

Introducción al estudio de las propiedades antibacterianas del grafeno

Introduction to the study of the antibacterial properties of graphene

Israel Gago¹, Inmaculada Molina¹, Gerardo León¹, Beatriz Miguel¹

¹ Universidad Politécnica de Cartagena, España

israel.gago@upct.es ; ima0@alu.upct.es ; gerardo.leon@upct.es ; beatriz.miguel@upct.es

RESUMEN. El grafeno es uno de los materiales más estudiados en los últimos años debido a sus excelentes propiedades mecánicas, ópticas y eléctricas, centrándose algunos estudios recientes en su capacidad de interactuar con células y tejidos. Entre los retos científicos de la bioingeniería está el desarrollo de nuevos sistemas de tratamiento de heridas mediante sustancias con alto poder bactericida. Las propiedades del grafeno en este sentido pueden aportar soluciones novedosas. En esta comunicación se presentan los resultados preliminares de un estudio sobre inhibición del crecimiento bacteriano en medios dopados con grafeno. La medida de la proliferación bacteriana en medios de cultivo convencionales y dopados con grafeno, confirman que éste actúa de manera efectiva como agente antibacteriano, lo que abre nuevas líneas de investigación en Defensa, entre ellas, la preparación de productos con grafeno para evitar infecciones en heridas abiertas antes de la evacuación del herido, aumentando sus posibilidades de supervivencia.

ABSTRACT. Graphene is one of the most studied materials in recent years due to its excellent mechanical, optical and electrical properties. Recent studies have been focused on the graphene capacity to interact with cells and tissues. One of the scientific challenges of bioengineering is the development of new systems to the wound healing by products with high bactericidal activity. Properties of graphene in this field can contribute to obtain new solutions. Preliminary results of one study about the inhibition of bacteria growth in graphene doped environments are shown in this paper. Comparison of the measure of the bacterial proliferation in both conventional and graphene doped cultures environments, confirms that graphene can act as an effective antibacterial agent. These results open new research lines in Defense, including the preparation of new graphene containing products to avoid infections in open injuries before wounded evacuation, which should lead to an increase of survival possibilities.

PALABRAS CLAVE: Grafeno, Bactericida, Nanocomposites, Ingeniería Biomédica, Supervivencia, Sistema Combatiente.

KEYWORDS: Graphene, Bactericide, Nanocomposites, Biomedical Engineering, Survival, Combatant system.

1. Introducción

El grafeno, lámina cristalina hexagonal de átomos de carbono con hibridación sp^2 , se ha convertido en uno de los nanomateriales más atractivos debido a sus excepcionales propiedades eléctricas, mecánicas y térmicas. Desde su descubrimiento en 2004 por Geim y Novoselov (Novoselov et al., 2004), las investigaciones acerca de las posibles aplicaciones de este material resultan muy prometedoras en campos tan diversos como la optoelectrónica, los materiales compuestos o la ingeniería biomédica (Katsnelson y Novoselov, 2007; Akash, Vijay y Pulya, 2014; Shang et al., 2008). Dentro de este último campo, las propiedades eléctricas del grafeno son útiles en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas. Del mismo modo, el grafeno puede ser utilizado como portador de agentes anti-infecciosos para potenciar su efecto terapéutico en virtud de su propia actividad antibacteriana (Pan et al., 2011). Por otro lado, el grafeno puede ser utilizado en el desarrollo de nanodispositivos para diversas aplicaciones terapéuticas y biosensores (Zhou, Zhai y Dong, 2009; Ohno, Maehashi y Matsumoto, 2010). Por ejemplo, los nanocomposites (materiales compuestos basados en nanotecnología) basados en el grafeno, unidos a la estimulación eléctrica y a una microtecnología adecuada, pueden conducir al desarrollo de estructuras capaces de mantener una señalización celular simultánea en el ámbito de la ingeniería de tejidos (Sant y Sant, 2014). El futuro desarrollo de estas aplicaciones aumenta las probabilidades de interacción del grafeno con el cuerpo humano, el medio ambiente y los microorganismos, por lo tanto, es necesario el estudio de su impacto medioambiental y toxicológico.

