



بررسی اثرات نانوساختار گرافن سلولز علیه میکروب‌های بیماری‌زای انتروکوک فکالیس، سالمونلا، کلبسیلا پنومونیه، استافیلوکوکوس اورئوس

فاطمه قنبری: گروه شیمی، واحد مهاباد، دانشگاه آزاد اسلامی، مهاباد، ایران (* نویسنده مسئول) ghanbary83@yahoo.com

داوود ستم‌دیده: گروه شیمی، واحد مهاباد، دانشگاه آزاد اسلامی، مهاباد، ایران

پروانه ناصرزاده: مرکز تحقیقات کولرکتال، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

آرش جواد موسوی: دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

نانو کامپوزیت، سلولز گرافن، فعالیت ضد باکتریایی، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متیسیلین، انتروکوک ائروژنیوزا

زمینه و هدف: در طول دو دهه گذشته، بیماری‌های عفونی در حال ظهور سلامت عمومی جهانی را تهدید می‌کند. نکته مهم در رابطه با کلیه بیماری‌های عفونی این است که باکتری‌ها به دلیل توانایی سریع و موثر در سازگاری با تغییرات محیطی مکانیسم‌های زیادی برای فرار از اثرات دارو ایجاد می‌کنند. ۴۰ تا ۶۰ درصد از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس که در بیمارستان‌های ایالات متحده و بریتانیا یافت می‌شوند به متیسیلین (MRSA) مقاوم هستند، و بیشتر این سویه‌ها به چندین آنتی‌بیوتیک نیز مقاوم هستند. بیشتر آنتی‌بیوتیک‌ها ده‌ها سال پیش ساخته شده‌اند، بنابراین دیگر به عنوان عوامل ضد باکتریایی برای محل اتصال صحیح باکتری‌ها مورد هدف قرار نمی‌گیرند زیرا باکتری‌ها ژنوم خود را به عنوان یک ابزار محافظتی تکامل داده‌اند. مقاومت میکروبی به آنتی‌بیوتیک‌های رایج منجر به افزایش تلاش‌ها برای کشف و سنتز عوامل میکروبی برای جایگزینی داروهای فعلی شده است. همانطور که نانویزشکی به طور مداوم پیشرفت می‌کند، رویکردهای نوآورانه متمرکز بر بهبود انتقال داروهای ضد میکروبی محلی در حال ظهور هستند. نانوذرات می‌توانند در برخورد با عوامل پاتوژن محتوای خود را که شامل آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشند را آزاد نمایند. یکی از نانوذراتی که در مطالعه‌ی پیش رو بر آن تمرکز شده است نانوذرات سلولز می‌باشند. نانو سلولز به دلیل سازگاری و خواص عالی از جمله داشتن سطح به حجم بالا، زیست تخریب پذیر بودن، تجدید پذیر بودن، امکان عملکرد سطحی و برخورداری از استحکام مکانیکی بالا، توجه زیادی را به خود جلب کرده است. بر اساس گزارش‌ها، نانو سلولز یکی از موثرترین موادی است که می‌تواند ویژگی ضد میکروبی برای چندین سوبه‌ی باکتریایی داشته باشد.

روش کار: در این مطالعه، نانو کامپوزیت سلولز-گرافن را از منابع ارزان قیمت تهیه کردیم و فعالیت ضد باکتریایی آن را در برابر باکتری‌های بیماری‌زای انسانی بررسی کردیم. ساختار سلولز-گرافن با طیف سنجی فرو سرخ تبدیل فوریه (FTIR) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مشخص شد. در مرحله دوم، برای تعیین فعالیت ضد باکتریایی نانو کامپوزیت سنتز شده، از روش انتشار در آگار استفاده شد و فعالیت ضد باکتریایی نانو کامپوزیت سلولز گرافن را با نانوذرات نیترا نقره مقایسه کردیم.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که نانو کامپوزیت سلولز-گرافن دارای فعالیت ضد باکتریایی خوبی روی سویه‌های باکتریایی آزمایش شده بود و در همه موارد فعالیت نانو کامپوزیت سلولز-گرافن بیشتر از نیترا نقره بود.

نتیجه‌گیری: در آینده ترکیبات نانو کامپوزیت سلولز گرافن می‌توانند برای پانسمان زخم‌ها و سوختگی‌ها با کمترین سمیت جایگزین نانوذرات نقره شوند.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

Ghanbary F, Naserzadeh P, Setamdideh D, Mosavi AJ. Investigating the Effects of Graphene Nanostructures Against Pathogenic Microbes, Enterococcus faecalis, Salmonella, Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus aureus. Razi J Med Sci. 2025(8 Jun);32.49.

Copyright: ©2024 The Author(s); Published by Iran University of Medical Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the CC BY-NC-SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.en>).

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 4.0 صورت گرفته است.

Investigating the Effects of Graphene Nanostructures Against Pathogenic Microbes, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*

Fatemeh Ghanbary: PhD, Department of Chemistry, MAH.C. Islamic Azad University, Mahabad, Iran (* Corresponding Author) ghanbary83@yahoo.com

Davood Setamdideh: PhD, Department of Chemistry, MAH.C. Islamic Azad University, Mahabad, Iran

