

**Tópico: 21. Películas delgadas y tratamiento de superficie.**

**Aplicación de grafeno en recubrimientos antifouling**

**M. Viera <sup>a,b</sup>, S.E. Rastelli <sup>a,c</sup>, M.C. Dalfovo <sup>d</sup>, F. Ibañez <sup>d</sup>, S. Gómez de Saravia <sup>a,c</sup>**

<sup>a</sup> Centro de Investigaciones y Desarrollo en Tecnología de Pinturas -CIDEPINT- (CICPBA-CONICET), 50 e/ 121 y 122, La Plata (1900) , Argentina.

<sup>b</sup> Facultad de Ciencias Exactas. UNLP, 47 y 115, La Plata (1900) , Argentina

<sup>c</sup> Facultad de Ciencias Naturales y Museo. UNLP, 60 y 122, La Plata (1900) , Argentina.

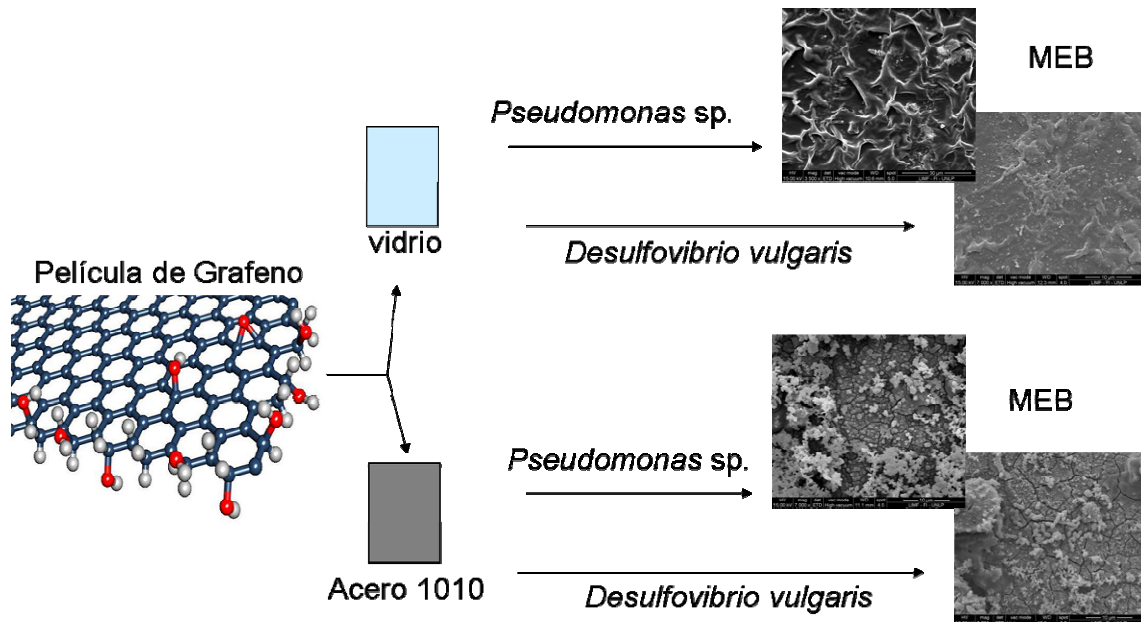
<sup>d</sup> Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas -INIFTA-Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, CCT La Plata- CONICET, C.C. 16, Suc.4, La Plata (1900) , Argentina.

Email: [sandragomezdesaravia@yahoo.com.ar](mailto:sandragomezdesaravia@yahoo.com.ar), [marisa.rviera@gmail.com](mailto:marisa.rviera@gmail.com), [serastelli@hotmail.com](mailto:serastelli@hotmail.com); [mcdalfovo@gmail.com](mailto:mcdalfovo@gmail.com); [fjibanez73@gmail.com](mailto:fjibanez73@gmail.com); [sandragomezdesaravia@yahoo.com.ar](mailto:sandragomezdesaravia@yahoo.com.ar)

**Preferencia de presentación (oral o póster): póster**

**Palabras Claves:** Grafeno, bacterias, biofilms.

**Resumen Grafico:**



El grafeno (G) está formado por un conjunto de átomos de carbono con una estructura hexagonal. Como sustratos para soportar la película de G, obtenida por la técnica CVD (*chemical vapor deposition*), se utilizaron cupones de vidrio y de acero al carbono SAE 1010. Sobre estos cupones se evaluó, mediante microscopía electrónica de barrido, el efecto del G sobre la adherencia y desarrollo de biofilms de dos cepas bacterianas: *Pseudomonas sp.* y *Desulfovibrio vulgaris*. Preliminarmente fue posible apreciar una menor adherencia de ambas cepas bacterianas sobre los cupones de acero con la película de G, no observándose este resultado sobre el vidrio.