Se encuentran descritos en la bibliografía numerosos estudios sobre la toxicidad y la interacción con los microorganismos de algunos derivados del grafeno, como el óxido de grafeno o el óxido de grafeno reducido (Ji, Sun y Qu, 2016; Jastrzębska, Kurtycz y Olszyna, 2012; Hu et al., 2010; Gurunathan et al., 2012; Chen et al., 2014; Hu et al., 2011; Veerapandian, Zhang, Krishnamoorthy y Yun, 2013; Liu et al., 2012; Khan, Abdelhamid y Wu, 2015; Krishnamoorthy et al., 2012; Sawangphruk et al., 2012; Wang et al., 2013; Turcheniuk et al., 2015), pero son pocos los estudios que en este sentido existen sobre el grafeno prístino few-layer (Sasidharan et al., 2012; Zhou et al., 2012; Li et al., 2012; Krishnamoorthy et al., 2012; Li et al., 2013); enfatizándose, en cualquier caso, la influencia tanto de la concentración como de la forma del nanomaterial en sus propiedades bactericidas (Zhang et al., 2010). Con objeto de analizar la viabilidad del desarrollo de geles y apósitos basados en el grafeno (Kang et al., 2008), que permitan evitar infecciones en heridas abiertas antes de la evacuación del herido, aumentando de este modo sus posibilidades de supervivencia, se presentan en esta comunicación los resultados preliminares obtenidos por nuestro grupo de trabajo en los estudios de la posible inhibición del crecimiento de microorganismos mediante la adición de pequeñas cantidades de grafeno a los medios de cultivo.

2. Metodología

El grafeno prístino few-layer, fue sintetizado en nuestro laboratorio y caracterizado por espectroscopía de Raman (SiO_2/Si , 532 nm) y microscopía HR-TEM.

El medio de cultivo en gel estaba constituido por disoluciones del 1,5 % (w/w) de agar para bacteriología (Adsa Micro) en agua destilada tipo I, enriquecidas con un 2 % (w/w) de aporte proteico. Los cultivos se realizaron en placas de petri de polipropileno (JLC) de 51 mm de diámetro, obteniéndose un espesor de gel de 2 mm por placa. Para conseguir la máxima homogeneidad, el aporte proteico fue disuelto en agua y agitado durante 2 horas en un baño de ultrasonidos (GT Sonic, VGT-1730-QTD). Seguidamente se añadió el agar y se sonificó durante 30 minutos más. En el caso de los medios dopados, junto con el aporte proteico se añadió un 1 % (w/w) de grafeno. El medio de cultivo en estado líquido se sumergió en un baño de agua hirviendo para su completa esterilización y fue vertido en las placas de petri, donde se produjo la gelificación del mismo. La Figura 1 muestra un ejemplo de los medios de cultivo preparados.



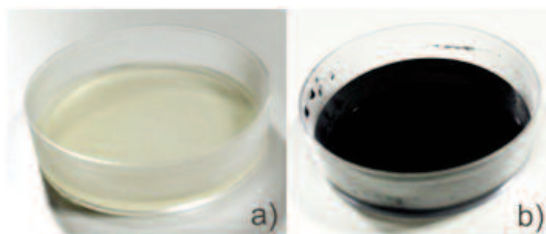


Figura 1. Placas de petri con el medio de cultivo ya gelificado y listo para la siembra de bacterias sin dopaje de grafeno (a) y dopada con un 1 % w/w de grafeno (b).

