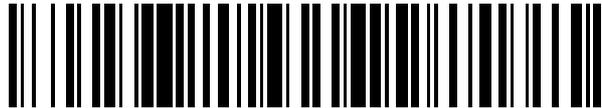


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 695 310**

21 Número de solicitud: 201730850

51 Int. Cl.:

C01B 32/198 (2007.01)

C12N 1/02 (2006.01)

C12P 3/00 (2006.01)

B82Y 40/00 (2011.01)

C12R 1/07 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

28.06.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

03.01.2019

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD REY JUAN CARLOS (100.0%)
C/ TULIPAN S/N
28933 MOSTOLES (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**SIMARRO DELGADO, Raquel;
BAUTISTA SANTA CRUZ, Luis Fernando;
VARGAS FERNANDEZ, Carolina;
GONZALEZ BENITEZ, Natalia;
MOLINA COBOS, Maria Del Carmen;
DIAZ PEÑA, Eva Maria y
REINA PERALTAS, Jose Alberto**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

54 Título: **PROCESO BIOLÓGICO PARA LA OBTENCIÓN DE ÓXIDO DE GRAFENO REDUCIDO,
MEDIANTE EL USO DE MICROORGANISMOS**

ES 2 695 310 A1

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



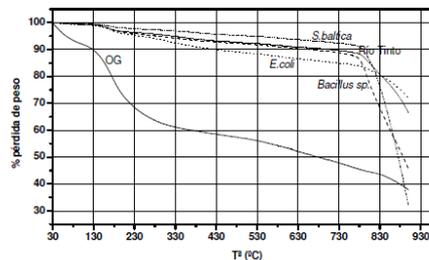
11 Número de publicación: **2 695 310**

21 Número de solicitud: 201730850

57 Resumen:

Esta invención propone un método para la reducción de óxido de grafeno mediante el uso de microorganismos que comprende las siguientes etapas: reactivación y cultivo de la biomasa microbiana; preparación de un medio donde se produce el proceso de reducción, ya sea sobre el óxido de grafeno sólido o disperso en un medio acuoso; y la aportación de un elemento microbiano que produce la reducción del óxido; donde el medio acuoso se produce esta reacción es agua corriente sin ningún tipo de tratamiento adicional, tal como puede ser la aportación adicional de nutrientes o fuentes de carbono, muy común en otros cultivos microbianos o bien una lámina de óxido de grafeno. Igualmente, la temperatura a la que se produce la reacción es la que podríamos considerar como "temperatura ambiente" y el proceso se puede realizar bajo condiciones aerobias, pero ambas características deben respetar los límites y requerimientos del elemento microbiano para permitir su crecimiento. Este proceso se desarrolla bajo condiciones simples, debido a que es un proceso microbiano pasivo que depende de forma indirecta del metabolismo microbiano.

Figura 2



DESCRIPCIÓN

PROCESO BIOLÓGICO PARA LA OBTENCIÓN DE ÓXIDO DE GRAFENO
REDUCIDO, MEDIANTE EL USO DE MICROORGANISMOS

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

10 La presente invención relativa a la reducción microbiana de óxido de grafeno pertenece al sector de la síntesis biológica de nanomateriales, más concretamente a la síntesis biológica de óxido de grafeno reducido.

15 El objeto principal de la presente invención es un proceso biológico para reducir óxido de grafeno produciendo óxido de grafeno reducido biológicamente mediante diversos microorganismos y consorcios microbianos, que proporciona a este campo un proceso medioambientalmente sostenible, rápido y económico para la obtención de grafeno de cierta pureza.

20 **ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

El grafeno es un nanomaterial de carbono y principal componente del grafito, cuya estructura cristalina consta de una o más láminas bidimensionales de átomos de carbono con disposición hexagonal. La estructura monocapa proporciona al grafeno propiedades inusuales: dureza, (similar a la del diamante y unas 200 veces mayor que la del acero), elevada elasticidad y flexibilidad (mayor durabilidad), elevada conductividad térmica ($\sim 4 \cdot 10^3 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$) y eléctrica ($\sim 1 \cdot 10^6 \Omega^{-1}\text{m}^{-1}$, superior a la de los metales conductores habituales), transparente y muy ligero ($0,77 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$) y resistente a la radiación ionizante.

30

Sus propiedades únicas le otorgan diversas aplicaciones en campos de acción cada vez más diversos, en los que el grafeno se plantea como material base de dispositivos y estructuras. La tecnología electrónica es uno de los campos de aplicación más desarrollados en la actualidad en los cuales el grafeno se plantea como principal componente para la fabricación de dispositivos optoelectrónicos (pantallas) que forman

35

parte de teléfonos móviles, pantallas de cristal líquido (LCD) o de sistemas de comunicaciones por fibra óptica. El uso de grafeno como batería se propone como una de las alternativas con mayor proyección de futuro. Otras aplicaciones del grafeno se extienden a campos relacionados con las tecnologías medioambientales enfocadas a la sorción y fotocátalisis de compuestos contaminantes y como detector de gases atmosféricos como NO₂ y CO. La aplicabilidad del grafeno se extiende a campos tan trascendentes como la biomedicina usándose como biosensor para la detección en organismos de neurotransmisores o metales pesados.