Parvaneh Naserzadeh: PhD, Colorectal Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Arash Javad Mosavi: MD, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background & Aims: The past two decades have witnessed a significant and ongoing threat to global public health posed by emerging infectious diseases. A critical aspect of combating these infections lies in understanding the remarkable adaptability of bacteria. These microscopic organisms possess an extraordinary ability to evolve and develop numerous mechanisms to evade the effects of antimicrobial drugs, often with remarkable speed and efficiency. This evolutionary arms race has led to a alarming rise in antimicrobial resistance (AMR), rendering many conventional antibiotics less effective, or even completely ineffective, against common bacterial pathogens. A prime example of this escalating crisis is the widespread resistance observed in *Staphylococcus aureus*, a bacterium notorious for causing a range of infections, from mild skin infections to life-threatening conditions like sepsis and endocarditis. A staggering 40% to 60% of *Staphylococcus aureus* strains isolated in hospitals across the United States and the United Kingdom are now resistant to methicillin (MRSA). What's more concerning is that a significant proportion of these MRSA strains exhibit multidrug resistance, meaning they are resistant to several other classes of antibiotics as well. This widespread resistance poses immense challenges to clinical practice, limiting treatment options and increasing morbidity and mortality rates. The unfortunate reality is that many of the antibiotics currently in use were developed decades ago. Consequently, bacteria have had ample time to evolve sophisticated protective mechanisms within their genomes, allowing them to circumvent the intended antibacterial action of these older drugs. This inherent adaptability of bacteria has significantly diminished the efficacy of many conventional antimicrobial agents. The growing problem of microbial resistance to common antibiotics has thus intensified global efforts to discover and synthesize novel antimicrobial agents that can serve as effective replacements for existing medications. The urgency for new therapeutic strategies is paramount to safeguard public health and ensure that treatable infections do not become untreatable. In this context, nanomedicine has emerged as a promising field, offering innovative approaches focused on improving the targeted delivery of antimicrobial drugs. Nanoparticles, due to their unique physical and chemical properties, hold immense potential in this regard. They can be engineered to encapsulate antimicrobial agents and selectively release their payload upon encountering pathogenic microorganisms, thereby increasing the local concentration of the drug at the site of infection and minimizing systemic side effects. This targeted delivery mechanism not only enhances the therapeutic efficacy but also potentially reduces the selective pressure that drives the development of resistance. Among the various types of nanoparticles, cellulose-based nanoparticles have garnered significant attention, and they are a key focus of the present study. Nanocellulose, derived from abundant and renewable natural resources, boasts a compelling combination of properties that make it an attractive candidate for biomedical applications, particularly in the realm of antimicrobial therapy. These properties include excellent biocompatibility, biodegradability, and renewability, making them environmentally friendly and safe for biological systems. Furthermore, nanocellulose exhibits a high surface-area-to-volume ratio, which provides ample sites for functionalization and drug loading. Its remarkable mechanical strength and the ease with which its surface can be functionalized further enhance its utility. Importantly, numerous reports have highlighted the inherent antimicrobial properties of nanocellulose

Keywords

Nanocomposite,
Cellulose-graphene,
Antibacterial activity,
Methicillin-resistant,
Staphylococcus aureus,
Enterococcus aeruginosa

Received: 01/03/2025

Published: 08/06/2025

against several bacterial strains, positioning it as a potent and versatile antimicrobial agent in its own right, even before incorporating other active compounds.

Methods: In this pioneering study, we embarked on a systematic investigation to synthesize a cellulose-graphene nanocomposite from cost-effective and readily available sources. The primary objective was to thoroughly evaluate its antibacterial activity against a panel of human pathogenic bacteria. The structural characteristics of the synthesized cellulose-graphene nanocomposite were meticulously elucidated using two advanced analytical techniques. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) was employed to identify the functional groups present and confirm the successful formation of the composite by analyzing vibrational modes of the chemical bonds. Simultaneously, scanning electron microscopy (SEM) was utilized to visualize the morphology, size, and dispersion of the nanocomposite particles, providing crucial insights into their physical structure and potential interactions with bacterial cells. Following the thorough structural characterization, the antibacterial efficacy of the synthesized nanocomposite was rigorously assessed using the agar diffusion method, a well-established and widely accepted technique in microbiology. This method involves placing discs impregnated with the test substance onto agar plates inoculated with specific bacterial strains. The formation of a zone of inhibition around the disc, where bacterial growth is suppressed, indicates antimicrobial activity. For a comprehensive comparative analysis, the antibacterial activity of the cellulose-graphene nanocomposite was directly compared with that of silver nitrate nanoparticles, a well-known antimicrobial agent, under identical experimental conditions. This direct comparison allowed us to ascertain the relative potency and effectiveness of our novel nanocomposite.

Results: The results of our comprehensive investigation were highly encouraging and demonstrably showcased the potent antibacterial activity of the cellulose-graphene nanocomposite. The nanocomposite exhibited significant antibacterial effects against all the bacterial strains tested in this study. What was particularly noteworthy was that, in every single instance, the antibacterial activity demonstrated by the cellulose-graphene nanocomposite surpassed that of silver nitrate nanoparticles. This superior performance underscores the potential of our novel composite as a more effective antimicrobial agent compared to a conventional and widely used alternative. The consistent and robust antibacterial action across various bacterial strains highlights its broad-spectrum efficacy.

Conclusion: Based on these compelling findings, we confidently conclude that cellulose-graphene nanocomposites hold immense promise for future biomedical applications, particularly in the development of advanced wound dressings and burn treatments. Their superior antibacterial activity, coupled with the potential for minimal toxicity, positions them as a highly viable and potentially safer alternative to silver nanoparticles, which are currently a common component in many wound care products. The prospect of replacing silver nanoparticles with a more effective and less toxic material like cellulose-graphene nanocomposites represents a significant advancement in the field of antimicrobial biomaterials. This research paves the way for the development of innovative and highly effective therapeutic strategies to combat bacterial infections, ultimately improving patient outcomes and addressing the global challenge of antimicrobial resistance. The future appears bright for these versatile nanocomposites in revolutionizing wound care and infection control.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Cite this article as:

Ghanbary F, Naserzadeh P, Setamdideh D, Mosavi AJ. Investigating the Effects of Graphene Nanostructures Against Pathogenic Microbes, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*. *Razi J Med Sci*. 2025(8 Jun);32:49.

Copyright: ©2024 The Author(s); Published by Iran University of Medical Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the CC BY-NC-SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.en>).

***This work is published under CC BY-NC-SA 4.0 licence.**

مقدمه

یکی از چالش‌های بسیار مهم در سال‌های اخیر مدیریت بیماری‌های عفونی است. مراکز کنترل عفونت‌های میکروبی و پیشگیری از بیماری و سازمان بهداشت جهانی (WHO) (World Health Organization) در ۳۱ دسامبر ۲۰۱۹، مجموعه‌ای از موارد ذات‌الریه را گزارش کرد که از یک بازار عمده فروشی غذاهای دریایی و حیات وحش در شهر ووهان چین نشأت می‌گرفت که بعداً با نام کووید-۱۹ شناخته شد و به سرعت در سراسر جهان گسترش یافت (۱). در ۱۲ مارس ۲۰۲۰، WHO شیوع کووید-۱۹ را به عنوان یک بیماری همه‌گیر اعلام کرد که در رابطه با منشاء دقیق، ساختار، ترکیب، تست‌های تشخیصی سریع و ایمونولوژیک مناسب، واکسن‌های مناسب و مواد ضد میکروبی موثر ابهامات زیادی وجود دارد (۲ و ۳).