Las muestras bacterianas se recogieron en dos entornos con diferentes características: zona urbana y zona portuaria. La siembra se realizó in situ en los lugares de obtención de las muestras. Los cultivos se incubaron durante 72 horas a 37,5 °C. Una vez concluido el tiempo de incubación, las muestras fueron extraídas y pulverizadas con una disolución 1:1 v/v de hipoclorito de sodio en agua destilada para provocar la muerte celular y detener el crecimiento de las bacterias, así como para eliminar los riesgos de manipular material biológico potencialmente infeccioso.

Para estudiar la proliferación bacteriana en los cultivos realizados se utilizaron la microscopía óptica y la microscopía electrónica de barrido (SEM). Mediante microscopía óptica se adquirieron imágenes directamente de las placas de petri mediante un estereomicroscopio trinocular (Olympus, SZ61 TR). Para la preparación de las muestras de microscopía SEM se tomó de cada cultivo una porción representativa y se colocó sobre un portaobjetos cuadrado de vidrio (20 x 20 mm). La deshidratación de los especímenes se realizó a temperatura ambiente para no comprometer la integridad del polisacárido gelificante (Figura 3). Para la obtención de imágenes de alta resolución, las muestras se metalizaron mediante sputtering de plasma (Quorum Technologies, SC7610; Pt, 120 s, 120 mA). Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico de barrido (Hitachi, S-3500N; 5 kV, 128 μ A). La obtención de los datos correspondientes a las áreas totales y colonizadas se realizó mediante la aplicación informática para análisis científico de imágenes ImageJ.

Como parámetros de análisis de los resultados se han utilizado el ratio de colonización bacteriana (RCB), relación adimensional entre el área colonizada por la bacteria y el área total de la muestra, y el cociente de inhibición relativa (CIR), relación entre los ratios de colonización bacteriana de los cultivos sin y con grafeno.

3. Resultados

Las figuras 2 y 3 muestran los resultados obtenidos en la caracterización del grafeno prístino few-layer sintetizado en nuestro laboratorio, y utilizado en este estudio, mediante microscopía HR-TEM y espectroscopía de Raman (SiO_2/Si , 532 nm), respectivamente.

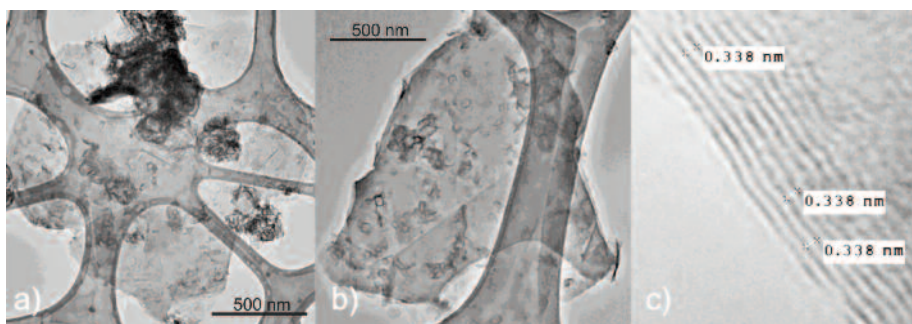


Figura 2. Micrografías HR-TEM del grafeno sintetizado: láminas de grafeno few-layer aisladas (a y b) y distancia entre planos cristalinos (c).