Los procesos más extendidos para la síntesis de grafeno, se basan principalmente en métodos físico-químicos o químicos que usan como material de partida directamente el grafito u otro precursor, para obtener óxido de grafeno y posteriormente grafeno, tras un proceso químico de reducción. Los métodos físicos se basan principalmente en la descamación repetida de grafito mediante exfoliación y escisión [Novoselov et al 2004. Science, 306: 666-669], mientras que los métodos químicos implican el uso de agentes reductores cuyo principal representante es la hidracina o N-metil pirrolidona [Hernández et al 2008. Nature Nanotechnology, 3: 563 – 568]. Estos últimos, son procesos reproducibles y altamente productivos, pero el uso de agentes reductores tóxicos y corrosivos como la hidracina supone un freno a su futuro desarrollo industrial. Existe una segunda generación de procesos basados en tecnologías electroquímicas o térmicas que se plantean como escalables y reproducibles, pero igualmente con un impacto negativo desde el punto de vista ambiental dado el alto grado de consumo energético que conllevan [Gurunathan et al 2013. Colloids and Surfaces, 102: 772-777], que implica un alto coste económico [Wang et al 2013. Nature Materials, 12: 81–87].

Una de las tecnologías más prometedoras son las basadas en procesos biológicos para reducir óxido de grafeno y obtener óxido de grafeno reducido, cuyas propiedades se igualan al grafeno obtenido químicamente de forma proporcional al grado de reducción, en un proceso rápido, viable, reproducible y ambientalmente respetuoso. El proceso se puede desarrollar de forma activa, lo que implica la reducción directa del óxido a expensas del metabolismo anaerobio de los microorganismos o mediante el uso de ciertas estructuras celulares como pilis. Sin embargo, el óxido de grafeno se puede reducir de forma pasiva e independiente al metabolismo microbiano, como consecuencia indirecta del movimiento de electrones y lanzadores de electrones que

se activan durante la actividad microbiana. Los estudios científicos que desarrollan estos procesos implican el uso de cepas bacterianas pertenecientes al género *Shewanella* o a la especie *Escherichia coli* utilizando medios acuosos o nutritivos [Akhavan y Ghaderi 2012. Carbon, 50: 1853-1860], bajo condiciones aerobias o anaerobias dada la condición facultativa de las cepas utilizadas. En este sentido las siguientes patentes muestran procesos biológicos de producción de grafeno: Sun (CN103255177) presenta un proceso de reducción de OG en medio acuoso bajo anaerobiosis usando bacterias desnitrificantes; Sun (CN103395775) propone la reducción de óxido de grafito en medio acuoso suministrando *Staphylococcus* spp. en un ánodo de pila combustible; Liu (CN103255177) patenta la reducción de óxido de grafeno en medio acuoso y condiciones anaerobias usando como agente reductor bacterias sulfato reductoras para obtener grafeno simultáneamente dopado con azufre y nitrógeno.

Al contrario de estas patentes, esta solicitud propone un método novedoso de reducción de óxido de grafeno que, por una parte, no utiliza agentes químicos sino elementos microbianos y, por otra parte, producen la reacción química en un medio acuoso sencillo, o sobre óxido de grafeno sólido, bajo condiciones ambientales y sin la necesidad de utilizar ningún aditivo o medio nutriente especial adicionales.

20

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

El proceso biológico para la obtención de óxido de grafeno reducido objeto de la invención comprende la utilización de cepas y consorcios de microorganismos para la reducción de óxido de grafeno y su conversión en óxido de grafeno reducido, cuyas características se asemejan tanto más al grafeno cuanto mayor sea su grado de reducción. El proceso se desarrolla de una forma rápida, medioambientalmente sostenible y económicamente viable mediante la reducción microbiana de óxido de grafeno de forma pasiva, lo que permite que el proceso se realice en un medio acuoso, aerobio y a temperatura ambiente o bien sobre una estructura sólida de óxido de grafeno.

30

Las principales ventajas de este proceso son:

- Condiciones ambientales simples: condiciones aerobias, temperatura ambiente y medio acuoso de reducción.

35

- Obtención de óxido de grafeno reducido de forma rápida.
- Agente de reducción: biomasa microbiana como por ejemplo, cepas bacterias de rápido crecimiento como *Escherichia coli*, *Shewanella baltica* y *Bacillus sp*, aerobias facultativas y mesófilas, o un consorcio microbiano procedente de Río Tinto, con características reductoras, facultativas y mesófilas, aunque podría ser cualquier microorganismo, ya que es un proceso pasivo.

De forma general, el proceso completo de reducción biológico se realiza siguiendo los siguientes pasos:

- 1- Cultivo y crecimiento de las cepas y consorcios microbianos. Este es un proceso estándar donde el cultivo de microorganismo, una vez crecido, se lava y se separa mediante un procedimiento de separación sólido-líquido tal como, por ejemplo, sedimentación, centrifugación o filtración, para la eliminación de restos del medio nutriente y recolección de la biomasa.
- 2- En el segundo paso, objeto de esta patente, se realiza el proceso de reducción de una suspensión de óxido de grafeno en agua o sobre una lámina de óxido de grafeno, inoculando o extendiendo respectivamente, la biomasa recolectada en el primer paso.
- 3- En el tercer paso se procede a la recuperación del producto obtenido tras el proceso de reducción, óxido de grafeno reducido, mediante la sonicación y centrifugación de la suspensión, para eliminar las células y la posterior evaporación del agua mediante secado, para recolectar el óxido de grafeno reducido de la suspensión libre de células. En caso de trabajar sobre láminas de óxido de grafeno, se procede a la limpieza de las láminas para eliminar las células mediante la sonicación de la lámina en un medio acuoso.