**Tópico: 21. Películas delgadas y tratamiento de superficie.****Aplicación de grafeno en recubrimientos antifouling**

**M. Viera<sup>a,b</sup>, S.E. Rastelli<sup>a,c</sup>, M.C. Dalfovo<sup>d</sup>, F. Ibañez<sup>4</sup>, S. Gómez de Saravia<sup>1,3\*</sup>**

<sup>a</sup> Centro de Investigaciones y Desarrollo en Tecnología de Pinturas -CIDEPI- (CICPBA-CONICET), 50 e/ 121 y 122, La Plata (1900), Argentina.

<sup>b</sup> Facultad de Ciencias Exactas. UNLP, 47 y 115, La Plata (1900), Argentina

<sup>c</sup> Facultad de Ciencias Naturales y Museo. UNLP, 60 y 122, La Plata (1900), Argentina.

<sup>d</sup> Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas -INIFTA-Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, CCT La Plata- CONICET, C.C. 16, Suc.4, La Plata (1900), Argentina.

---

\*Autor correspondiente. Dirección de correo electrónico: sandragomezdesaravia@yahoo.com.ar

---

**ABSTRACT**

Adherence of microorganisms to surface of different materials and the subsequent development of biofilms generate several problems including biocorrosion, loss of equipment performance, deterioration of products, biodeterioration of materials, etc. Microbial adherence may affect the normal functioning of different systems including water distribution pipes, industrial equipment or biomedical devices. Given that adherence of microorganisms to surfaces is required for biofilm formation, preventing microbial adhesion is of major importance to avoid or at least reduce biological contamination of the system. Efficient proposals to solve this problem include: i) to alter the surface properties of the base materials, ii) to incorporate nanoparticles, and/or biocides of natural origin to coatings, iii) to develop new coatings using graphene, among other. Graphene (G) was the first 2D material to be isolated and characterized. This nanocarbon shows unusual and unique chemical and physical properties compared with its counterpart, the graphite. Since the discovery of graphene the scientific community has been actively working on the application of this nanocarbon in the design of materials for chemical/biological sensing, to name a few. However, there has been little discussion on the antimicrobial effects of G on bacteria forming biofilms in materials of industrial and patrimonial importance. The aim of this study was to determine the effect of G coating in bacterial adherence and biofilms formations on 1010 carbon steel and on glass. G was obtained by the CVD technique (chemical vapor deposition). Bacterial adherence and biofilm formation were tested using two bacteria *Pseudomonas* sp. and *Desulfovibrio vulgaris*. Inhibition of bacterial adherence on materials covered with G was analyzed using scanning electronic microscopy (SEM). Results from the analysis revealed that the G film caused a reduction on the adherence of both bacteria to the steel surface. No reduction in the adherence on glass samples was observed.

---

Keywords: Graphene, bacteria, biofilms.

---

**RESUMEN**

La adherencia de microorganismos sobre diferentes materiales y el desarrollo de "biofilms" generan problemas de biocorrosión, pérdida de rendimiento de equipos, biodeterioro de materiales, etc. Puede afectar el normal funcionamiento de sistemas como tuberías de distribución de agua, equipamiento industrial o dispositivos biomédicos. Dado que la adherencia microbiana es requisito para que se genere el biofilm, tiene un importante impacto evitar, o al menos reducir, la contaminación biológica del sistema. Algunos enfoques eficaces para reducir esta problemática son: i) alterar las propiedades de la superficie de los materiales base de modo que sean menos afines con los microorganismos, ii) incorporar nanopartículas, y/o biocidas de origen natural en recubrimientos, iii) desarrollar nuevos recubrimientos con grafeno, entre otros. El grafeno (G) fue el primer material 2D aislado y caracterizado. Este nanocarbón exhibe propiedades químicas y físicas inusuales y únicas, en comparación a su contraparte el grafito. Desde su descubrimiento la comunidad científica está trabajando en su aplicación en el diseño de materiales para sensado químico/biológico, catálisis, por mencionar sólo algunas. Pero poco se ha explorado sobre los efectos antimicrobianos que posee el G sobre bacterias formadoras de biofilms en materiales de importancia industrial y patrimonial. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del G en la adherencia bacteriana y formación de biofilms sobre acero al carbono SAE 1010 y vidrio. La cubierta de G fue obtenida por la técnica CVD (chemical vapor deposition). La adherencia bacteriana y la formación del biofilm se ensayaron utilizando *Pseudomonas* sp. y *Desulfovibrio*. La inhibición de la adherencia bacteriana sobre los materiales cubiertos con G se analizó utilizando microscopía electrónica de barrido (MEB). Pudo observarse que en el acero al carbono SAE 1010, la película de G disminuyó la adherencia de ambas cepas bacterianas a la superficie metálica, no observándose este comportamiento sobre el vidrio.