عفونت با پاتوژن‌ها (باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌های بیماری‌زا)، به ویژه زخم‌های سوختگی، آسیب‌های جدی و روش‌های جراحی، می‌تواند روند بهبود زخم را طولانی‌تر کرده و از طرفی منجر به بقا و چسبندگی سطحی پاتوژن‌های باکتریایی بر روی سطح زخم‌ها شود. شیوع این عفونت غالباً از انتقال مستقیم کارکنان مراقبت‌های بهداشتی به بیماران و همچنین از طریق تعامل غیرمستقیم بین عوامل بیماری‌زا از محیط بیمارستان و کارکنان مراقبت‌های بهداشتی نشأت می‌گیرد. مطالعات انجام شده توسط کرامرو اوتو نشان داده است که پاتوژن‌های بیمارستانی، از جمله اسینتوباکتریومانی (*baumannii Acinetobacter*) و استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) می‌توانند برای چند هفته تا چند ماه روی یک سطح بی‌جان زنده بمانند. بنابراین، دستیابی به مقاومت آنتی‌بیوتیکی همراه با گندزدایی، استراتژی مبارزه‌ای موثرتری را در برابر مقاومت بیماریزا ارائه می‌دهد. از این رو مطالعات در زمینه‌ی ترکیبات جایگزین ضد میکروبی بسیار مورد توجه قرار گرفته است زیرا می‌توانند ضمن ضد عفونی کردن و علیرغم تماس فیزیکی مکرر با انسان، مقاومت قابل توجهی علیه عفونت ایجاد کنند (۴ و ۵).

امروزه نانو مواد به عنوان آنتی باکتریال‌های

جایگزین، بسیار مورد توجه قرار گرفته اند و نانو سلولز می‌تواند به عنوان یک ماده‌ی ضد میکروبی در برابر میکروب‌ها گزینه‌ی مناسب باشد (۶). این ماده به دلیل انطباق پذیری و خواص عالی خود، مانند داشتن سطح ویژه بالا، زیست تخریب پذیر بودن، تجدیدپذیر بودن، امکان عملکرد سطحی و داشتن استحکام مکانیکی بالا بسیار مورد توجه قرار گرفته است. طبق گزارشات انجام شده نانوسلولز یکی از مؤثرترین موادی است که می‌تواند چندین میکروب را فیلتر کند. در سال‌های اخیر مواد ضد میکروبی مبتنی بر نانوسلولز کاربردهای زیادی را در زمینه‌های مختلف صنعت به خود جلب کرده است.

مطالعه‌ی انجام گرفته در سال ۲۰۱۹ نشان می‌دهد که فعالیت‌های ضد باکتریایی نانومواد مبتنی بر گرافن مانند کامپوزیت‌های مواد کربنی، کامپوزیت‌های گرافن - فلز، کامپوزیت‌های اکسید فلزی و کامپوزیت‌های-GN پلیمر در برابر بسیاری از شاخص‌های باکتریایی، از جمله سودوموناس، ای کولای، انتروکوکوس فکاليس، سالمونلا تیفی و استپروتوکوکوس اورئوس به روش‌های متفاوت از ماهیت ضد باکتریایی چشمگیری برخوردار هستند (۷). در مطالعه‌ی انجام گرفته در سال ۲۰۲۰ مکانیسم‌های ضد باکتریایی گرافن مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق با استفاده از شبیه‌سازی‌های دینامیکی مولکولی، تعاملات بین مواد گرافن انجام شده است. نتایج نشان می‌دهد که به دلیل فعل و انفعالات فیزیکی، سلول باکتری بدون تغییر در پارامترهای رشد خود به دام می‌افتد. این ممکن است منجر به افزایش فشار داخلی سلول، پارگی دیواره و در نتیجه مرگ آن شود (۸).

راجا پاکشا و همکاران در سال ۲۰۱۹ نانوذرات اکسید مس (CuONPs) دوپ شده در اکسید گرافن (GO) را به عنوان یک روش جدید جهت تولید عوامل ضد باکتریایی معرفی کردند. هدف از این مطالعه، ارزیابی خواص ضد باکتریایی مواد هیبرید شده GO-CuONP در برابر اشرشیاکلی بیماری‌زا و سالمونلا تیفی موریوم بود. GO با استفاده از روش اصلاح شده هامر سنتز شد و با استفاده از یک سری واکنش‌های شیمیایی حرارتی با ۴۰ درصد وزنی بر وزن CuONPs

گرافن اکسیدچشمگیر بود. داده‌های ارائه‌شده نشان داد که GO یک عامل باکتری‌کش مؤثر در برابر ابر میکروب‌های مختلف است و می‌تواند به عنوان یک عامل ضد باکتری در آینده مورد استفاده قرار گیرد (۱۰).

در سال ۲۰۲۲ کاظمی و همکاران با استفاده از روش فرسایش لیزر با پالس (PLA) نانوکامپوزیت MOF-5 (ترکیبات با چهارچوب آلی فلزی) کوبل شده با گرافن را در محیط مایع برای اولین بار مورد بررسی قرار دادند. در این روش نانوساختارهای MOF-5 با تابش صفحه روی با خلوص بالا (Zn) در محلول دی متیل فرمامید (DMF) حاوی اسید لیگاند ترفتالیک با لیزر Nd:YAG پالس سنتز شد. و سپس با استفاده از طول موج بنیادی لیزر Nd:YAG در ۱۰۴۶ نانومتر و عرض پالس ns۷، سه نمونه از نانوساختارهای MOF-5 در محلول‌هایی با سه غلظت لیگاند تولید شد. همچنین، فعالیت ضد باکتریایی نمونه‌ها علیه باکتری اشیریشیا کلی به عنوان یک باکتری گرم منفی و استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یک باکتری گرم مثبت مورد ارزیابی قرار گرفت. مورفولوژی نانوساختارهای MOF-5 به دلیل وجود نانو ورقه‌های گرافن در ساختار نانوکامپوزیت اصلاح شد. تصاویر TEM نشان می‌دهد که ذرات مربع شکل MOF-5 وی سطح نانو صفحات گرافن قرار دارند. غلظت نمونه‌های سنتز شده با افزایش غلظت لیگاند در محیط مایع فرسایش افزایش یافت و نتایج اثرات ضد باکتریایی چشمگیر نانوکامپوزیت را در علیه باکتری گرم منفی نشان داد که این امر می‌تواند با گرانش بارهای مخالف در ارتباط باشد (۱۱).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۲ انجام گرفت ساخت و خصوصیات کامپوزیت گرافن اکسید/کلسیم هیدروکسی آپاتیت/پلی‌کاپرولاکتون بررسی شد. پلی‌کاپرولاکتون به دلیل خواص پزشکی عالی و مقاومت شیمیایی مورد توجه است. اکسید گرافن (GO) و هیدروکسی آپاتیت کلسیم (HAp) هر دو به دلیل زیست سازگاری برتر، خواص مکانیکی بالا، رسانایی الکتریکی قابل توجه و رسانایی حرارتی به کرات در