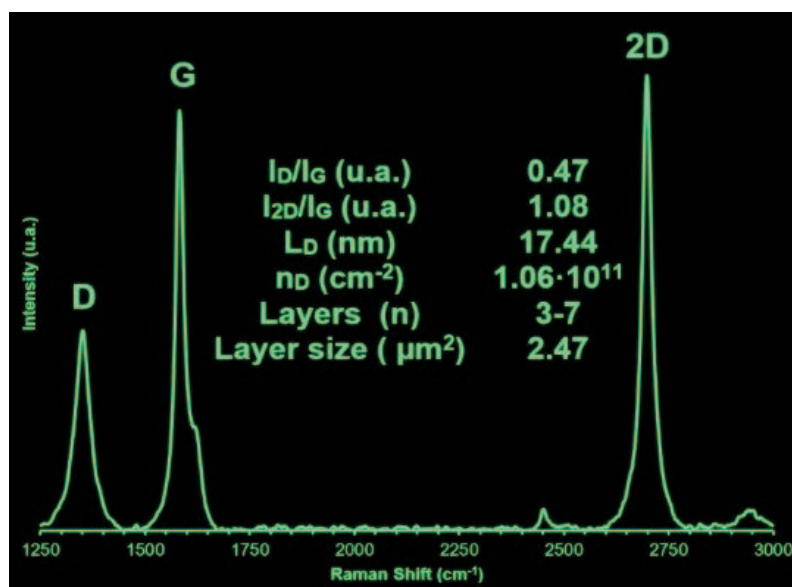


Figura 3. Espectro de Raman del grafeno obtenido.

La figura 4 muestra el aspecto de las capsulas petri sin dopar y dopada con grafeno (1% en peso) tras la incubación de los cultivos (zona portuaria) durante 72 horas, mientras que en la figura 5 puede apreciarse el aspecto de esas muestras una vez deshidratadas y preparadas para su análisis por espectroscopia electrónica de barrido.

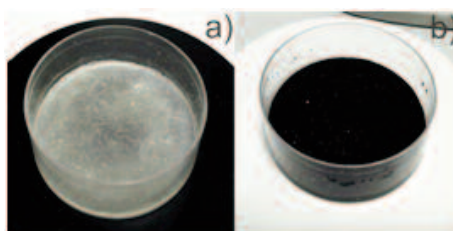


Figura 4. Placas de petri (zona urbana) tras la incubación de los cultivos durante 72 horas sin dopaje de grafeno (a) y dopada con un 1 % w/w de grafeno (b).



Figura 5. Cultivos deshidratados y preparados para su análisis mediante microscopía SEM: sin dopaje de grafeno (a) y del cultivo dopado con un 1 % w/w de grafeno (b).

Las figuras 6 y 7 muestran las imágenes obtenidas mediante el análisis de los cultivos preparados por microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido, respectivamente.

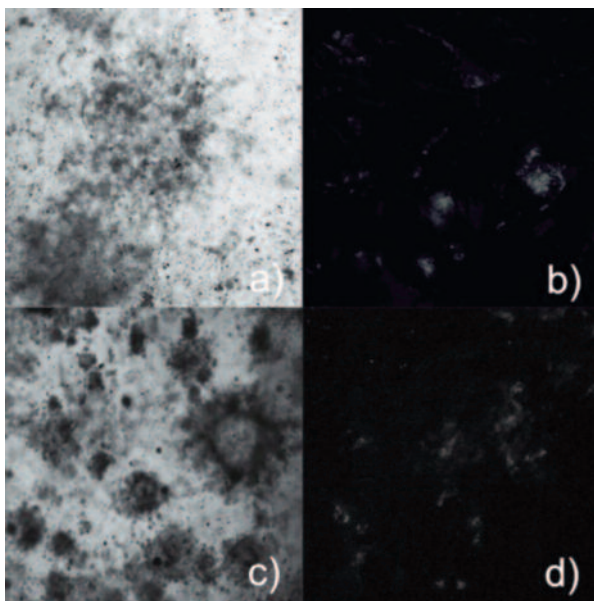


Figura 6. Micrografías ópticas de los cultivos obtenidos: cultivo sin grafeno: (a) zona portuaria, (c) zona urbana; cultivo dopado con grafeno: (b) zona portuaria, (d) zona urbana.

