی (TG-DTA)^۶ (ساخت شرکت Bahr آلمان و مدل STA504)، با سرعت گرمایش ۱۰ درجه سلسیوس بر دقیقه، مورد آزمون حرارتی قرار گرفت تا محدوده دمای تحول‌های فیزیکی و شیمیایی، مشخص شود. همچنین، آنالیز حرارتی، روی نمونه سنتز شده، انجام شد تا رفتار پایداری حرارتی گرافن اکسید نیز، بررسی شود.

۳-۲- تعیین حساسیت میکروبی به روش انتشار از دیسک

۲-۳-۱- تهیه محیط کشت آگار مولر هیتون

۳۴ گرم از پودر محیط کشت آگار مولر هیتون، در یک لیتر آب مقطر، حل و با حرارت‌دادن، شفاف شد. سپس محیط، در اتوکلاو، استریل شد و در زیر هود میکروبیولوژی، در پتری‌دیش‌های استریل، ریخته شد و ۱۵ تا ۲۰ دقیقه، زمان داده شد تا محیط، به حالت جامد، تبدیل شود.

۲-۳-۲- تهیه استاندارد ۰/۵ مک فارلند

به منظور تهیه استاندارد ۰/۵ مک فارلند، ۰/۵ میلی‌لیتر کلرید باریم ۰/۱ درصد مولار و ۹۹/۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۱ درصد، تهیه شد. سپس، در لوله آزمایش، ۱۰ میلی‌لیتر از اسیدی که تهیه شده بود، ریخته و ۵۰ میکرولیتر از آن، خارج و ۵۰ میکرولیتر کلرید باریم، به آن، اضافه شد. جذب نوری محلول تهیه شده، در طول موج ۶۲۵ نانومتر، خوانده شد. سپس، محلول، در لوله خشک و تمیز، ریخته شد و دهانه لوله، به طور کامل، مسدود گردید. در نهایت، در دمای اتاق و در تاریکی، نگهداری شد.

۲-۳-۳- تهیه سوسپانسیون باکتری

ابتدا، در دو لوله آزمایش، هرکدام، ۴ میلی‌لیتر، سرم فیزیولوژی، ریخته و استریل شد. سپس، کلنی^۷ باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس^۸ و اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا^۹ جدا شده از نمونه‌های بالینی، در لوله‌های جداگانه، تلقیح شد تا کدورتی مشابه ۰/۵ مک‌فارلند، داشته باشند.

۲-۳-۴- تلقیح سوسپانسیون باکتری به محیط کشت

پس از تهیه سوسپانسیون میکروبی مطابق با کدورت استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند، یک سوآپ استریل، آغشته به سوسپانسیون میکروبی شد و پس از گرفتن مایع اضافی آن توسط فشار دادن سوآپ به دیواره داخلی لوله، سوآپ مرطوب، در سطح محیط مولر هیتون آگاری که قبلاً به دمای اتاق رسیده بود، به طور یکنواخت، کشت داده شد.

۲-۳-۵- قرار دادن دیسک آنتی‌بیوتیکی

۱۵ دقیقه قبل از شروع این مرحله از آزمایش، دیسک

^۱ X-Ray Diffraction

^۲ Resolution

^۳ Fourier Transform Infrared Spectroscopy

^۴ Scanning Electron Microscopy

^۵ Atomic Force Microscopy

^۶ Thermal Gravimetric- Differential Thermal Analysis

^۷ Colony

^۸ Staphylococcus Aureus

^۹ Pseudomonas Aeruginosa

موقعیت پیک در 2θ برابر با $15/17$ درجه، نشان می‌دهد که باگاس نیشکر، به‌طور کامل، به گرافن اکسید، تبدیل شده است. همچنین، با استفاده از قانون براگ (معادله ۱)، فاصله بین صفحات گرافن اکسید (d)، $0/73$ نانومتر به‌دست آمد.

$$n\lambda = 2d \cdot \sin \theta \quad (1)$$

که در آن n، تعداد مرتبه بازتاب (تعداد صفحه‌های کریستالی)، λ طول موج پرتو ایکس تابشی به نمونه از هدف مسی ($1/5418$ انگستروم)، d، فاصله بین صفحات و θ ، زاویه پرتوهای بازتابش است.

با استفاده از رابطه شرر (معادله ۲) مربوط به بازتاب صفحه (۰۰۲)، ارتفاع متوسط صفحات چیده شده (H)، برابر با λ ، به‌دست آمد (جدول ۱).

$$H = \frac{K\lambda}{FWHM \cos \theta} \quad (2)$$

که در این رابطه، K، عدد ثابت است که به ساختار ماده و نحوه تعیین پهنای پیک و توزیع اندازه وابسته بوده و برای ساختار گرافن اکسید، $0/9$ است. λ طول موج مس ($1/54$ انگستروم)، FWHM، پهنای پیک در نصف ارتفاع بیشینه، θ ، نصف زاویه پیک و H، ارتفاع متوسط صفحات چیده شده است.

جدول ۱. اطلاعات به‌دست آمده از نتایج XRD

نمونه	2θ (درجه)	FWHM (درجه)	d (نانومتر)	H (نانومتر)	n
گرافن اکسید	$15/17$	$1/89$	$0/73$	۴	۵-۶

نتایج، نشان می‌دهد که پیک 2θ به‌دست آمده از اکسایش تک‌مرحله‌ای باگاس نیشکر (شکل ۳)، با نتایج مطالعات پیشین، مطابقت دارد [۳۰-۳۲]، بنابراین، می‌توان آن را به ساختار دو بعدی گرافن اکسید، نسبت داد.