ذوب شد. سپس هیبریدهای حاصل با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و مطالعات طیف‌سنجی تایید شدند. باکتری‌های زنده و مرده متصل به مواد GO-CuONP با استفاده از میکروسکوپ اسکن لیزری کانفوکال (CLSM) شناسایی شدند. سنجش فعالیت ضد باکتریایی مواد GO-CuONP با استفاده از روش شمارش صفحه استاندارد انجام شد. نتایج نشان داد که نانوکامپوزیت GO-CuONP یک نانو ماده ضد باکتری مؤثر است که به طور قابل توجهی رشد باکتری‌های *E. coli* و *S. typhimurium* را در مقایسه با آنچه روی ماده بکر GO مشاهده می‌شود، مهار می‌کند. این مطالعه نشان می‌دهد که کامپوزیت‌های GO-CuONP یک نانومواد ضد باکتریایی با کارایی بالا هستند (۹).

محققان در سال ۲۰۲۳ کارایی اکسید گرافن رادر برابر بیوفیلیم‌ها و استافیلوکوکوس اورئوس درون سلولی مورد آزمایش قرار داد و در ادامه مکانیسم فعالیت‌های ضد میکروبی داخل سلولی و سمیت‌های GO رامشخص کرد. خواص آنتی‌بیوفیلیم M GO بر اساس اختلال در ساختار بیوفیلیم مورد ارزیابی قرار گرفت و فعالیت‌های ضد میکروبی درون سلولی با بقای استافیلوکوکوس اورئوس در سلول‌های پستانی گاو آلوده که در تماس مستقیم با GO بود مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در غلظت ۱۰۰ mg/ml GO، بین ۳۰ تا ۷۰ درصد از توده بیوفیلیم استافیلوکوکوس اورئوس را کاهش می‌دهد که نشان دهنده توانایی GO در تخریب ساختار بیوفیلیم است. فعالیت‌های ضد میکروبی زمانی که سلول‌ها از قبل با سیتوکالاسین درمان شدند، مهار شد، و این امر نشان می‌دهد که فعالیت‌های ضد میکروبی داخل سلولی GO وابسته به پلیمریزاسیون اکتین غشای سلولی است (۱۰).

در این مطالعه دیگر، GO سنتز و خاصیت ضد میکروبی آن در برابر میکروب‌های مختلف بیمارستانی مقاوم به چند داروی گرم منفی و گرم مثبت (MDR) بررسی و با قابلیت باکتری‌کشی برخی از آنتی بیوتیک‌های رایج مقایسه شد و در همه موارد درجه مهار

ATCC 27853) همگی از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. در کل مراحل انجام آزمایش از آب دیونیزه استفاده شد.

سنتز سلولز گرافن: گرافن اکسید با روش هامرز از گرافیت طبیعی سنتز شد. گرافیت (۵ گرم) و NaNO_3 (۵/۲ گرم) با ۱۲۰ میلی لیتر H_2SO_4 نودو پنج درصد در یک فلاسک ۵۰۰ میلی لیتری مخلوط شدند. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در یک حمام یخ هم زده شد. تحت هم زدن شدید، پرمنگنات پتاسیم (۱۵ گرم) به سو سیانسیون اضافه شد. سرعت افزودن به دقت کنترل شد تا دمای واکنش زیر ۲۰ درجه سانتیگراد حفظ شود. مخلوط به مدت یک شب در دمای اتاق هم زده شد. سپس، ۱۵۰ میلی لیتر H_2O به آهستگی تحت هم زن شدید اضافه شد. دمای واکنش با جوشاندن به سرعت به ۹۸ درجه سانتیگراد افزایش یافت و رنگ آن به زرد تغییر یافت. سوسپانسیون رقیق شده در دمای ۹۸ درجه سانتیگراد به مدت یک روز هم زده شد. سپس ۵۰ میلی لیتر H_2O_2 سی درصد به مخلوط اضافه شد. برای خالص سازی، مخلوط با شستشو و سانتریفیوژ با HCl پنج درصد و سپس آب دیونیزه شد طی چندین مرتبه شسته شد. و در انتها گرافن اکسید پس از فیلتراسیون و خشک شدن در خلاء، به دست آمد. گرافن کاهش یافته (rGO) با احیای شیمیایی GO با بوروهیدرید سدیم تهیه شد. ۳/۰ گرم GO در ۵۰ میلی لیتر آب دیونیزه حل شد. سپس ۵/۰ گرم بوروهیدرید سدیم اضافه شده و مخلوط به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شد. پس از اتمام واکنش، rGO جامد سانتریفیوژ شده، بارها با آب دیونیزه شسته شد و محصول نهایی در یک آون خلاء در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد یک شبه خشک شد. برای تهیه ی سلولز گرافن ۵/۴ گرم سلولز و ۵/۰ گرم گرافن را در ظرف ریخته، سپس مقداری استون به عنوان حلال به آن اضافه می کنیم و روی هیتر قرار داده و با همزن مغناطیسی هم می زنیم تا خشک شود. پس از خشک شدن، محصول نانوکامپوزیت های سلولز-گرافن به دست آمد. برای بررسی ساختار نانوکامپوزیت سنتز

مطالعات مورد استفاده قرار گرفته اند. در این مطالعه کامپوزیت Hap در پلیمر تجزیه ناپذیر پلی کاپرولاکتون (PCL) پراکنده شد تا یک داربست کامپوزیتی با هدف افزایش تمایز استخوان زایی استئوبلاست ها برای کاربردهای پزشکی بالقوه ایجاد کند. کامپوزیت سنتز شده با استفاده از روش های مختلف شیمی فیزیکی مشخص شد. در این مطالعه اثر سیتوتوکسیک با استفاده از تکثیر سلولی با رده سلولی پیش استئوبلاست MC3T3-E1 و اثر باکتریواستاتیک GO با استفاده از سویه های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی ارزیابی شد. نتایج نشان داد که داربست کامپوزیتی PCL GO/Hap/ می تواند به عنوان ماتریکس سازگار با بیولوژیک برای بازسازی بافت استخوانی با اثر ضد میکروبی عمل کند (۱۲).