---

Palabras Clave: Grafeno, bacterias, biofilms.

---

---

## 1. Introducción

El grafeno (G) está formado por un conjunto de átomos de carbono que se disponen en una estructura hexagonal del tipo “panal de abeja”. Es mecánicamente duro, extremadamente flexible, químicamente inerte y ópticamente transparente [1]. Se ha propuesto como un material excelente para aplicaciones biomédicas y en bioingeniería [2-5]. Los distintos productos de obtención de G incluyen: óxido de grafeno, óxido de grafeno reducido (rGO) y deposición química de vapores (CVD) que poseen propiedades diferentes que pueden verse reflejadas en aplicaciones de los sistemas biológicos. La mayoría de los estudios en el área de la biología se han llevado a cabo utilizando óxido de grafeno [6-8], que requiere una etapa de reducción subsiguiente para convertirlo en grafeno [9].

Recientemente, se informó que películas de G producidas por CVD sobre Cu o Ge, o transferido a SiO<sub>2</sub> posee actividad antibacteriana que estaría relacionada con las propiedades electrónicas del sustrato [10]. Este resultado lleva a la conclusión adicional que debe considerarse tener cuidado cuando estos nanomateriales se eliminan al medio ambiente, para evitar el daño potencial que pueden causar.

La presencia de grupos funcionales hidroxilo, epoxy, carbonilo y carboxilo en la superficie del G le proporcionan propiedades físicas interesantes que incluyen alta solubilidad en disolventes polares, buenas propiedades coloidales, bajos costos de producción, baja toxicidad y una gran superficie a la que se les puede incorporar agentes antimicrobianos, incluyendo nanoplatina [11-17]. Desde su descubrimiento, muchos científicos están trabajando activamente en su aplicación en el diseño de materiales para sensado químico/biológico, catálisis, optoelectrónica y *surface-enhanced Raman scattering* (SERS), por mencionar sólo algunas. Pero poco se ha explorado en el campo de los efectos antimicrobianos que posee el G sobre bacterias formadoras de biofilms en materiales de importancia industrial y patrimonial.

Por consiguiente, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del G en la adherencia bacteriana y en la formación de biofilms sobre diferentes materiales conductores (acero al carbono SAE 1010) y no conductores (vidrio) recubiertos con G obtenido por la técnica CVD (*chemical vapor deposition*). La adherencia bacteriana y la formación del biofilm se ensayó utilizando dos bacterias habituales en ambientes industriales: *Pseudomonas* sp., bacteria aeróbica Gram-negativa y *Desulfovibrio vulgaris* (*D. vulgaris*), bacteria anaeróbica, Gram-negativa reductora de sulfato, (típicas de sistemas de extracción y procesamiento de petróleo).

---

## 2. Experimental.

### 2.1. Obtención de Grafeno (G): Síntesis y Transferencia de G por Chemical Vapor Deposition (CVD).

La síntesis consistió en el crecimiento de G sobre un catalizador (láminas de Cu de 25 µm de espesor) y utilizando CH<sub>4</sub> como precursor junto con mezclas de H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> [18-19]. Detalles de la obtención y transferencia de G se describen en Dalfvo *et al.* [18]. Cabe mencionar que la transferencia de G se realiza empleando polímeros de alto peso molecular, los cuales son de difícil remoción. Para soportar al G fueron utilizados sustratos de vidrio (previamente tratados con una solución 3:1 de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% durante 8min.) y de acero al carbono SAE 1010, ambos de 1cm x 1,5cm de lado. La síntesis por CVD es la única

que permite obtener G de alta calidad y sin restricciones en su tamaño, lo que lo diferencia de la exfoliación mecánica la cual es de bajo rendimiento y bastante irreproducible.