Esta invención propone un método para la reducción de óxido de grafeno mediante el uso de microorganismos que comprende las siguientes etapas: preparación de un medio donde se produce el proceso de reducción (lámina de óxido de grafeno o un medio acuoso en el que se dispersa el óxido de grafeno) y la aportación de un elemento microbiano al medio de reducción en forma de biomasa, que produce de forma pasiva la reducción del óxido; donde el medio acuoso en el que se produce la reacción es agua simple, sin ningún tipo de tratamiento adicional, tal como puede ser la aportación adicional de nutrientes o fuentes de carbono, muy común en otros procesos biológicos. Igualmente, la temperatura a la que se produce la reacción es la

que se considera “temperatura ambiente”, comprendida entre 15°C y 30°C, pero siempre depende del rango de acción del elemento biológico que se utilice en el proceso.

5 Para un mayor rendimiento de la reacción de reducción en medio acuosos, se puede dispersar el óxido de grafeno en el agua por cualquiera de los métodos convencionales: agitación manual, vortex, etc., o con un sistema de ultrasonidos a baja frecuencia, como pueden ser por ejemplo a 20 Hz.

10 Cualquier concentración del elemento microbiano disuelto en el agua reduce el óxido de grafeno, pero la comprendida entre 30 mg/ml y 100 mg/ml produce resultados especialmente buenos, en el balance entre tiempo de reacción y producto obtenido. Igualmente ocurre con la concentración de óxido de grafeno disperso en el agua, aunque cualquiera es válida la comprendida entre 0,2 y 4 mg/ml obtienen rendimientos óptimos.

15 Esta reducción de óxido de grafeno se puede realizar con todo tipo de microorganismos. En esta patente se ejemplifica con el uso de bacterias pertenecientes a los géneros *Shewanella*, *Escherichia* y *Bacillus*. Al igual que ocurre entre los diferentes tipos de microorganismos (hongos, bacterias, microalgas) que se pueden usar, especies concretas dentro de cada género pueden mostrar mejores resultados que otras. Así en los ejemplos de la presente invención, a pesar de las
20 diferencias que pueden existir en función de la especie bacteriana utilizada, cualquier bacteria de cada uno de los géneros sería capaz de reducir el óxido de grafeno adecuadamente. Por citar alguna, la especie *Escherichia coli* produce excelentes resultados en el proceso de reducción. Asociaciones microbianas formando consorcios, procedentes de determinados hábitats, también son capaces de reducir el
25 óxido de grafeno. Los consorcios microbianos son asociaciones de microorganismos de diversos géneros y especies asociados en un determinado hábitat en el que actúan cooperativamente en conjunto. Concretamente para el proceso que nos atañe, el consorcio natural de microorganismos procedentes de la cuenca de Río Tinto, se ha mostrado especialmente activo en la reducción del óxido de grafeno, posiblemente
30 debido a los procesos naturales de oxidación-reducción microbiana de metales pesados y sulfuros que se dan en un ambiente de bajo pH.

Tras el proceso de reducción, en el último paso se procederá a la recuperación del

producto, óxido de grafeno reducido, mediante un proceso que nos permita eliminar las células microbianas del producto reducido, bien en fase sólida o en lámina, basado en la sonicación y separación de la fase acuosa (cuando corresponda). La fase acuosa con las células en suspensión o la lámina de grafeno sumergida en agua se somete a un proceso de sonicación en un baño de ultrasonidos durante 20 minutos para permitir liberar las partículas del óxido de grafeno reducido que puedan estar adsorbidas sobre la superficie celular o liberar las células de la superficie de la lámina. Posteriormente con el objetivo de eliminar las células de la solución acuosa, se centrifuga la muestra a una velocidad en un rango de entre 1.500 y 15.000 rpm, obteniendo un resultado óptimo a 13.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante contiene el óxido de grafeno reducido disperso en agua, libre de células, que posteriormente se seca para obtener el óxido de grafeno reducido.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de la reproducibilidad y eficacia del proceso de reducción microbiano de óxido de grafeno, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de figuras en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1: Difracción de rayos X de una muestra de óxido de grafeno sin reducir, en la parte baja de la gráfica, y después de ser sometido a un proceso de reducción bacteriano por las cepas *Bacillus* sp CECT40., *Shewanella baltica* CECT 323, *Escherichia coli* CECT 101 y el consorcio microbiano de Río Tinto.

Figura 2.- Termogravimetría que muestra la pérdida de peso producida entre 0 y 1000°C de una muestra de óxido de grafeno (OG) sin reducir frente a las muestras de óxido de grafeno reducidas biológicamente por *Bacillus* sp CECT 40, *Shewanella baltica* CECT 323 (*S. baltica*), *Escherichia coli* CECT 101 (*E. coli*) y el consorcio microbiano de Río Tinto.