۳-۲- FTIR

از آزمون FTIR، برای تعیین گروه‌های اکسیژنی روی سطح گرافن اکسید، استفاده شد (شکل ۴). قابل ذکر است که این آزمون، به‌طور کامل، به شیوه سنتز و متغیرهای روش مورد

آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین، از یخچال، خارج شد تا دمای آن، به دمای اتاق برسد. دیسک آنتی‌بیوتیک، توسط پنس استریل و سرد شده، برداشته و در سطح پتری‌دیش، قرار داده شد. با پنس، روی دیسک، به‌طور مختصر، فشار داده شد تا به‌طور کامل، با سطح محیط کشت، تماس یابد. دیسک، با فاصله 20 میلی‌متر از لبه پتری‌دیش، قرار داده شد. سپس، برای کشت، در انکوباتور با دمای 37 درجه سلسیوس و به مدت 24 ساعت، قرار گرفت. پس از 24 ساعت، قطر هاله عدم رشد، اندازه‌گیری شد.

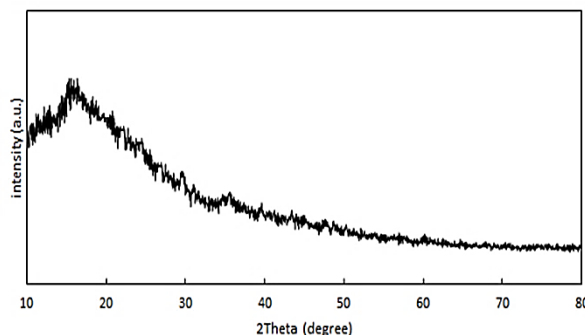
۲-۳-۶- تعیین اثر ضد میکروبی گرافن اکسید

پس از تهیه سوسپانسیون میکروبی مطابق با کدورت استاندارد $0/5$ مک‌فارلند، یک سوآپ استریل، آغشته به سوسپانسیون میکروبی شد. پس از گرفتن مایع اضافی آن، سوآپ مرطوب، در سطح محیط مولر هیتون آگاری که قبلاً به دمای اتاق رسید بود، پخش شد. دیسک‌های تهیه شده، حاوی غلظت‌های مختلف گرافن اکسید، روی این کشت میکروبی، گذاشته شد. سپس پتری‌دیش‌ها، در انکوباتور با دمای 37 درجه سلسیوس، به مدت 24 ساعت، انکوبه شد. در نهایت، قطر هاله‌های عدم رشد باکتری در اطراف هر دیسک، اندازه‌گیری شد و کمترین غلظت گرافن اکسید که منجر به تشکیل هاله عدم رشد باکتری در اطراف دیسک شده بود، به‌عنوان کمترین غلظت مهارکننده رشد باکتری، در نظر گرفته شد.

۳- نتایج و بحث

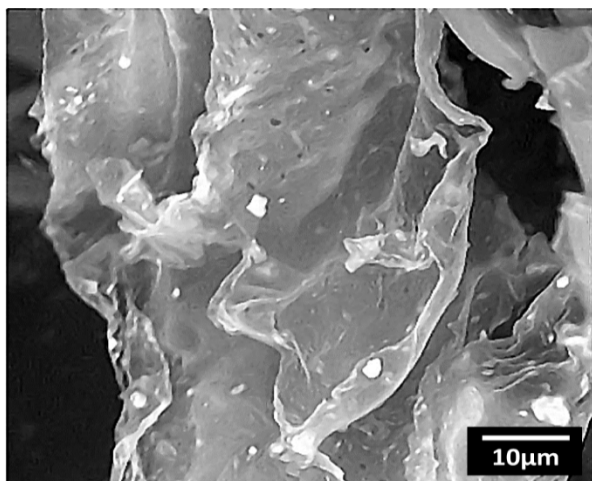
۳-۱- XRD

در شکل ۳، الگوی پراش اشعه ایکس (XRD) گرافن اکسید سنتز شده، ارائه شده است که با نرم افزار High Score X'Pert، مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۳. الگوی پراش پرتو ایکس گرافن اکسید

سنتز شده از باگاس نیشکر، توسط SEM، ارائه شده است. تصویر SEM، ساختار صفحه‌ای گرافن اکسید، نمایانگر چین-خوردگی‌ها را نشان می‌دهد که مشابه ساختار گزارش شده، توسط پژوهش‌های دیگر است [۳۸].