### 2.2 Estudios de evaluación de las propiedades del grafeno sobre la adherencia bacteriana y formación de biofilms.

Se preparó una suspensión bacteriana con *D. vulgaris* en medio de cultivo M9 + PosgateC (9:1), una solución 1M de ácido tioglicólico y 0,5M de ácido ascórbico fue agregada al 0,1% para asegurar la anaerobiosis del medio. Se alicuotaron 5ml de esta suspensión en frascos de penicilina estériles. En cada frasco se colocó un cupón de vidrio con G (“VG”) y uno de acero al carbono SAE 1010 con G (“AG”). Los frascos con las muestras se colocaron en una jarra de anaerobiosis y se incubaron a 30°C durante 7 días. Los ensayos con *Pseudomonas* sp. se realizaron en placas de cultivo de 48 pocillos. A partir de un cultivo fresco de 24hs en pico de flauta, se preparó una suspensión en caldo nutritivo con una DO ≈ 0,1 (10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>). En cada pocillo se colocó 1ml de esta suspensión, donde se introdujeron los cupones de VG y AG por separado. La placa se incubó a 30°C durante 24hs.

Luego del período de incubación, los cupones se retiraron, se enjuagaron con agua destilada estéril mediante micropipeta y se fijaron en glutaraldehído al 2,5% en buffer fosfato salino (PBS) durante 24hs., posteriormente se metalizaron con Au para su observación en el microscopio electrónico de barrido (MEB) (FEI Quanta 200).

Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

---

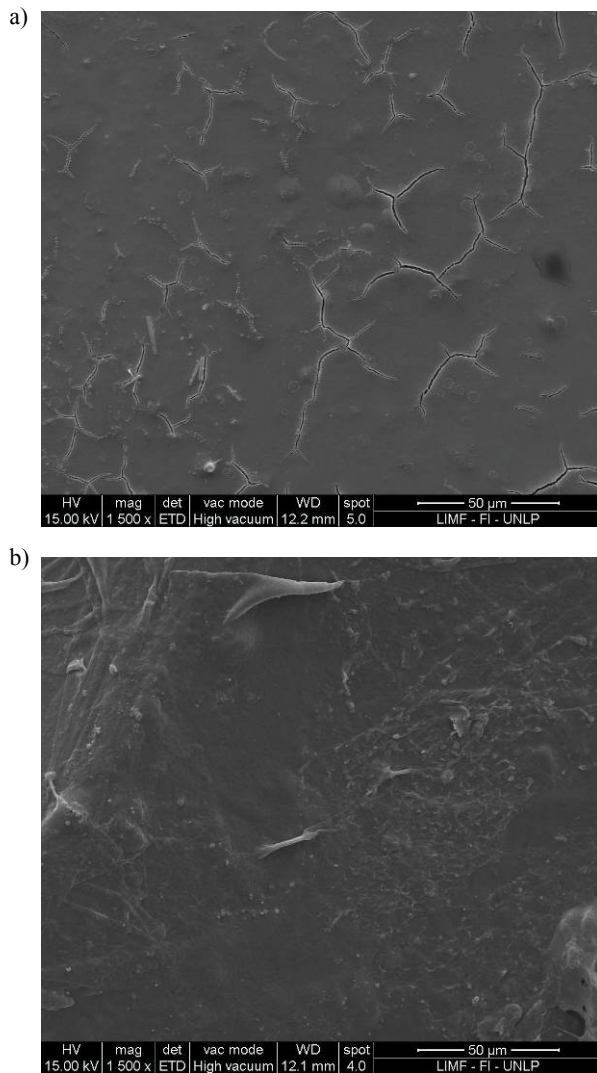
## 3. Resultados y Discusión.

Con el objetivo de producir superficies modificadas con integridad estructural mejorada, mejor resistencia, como protección contra la corrosión o con propiedades anti-bacterianas, es cada vez mayor la utilización de G en aplicaciones de películas y recubrimientos delgados [20-21]. En la Figura 1 se observa el aspecto general de la película de G transferida sobre los cupones de a) vidrio y b) acero al carbono SAE 1010, antes de la incubación con los microorganismos. Se utilizó vidrio debido a que es un material inerte que permite comparar la adherencia bacteriana respecto del acero, material empleado en los sistemas de extracción y distribución de petróleo.