ما در این مطالعه نانوکامپوزیت سلولوز گرافن را از منابع با قیمت پایین سنتز کردیم و ماهیت ضد باکتریایی آن را علیه باکتری های بیماریزای استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و انتروکوک فکالیز و گرم منفی سالمونلا، کلبسیلا مورد بررسی قرار دادیم. در واقع ساختار انعطاف پذیر گرافن که باعث تشکیل یک ساختار لانه زنبوری برای گرافن شده و در نتیجه منجر به دام انداختن باکتری ها می شود و عامل دیگر خاصیت استرس اکسیداتیو گرافن هست که می تواند توجیح مکانیسم میکروب کشی گرافن باشد.

روش کار

مواد مورد نیاز: پرمنگنات پتاسیم، بوروهیدرید سدیم، گرافیت، مالاشیت سبز، نیترات سدیم، اسید سولفوریک، هیدروکلریک اسید، دی متیل سولفوکسید و آب اکسیژنه همگی از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. سالین استریل در لوله های ۲ میلی لیتری، استاندارد ۵/۰ مک فارلند کارت ویکر هام، صفحات آگار مولر-هینتون ۱۰۰ میلی متر یا ۱۵۰ میلی متر و باکتری های انتروکوک فکالیز (ATCC 25923)، سالمونلا (ATCC 14990)، کلبسیلا پنومونیه (ATCC 259) و استافیلوکوکوس اورئوس

باکتریایی مجدداً داخل پلیت ها که حاوی غلظت های متفاوتی از نانوذرات بودند کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. و تست حداقل غلظتی از نانوذرات که باکتری ها را از بین می برد (MBC) پس از ۲۴ ساعت مواجهه برای هر نانوذره انجام گردید.

یافته ها

نتایج بررسی طیف های XPS، XRD و FTIR

اکسید گرافن و اکسید گرافن احیا شده: شکل ۱ طیف XRD گرافیت، اکسید گرافن و اکسید گرافن احیا شده را نشان می دهد. طیف XRD گرافیت دارای یک قله تیز در $2\theta = 26.50^\circ$ مطابق با گرافیت است که از لایه گرافن منظم با فضای داخلی $3.5/\text{\AA}$ آنگستروم تشکیل شده است. این اوج برای GO ظاهر نمی شود. نمونه GO یک پیک قوی در $2\theta = 11.60^\circ$ را نشان می دهد که با فضای بین لایه ای در حدود $7.6/\text{\AA}$ نانومتر سازگار است و نشان دهنده وجود اکسیژن است که هیدراتاسیون و لایه برداری ورقه های GO را در محیط آبی تسهیل می کند.

شکل ۲ طیف XPS و FTIR اکسید گرافن و اکسید گرافن احیا شده را نشان می دهد. طیف $C1s$ XPS باز سازی پیوندهای $C = C$ در GOR را تایید می کند. پیک دو مشاهده شده XPS در نمونه GO نشان دهنده وجود گروه های عاملی است. پس از کاهش، پیوند $C = C$ پیوند غالب است به طوری که با تک پیک در 284 eV آشکار می شود. اوج کوچک مشاهده شده در 284.5 eV به دلیل حضور کربن کربونیل در rGO است.

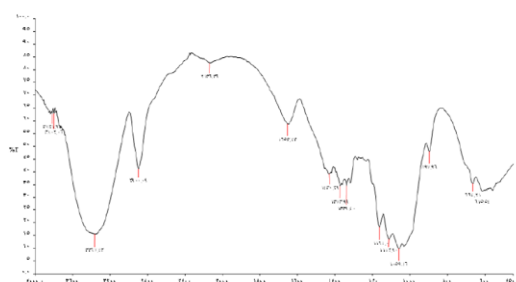
در شکل ۳ طیف FTIR به وضوح نشان می دهد که rGO به طور قابل توجهی دارای گروه های عاملی کمتری نسبت به GO است. گروه های عاملی و طول موج آنها در طیف FTIR نشان داده شده است. حضور قله در 3432 cm^{-1} به دلیل OH^- ، قله ظاهر شده در 1711 cm^{-1} به دلیل گروه های $C = O$ و قله ظاهر شده در 1627 cm^{-1} مربوط به گروه $C = C$ است. گروه $C = O$ با کاهش اکسید گرافن به گرافن ناپدید می شود.

شده از طیف های پراش اشعه پرتو ایکس (X-ray diffraction: XRD)، طیف سنجی فتوالکتریکی پرتو ایکس (X-ray photoelectron spectroscopy: XPS)، طیف سنجی تبدیل فوریه فروسرخ-Fourier transform infrared spectroscopy: FTIR) میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning Electron Microscopy: SEM) استفاده شد.

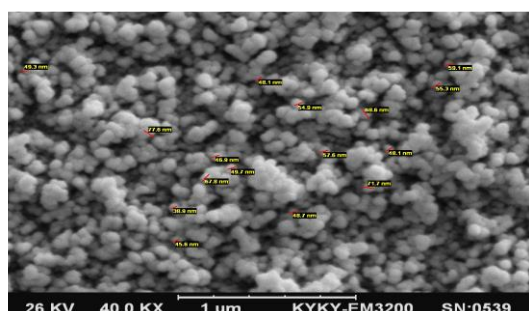
آزمون های میکروبیولوژی: آزمون های میکروبیولوژی جهت بررسی قدرت ضد میکروبی نانوکامپوزیت انجام گرفت. این آزمون در دو مرحله ی کیفی (روش انتشار از چاهک) و کمی (روش رقیق سازی لوله ای در محیط کشت آگار) انجام شد.