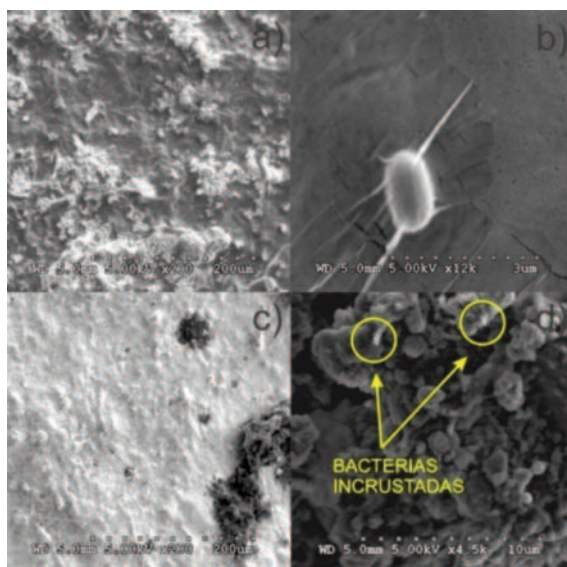


Figura 7. Micrografías SEM de los cultivos obtenidos con muestras de la zona portuaria: cultivo sin grafeno (a, b), cultivo dopado con grafeno (c, d).

En la tabla 1 se indican los ratios de colonización bacteriana (RCB) y los cocientes de inhibición relativa (CIR) obtenidos para las muestras sin dopar y dopadas con grafeno, de las zonas portuaria y urbana.

Muestra	RCB (%)		CIR (%)
	Sin grafeno	Con grafeno	
Zona portuaria	52,118	0,140	37307,901
Zona urbana	62,175	0,602	10327,584

Tabla 1. RCBs y CIRs de los cultivos obtenidos de las zonas portuaria y urbana, dopados con grafeno y sin dopar.

4. Discusión

Los resultados obtenidos mediante microscopía HR-TEM (Figura 2) permitieron conocer el área de las láminas y verificar la distancia entre los planos cristalinos de las muestras de grafeno. El elevado valor del área media de las láminas ($2,47 \mu\text{m}^2$), en comparación con el descrito por otros autores, demuestra la alta calidad del grafeno obtenido, y la distancia entre planos cristalinos ($0,338 \text{ nm}$), es prácticamente igual que la teórica ($0,335 \text{ nm}$) descrita en la bibliografía (Hembacher et al., 2003).

El análisis de los tres picos fundamentales del espectro de Raman del grafeno (D, G y 2D) permitió calcular los coeficientes de caracterización fundamentales: I_D/I_G , I_{2D}/I_G , a partir de los cuales se obtuvo la distancia entre defectos (L_D), la densidad de defectos (n_D), y el número de láminas de la muestra (n) (Figura 3). Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el grafeno utilizado en nuestros experimentos es grafeno prístino few-layer (3-7 láminas), con un bajo porcentaje de defectos (Cançado, 2011).

El análisis visual de los cultivos realizados permitió apreciar una colonización bacteriana de similares características en las muestras no dopadas, independientemente de su origen, observándose una ocupación completa de las placas, mientras que, por el contrario, en los cultivos dopados con grafeno se observó una ausencia prácticamente total de colonias (Figura 4).

Estas observaciones fueron confirmadas a través de las imágenes obtenidas por microscopía óptica y electrónica de barrido (Figuras 6.a, 6.b y 7.a y 7.c). Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido permitieron visualizar cepas específicas de bacterias e incluso, siguiendo los criterios de Krishnamoorthy y col. (Krishnamoorthy et al., 2012), cepas incrustadas en la matriz del nanocomposite (Figuras 7.b y 7.d).

Aunque el mecanismo de esta acción bactericida del grafeno no se conoce en profundidad, se han propuesto dos hipótesis fundamentales para explicarlo. La primera (Li et al., 2012; Krishnamoorthy et al., 2012) atribuye la actividad microbiana del grafeno prístino, al igual que la de otros nanomateriales de grafeno, al aumento que éste produce en la cantidad de especies oxigenadas reactivas en el interior de las bacterias, lo que genera un estrés oxidativo que induce inactivación de las proteínas celulares, peroxidación de lípidos, disfunción mitocondrial (despolarización de la membrana mitocondrial que genera disminución en la síntesis de ATP) y eventualmente apoptosis o necrosis celular. La segunda (Akhavan y Ghaderi, 2010) considera como causa fundamental de la actividad antimicrobiana del grafeno, el daño producido en la membrana celular de las bacterias por las terminaciones extremadamente afiladas de sus nanoláminas.