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

Los microorganismos utilizados para ejemplificar el proceso microbiano de reducción

de óxido de grafeno que comprende la presente patente, son cepas bacterianas obtenidas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) previamente aisladas de muestras ambientales procedentes de sedimentos y posteriormente cultivadas e identificadas. Además, uno de los procesos que se propone se realiza con un consorcio microbiano procedente de las aguas del Río Tinto. En cualquier caso, la biomasa bacteriana fue cultivada y almacenada a -20°C hasta su uso.

Primeramente, se muestra mediante varios ejemplos el proceso de reactivación de biomasa microbiana para su cultivo y posterior uso como elemento microbiano que reducirá óxido de grafeno. Este es un proceso de reactivación y cultivo de biomasa que se puede aplicar de forma general para todos los microorganismos, aunque con ciertas especificaciones en función del microorganismo utilizado, para el cultivo de biomasa de cualquier tipo de microorganismo. Las especificaciones estarán determinadas por el tipo de medio de cultivo o temperatura óptima, o el periodo de incubación que requiera cada microorganismo. Así pues, el proceso de reactivación y cultivo de biomasa de forma generalizada comprende las siguientes fases: 1) reactivación de biomasa microbiana congelada o liofilizada en un medio de cultivo óptimo, a la temperatura de crecimiento óptima del microorganismo; 2) incubación del microorganismos hasta que alcanza la densidad celular adecuada y ésta se mantiene estable; 4) recolección y lavado de la biomasa para separar la fase acuosa y eliminar restos de nutrientes del medio; 5) aplicación de la biomasa al medio acuoso o al elemento sólido que contiene el óxido de grafeno para que se produzca el proceso de reducción.

En los ejemplos que aparecen a continuación, se especifica la reactivación y el cultivo de biomasa de las cepas microbianas utilizadas como ejemplo en esta patente, como elemento biológico para reducir el óxido de grafeno. Este proceso se realizará de la misma manera para todas las cepas: las cepas microbianas se cultivan en medios de cultivo nutritivos sólidos (bacto-triptona 10 g·l⁻¹, extracto de bacto-levadura 5 g·l⁻¹, NaCl 5 g·l⁻¹, agar) a 30°C. A partir de esta biomasa se prepararán cultivos líquidos madre de cada cepa y del consorcio sin previo cultivo en placa, en medio nutritivo (bacto-triptona 10 g·l⁻¹, extracto de bacto-levadura 5 g·l⁻¹, NaCl 5 g·l⁻¹), a 25°C, oscuridad y agitación constante para proporcionar oxígeno. Los cultivos se mantienen en incubación hasta que la densidad celular estimada a partir de la medición de la absorbancia del cultivo en un espectrofotómetro a 600 nm, es constante (aproximadamente 3 días). En este

momento se recolecta la biomasa centrifugando el cultivo dos veces durante 15 minutos a 1500 rpm. Por último y para eliminar cualquier traza de medio, la biomasa es lavada con solución salina tamponada y se vuelve a centrifugar.

5 Ejemplo 1: proceso de reducción de óxido de grafeno con *Bacillus sp CECT 40*

Una vez obtenida biomasa de la forma que se explica anteriormente, se forma el cultivo donde se realizará el proceso de reducción compuesto por 30 ml de solución acuosa con 0.4 mg/ml óxido de grafeno disperso y 45 mg/ml de biomasa de *Bacillus sp CECT 40*. El proceso se realiza bajo condiciones aerobias para lo cual se mantienen los cultivos en agitación (150 rpm) y temperatura ambiente durante 72 h.

Una vez pasado este tiempo, el último paso consiste en la extracción del óxido de grafeno reducido biológicamente por *Bacillus sp CECT 40* de la solución acuosa con células. El cultivo se introduce en un baño de ultrasonidos y se sónica durante 10 min y una doble centrifugación a 1500 rpm 15 min. El sobrenadante que contiene el óxido de grafeno reducido biológicamente se seca en una estufa a 65°C durante 24 horas.

La muestra fue analizada mediante espectroscopías UV-vis, Raman e infrarroja (FT-IR), difracción con rayos X y termogravimetría para determinar las características del óxido de grafeno reducido.

Bacillus sp CECT 40. es una cepa bacteriana eficaz en la reducción de óxido de grafeno tal y como demuestra la caracterización del producto obtenido. Tras el proceso de reducción de óxido de grafeno por *Bacillus sp CECT 40*., la suspensión acuosa de óxido de grafeno vira de color pardo-marrón a negro lo que indica la reducción del mismo. La espectroscopía UV-vis muestra que el producto final tiene un espectro de absorción ligeramente desplazado hacia el rango visible con un único máximo de absorción a 250 nm frente a los máximos que tiene el óxido de grafeno a 230 y 300 nm. La espectroscopía Raman demuestra que *Bacillus* desplaza 5.74 cm^{-1} las bandas D y G respecto a su posición en el óxido de grafeno (1333 cm^{-1} y 1593 cm^{-1} , respectivamente) y presenta una relación de intensidades ID/IG mayor. El análisis de difracción por rayos X (Figura 1) mostró una coherente disminución del pico a 10.3° característico del OG, que se atribuye a la eliminación de grupos funcionales que contienen oxígeno durante el proceso de reducción. Finalmente, el análisis termoagravimétrico (Figura 2) indica que *Bacillus sp CECT 40* reduce el óxido de

grafeno formando un producto estable con tan solo un porcentaje de pérdida de peso de 16.49 % entre 0-600°C frente a un 65.34% de pérdida de peso del óxido de grafeno. Estos resultados indican menor presencia de grupos oxigenados en el óxido de grafeno biológicamente reducido y una mayor de la estabilidad del producto reducido tras 72 h de incubación.