شکل ۵. تصویر SEM گرافن اکسید تهیه شده از باگاس نیشکر

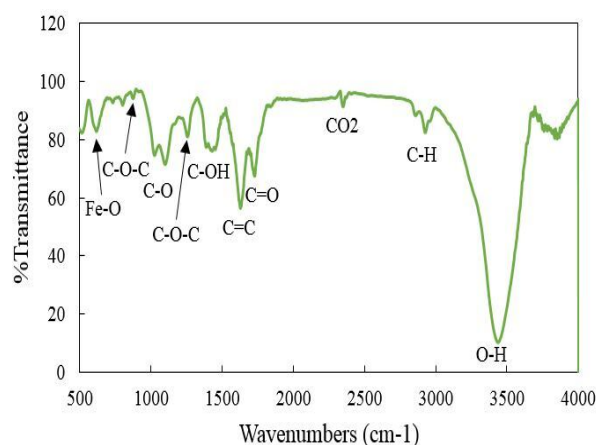
۳-۴- AFM

در شکل ۶ (الف)، چین خوردگی‌هایی در صفحات گرافن اکسید وجود دارد، دیده می‌شود. این چین خوردگی‌های حاصل از فرآیند شیمیایی، غیرقابل اجتناب است. به نظر می‌رسد، هرچه اندازه صفحات گرافن اکسید، بزرگ‌تر و مقدار گروه‌های اکسیژنی، بیشتر باشد، چین خوردگی‌ها، بیشتر خواهد بود [۳۹ و ۴۰]. ضخامت صفحات گرافن اکسید و اندازه متوسط آن‌ها، توسط آزمون AFM، اندازه‌گیری شد. گرافن اکسید سنتز شده، دارای ابعاد جانبی متوسط^۲ (ALD) ۵۰۰ نانومتر بود که در شکل ۶ (ب)، قابل مشاهده است و اندازه متوسط ضخامت صفحات، حدود ۵ نانومتر است که معادل با ۵ تا ۶ لایه از صفحات گرافن اکسید است (شکل ۶ ج)) و نتایج، داده‌های حاصل از XRD را تأیید می‌نماید.

۳-۵- TG-DTA

در شکل ۷، نتایج آنالیز حرارتی باگاس نیشکر در دو محیط اکسایش و خشتی، ارائه شده است. نتایج گرماسنجی حرارتی (TG) در هر دو محیط، نشان‌دهنده کاهش جرم نخست تا ۲۵۰ درجه سلسیوس، به علت دهیدراته شدن و

استفاده، حساس است و مقدار گروه‌های اکسیژنی، برای نمونه-های مختلف گرافن اکسید، متفاوت است. گروه‌های اکسیژنی موجود در ساختار گرافن اکسید، عبارتند از: یک پیک وسیع در 3400 cm^{-1} برای پیوند O-H گروه هیدروکسیل، پیوند C-H در 2924 cm^{-1} ، پیوند C=O گروه کربوکسیل در 1734 cm^{-1} ، پیوند C=C مناطق گرافیتی اکسید نشده SP^2 در 1627 cm^{-1} ، پیوند C-OH در 1432 cm^{-1} ، پیوند C-O-C گروه اپوکسی و پیوند C-O گروه کربونیل در محدوده زیر 1250 cm^{-1} . نتایج حاصل از آنالیز FTIR نمونه سنتز شده (شکل ۴)، نشان‌دهنده گروه‌های هیدروکسیل، اپوکسی و کربوکسیل در ساختار است. وجود این گروه‌های اکسیژنی در ساختار، مؤید تخریب و اکسایش ساختار گرافیتی با مناطق SP^2 و جایگزینی آن با مناطق اکسیدی SP^3 است [۳۳-۳۵]. پیک پهن گروه هیدروکسیل در 3400 cm^{-1} ، مربوط به سه پیوند O-H مختلف؛ شامل گروه‌های الکلی و فنولی چسبیده به صفحات گرافن اکسید و مولکول‌های آب حبس شده بین لایه‌های گرافن اکسید است [۳۴]. لازم به ذکر است پیک 2348 cm^{-1} ، مربوط به حضور مقدار کم گاز CO_2 بوده که می‌تواند در دیواره یک ساختار متخلخل و یا یک سطح وسیع جامد، جذب شود. همچنین، پیک 617 cm^{-1} ، مربوط به پیوند Fe-O، به علت حضور ناخالصی حاصل از تجزیه فروسن است [۳۶ و ۳۷].



شکل ۴. نتایج آنالیز FTIR گرافن اکسید

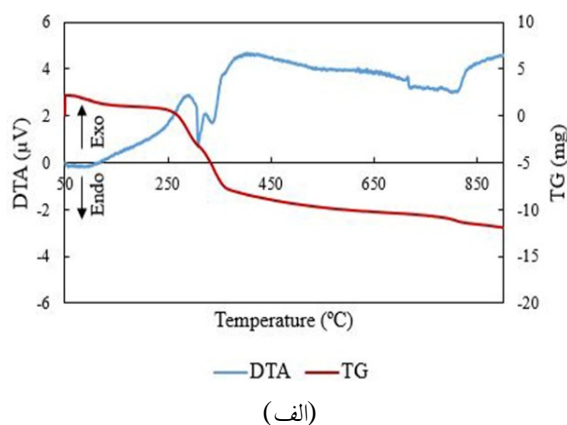
۳-۳- SEM

در شکل ۵، بررسی ریخت‌شناسی^۱ سطح گرافن اکسید

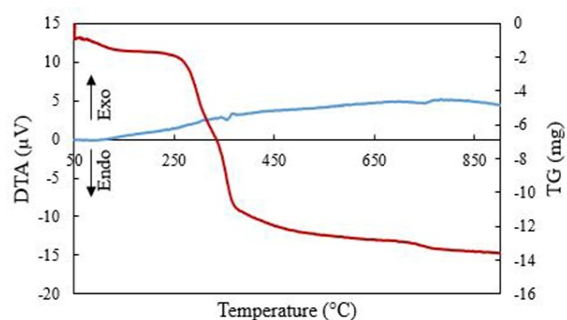
² Average Lateral Dimensions

¹ Morphology

در محیط هوا، در دمای پایین‌تری نسبت به محیط خنثی انجام می‌شود و پیک‌های گرمای قوی‌تری نمایان می‌شود که این مسئله، با مقایسه قسمت الف و ب شکل ۷، تأیید می‌گردد. نمودار آنالیز حرارتی افتراقی شکل ۷ الف، نشان می‌دهد که واکنش تجزیه حرارتی واقعی، بالاتر از دمای ۳۰۰ درجه سلسیوس اتفاق می‌افتد و نمودار گرماسنجی حرارتی آن، نشان‌دهنده کاهش جرم شدید، در محدوده دمایی ۲۵۰ تا ۳۵۰ درجه سلسیوس است که توسط احتراق مواد فرار کربوهیدرات، ایجاد شده است [۴۱ و ۴۲]. بنابراین، دمای لازم جهت سنتز گرافن اکسید، دمای ۳۵۰ درجه سلسیوس، انتخاب شد.