El efecto y la interacción de los materiales con G sobre la estructura, metabolismo y viabilidad de las bacterias dependen de las propiedades fisicoquímicas del material, del tiempo de exposición, así como de las características de los microorganismos utilizados en los ensayos [10,22]. Es importante tener en cuenta que estos parámetros pueden tanto promover como inhibir la adhesión bacteriana y la posterior formación de biofilms.

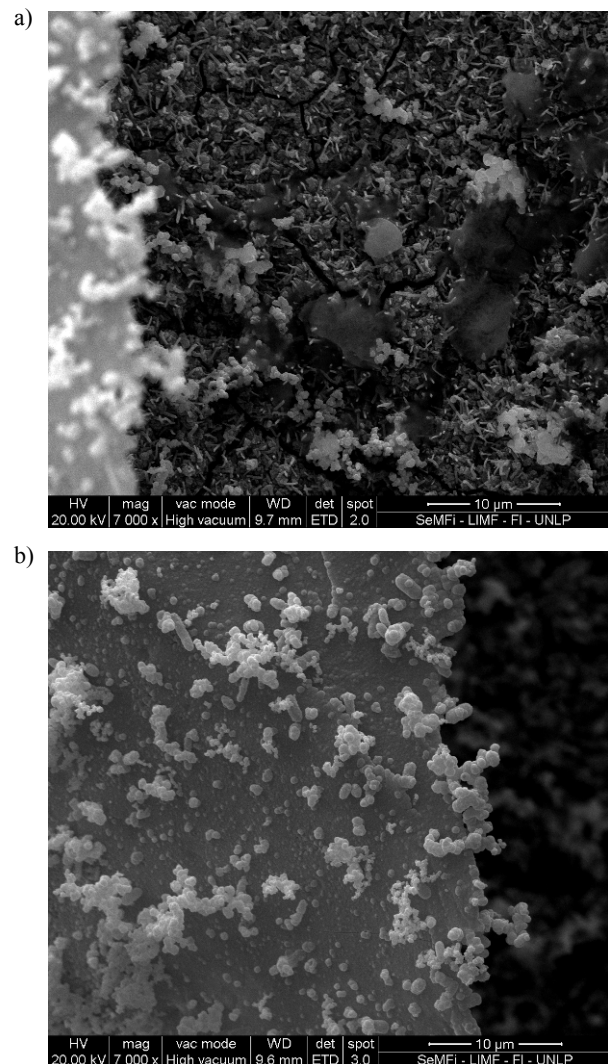
La morfología de la superficie se puede utilizar con fines bactericidas. Las superficies estructuradas tienen rugosidad significativa o picos con altas relaciones de aspecto que pueden causar la ruptura de la pared celular bacteriana [23]. Es evidente que en el caso de G y óxidos de G, los bordes afilados y un estrés oxidativo cumplen también este último criterio, sin embargo los planos basales pueden ser considerados atómicamente lisos [24]. Por lo tanto es esperable que la interacción de las bacterias con G

sea altamente dependiente de la orientación de la superficie en relación con las bacterias.



**Fig. 1.** Película de *G* antes de la incubación con los microorganismos, **a)** sobre vidrio **b)** sobre acero SAE 1010.