A partir de las imágenes de microscopía óptica (Figura 7) se obtuvieron las áreas de colonización bacteriana y, a partir de ellas, los ratios de colonización bacteriana y los cocientes de inhibición relativa de las distintas muestras (Tabla 1). Los valores de estos parámetros muestran una diferente actividad bactericida del grafeno en las dos muestras estudiadas, lo que sugiere que dicha actividad es distinta para muestras con tipos de bacterias diferentes. Este comportamiento podría estar relacionado con el hecho descrito en la bibliografía (Krishnamoorthy et al., 2012) de que el grafeno posee mayor poder bactericida frente a las bacterias Gram negativas que frente a las Gram positivas, como consecuencia del distinto espesor de la capa de peptidoglucano de la pared bacteriana ($7-8 \text{ nm}$ en las primeras y $20-80 \text{ nm}$ en las segundas).

En cualquier caso, los resultados de la Tabla 1 ponen de manifiesto que la presencia de grafeno en los medios de cultivo disminuye de manera muy significativa el crecimiento bacteriano, obteniéndose inhibiciones de entre 100 y 400 veces en la colonización bacteriana, dependiendo del origen de la muestra y, en consecuencia, del tipo de bacterias presentes en la misma. Estos resultados apoyan la viabilidad del desarrollo de geles y apósitos basados en el grafeno que permitan evitar infecciones en heridas abiertas, antes de la evacuación del herido, aumentando de este modo sus posibilidades de supervivencia.



5. Conclusiones

Se describen en esta comunicación los resultados preliminares obtenidos por nuestro grupo de trabajo en los estudios de la inhibición del crecimiento de microorganismos mediante la adición de pequeñas cantidades de grafeno a los medios de cultivo. El estudio comparativo del crecimiento bacteriano en cultivos dopados y no dopados con grafeno confirma que éste actúa de manera efectiva como agente antibacteriano, siendo la eficacia de esta actividad dependiente del tipo de cepa bacteriana. Utilizando el ratio de colonización bacteriana y el cociente de inhibición relativa como parámetros de análisis, se ha cuantificado que la presencia de grafeno inhibe entre 100 y 400 veces la colonización bacteriana, dependiendo del origen de la muestra y, en consecuencia, del tipo de bacteria presente en la misma. Los resultados abren nuevas expectativas sobre el empleo del grafeno en el campo de la Defensa, fundamentalmente en lo que se refiere a la preparación de productos basados en el mismo, que permitan evitar infecciones en heridas abiertas antes de la evacuación de un herido, aumentando de este modo sus posibilidades de supervivencia.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo recibido por parte del Servicio de Apoyo a la Investigación Tecnológica (SAIT) de la Universidad Politécnica de Cartagena y a la Autoridad Portuaria de Cartagena.

Cómo citar este artículo / How to cite this paper

Gago, I.; Molina, I.; León, G.; Miguel, B. (2016). Introducción al estudio de las propiedades antibacterianas del grafeno. *Revista de Pensamiento Estratégico y Seguridad CISDE*, 1(2), 87-94. (www.cisdejournal.com)