(الف)

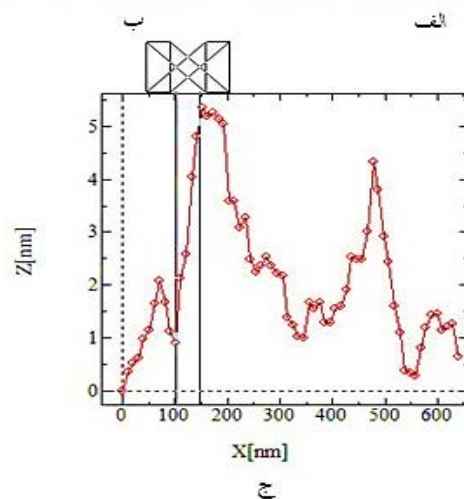
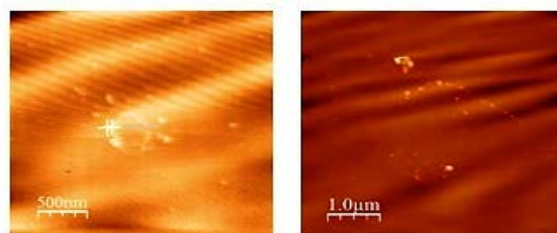


(ب)

شکل ۷. نتایج آنالیز حرارتی باگاس نیشکر در محیط الف) هوا و ب) آرگون

در شکل ۸، نتایج آنالیز حرارتی گرافن اکسید سنتز شده از باگاس نیشکر، در دو محیط هوا و آرگون، ارائه شده است. بر اساس نتایج گرماسنجی حرارتی، گرافن اکسید، از دمای حدود ۶۰ درجه سلسیوس، ناپایدار بوده و حدود ۶۰ درصد از جرم خود را در بالای ۳۰۰ درجه سلسیوس و کل جرم خود را

خروج ترکیبات فرار از الیاف است و کاهش جرم دوم، از ۲۵۰ تا ۳۵۰ درجه سلسیوس، به دلیل تجزیه ترکیبات همی سلولوز، سلولز و لیگین‌های موجود در ساختار باگاس است که در این محدوده، واکنش کامل نشده و تا دمای ۱۰۰۰ درجه سلسیوس نیز، ادامه دارد.



ج

شکل ۶. الف) و ب) ریخت‌شناسی سطحی: مشاهده صفحات چین‌خورده و ج) تغییرات ضخامت یا همان ارتفاع چین‌خوردگی صفحات گرافن اکسید سنتز شده در طول فاصله‌های افقی روبش شده با اشعه ایکس در آزمون AFM

نتایج آنالیز حرارتی افتراقی (DTA)، سه پیک گرمازا را بین ۲۵۰ تا ۴۵۰ درجه سلسیوس نشان می‌دهد که مربوط به فرآیند آزاد شدن ترکیبات فرار و احتراق کربن در محیط اکسیدی به صورت CO_2 ، CO و... است. پیک گرماگیر در دمای بالاتر از ۷۵۰ درجه سلسیوس، مربوط به فرآیند شکل‌گیری ساختار گرافن اکسید، به واسطه سازوکارهای نفوذی و خروج تدریجی ترکیبات آلی، به شکل بخار است. وجود شیب منفی از دمای ۴۵۰ تا ۸۰۰ درجه سلسیوس، نشانگر تدریجی بودن این فرآیند است. این پیک‌ها، در نمودار DTA قسمت ب، به علت عدم حضور اکسیژن، شدت بسیار کمتری دارند. به‌طور کلی، تجزیه حرارتی محصولات نباتی که جزء ترکیبات آلی هستند،

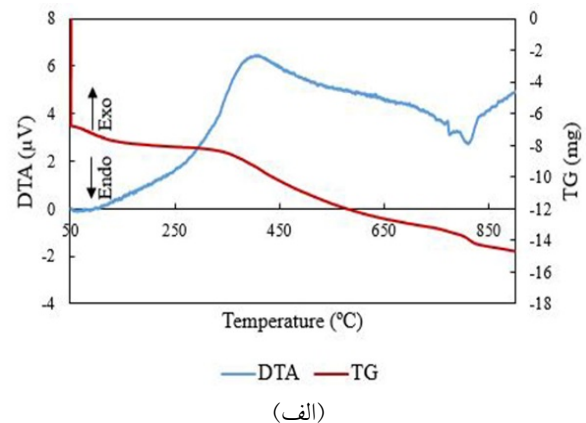
است، تنها یک پیک گرمایگر، در ۷۶۰ درجه سلسیوس نشان می‌دهد که مربوط به تخریب حرارتی ساختار کربنی با خروج همزمان مواد آلی و اکسیژن است و به همین دلیل، پیک با شدت نسبی بالاتری، نسبت به محیط اکسیژن، حاصل می‌شود. به عبارتی، ساختار گرافن اکسید، در محیط خنثی، تا این دما، پایدار است.