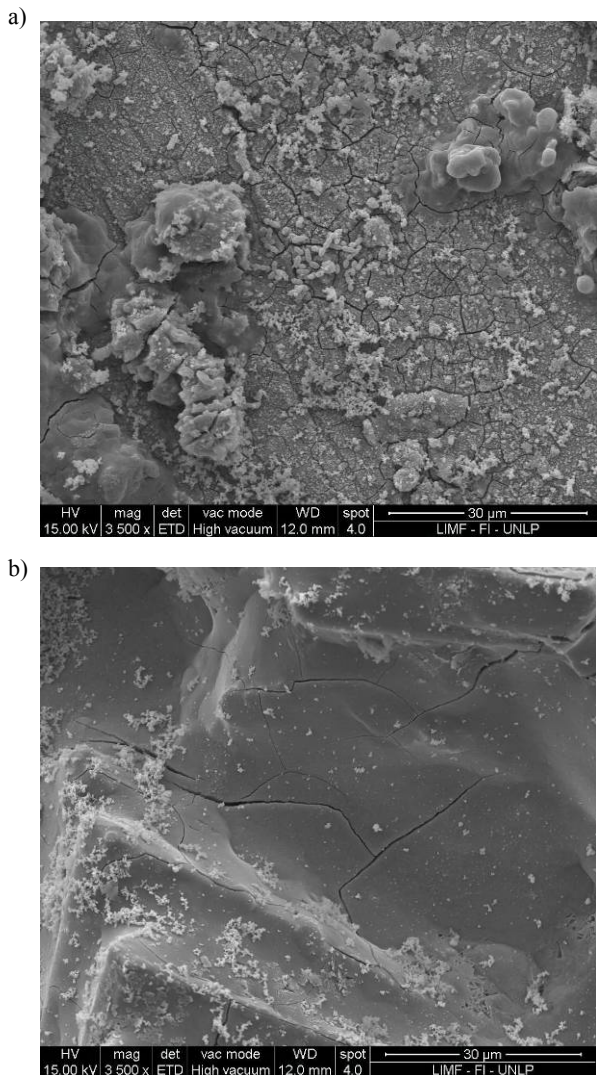
La adherencia bacteriana y la formación de biofilms fueron analizadas por MEB. Se observó que hubo una menor adherencia sobre los cupones de acero SAE 1010 tanto de *Pseudomonas* sp. (Figura 2) como de *D. vulgaris* (Figura 3). Es sabido que las bacterias excretan una variedad de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) que incluyen polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos [25]. Estas sustancias desempeñan un importante papel en la adhesión bacteriana a las superficies y le proporcionan protección, ejerciendo un efecto barrera frente a condiciones ambientales adversas. Las micrografías obtenidas por MEB nos permiten observar diferente cantidad de SPE excretadas por las dos cepas en los distintos sustratos ensayados. Cabe destacar, que sobre los cupones de acero SAE 1010 fue difícil identificar claramente estas SPE ya que se entremezclan con los óxidos y productos de corrosión del sustrato.



**Fig. 2.** *Pseudomonas* sp. sobre **a)** acero SAE 1010 sin película de *G* y **b)** sobre AG.

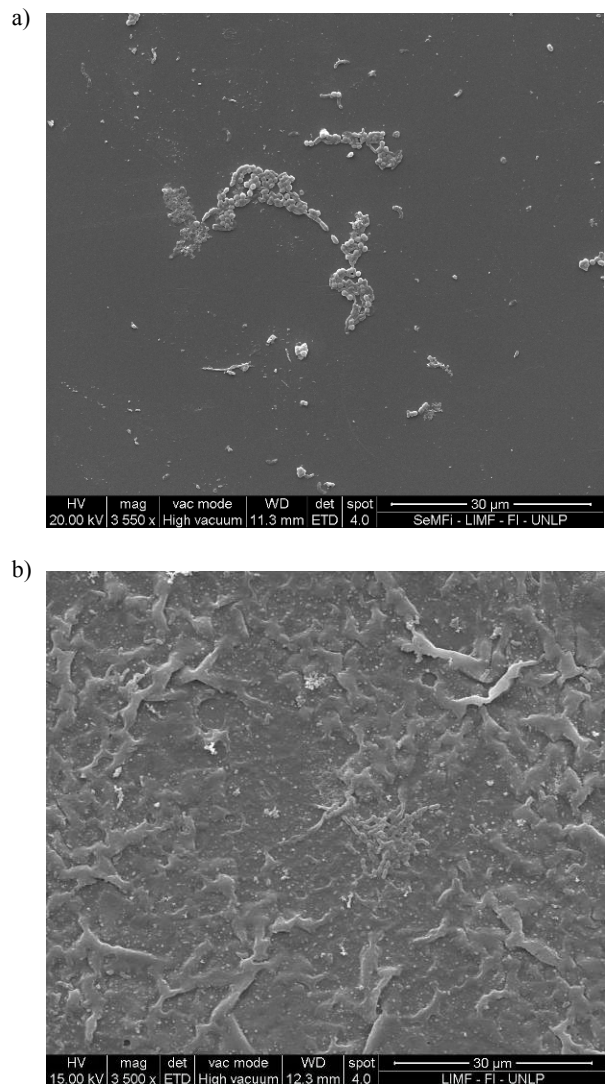
En cuanto a los ensayos realizados sobre el vidrio, no fue posible observar una significativa disminución de la adherencia de *D. vulgaris* (Figura 4) y de *Pseudomonas* sp en presencia de la película de grafeno. Rogers *et al.* [26] han clasificado diferentes materiales de acuerdo con el crecimiento de biopelículas microbianas en general y de *Legionella pneumophila* en particular, resultando el vidrio el menos susceptible y el látex el más susceptible al crecimiento microbiano. Sin embargo, cabe destacar nuevamente, que tales resultados tienen que ser evaluados con precaución ya que pueden variar con la especie microbiana y con las condiciones de prueba. Algunos autores [27] encontraron que el poliéster fue el material con mayor crecimiento de biofilms de *Listeria monocytogenes* probado en caldo nutritivo, mientras que el mismo experimento realizado en un medio mínimo casi no mostró la formación de biofilms sobre este material. Por el contrario, sobre nylon se determinó poco crecimiento de biofilms en caldo, pero mostró una cobertura significativa de cobertura con en medio mínimo. Es por esto que es muy difícil predecir qué material promoverá en mayor o menor medida la formación de biofilm. Algunas predicciones generales