Referencias

- Akash, M.; Vijay, K. S.; Pulya, U. S. (2014). Investigation of mechanical properties of alumina nanoparticle-loaded hybrid glass/carbon-fiber-reinforced epoxy composites. *Journal of Applied Polymer Science*, 131(1), Artículo APP39749.
- Akhavan, O.; Ghaderi, E. (2010). Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria. *ACS Nano*, (4), 5731-5736.
- Cançado, L. G. (2011). Quantifying defects in graphene via Raman spectroscopy at different excitation energies. *Nanoletters*, (11), 3190-3196.
- Chen, J.; Peng, H.; Wang, X.; Shao, F.; Yuan, Z.; Han, H. (2014). Graphene oxide exhibits broad spectrum antimicrobial activity against bacterial phytopathogens and fungal conidia by intertwining and membrane perturbation. *Nanoscale*, (6), 1879-1889.
- Gurunathan, S.; Han, J. W.; Dayem, A. A.; Eppakayala, V.; Kim, J. H. (2012). Oxidative stress-mediated antibacterial activity of graphene oxide and reduced graphene oxide in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Nanomedicine*, (7), 5901-5914.
- Hembacher, S.; Giessibl, F. J.; Mannhart, J.; Quate, C. F. (2003). Revealing the hidden atom in graphite by low-temperature atomic force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(22), 12539-12542.
- Hu, W.; Peng, C.; Luo, W.; Lv, M.; Li, X.; Li, D.; Huang, Q.; Fan, C. (2010). Graphene-based antibacterial paper. *ACS Nano*, (4), 4317-4323.
- Hu, W.; Peng, C.; Lv, M.; Li, X.; Zhang, Y.; Chen, N.; Fan, C.; Huang, Q. (2011). Protein corona-mediated mitigation of cytotoxicity of graphene oxide. *ACS Nano*, (5), 3693-3700.
- Jastrzębska, A. M.; Kurtycz, P.; Olszyna, A. R. (2012). Recent advances in graphene family materials toxicity investigations. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(12), 1-21.
- Ji, H.; Sun, H.; Qu, X. (2016). Antibacterial application of graphene-based nanomaterials. Recent achievements and challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews*. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.009>)
- Kang, S.; Herzberg, M.; Rodrigues, D. F.; Elimelech, M. (2008). Antibacterial Effects of Carbon Nanotubes: Size Does Matter. *Langmuir*, (24), 6409-6413.
- Katsnelson, M. I.; Novoselov, K. S. (2007). Graphene: new bridge between condensed matter physics and quantum electrodynamics. *Solid State Communications*, (143), 3-13.
- Khan, M. S.; Abdelhamid, H. N.; Wu, H. F. (2015). Near infrared (NIR) laser mediated surface activation of graphene oxide nanoflakes for efficient antibacterial, antifungal and wound healing treatment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, (127), 281-291.
- Krishnamoorthy, K.; Umasuthan, N.; Mohan, R.; Lee, J.; Kim, S. J. (2012). Antibacterial activity of graphene oxide nanosheets. *Science of Advanced Materials*, (4), 1111-1117.
- Krishnamoorthy, K.; Veerapandian, M.; Zhang, L.; Yun, K.; Kim, S. J. (2012). Antibacterial efficiency of graphene nanosheet against pathogenic bacteria via lipid peroxidation. *The Journal of Physical Chemistry C*, (116), 17280-17287.