۳-۶- آزمون ضدباکتری

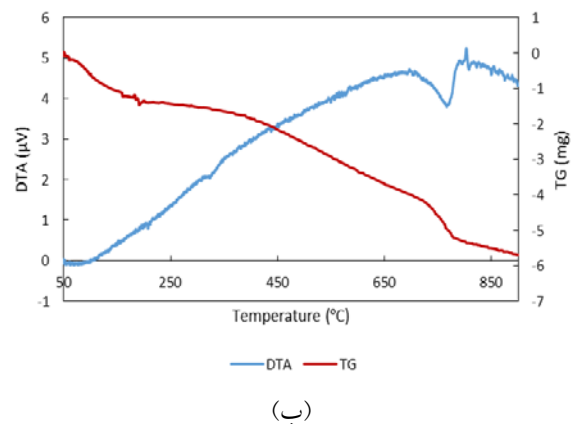
در جدول ۲، قطر هاله عدم رشد ایجادشده توسط دیسک استاندارد آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین، به همراه گرافن اکسید در غلظت‌های مختلف، ارائه شده است. هر سه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا جداشده از نمونه‌های بالینی، در بررسی اثر ضد-باکتری گرافن اکسید به روش انتشار از دیسک، به این ماده، حساس بودند؛ قطر هاله عدم رشد باکتری در اطراف دیسک، برای حداقل غلظت مهارکننده رشد (گرافن اکسید ۴۰۰ میکروگرم)، به ترتیب، ۴، ۲ و ۲/۵ میلی‌متر، مشاهده شد. هاله عدم رشد، برای غلظت ۶۰۰ میکرولیتر، افزایش یافت و برای هر سه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا، به ترتیب، به قطر ۷، ۴ و ۵ میلی‌متر بود.

نتایج، نشان داد که فعالیت ضدباکتری این ورقه‌ها، وابسته به غلظت گرافن اکسید است؛ با افزایش غلظت، نرخ غیرفعال‌سازی (میزان مرگ) سلول‌های باکتری، بالا می‌رود و قطر هاله عدم رشد باکتری، افزایش می‌یابد. همچنین، نانورقه‌های گرافن اکسید، نسبت به باکتری گرم مثبت، در مقایسه با باکتری گرم منفی، سمیت بیشتری دارند که این اختلاف سمیت مشاهده‌شده، ناشی از عوامل بسیاری، از جمله طبیعت دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت است. باکتری‌های گرم منفی، علاوه بر دیواره سلولی پیچیده، دارای یک غشای خارجی هستند که در خارج از لایه پتیدوگلیکان^۱، قرار گرفته است. این غشا، مانند غشای سیتوپلاسمی بوده و ماده اصلی تشکیل‌دهنده آن، فسفولیپید است. غشای خارجی، ماهیت لیپیدی دارد. لذا، انتظار می‌رود که سوسپانسیون گرافن

در محدوده دمای ۸۰۰ تا ۹۰۰ درجه سلسیوس، از دست می‌دهد [۴۳]. کاهش جرم در زیر دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس، مربوط به از دست دادن رطوبت است. کاهش جرم بالای ۲۰۰ درجه سلسیوس، می‌تواند به تجزیه گروه‌های عاملی حاوی اکسیژن، مانند گروه‌های کربوکسیل و هیدروکسیل و خروج گازهای CO₂ و بخار آب، نسبت داده شود. کاهش جرم در ۷۵۰ درجه سلسیوس، مربوط به پیرولیز گروه‌های عاملی باقیمانده حاوی اکسیژن است.



(الف)



(ب)

شکل ۸. آنالیز حرارتی گرافن اکسید سنتز شده در محیط الف) هوا و ب) آرگون

نتایج آنالیز حرارتی افتراقی، قسمت الف شکل ۸، نشان-دهنده یک پیک گرمایگر و یک پیک گرمایگر در یک پیک گرمایگر در محیط هوا است که پیک گرمایگر در حدود ۴۰۰ درجه سلسیوس، می‌تواند به تشکیل ترکیبات آلی فرار و آزاد شدن آنها از ساختار گرافن اکسید نسبت داده شود. وجود پیک گرمایگر در دماهای بین ۷۶۰ و ۸۰۰ درجه سلسیوس، مربوط به تخریب حرارتی ساختار کربنی گرافن اکسید است [۴۴-۴۶]. نمودار آنالیز حرارتی افتراقی قسمت ب شکل ۸ که مربوط به محیط خنثی

¹ Peptidoglycan

امر، موجب می‌شود این نانورقه‌ها، بتوانند به آهستگی، در غشا، نفوذ کنند. این باکتری‌ها، به‌طور ذاتی، دارای مقاومت نسبتاً بالایی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها هستند. بنابراین، انتظار می‌رود که میزان مرگ سلولی، در باکتری‌های گرم منفی، نسبت به باکتری‌های گرم مثبت، به‌طور قابل ملاحظه‌ای، کمتر باشد که این مطلب، در توافق با نتایج به‌دست آمده است. لازم به ذکر است که سمیت نانوذرات، نسبت به‌گونه‌های باکتریایی، نه تنها به ساختار باکتری‌ها، بلکه به چندین عامل، از جمله فعالیت آنزیمی نیز، وابسته است [۴۷].