روش انتشار از چاهک: برای تعیین کیفی قدرت آنتی باکتریالی نانوذرات گرافن سلولز و نیترا ت نقره ابتدا از روش انتشار از چاهک استفاده کردیم. در این روش ابتدا محلولی از هر یک از نانوذرات در حلال DMSO در غلظت های ۳ و ۷ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه کردیم. پلیت های مولر هینتون آگار با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی نیم مک فارلند تلقیح شدند. سپس با استفاده از یک پیپت پاستور استریل، چاهک ها (قطر ۸ میلی متر) در پلیت ها پانچ شدند. سپس این چاهک ها با ۵۰ میکرولیتر محلول حاوی نانوذرات در غلظت های ۳ و ۷ میلی گرم بر میلی لیتر پر شدند. چاهک های شاهد با ۵۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکسید پر شدند. این پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت انکوبه شدند. پس از این مدت، فعالیت ضد باکتریایی این نانوذرات با اندازه گیری قطر ناحیه مهار در اطراف چاهک ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

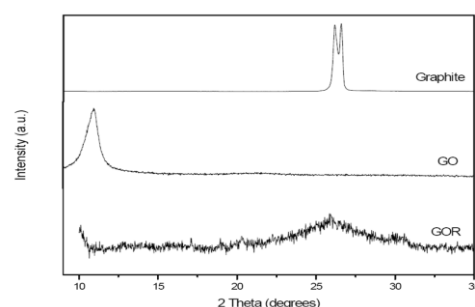
روش رقیق سازی آگار جهت تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی نانوذرات: در این روش، سنجش ها در حجم های بسیار کوچک ۱ میلی لیتری در میکروپلیت های ۲۴ خانه ای استریل ته گرد انجام شد. غلظت های ۵، ۱۲.۵/۵، ۱/۲، ۰.۷۵/۰، ۰.۳۵/۰ و ۱۸/۰ میلی گرم بر میلی لیتر از نانوذرات جهت تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه هر کدام از سوسپانسیون های



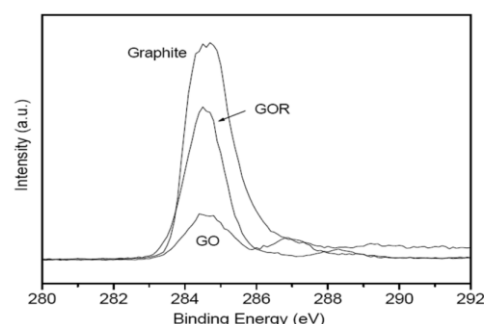
شکل ۴ - طیف FTIR سلولوز خالص



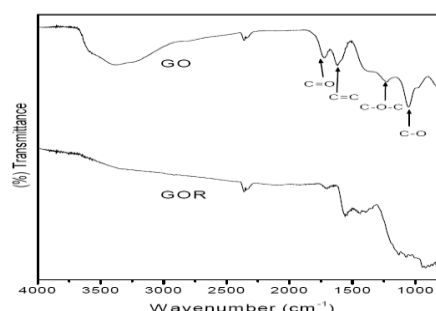
شکل ۵ - تصویر SEM نانوکامپوزیت های سلولز-گرافن



شکل ۱- طیف XRD گرافیت، اکسید گرافن و اکسید گرافن احیا شده



شکل ۲- طیف XPS گرافیت، اکسید گرافن و اکسید گرافن احیا شده



شکل ۳- طیف FTIR اکسید گرافن و اکسید گرافن احیا شده

۹/۳۸ نانومتر است. می توان یکنواختی و توزیع بهینه ذرات را در تصویر مشاهده کرد.

نتایج آزمون انتشار از چاهک نانوذرات نقره و سلولز گرافن علیه باکتری:

نتایج حاصل از روش انتشار از چاهک علیه چهار باکتری بیماری زای انسانی با استفاده از نانوذرات نقره و سلولز گرافن، در جدول شماره ۱ خلاصه شده است. آزمون آنتی بیوگرام در این مطالعه با سه مرتبه تکرار و در دو غلظت ۷ و ۳ میلی گرم بر میلی لیتر برای هر نانوذره تکرار شده است. نتایج به صورت میانگین سه روش در جدول گزارش شده است.

نتایج آزمون رقیق سازی آگار نانوذرات نقره و سلولز گرافن علیه باکتری:

نتایج مربوط به روش رقیق سازی آگار که در شش رقت ۵، ۵/۲، ۲۵/۱، ۷۵/۰، ۳۵/۰ و ۱۸/۰ میلی گرم بر میلی لیتر علیه چهار باکتری بیماریزای انسانی انجام گرفته در جدول شماره ۳ ارائه شده است. در این جدول برای نانوذرات نقره و سلولز گرافن مقادیر عددی حداقل غلظت بازدارندگی بیان شده است. در واقع این عدد

جدول ۱- نتایج آنتی بیوگرام برای نانوذرات نقره و سلولوز گرافن در غلظت ۳mg/ml

نام ترکیب	انتروکوک فکاليس ATCC 25923	سالمونلا ATCC 14990	کلبسیلا پنومونیه ATCC 259	استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 27853
سلولوز گرافن	۱۳±۰/۸	۱۴±۰/۵	۱۲±۰/۸	.
نقره	۱۲±۰/۷	.	۱۲±۰/۹	.
دی متیل سولفوکسید	.	.	.	.

جدول ۲- نتایج آنتی بیوگرام برای نانوذرات نقره و سلولوز گرافن در غلظت 7mg/ml

نام ترکیب	انتروکوک فکاليس ATCC 25923	سالمونلا ATCC 14990	کلبسیلا پنومونیه ATCC 259	استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 27853
سلولوز گرافن	۱۲±۰/۸	۱۴±۰/۸	۱۴±۰/۸	.
نقره	۱۲±۰/۸	۱۲±۰/۸	۱۳±۰/۸	.
دی متیل سولفوکسید	.	.	.	.

جدول ۳- نتایج حداقل غلظت بازدارندگی برای نانوذرات نقره و سلولوز گرافن با استفاده از روش رقیق سازی آگار،

نام ترکیب	انتروکوک فکاليس ATCC 25923	سالمونلا ATCC 14990	کلبسیلا پنومونیه ATCC 259	استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 27853
گرافن سلولوز	۵≥	۵	۵≥	NA
نقره	۵	NA	۵	NA
دی متیل سولفوکسید	NA	NA	NA	NA

همانطور که شکل ها و جدول نشان می دهد، این حلال در این غلظت از فعالیت ضد باکتریایی برخوردار نبود.

بحث

امروزه ما شاهد رشد روزافزون مطالعات آزمایشگاهی برای طراحی و ساخت ترکیبات دارویی جدید که در درمان بیماریه - ای مختل - ف مورد استفاده قرار می گیرد، هستیم. در مطالعه ای در سال ۲۰۰۸ اثرات سمیت نانوگرافن از طریق افزایش تولید آنزیم های گلوکاتینون پراکسیداز، دسموتاز و کاتالاز بر روی سلول های ایزوله شده از بافت کلیه ی موش آزمایشگاهی نشان داده شد (۱۳). لیائو و همکارانش طی تحقیقاتی که انجام دادند نشان دادند که نانوذرات گرافنی اثرات سمیت سلولی برفیبروبلاست، گلبول های قرمز از طریق تولید گونه های فعال اکسیژن داشتند (۱۴) در تحقیقاتی که لیو و همکارانش (۱۵) و در تحقیقات

گویای این مطلب است که نانوذرات حاصل در این غلظت قادرند ۹۰ درصد از باکتری هارا از بین برده و از رشد آن ها جلوگیری کنند. نتایج تست MBC با MIC یکسان بدست آمد (NA: non-significant).