- Li, Y.; Liu, Y.; Fu, Y.; Wei, T.; Le Guyader, L.; Gao, G.; Liu, R. S.; Chang, Y. Z.; Chen, C. (2012). The triggering of apoptosis in macrophages by pristine graphene through the MAPK and TGF-beta signaling pathways. *Biomaterials*, (33), 402-411.
- Li, Y.; Yuan, H.; Von demBussche, A.; Creighton, M.; Hurt, R. H.; Kane, A. B.; Gao, H. (2013). Graphenemicrosheets enter cells through spontaneous membrane penetration at edge asperities and corner sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, (110), 12295-12300.
- Liu, S.; Hu, M.; Zeng, T. H.; Wu, R.; Jiang, R.; Wei, J.; Wang, L.; Kong, J.; Chen, Y. (2012). Lateral dimension-dependent antibacterial activity of graphene oxide sheets. *Langmuir*, (28), 12364-12372.
- Novoselov, K. S.; Geim, A. K.; Morozov, S. V.; Jiang, D.; Zhang, Y.; Dubonos, S. V.; Grigorieva, I.; Firsov, A. A. (2004). Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science*, (306), 666-669.
- Ohno, Y.; Maehashi, K.; Matsumoto, K. (2010). Label-free biosensors based on Aptamer-modified graphene field-effect transistors. *Journal of the American Chemical Society*, (132), 18012-18013.
- Pan, Y.; Bao, H.; Sahoo, N. G.; Wu, T.; Li, L. (2011). Water-soluble poly(N-isopropylacrylamide)-graphene sheets synthesized via click chemistry for drug delivery. *Advanced Functional Materials*, (21), 2754-2763.
- Sant, S.; Sant, V. (2014). Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, (173), 75-88.
- Sasidharan, A.; Panchakarla, L. S.; Sadanandan, A. R.; Ashokan, A.; Chandran, P.; Girish, C. M.; Menon, D.; Nair, S. V.; Rao, C. N.; Koyakutty, M. (2012). Hemocompatibility and macrophage response of pristine and functionalized graphene. *Small*, (8), 1251-1263.
- Sawangphruk, M.; Srimuk, P.; Chiochan, P.; Sangsri, T.; Siwayaprahm, P. (2012). Synthesis and antifungal activity of reduced graphene oxide nanosheets. *Carbon*, (50), 5156-5161.
- Shang, N. G.; Papakonstantinou, P.; McMullan, M.; Chu, M.; Stramboulis, A.; Potenza, A. (coords) (2008). Catalyst-free efficient growth, orientation and biosensing properties of multilayer graphene nanoflake films with sharp edge planes. *Advanced Functional Materials*, (18), 3506-3514.
- Turcheniuk, K.; Hage, C. H.; Spadavecchia, J.; Serrano, A. Y.; Larroulet, I.; Pesquera, A.; Zurutuza, A.; Pisfil, M. G.; Heliot, L.; Boukaert, J.; Boukherroub, R.; Szunerits, S. (2015). Plasmonicphotothermal destruction of uropathogenic E-coli with reduced graphene oxide and core/shell nanocomposites of gold nanorods/reduced graphene oxide. *Journal of Materials Chemistry B*, (3), 375-386.
- Veerapandian, M.; Zhang, L.; Krishnamoorthy, K.; Yun, K. (2013). Surface activation of graphene oxide nanosheets by ultraviolet irradiation for highly efficient anti-bacterials. *Nanotechnology*, 24(39), Artículo n° 395706.
- Wang, Y. W.; Fu, Y. Y.; Wu, L. J.; Li, J.; Yang, H. H.; Chen, G. N. (2013). Targeted photothermal ablation of pathogenic bacterium, *Staphylococcus aureus*, with nanoscale reduced graphene oxide. *Journal of Materials Chemistry B*, (1), 2496-2501.
- Zhang, Y. B.; Ali, S. F.; Dervishi, E.; Xu, Y.; Li, Z. R.; Casciano, D.; Biris, A. S. (2010). Cytotoxicity effects of graphene and single-wall carbon nanotubes in neural phaeochromocytoma-derived PC12 cells. *ACS Nano*, (4), 3181-3186.
- Zhou, M.; Zhai, Y.; Dong, S. (2009). Electrochemical sensing and biosensing platform based on chemically reduced graphene oxide. *Analytical Chemistry*, (81), 5603-5613.
- Zhou, H.; Zhao, K.; Li, W.; Yang, N.; Liu, Y.; Chen, C.; Wei, T. (2012). The interactions between pristine graphene and macrophages and the production of cytokines/chemokines via TLR- and NF-kappaB-related signaling pathways. *Biomaterials*, (33), 6933-6942.