Ejemplo 2: proceso de reducción de óxido de grafeno con *Shewanella baltica* CECT 323

Una vez obtenida biomasa se forma el cultivo donde se realizará el proceso de reducción compuesto por 30 ml de solución acuosa con 0.4 mg/ml óxido de grafeno disperso y 45 mg/ml de biomasa de *Shewanella baltica* CECT 323. El proceso se realiza bajo condiciones aerobias para lo cual se mantienen los cultivos en agitación (150 rpm) y temperatura ambiente durante 72 h.

Una vez pasado este tiempo, el último paso consiste en la extracción del óxido de grafeno reducido biológicamente por *Shewanella baltica* CECT 323 de la solución acuosa con células. El cultivo se somete a sonicación en un baño de ultrasonidos durante 10 min y una doble centrifugación a 1500 rpm durante 15 min. El sobrenadante que contiene el óxido de grafeno reducido biológicamente se seca en una estufa a 65°C durante 24 horas. La muestra fue analizada mediante espectroscopías UV-vis, Raman e infrarroja (FT-IR), difracción con rayos X y termogravimetría.

Shewanella baltica CECT 323 es una cepa bacteriana eficaz en la reducción de óxido de grafeno tal y como demuestra la caracterización del producto obtenido. Tras el proceso de reducción de óxido de grafeno por *Shewanella baltica* CECT 323, la suspensión acuosa de óxido de grafeno vira de color pardo-marrón a negro, lo que indica la reducción del mismo. La espectroscopía UV-vis muestra que el producto final tiene un espectro de absorción ligeramente desplazado hacia el rango visible con un único máximo de absorción a 250 nm frente a los máximos que tiene el óxido de grafeno a 230 y 300 nm. La espectroscopía Raman muestra que, tras 48 h de reducción, *Shewanella baltica* CECT 323 desplaza 10.66 cm^{-1} y 5.48 cm^{-1} respectivamente las bandas D y G en relación a su posición en el óxido de grafeno y presenta una relación de intensidades ID/IG ligeramente mayor. La difracción por rayos X (Figura 1) mostró una coherente disminución del pico a 10.3°, característico

del OG, que se atribuye a la eliminación de grupos funcionales que contienen oxígeno durante el proceso de reducción. Finalmente, el análisis termogravimétrico entre 0 y 600°C (Figura 2) indica que *Shewanella baltica* CECT 323 reduce el óxido de grafeno y forma un producto estable tras 48 h de reducción ya que este producto presenta un porcentaje de pérdida de peso del 5.88% entre 0-600°C frente a un 65.34% de pérdida de peso del óxido de grafeno. Estos resultados indican menor presencia de grupos oxigenados en el producto biológicamente reducido con respecto al óxido de grafeno. Estos resultados indican que *Shewanella baltica* CECT 323 es la una cepa bacteriana que reduce eficazmente óxido de grafeno bajo condiciones aerobias y 48 h.

10

Ejemplo 3: proceso de reducción de óxido de grafeno con *Escherichia coli* CECT 101

Una vez obtenida la *biomasa* se forma el cultivo donde se realizará el proceso de reducción con 30 ml de solución acuosa con 0.4 mg/ml óxido de grafeno y 45 mg/ml de biomasa de *E. coli* CECT 101. El proceso se realiza bajo condiciones aerobias para lo cual se mantienen los cultivos en agitación (150 rpm) y temperatura ambiente durante 72 h.

15

Una vez pasado este tiempo, el último paso consiste en la extracción del óxido de grafeno reducido biológicamente por *E. coli* CECT 101, de la solución acuosa con células. El cultivo se somete a sonicación en un baño de ultrasonidos durante 10 min y una doble centrifugación a 1500 rpm durante 15 min. El sobrenadante que contiene el óxido de grafeno reducido biológicamente se seca en una estufa a 65°C durante 24 horas. La muestra fue analizada mediante espectroscopía UV-vis, Raman e infrarroja (FT-IR), difracción con rayos X y termogravimetría.

20

25

E. coli CECT 101 es una cepa bacteriana eficaz en la reducción de óxido de grafeno tal y como demuestra la caracterización del producto obtenido. Tras el proceso de reducción de óxido de grafeno por *E. coli* CECT 101, la suspensión acuosa de óxido de grafeno vira de color pardo-marrón a negro, lo que indica la reducción del mismo.