pueden ser posibles si ciertas condiciones, como el estado nutricional, la temperatura de un sistema y los microorganismos pueden mantenerse constantes.



**Fig. 3.** *D. vulgaris* sobre a) acero SAE 1010 sin película de G y b) sobre AG.

Las propiedades antimicrobianas del G y sus compuestos afectan más a las bacterias gram-positivas que a las gram-negativas y a los hongos. Esto es debido a las diferencias en la conformación de la pared celular que los componen [28]. Thani *et al.* [29] estudiaron la interacción entre las células microbianas y óxidos de G a través del MEB, demostrando que la morfología de las bacterias gram-positivas se mantuvo sin cambios y que las gram-negativas se arrugaron y/o aplanaron perdiendo su integridad, preliminarmente, en nuestros estudios no se han observado este tipo de cambios morfológicos.



**Fig. 4.** *D. vulgaris* sobre a) vidrio sin película de G y b) sobre VG.

#### 4. Conclusiones.

Estas primeras experiencias utilizando películas de grafeno permitieron observar una disminución en la adherencia de ambas cepas bacteriana a la superficie metálica, no observándose este comportamiento sobre el vidrio. Estos ensayos preliminares, serán complementados con nuevos estudios tales como recuentos microbianos para hacer una evaluación cuantitativa de los microorganismos adheridos, observaciones con otras microscopías como AFM para una mejor apreciación de las SPE, de epifluorescencia para evaluar la viabilidad de los microorganismos adheridos, entre otros. Estos estudios permitirán un mejor entendimiento de la interacción G-microorganismo para futuras aplicaciones de estos recubrimientos con propiedades antifouling.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires (833/14) y a la Universidad Nacional de La Plata (11/I201) los subsidios recibidos.