اکسید را دفع کند. اما از آنجایی که حاوی مولکول‌های پروتئین به‌نام پورین‌ها و پروتئین‌های مشابه پورین است، قادر است با ایجاد سوراخ‌هایی در غشا، انتشار غیرفعال ترکیبات آب‌دوست را از غشای خارجی، ممکن سازد. این پروتئین‌ها، مانند غربال، عمل کرده و موجب می‌شوند تا مولکول‌های بزرگ آنتی‌بیوتیک، به‌طور نسبتاً آهسته‌ای، در غشای خارجی، نفوذ کنند. بنابراین، به احتمال زیاد، زمانی که نانورقه‌های گرافن اکسید، به غشای خارجی نزدیک می‌شوند، به‌دلیل دارا بودن لبه‌های تیز، سوراخ‌هایی علاوه بر سوراخ‌های موجود در غشا، ایجاد می‌کنند. این

جدول ۲. نتایج حاصل از آزمون ضد میکروبی گرافن اکسید

قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)			
ماده	استافیلوکوکوس اورئوس	اشرشیاکلی	سودوموناس آئروژینوزا
تتراسایکلین	۰	۰	۰
گرافن اکسید (۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)	۰	۰	۰
گرافن اکسید (۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)	۴	۲	۲/۵
گرافن اکسید (۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)	۷	۴	۵

۴- نتیجه‌گیری

در این تحقیق، گرافن اکسید، به روش سبز، سنتز شد. بررسی نتایج XRD و FTIR، تشکیل گرافن اکسید را تأیید کرد. تصاویر SEM، نشان داد که گرافن اکسید، به‌صورت ساختارهای لایه‌ای با لبه نازک، وجود دارد. در بررسی اثر ضد- میکروبی گرافن اکسید سنتز شده به روش انتشار از دیسک، هر سه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های بالینی، به این ماده، حساس بودند و هاله عدم رشد باکتری در اطراف دیسک، مشاهده شد. این فرآیند ساده و کم هزینه، می‌تواند فرصت مناسبی برای تولید کم‌هزینه و تجاری مواد گرافنی، به‌منظور کاربردهای پزشکی باشد.

۵- سپاسگزاری

بدین‌وسیله از حمایت‌های مالی و معنوی دانشگاه یزد تشکر و قدردانی می‌گردد.

- Novoselov, K., Geim, A., Morozov, S., Jiang, D., Zhang, Y., Dubonos, S., Grigorieva, I., Firsov, A., "Electric field effect in atomically thin carbon films", *Journal of Science*, Vol. 306, No. 5696, (2004), 666-669. <https://doi.org/10.1126/science.1102896>
- Schwierz, F., "Graphene transistors", *Journal of Nature Nanotechnol.*, Vol. 5, (2010), 487-496. <https://doi.org/10.1038/nnano.2010.89>
- Balandin, A. A., Ghosh, S., Bao, W., Calizo, I., Teweldebrhan, D., Miao, F., Lau, C. N., "Superior thermal conductivity of single-layer graphene", *Nano Letters*, Vol. 8, No. 3, (2008), 902-907. <https://doi.org/10.1021/nl0731872>
- Song, H., Zhang, L., He, C., Qu, Y., Tian, Y. F., Lv, Y., "Graphene sheets decorated with SnO₂ nanoparticles: In situ synthesis and highly efficient materials for cataluminescence gas sensors", *Journal of Materials Chemistry*, Vol. 21, (2011), 5972-5977. <https://doi.org/10.1039/C0JM04331A>
- Si, Y. C., Samulski, E. T., "Exfoliated graphene separated by platinum nanoparticles", *Journal of Chemistry of Materials*, Vol. 20, No. 21, (2008), 6792-6797. <https://doi.org/10.1021/cm801356a>
- Lu, G., Park, S., Yu, K., Ruoff, R. S., Ocola, L. E., Rosenmann, D., Chen, J., "Toward practical gas sensing with highly reduced graphene oxide: A new signal processing method to circumvent run-to-run and device-to-device variations", *Journal of ACS Nano*, Vol. 5, No. 2, (2011), 1154-1164. <https://doi.org/10.1021/nn102803q>
- Lee, C., Wei, X., Kysar, J. W., Hone, J., "Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene", *Journal of Science*, Vol. 321, No. 5887, (2008), 385-388. <https://doi.org/10.1126/science.1157996>
- Georgakilas, V., Otyepka, M., Bourlinos, A. B., Chandra, V., Kim, N., Kemp, K. C., Hobza, P., Zboril, R., Kim, K. S., "Functionalization of graphene: Covalent and non-covalent approaches, derivatives and applications", *Journal of Chemistry Review*, Vol. 112, No. 11, (2012), 6156-6214. <https://doi.org/10.1021/cr3000412>