30

La espectroscopía UV-vis muestra que el producto final tiene un espectro de absorción ligeramente desplazado al rango visible con un único máximo de absorción a 250 nm frente a los máximos que tiene el óxido de grafeno a 230 y 300 nm. La espectroscopía Raman muestra que, tras 72 h de reducción, *E. coli* CECT 101 desplaza 4.96 cm^{-1} y 1.3 cm^{-1} respectivamente las bandas D y G en relación a su posición en el óxido de grafeno y presenta una relación de intensidades ID/IG ligeramente mayor. La

35

difracción por rayos X (Figura 1) mostró una coherente disminución del pico a 10.3° , característico del OG, que se atribuye a la eliminación de grupos funcionales que contienen oxígeno durante el proceso de reducción. Finalmente, el análisis termogravimétrico entre 0 y 600°C (Figura 2) indica que *E. coli CECT 101* reduce el óxido de grafeno y forma un producto estable tras 72 h de reducción ya que este producto presenta un porcentaje de pérdida de peso del 12.72% entre $0-600^\circ\text{C}$ frente a un 65.34% de pérdida de peso del óxido de grafeno. Estos resultados indican menor presencia de grupos oxigenados en el producto biológicamente reducido con respecto al óxido de grafeno. Estos resultados indican que *E. coli CECT 101* es una cepa bacteriana que reduce eficazmente óxido de grafeno bajo condiciones aerobias y 72 h.

Ejemplo 4: proceso de reducción de óxido de grafeno con consorcio procedente del Río Tinto

A partir de biomasa del consorcio de Río Tinto se forma el medio donde se realizará el proceso de reducción con 30 ml de una solución acuosa con 0.4 mg/ml óxido de grafeno disperso y 45 mg/ml de biomasa del consorcio microbiano del Río Tinto. El proceso se realiza bajo condiciones aerobias para lo cual se mantienen los cultivos en agitación (150 rpm) y temperatura ambiente durante 72 h.

Una vez pasado este tiempo, el último paso consiste en la extracción del óxido de grafeno reducido biológicamente por consorcio bacteriano del Río Tinto, de la solución acuosa con células. El cultivo se somete a sonicación en un baño de ultrasonidos durante 10 min y una doble centrifugación a 1500 rpm durante 15 min. El sobrenadante que contiene el óxido de grafeno reducido biológicamente se seca en una estufa a 65°C durante 24 horas. La muestra fue analizada mediante espectroscopías UV-vis, Raman e infrarroja (FT-IR), difracción con rayos X y termogravimetría.

El consorcio microbiano aislado del Río Tinto es eficaz en la reducción de óxido de grafeno tal y como demuestra la caracterización del producto obtenido. Tras el proceso de reducción de óxido de grafeno por consorcio bacteriano de Río Tinto, la suspensión acuosa de óxido de grafeno vira de color pardo-marrón a negro lo que indica la reducción del mismo. La espectroscopía infrarroja muestra un aumento progresivo de la transmitancia de las bandas con máximos a 1630 cm^{-1} y 1100 cm^{-1} , correspondientes a la vibración de los enlaces C=C y C-O, que resulta mucho más

acusado tras 72 h de reducción. La espectroscopía UV-vis muestra que el producto final tiene un espectro de absorción ligeramente desplazado al rango visible con un único máximo de absorción a 250 nm frente a los máximos que tiene el óxido de grafeno a 230 y 300 nm. La espectroscopía Raman muestra que el consorcio bacteriano genera un desplazamiento de la banda D de 1.31 cm^{-1} y 7.83 cm^{-1} tras 48 y 72 h de reducción respectivamente. La relación de intensidades ID/IG sufrió un aumento del 19.2% respecto al valor del óxido de grafeno tras 48 h del proceso. La difracción por rayos X (Figura 1) mostró una coherente disminución del pico a 10.3° , característico del OG, que se atribuye a la eliminación de grupos funcionales que contienen oxígeno durante el proceso de reducción. Finalmente, el análisis termogravimétrico entre 0 y 600°C (Figura 2) indica que el consorcio bacteriano reduce el óxido de grafeno y forma un producto estable sin apenas diferencias entre 48 y 72 h ya que este producto presenta un porcentaje de pérdida de peso del 7.02% y 8.69% respectivamente entre 0- 600°C frente a un 65.34% de pérdida de peso del óxido de grafeno. Estos resultados indican menor presencia de grupos oxigenados en el producto biológicamente reducido con respecto al óxido de grafeno. Estos resultados indican que el consorcio de Río Tinto es una cepa bacteriana que reduce eficazmente óxido de grafeno bajo condiciones aerobias tras 48 h y 72 h.

20

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la reducción de óxido de grafeno mediante el uso de microorganismos que comprende las siguientes etapas:
 - a. reactivación del microorganismo y cultivo de biomasa;
 - 5 b. preparación de un medio acuoso o del elemento sólido que contiene el óxido de grafeno, donde se produce la reacción;
 - c. aportación de biomasa microbiana, al medio que contiene el óxido de grafeno, donde se produce la reducción, **caracterizado porque** el medio donde el elemento microbiano reduce el óxido de grafeno está a
10 temperatura ambiente, sin aportación adicional de nutrientes y/o fuentes de carbono.
2. Procedimiento para la reducción de óxido de grafeno mediante el uso de microorganismos, según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el medio donde se produce la reacción es un medio acuoso o un elemento sólido, que
15 contiene el óxido de grafeno.
3. Procedimiento, de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** el óxido de grafeno puede suministrarse de forma sólida, en forma de lámina o película o disperso en medio acuoso.
4. Procedimiento, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores,
20 **caracterizado porque** el medio donde se realiza la reducción es agua.
5. Procedimiento, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el óxido de grafeno y el elemento microbiano deben de estar en contacto.
6. Procedimiento, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores,
25 **caracterizado porque** en medio acuoso el óxido de grafeno y la biomasa microbiana se mezclan para obtener una mezcla uniforme.
7. Procedimiento, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** en el medio acuoso, la dispersión del óxido de grafeno se obtiene mediante un proceso de mezcla sólido-líquido como ultrasonidos.
- 30 8. Procedimiento, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el elemento microbiano forma un biofilm acuoso sobre

el óxido de grafeno sólido o se encuentra en el medio acuoso con el óxido de grafeno en dispersión.