اعداد در جدول ۳ نشان دهنده ی ماهیت ضد باکتریایی نقره و سلولز گرافن است. مقایسه اعداد نشان می دهد که تقریباً در تمامی موارد قدرت ضد میکروبی نانوذره ی گرافن سلولز بیشتر از نانوذره ی نقره است. و تقریباً هر دو نانوذره نسبت به باکتری های گرم منفی از قدرت ضد میکروبی بیشتری نسبت به باکتری های گرم مثبت برخوردار بودند. بین این چهار باکتری بیماری زا دو باکتری کلبسیلا پنومونیه و انتروکوک فکاليس از حساسیت بیشتر نسبت به نانوذره ی سلولز گرافن برخوردار بودند. و در هر دو مورد قدرت ضد میکروبی نانوذره ی سلولز گرافن بیشتر از نانوذره ی نقره بود. در این آزمایش از دی متیل سولفوکسید ده درصد طی انجام آزمون رقیق سازی استفاده شد و

فکالیس از حساسیت بیشتر نسبت به نانوذره ی گرافن سلولز برخوردار بودند. و در هر دو مورد قدرت ضد میکروبی نانوذره ی گرافن سلولز بیشتر از نانوذره ی نقره بود.

در خصوص مکانیسم های اثرگذاری نانوذرات بر پایه ی ساختارهای گرافنی مطالعات بسیار زیادی انجام گردیده است. طبق آنچه به طور خلاصه در مطالعات مختلفی که در سطور بالا و براساس نتایج حاصل از پژوهش مذکور در توجیه قدرت ضد باکتریایی بیشتر گرافن سلولز نسبت به نانوذره ی نقره به این نتیجه رسیده شد که ظرفیت اکسیداتیو مواد گرافنی می تواند به رسانایی بالای این ذرات مرتبط باشد. مانگادلو و همکارانش نشان دادند که مکانیسم ضد میکروبی مواد گرافنی از انتقال الکترون سرچشمه می گیرد و نه از گونه های فعال اکسیژن بنابراین، با استفاده از یک ورقه گرافن، یک هادی مس، یک نیمه هادی و عایق SiO_2 ، فعالیت ضد میکروبی گرافن را علیه اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس بررسی کردند. آنها دریافتند که رشد باکتری در ارتباط با فیلم های G-Cu و G-Ge مهار گردید در حالی که G-SiO_2 نتایج معکوس نشان داد. ظرفیت ورقه های اکسید گرافن احیا شده (rGO) برای اکسید کردن گلوکاتینون احیا (GSH) از رسانایی بسیار بالاتر rGO در مقایسه با ورقه های اکسید گرافن (GO) ناشی می گردید، که در آن rGO در فرآیند انتقال الکترون از محیط درون سلولی باکتری به محیط خارجی به عنوان یک پل رسانا بر روی دولایه لپیدی عایق عمل نمود (۱۸). طبق این نظریه مواد گرافنی ها به عنوان گیرنده های الکترون می باشند و سبب فعال نمودن مسیر استرس اکسیداتیو (مستقل از حضور گونه های فعال اکسیژن) می گردند (۱۸). تعامل بین باکتری ها و نانوذرات گرافن، منجر به کاهش تعداد باکتری ها می شود که مرسوم به اثر خودکشی باکتریایی است و وقتی باکتری های زنده با نانو صفحات GO انکوبه می گردند باکتری ها با نانوذرات گرافن برهمکنش ایجاد نموده و گروه های عاملی حاوی اکسیژن را با واکنش های گلیکولیز کاهش می دهند و منجر به مهار بیشتری از تکثیر باکتریایی می شوند

مشابه پاتالو و همکارانش (۱۶) بر روی خواص میکروب کشی سوسپانسیون گرافن بر روی باکتری های اشرشیاکلی انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که باکتری پس از مواجهه با غلظت های مختلف سوسپانسیون گرافن دچار کاهش تکثیر باکتری از طریق افزایش گونه های آزاد اکسیژن و به دنبال آن افزایش قدرت باکتری کشی گردیده بودند. نتایج مطالعه ی ما نشان دادند که نانوذرات گرافن سلولز و نیز نقره توانایی باکتری کشی بالاتر از ۹۰ درصد را دارند. که در جهت تایید یافته های پیش از خود بودند. طی مطالعاتی والتینا پالمیری و تیم او انجام دادند، ورقه های ۲۰۰ نانومتری از اکسید گرافن، ۹۰ درصد از باکتری های اورئوس و فکالیس و حدود ۵۰ درصد از باکتری های اشرشیاکلی را در کمتر از دو ساعت از بین می بردند. اکسید گرافن حتی در غلظت هایی کمتر از ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر نیز در مقابله ی با باکتری ها نقش موثری داشت (۱۷). نتایج ما براساس مطالعات پیشین، ویژگی های باکتری کشی نانوذرات گرافن سلولز و نیز نانوذرات نقره را با تست های MIC و MBC و آنتی بیوگرام ثابت و تایید نمود. در ادامه محققین در خصوص مکانیسم های اثرگذاری ورقه های گرافنی ثابت نمودند که نانو ورقه ها قادرند به غشای باکتری ها آسیب وارد نموده و سبب کاهش تکثیر و در نهایت مرگ آنها گردند همچنین با ادامه ی مطالعات خود دریافتند که اکسید گرافن دارای خواص ضد باکتریایی در مقابل باکتری کاندیدا آلبیکنس (عامل عفونت های قارچی مانند برفک) نیز دارد که مکانیسم اثرگذاری آن مشابه مکانیسم باکتری کشی اشرشیاکلی بوده است (۱۷). نتایج بدست آمده از پژوهش ما نشان داد که نانوذرات سنتز شده اثرات باکتری کشی قوی در باکتری های انتروکوک فکالیس، سالمونلا، کلبسیلا پنومونیه، استافیلوکوکوس اورئوس دارد که البته میزان اثرگذاری در هرگونه ی باکتری متفاوت بوده است و هر دو نانوذره نسبت به باکتری های گرم منفی از قدرت ضد میکروبی بیشتری نسبت به باکتری های گرم مثبت برخوردار بودند. بین این چهار باکتری بیماری زا دو باکتری کلبسیلا پنومونیه و انتروکوک

مشارکت نویسندگان

نویسنده اول: تنظیم پروژه را انجام داده اند.
نویسندگان دوم، سوم و چهارم: انجام پروژه و جمع آوری داده ها را در محیط آزمایشگاهی انجام داده اند.
کار سپاند: تایید صحت داده های جمع آوری شده،
آنالیز آماری و تنظیم مقاله و در نهایت ارسال مقاله را انجام داده است.