- (2011), 1181-1186. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.05.014>
27. Akhavan, O., Ghaderi, E., "Photocatalytic reduction of graphene oxide nanosheets on TiO₂ thin film for photoinactivation of bacteria in solar light irradiation", *Journal of Physical Chemistry C*, Vol. 113, No. 47, (2009), 20214-20220. <https://doi.org/10.1021/jp906325q>
 28. Liu, S., Hu, M., Zeng, T. H., Wu, R., Jiang, R., Wei, J., Wang, L., Kong, J., Chen, Y., "Lateral dimension-dependent antibacterial activity of graphene oxide sheets", *Langmuir*, Vol. 28, No. 33, (2012), 12364-12372. <https://doi.org/10.1021/la3023908>
 29. Liu, S., Zeng, T. H., Hofmann, M., Burcombe, E., Wei, J., Jiang, R., Kong, J., Chen, Y., "Antibacterial activity of graphite, graphene oxide, and reduced graphene oxide: Membrane and oxidative stress", *ACS Nano*, Vol. 5, No. 6, (2011), 6971-6980. <https://doi.org/10.1021/nn202451x>
 30. Muralidharan, M. N., Ansari, S., "Thermally reduced graphene oxide/thermoplastic polyurethane nanocomposites as photomechanical actuators", *Journal of Advanced Materials Letter*, Vol. 4, (2013), 927-932. <https://doi.org/10.5185/AMLETT.2013.5474>
 31. Kellici, S., Acord, J., Ball, J., Reehal, H. S., Morgan, D., Saha, B., "A single rapid route for the synthesis of reduced graphene oxide with antibacterial activities", *Journal of RSC Advances*, Vol. 4, No. 29, (2014), 14858-14861. <https://doi.org/10.1039/C3RA47573E>
 32. Stobinski, L., Lesiak, B., Malolepszy, A., Mazurkiewicz, M., Mierzwa, B., Zemek, J., Jiricek, P., Bieloshapka, I., "Graphene oxide and reduced graphene oxide studied by the XRD, TEM and electron spectroscopy methods", *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, Vol. 195, (2014), 145-154. <https://doi.org/10.1016/j.elspec.2014.07.003>
 33. Marcano, D. C., Kosynkin, D. V., Berlin, J. M., Sinitskii, A., Sun, Z., Slesarev, A., Alemany, L. B., Lu, W., Tour, J. M., "Improved synthesis of graphene oxide", *Journal of ACS Nano*, Vol. 4, (2010), 4806-4814. <https://doi.org/10.1021/nn1006368>
 34. Xu, Y., Bai, H., Lu, G., Li, C., Shi, G., "Flexible graphene films via the filtration of water-soluble noncovalent functionalized graphene sheets", *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 130, No. 18, (2008), 5856-5857. <https://doi.org/10.1021/ja800745y>
 35. Verma, S., Mungse, H. P., Kumar, N., Choudhary, S., Jain, S. L., Sain, B., Khatri, O. P., "Graphene oxide: An efficient and reusable carbocatalyst for aza-Michael addition of amines to activated alkenes", *Journal of Chemistry Communications*, Vol. 47, (2011), 12673-12675. <https://doi.org/10.1039/C1CC15230K>
 36. Urban, M. W., *Vibrational spectroscopy of molecules and macromolecules on surfaces*, Wiley, (1993). <https://www.wiley.com/en-us/Vibrational+Spectroscopy+of+Molecules+and+Macromolecules+on+Surfaces-p-9780471528159>
 37. Tucureanu, V., Matei, A., Avram, A. M., "FTIR spectroscopy for carbon family study", *Analytical Chemistry*, Vol. 46, No. 6, (2016), 502-520. <https://doi.org/10.1080/10408347.2016.1157013>
 38. Satish, B., Venkata Rao, K., Shilpa Chakra, C. H., Tejaswi, T., "Synthesis and characterization of graphene oxide and its antimicrobial activity against *klebsiella* and *staphylococcus*", *Journal of International Advanced Biotechnology Research*, Vol. 4, No. 1, (2013), 142-146. <https://www.semanticscholar.org/paper/SYNTHESIS-AND-CHARACTERIZATION-OF-GRAPHENE-OXIDE-Bykkam-Rao/beaab6de1b628ad830dd10cb73c66e81a5986797>
 39. Aboutalebi, S. H., Gardarzi, M. M., Zheng, Q. B., Kim, J. K., "Spontaneous formation of liquid crystals in ultralarge graphene oxide dispersions", *Journal of Advanced Function Materials*, Vol. 21, No. 15, (2011), 2978-2988. <https://doi.org/10.1002/adfm.201100448>
 40. Shi, L., Yang, J., Huang, Z., Li, J., Tang, Z., Li, Y., Zheng, Q., "Fabrication of transparent, flexible conducting graphene thin films via soft transfer printing method", *Journal of Applied Surface Science*, Vol. 276, (2013), 437-446. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2013.03.113>
 41. Nassar, M. M., "Thermal analysis kinetics of bagasse and rice straw", *Journal of Energy Sources*, Vol. 21, No. 1-2, (2010), 131-137. <https://doi.org/10.1080/00908319950015000>
 9. Novoselov, K. S., Fal'ko, V. I., Colombo, L., Gellert, P. R., Schwab, M. G., Kim, K., "A roadmap for Graphene", *Journal of Nature*, Vol. 490, (2012), 192-200. <https://doi.org/10.1038/nature11458>
 10. Chung, C., Kim, Y. K., Shin, D., Ryoo, S. R., Hong, B. H., Min, D. H., "Biomedical applications of graphene and graphene oxide", *Journal of Accounts of Chemical Research*, Vol. 46, No. 10, (2013), 2211-2224. <https://doi.org/10.1021/ar300159f>
 11. Mao, H. Y., Laurent, S., Chen, W., Akhavan, O., Imani, M., Ashkarran, A. A., Mahmoudi, M., "Graphene: Promises, facts, opportunities, and challenges in nanomedicine", *Journal of Chemistry Review*, Vol. 113, No. 5, (2013), 3407-3424. <https://doi.org/10.1021/cr300335p>
 12. Eigler, S., Hu, Y., Ishii, Y., Hirsch, A., "Controlled functionalization of graphene oxide with sodium azide", *Journal of Nanoscale*, Vol. 5, No. 24, (2013), 12136-12139. <https://doi.org/10.1039/C3NR04332K>
 13. Heydari Bafrooei, E., Ensafi, A. A., "Chapter 4-Typically used carbon-based nanomaterials in the fabrication of biosensors", *Electrochemical biosensors*, (2019), 77-98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816491-4.00004-8>
 14. Stankovich, S., Dikin, D. A., Piner, R. D., Kohlhaas, K. A., Kleinhammes, A., Jia, Y., Wu, Y., Nguyen, S. B. T., Rouff, R. S., "Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide", *Journal of Carbon*, Vol. 45, No. 7, (2007), 1558-1565. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2007.02.034>
 15. Brodie, B. C., "On the atomic weight of graphite", *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, Vol. 149, (1859), 249-259. <https://doi.org/10.1098/rstl.1859.0013>
 16. Staudenmaier, L., "Verfahren zur darstellung der graphitsäure", *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, Vol. 31, No. 2, (1898), 1481-1487. <https://doi.org/10.1002/cber.18980310237>
 17. Hummers, W. S., Offeman, R. E., "Preparation of graphitic oxide", *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 80, No. 6, (1958), 1339. <https://doi.org/10.1021/ja01539a017>
 18. Guo, S., Dong, S., "Graphene nanosheet: Synthesis, molecular engineering, thin film, hybrids, and energy and analytical applications", *Journal of Chemical Society Reviews*, Vol. 40, No. 5, (2011), 2644-2672. <https://doi.org/10.1039/C0CS00079E>
 19. Seo, D. H., Rider, A. E., Kumar, S., Randeniya, L. K., Ostrikov, K., "Vertical graphene gas- and bio-sensors via catalyst-free, reactive plasma reforming of natural honey", *Journal of Carbon*, Vol. 60, (2013), 221-228. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2013.04.015>
 20. Seo, D. H., Han, Z. J., Kumar, S., Ostrikov, K., "Structure-controlled, vertical graphene-based, binder-free electrodes from plasma-reformed butter enhance super capacitor performance", *Journal of Advanced Energy Materials*, Vol. 3, No. 10, (2013), 1316-1323. <https://doi.org/10.1002/aenm.201300431>
 21. Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J. H., Park, S. J., Lee, H. J., Kim, S. H., Park, Y. K., Park, Y. H., Hwang, C. Y., Kim, Y. K., Lee, Y. S., Jeong, D. H., Cho, M. H., "Antimicrobial effects of silver nanoparticles", *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, Vol. 3, No. 1, (2007), 95-101. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001>
 22. Ye, S., Shao, K., Li, Z., Guo, N., Zuo, Y., Lil, Q., Lu, Z., Chen, L., He, Q., Han, H., "Antiviral activity of graphene oxide: How sharp edged structure and charge matter", *ACS Applied Materials & Interfaces*, Vol. 7, No. 38, (2015), 21571-21579. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b06876>
 23. Hu, W., Peng, C., Luo, W., Lv, M., Li, X., Li, D., Huang, Q., Fan, G., "Graphene-based antibacterial paper", *ACS Nano*, Vol. 4, No. 7, (2010), 4317-4323. <https://doi.org/10.1021/nn101097v>
 24. Akhavan, O., Ghaderi, E., "Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria", *ACS Nano*, Vol. 4, No. 10, (2010), 5731-5736. <https://doi.org/10.1021/nn101390x>
 25. Mannoor, M. S., Tao, H., Clayton, J. D., Sengupta, A., Kaplan, D. L., Naik, R. R., Verma, N., Omenetto, F. G., McAlpine, M. C., "Graphene-based wireless bacteria detection on tooth enamel", *Nature Communications*, Vol. 3, No. 763, (2012). <https://doi.org/10.1038/ncomms1767>
 26. Zhang, D., Liu, X., Wang, X., "Green synthesis of graphene oxide sheets decorated by silver nanoprisms and their anti-bacterial properties", *Journal of Inorganic Biochemistry*, Vol. 105, No. 9,