- 5 9. Procedimiento, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el elemento microbiano en medio acuoso puede encontrarse en una concentración comprendida entre 30 y 100 mg/mL.
10. Procedimiento, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el elemento reductor puede ser cualquier tipo de microorganismo unicelular ya sea hongo, bacteria o microalga.
- 10 11. Procedimiento, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el elemento reductor puede ser una cepa bacteriana seleccionada de un grupo que integran los géneros bacterianos *Shewanella*, *Escherichia* y *Bacillus*.
- 15 12. Procedimiento, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el elemento bacteriano es *Escherichia coli* CECT 101, *Shewanella baltica* CECT 323 o *Bacillus sp.* CECT 40
13. Procedimiento, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el elemento reductor puede ser un consorcio microbiano formado por un compendio de microorganismos asociados que proceden de un mismo ambiente o hábitat.
- 20 14. Procedimiento, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el elemento reductor es un consorcio microbiano procedente de las aguas del Rio Tinto.
15. Proceso de recuperación de óxido de grafeno reducido microbiológicamente en un medio acuoso **que comprende** las siguientes etapas:
- 25 a. se somete la mezcla a un proceso de sonicación, para liberar las partículas de óxido de grafeno reducido;
- b. se separan las células microbianas de la fase acuosa mediante sedimentación o centrifugación;
- c. y se seca el sobrenadante sin células bacterianas para obtener el óxido de grafeno reducido.
- 30 16. Proceso de recuperación de óxido de grafeno reducido microbiológicamente cuando éste es una lámina o película **que comprende** las siguientes etapas:
- a. se somete la lámina a un proceso de sonicación, para liberar las células

- adheridas a la lámina de óxido de grafeno reducido;
- b. se lava la lámina con agua destilada;
 - c. y se seca para eliminar restos de agua.