References

1. Mahira S, Jain A, Khan W, Domb AJ. Antimicrobial Materials for Biomedical Applications. Royal Society of Chemistry. 2019:1–37.
2. Zheng J. an Emerging Coronavirus that Causes a Global Threat Int. J. Biol. Sci. 2020:1678–1685.
3. Leung W, Sun Q. Electrostatic charged nanofiber filter for filtering airborne novel coronavirus and nano-aerosols. Technol. 2020:116-886.
4. Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces. BMC Infectious Diseases. 2006:1–8.
5. Kuhkan M, Ghanbary F, Karimi F. Antimicrobial activity of various nanocomposites against important pathogens. Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection. 2021:94-97.
6. Li J, Cha R, Mou K, Zhao X. Nanocellulose-Based Antibacterial Materials. Adv. Healthcare Mater. 2018:112- 116.
7. Xie Y, Hu X, Zhang Y. Development and antibacterial activities of bacterial cellulose/graphene oxide-CuO nanocomposite films. Carbohydr. Polym. 2019:115-456.
8. Olborska A, Janas-Naze A, Kaczmarek L. Antibacterial Effect of Graphene and Graphene Oxide as a Potential Material for Fiber Finishes. AUTEX Research Journal. 2020:506 –516.
9. Rajapaksha P, Cheeseman S, Hombsch S. Antibacterial Properties of Graphene Oxide–Copper Oxide Nanoparticle Nanocomposites. ACS Appl. Bio Mater. 2019:5687–5696.
10. Aunkor T, Raihan T, Malik S. Antibacterial activity of graphene oxide nanosheet against multidrug resistant superbugs isolated from infected patients. R Soc Open Sci. 2020: 200640.
11. Motakef-Kazemi N, Ataei F, Dorrani D. Laser ablation produced graphene/MOF-5 nanocomposite: antibacterial properties. JTAP. 2023:1-9.

(۱۸). زو و همکارانش طی مطالعه دیگری که انجام دادند اثبات نمودند که باکتری دریایی شوانلا در هر دو شرایط هوازی و بی هوازی تحت مواجهه با نانوذرات گرافنی، میزان تکثیرش کاهش می یابد (۱۹) و در ادامه محققین خاطر نشان نمودند که عملکرد مذکور با سه مکانیسم پیشنهادی قابل توجیه می باشد، گرافن با ساختار متصل به آن مانند سلولز به عنوان نانوجاقو از طریق لبه های تیز سبب آسیب به غشای باکتری ها می گردد (استرس غشای سلولی)، امکان فعال شدن مکانیسم های استرس اکسیداتیو و به دام انداختن باکتری توسط لایه نازک انعطاف پذیر می گردد که به دنبال چنین فرایند هایی باکتری قدرت تکثیر خود را از دست می دهد (۱۹).

نتیجه گیری

طی یافته هایی که در پژوهش پیش رو انجام گردید نشان داده شد که سلولز گرافن علیه باکتریهای پاتوژن انسانی مخصوصا کلبسیلا پنومونیه و انتروکوک فکالیز از قدرت ضد باکتریایی قابل توجهی برخوردار است. نکته ی قابل توجه این است که این نانوذره به مراتب در مقایسه با نانوذره ی نقره از ماهیت ضد باکتری موثرتری برخوردار بود. چنانچه در بالا نیز اشاره شده نانوذره ی گرافن سلولز با مکانیسم کاملا متفاوت و مجزا می تواند منجر به مرگ باکتریایی شود در نتیجه می تواند نوید بخش جانشینی با ترکیبات ضد میکروبی باشد که بر اساس مقاومت باکتریایی ماهیت ضد میکروبی خود را از دست داده اند. از طرف دیگر قیمت مقرون به صرفه ی این نانوذره می تواند آن را به گزینه ای مناسب جهت ورود به دنیای صنعت و پزشکی تبدیل کند. البته با مطالعات بیشتر می توان امکان ورود این نانوذره به دنیای داروسازی را بررسی کرد.

ملاحظات اخلاقی

تمامی ملاحظات اخلاقی مرتبط به پروژه مطابق موازین مصوب در دانشگاه آزاد اسلامی انجام شده است. تمامی نویسندگان مشارکت کننده در طرح قوانین مذکور را رعایت نموده اند.

12. Daulbayev CH, Sultanov F, Korobeinyk A. Effect of graphene oxide/hydroxyapatite nanocomposite on osteogenic differentiation and antimicrobial activity. *Surfaces and Interfaces*. 2022;101683.
13. Ronald RN. Nanotechnology and undefined, Graphene: Calling all chemists. *Nature*. 2008: 1-6.
14. Liao KH, Lin YS, Macosko CW, Haynes CL. Cytotoxicity of Graphene Oxide and Graphene in Human Erythrocytes and Skin Fibroblasts. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2011;2607–2615.
15. Liu S. Antibacterial Activity of Graphite, Graphite Oxide, Graphene Oxide, and Reduced Graphene Oxide: Membrane and Oxidative Stress. *ACS Nano*. 2011;6971–6980.
16. Patlolla A, Randolph J. Toxicity evaluation of graphene oxide in kidneys of Sprague-Dawley rats. *Mdpi.com*. 2016:77-79.
17. Palmieri V. Tapping into graphene-oxide's antibacterial properties to fight. *Physics World*. 2015: 99-112.
18. Mangadlao JD, Santos CM, Felipe M. On the antibacterial mechanism of graphene oxide (GO) Langmuir–Blodgett films. *Chem Commun*. 2015;2886–2889.
19. Zou X, Zhang L, Wang Z, and Luo Y. Mechanisms of the antimicrobial activities of graphene materials. *J. Am. Chem. Soc*. 2016;2064–2077.