- Scientific Journal Machines. Technologies. Materials*. Vol. 10, No. 6, (2016), 32-35. <https://stumejournals.com/journals/mtm/2016/6/32>
46. Justh, N., Berke, B., László, K., Szilágyi, I. M., "Thermal analysis of the improved Hummers' synthesis of graphene oxide", *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, Vol. 131, (2018), 2267-2272. <https://doi.org/10.1007/s10973-017-6697-2>
47. Krishnamoorthy, K., Umasuthan, N., Mohan, R., Lee, J., Kim, S. J., "Antibacterial activity of graphene oxide nanosheets", *Science of Advanced Materials*, Vol. 4, (2012), 1-7. <https://doi.org/10.1166/sam.2012.1402>
42. Liñán-Montes, A., de la Parra-Arciniega, S. M., Garza-González, M. T., García-Reyes, R. B., Soto-Regalado, E., Cerino-Córdova, F. J., "Characterization and thermal analysis of agave bagasse and malt spent grain", *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, Vol. 115, No. 1, (2014), 751-758. <https://doi.org/10.1007/s10973-013-3321-y>
43. Pendolino, F., Armata, N., *Graphene oxide environmental remediation process*, Springer, (2017). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-60429-9>
44. Hernandez, Y., Pang, S., Feng, X., Müllen, K., *Graphene and Its Synthesis*, Max Planck Institute for Polymer Research, Mainz, Germany, Elsevier, (2012).
45. Mindivan, F., "The synthesis and characterization of graphene oxide (GO) and reduced graphene oxide (RGO)", *International*