Figura 1

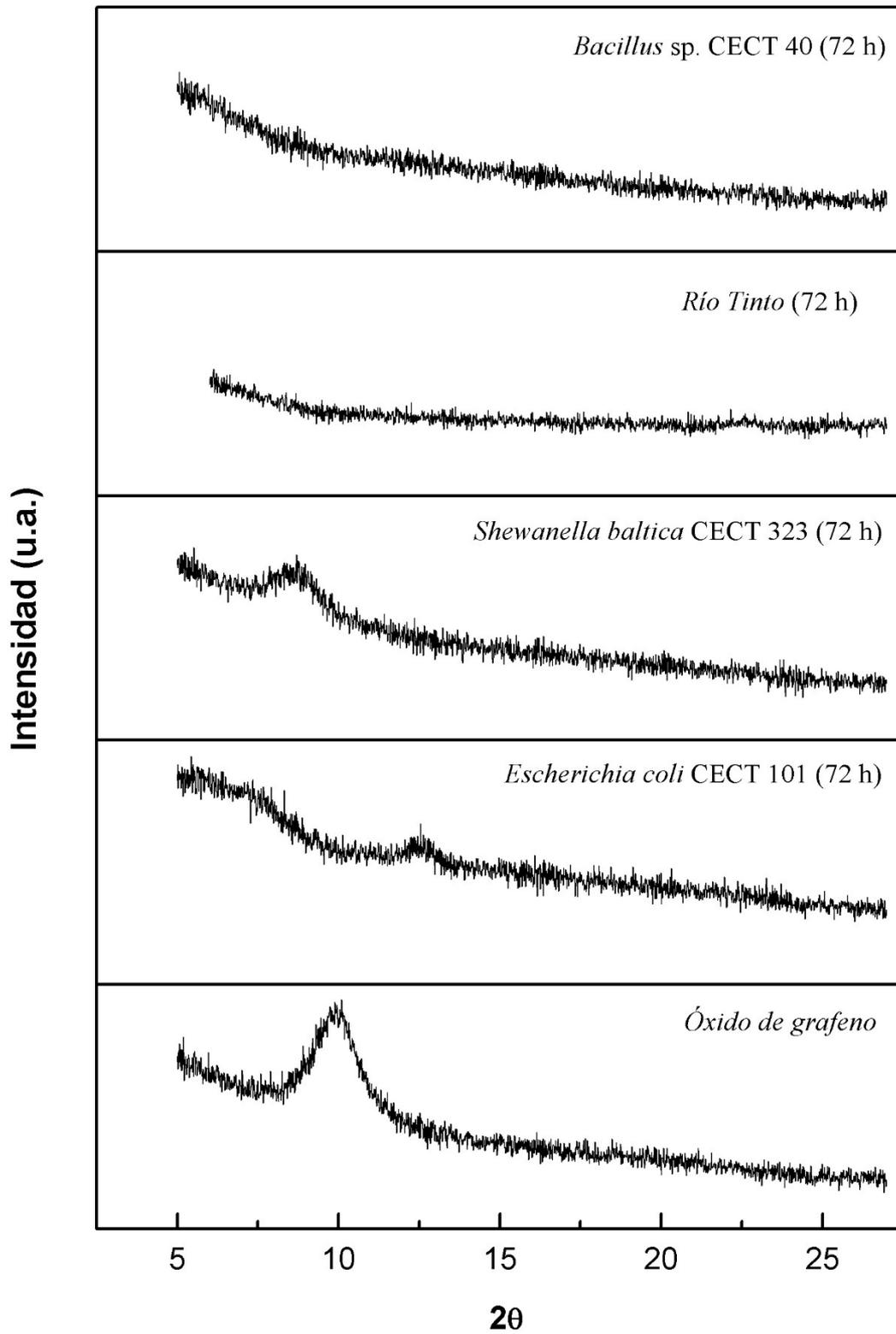
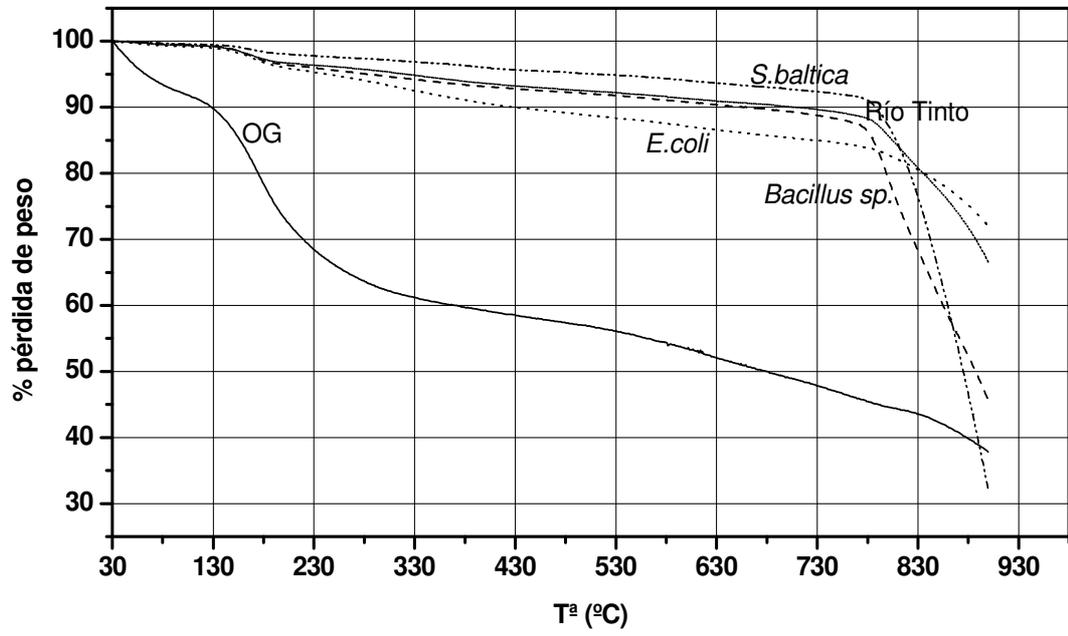


Figura 2





- ②① N.º solicitud: 201730850
②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.06.2017
②③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GURUNATHAN, S., et al., Microbial reduction of graphene oxide by Escherichia coli: A green chemistry approach, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 01/02/2013, Vol. 102, Páginas 772 - 777, ISSN 0927-7765 (print) ISSN 1873-4367 (electronic), <DOI: doi:10.1016/j.colsurfb.2012.09.011>. Apartados: 2.2 y 2.4	1-16
X	KHANRA, P., et al., Simultaneous bio-functionalization and reduction of graphene oxide by Baker's yeast, Chemical Engineering Journal, 2012, Vol. 183, Páginas 526-533. Apartado 2.3.	1-10,13-16
A	US 2015336799 A1 (ALAMADEED MARIAM AL ALI et al.) 26/11/2015, ejemplo 1, figura 1, tabla 1.	1-16
A	TANIZAWA, Y. et al., Microorganism mediated synthesis of reduced graphene oxide films. Journal of Physics: Conference Series, 05/03/2012, Vol. 352, Páginas 12011, ISSN 1742-6596, <DOI: doi:10.1088/1742-6596/352/1/012011>. Resumen.	1-16
A	WARD, O.P., et al., Reductive biotransformations of organic compounds by cells or enzymes of yeast. Enzyme and Microbial Technology, 01/07/1990, Vol. 12, Páginas 482 - 493, ISSN 0141-0229, <DOI: doi: 10.1016/0141-0229(90)90063-V>. Resumen.	1-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
10.11.2017

Examinador
M. d. García Poza

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C01B32/198 (2017.01)

C12N1/02 (2006.01)

C12P3/00 (2006.01)

B82Y40/00 (2011.01)

C12R1/07 (2006.01)

C12R1/645 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C01B, C12N, C12R, C12P, B82Y

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, XPESP, EMBASE, NPL, INSPEC