## REFERENCIAS

- [1] K.S. Novoselov, V.I. Faloko, *et al.* "A roadmap for graphene". *Nature* **2012**:490 (7419) 192–200.
- [2] K.S. Novoselov, A.K. Geim *et al.* "Electric field effect in atomically thin carbon films". *Science* **2004**:306 (5696) 666-669.
- [3] T. Szabo, O. Berkesi *et al.* "Evolution of surface functional groups in a series of progressively oxidized graphite oxides". *Chem. Mater.* **2006**:18 (11) 2740-2749.
- [4] A.K. Geim, K.S. Novoselov "The rise of graphene". *Nat. Mater.* **2007**: 6, 183-191.
- [5] J.L. Sabourin, M.D. Daniel *et al.* "Functionalized graphene sheet colloids for enhance fuel/propellant combustion". *ACS Nano* **2009**: 3 (12) 3945-3954.
- [6] S. Stankovich, D.A. Dikin *et al.* "Graphene-based composite materials". *Nature* **2006**:442 (7100) 282–286.
- [7] O. Akhavan, E. Ghaderi "Escherichia coli bacteria reduce graphene oxide to bactericidal graphene in a self-limiting manner". *Carbon* **2012**:50 (5) 1853–1860.
- [8] O. Akhavan, E. Ghaderi *et al.* "Wrapping bacteria by graphene nanosheets for isolation from environment, reactivation by sonication, and inactivation by near-infrared irradiation". *J. Phys. Chem. B* **2011**:115 (19) 6279–6288.
- [9] S. Stankovich, D.A. Dikin *et al.* "Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide" *Carbon* **2007**:45 (7), 1558–1565.
- [10] J. Li, G. Wang *et al.* "Antibacterial activity of large-area monolayer graphene film manipulated by charge transfer". *Sci. Rep.* **2014**:4, 4359.
- [11] C.E. Rodriguez-Rodriguez, E. Rodriguez-Cavallini *et al.* "Bacterial contamination of automotive fuels in a tropical region: the case of Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* **2009**: 57 (3) 489–504
- [12] D.F. Aktas, J.S. Lee *et al.* "Effects of oxygen on biodegradation of fuels in a corroding environment" *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **2012**:81, 114–126
- [13] D.M. Stamper, R.E. Morris *et al.* "Depletion of lubricity improves from hydrotreated renewable and ultralow-sulfur petroleum diesels by marine microbiota" *Energy Fuels*, **2012**:26 (11) 6854–6862
- [14] J.S. Lee, K.H. You *et al.* "Highly photoactive, low bandgap TiO<sub>2</sub> nanoparticles wrapped by graphene". *Adv. Mater.* **2012**:24 (8) 1084–1088.
- [15] J.M. Suflita, D.F. Aktas *et al.* "Molecular tools to track bacteria responsible for fuel deterioration and microbiologically influenced corrosion". *Biofouling* **2012**:28 (9) 1003–1010.
- [16] T.S. Gunasekera, R.C. Striebich *et al.* "Transcriptional profiling suggests that multiple metabolic adaptations are required for effective proliferation of *Pseudomonas aeruginosa* in jet fuel" *Environ. Sci. Technol.* **2013**:47 (23) 3449–13458.
- [17] R.C. Striebich, C.E. Smart *et al.* "Characterization of the F-76 diesel and jet-a aviation fuel hydrocarbon degradation profiles of *Pseudomonas aeruginosa* and *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*" *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2014**:93, 33–43
- [18] X. Li, W. Cai *et al.* "Large-Area Synthesis of High-Quality and Uniform Graphene Films on Copper foils" *Science* **2009**:324 (5932), 1312-131.
- [19] M.C. Dalfovo, G.I. Lacconi *et al.* "Synergy between Graphene and Au Nanoparticles (Heterojunction) towards Quenching, Improving Raman Signal, and UV Light sensing. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2014**:6 (9) 6384–6391.
- [20] R.K.S. Raman, P.C. Banerjee *et al.* "Protecting copper form electrochemical degradation by graphene coating". *Carbon* **2012**:50 (11) 4040-4045.
- [21] D. Prasai, J.C. Tuberquia *et al.* Graphene: corrosion-inhibiting coating. *ACS Nano* **2012**:6 (2) 1102-1108.
- [22] A.F. De Faria, A.C.M. de Moraes *et al.* "Toxicity of Nanomaterials to Microorganisms: Mechanisms, Methods, and new Perspectives. In: Nanomedicine and Nanotoxicology, Duran, N., S.S. Guterres and O.L. Alves (Eds.), **2014** Springer, New York, 363-405.
- [23] E.P. Ivanova, J. Hasan *et al.* "Natural bactericidal surfaces: mechanical rupture of *Pseudomonas aeruginosa* cells by cicada wings". *Small* **2012**:8, 2489-2494.
- [24] J. Chen, X. Wang and H. Han. "A new function of graphene oxide emerges: Inactivating phytopathogenic bacterium *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*". *J. Nanopart. Res.* **2013**:15 (5) 1658-1672.
- [25] S.M. Notley, J.C. Russell y E.P. Ivanova "Bacterial Interaction with Graphene Particles and Surfaces, Nanotechnology and Nanomaterials, In: Advances in Graphene Sciences. M. Aliofkhaezrai, (Ed.) **2013**. ISBN 978-953-51-1182-5.
- [26] J. Rogers, A.B. Dowsett *et al.* "Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems". *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**: 60 (6) 1842–1851.
- [27] I.C. Blackman, J.F. Frank, "Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces". *J. Food Prot.* **1996** 59, 827–831.
- [28] G.J. Tortora, B.R. Funke y C.L. Case "Microbiology: An Introduction." 11th Edn. **2013**. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco.
- [29] R.F. Al-Thani, N.K. Patan y M.A. Al-Maadeed "graphene oxide as antimicrobial against two gram-positive and two gram-negative bacteria in addition to one fungus" *Online J. Biol. Sci.* **2014**:14 (3) 230-239.