

NAUKI INŻYNIERSKIE I TECHNOLOGIE ENGINEERING SCIENCES AND TECHNOLOGIES

2(17)•2015



Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu
Wrocław 2015

Redakcja wydawnicza: Anna Grzybowska
Redakcja techniczna: Barbara Łopusiewicz
Korekta: Justyna Mroczkowska
Łamanie: Beata Mazur
Projekt okładki: Beata Dębska

Informacje o naborze artykułów i zasadach recenzowania
znajdują się na stronie internetowej Wydawnictwa
www.nit.ue.wroc.pl
www.wydawnictwo.ue.wroc.pl

Publikacja udostępniona na licencji Creative Commons
Uznanie autorstwa-Użycie niekomercyjne-Bez utworów zależnych 3.0 Polska
(CC BY-NC-ND 3.0 PL)



© Copyright by Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu
Wrocław 2015

ISSN 2080-5985
e-ISSN 2449-9773

Wersja pierwotna: publikacja drukowana

Zamówienia na opublikowane prace należy składać na adres:
Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu
ul. Komandorska 118/120
53-345 Wrocław
tel./fax 71 36 80 602; e-mail: econbook@ue.wroc.pl
www.ksiegarnia.ue.wroc.pl

Druk i oprawa: TOTEM

Spis treści

Wstęp	7
Diana Małgorzata Bobrowska, Patrycja Olszyńska, Monika Imierska, Justyna Czyrko: Nanocebunki węglowe oraz ich potencjalne zastosowanie w biomedycynie.....	9
Małgorzata Korzeniowska, Anna Pudło, Wiesław Kopec: Aktywność przeciwutleniająca tkanek podrobów kurcząt żywionych paszą wzbogaconą w selen i metioninę.....	22
Agnieszka Orkus, Monika Babiarez: Ocena wybranych zwyczajów żywieniowych młodzieży licealnej.....	31
Agnieszka Orkus: Pakowanie mięsa drobiowego w modyfikowanej atmosferze.....	41
Renata Prusinowska, Krzysztof Śmigielki: Losses of essential oils and antioxidants during the drying of herbs and spices. A review.....	51
Magdalena Szaniawska, Anna Taraba, Katarzyna Szymczyk: Budowa, właściwości i zastosowanie antocyjanów.....	63
Marta Wesółowska-Trojanowska, Zdzisław Targoński: Hemicelulazy – właściwości, otrzymywanie i zastosowanie.....	79

Summaries

Diana Małgorzata Bobrowska, Patrycja Olszyńska, Monika Imierska, Justyna Czyrko: Carbon nano-onions and their biomedical applications.....	9
Małgorzata Korzeniowska, Anna Pudło, Wiesław Kopec: Antioxidative activity of the offal tissues of chicken fed with selenium and methionine enriched diet.....	22
Agnieszka Orkus, Monika Babiarez: Assessment of selected dietary habits of secondary school students.....	31
Agnieszka Orkus: Modified atmosphere packaging of poultry meat.....	41
Renata Prusinowska, Krzysztof Śmigielki: Straty olejków eterycznych oraz związków o właściwościach przeciwutleniających podczas suszenia ziół i przypraw. Przegląd.....	51
Magdalena Szaniawska, Anna Taraba, Katarzyna Szymczyk: Structure, properties and application of anthocyanins.....	63
Marta Wesółowska-Trojanowska, Zdzisław Targoński: Hemicellulases – properties, application and production.....	79

**Diana Małgorzata Bobrowska, Patrycja Olszyńska,
Monika Imierska, Justyna Czyrko**

Uniwersytet w Białymstoku
e-mail: d.bobrowska@uwb.edu.pl

NANOCEBULKI WĘGLOWE ORAZ ICH POTENCJALNE ZASTOSOWANIE W BIOMEDYCYNIE

CARBON NANO-ONIONS AND THEIR BIOMEDICAL APPLICATIONS

DOI: 10.15611/nit.2015.2.01

Streszczenie: Nanocebulki węglowe (Carbon Nano-Onions – CNOs) zbudowane są z zamkniętych sferycznie monowarstw węglowych skupionych wokół pustego rdzenia – fulerenu C_{60} . Dotychczasowe badania dowiodły, iż CNOs wykazują lepsze właściwości niż pozostałe struktury węglowe. Duży stosunek powierzchni do objętości, niska gęstość oraz wielowarstwowa morfologia grafitowa umożliwiają wiele zastosowań, m.in. w superkondensatorach, bateriach litowo-jonowych czy układach elektromagnetycznych. Największe zainteresowanie wzbudza brak ich toksyczności, co predysponuje CNOs do odgrywania ważnej roli w nanomedycynie lub biotechnologii. Nanocebulki mogą być wykorzystane jako: materiał kontrastowy umożliwiający fluoroscencyjne obrazowanie żywych organizmów, do budowy bioczuJNIKÓW, a także jako nanoplatforma do unieruchomienia bądź transportu substancji aktywnych. W pracy przedstawiono obecny stan wiedzy na temat zastosowania wielościennych fulerenów w diagnostyce biomedycznej oraz innych gałęziach biotechnologicznych.

Słowa kluczowe: nanocebulki węglowe, diagnoza biomedyczna, biotechnologia, biomedycyna.

Summary: Carbon nano-onions (CNOs), also known as multilayer fullerenes, are spherical structures that consist of a hollow spherical fullerene core surrounded by concentric graphene layers with the increasing diameter. CNOs represent one of the most interesting forms of carbon, mainly due to their 0-D structure, small diameter, high electrical conductivity, and easy dispersion. Carbon nano-onions could be easily modified to other form, which offers a lot of applicable opportunity such as energy storage devices, material for supercapacitor electrodes, but the most important applications are connected with biotechnology and nanomedicine. The CNOs could be served as a highly-fluorescent bioimaging agent, drug delivery and biosensors. Therefore, the small size of CNO and non-toxicity, make it possible to use them in *in vitro* and *in vivo* studies. The CNOs show good biocompatibility in the wide range of the concentrations.

Keywords: carbon nano-onions, biomedical diagnostics, biotechnology, biomedicine.

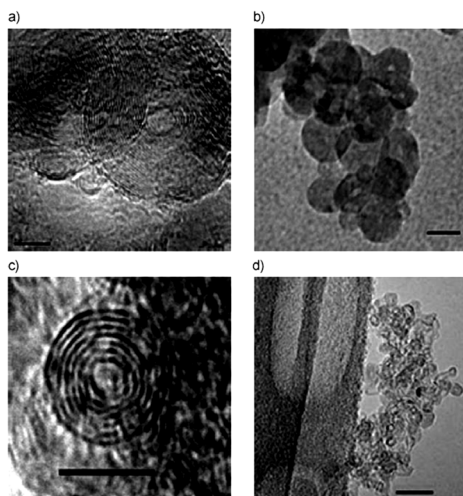
1. Wstęp

Mimo różnorodności nanomateriałów węglowych duże zainteresowanie wśród naukowców wzbudziły nanorurki węglowe (Carbon NanoTubes – CNTs), ze względu na liczne możliwości zastosowania pozostawiając daleko w tyle inne nanostruktury. Jednakże bardzo szybko okazało się, iż mimo nietypowych właściwości są one bardzo kapryśnym materiałem, trudnym do syntezy na szeroką skalę czy otrzymania jednego rodzaju CNTs, charakteryzujących się tymi samymi właściwościami. W ich cieniu pozostawały wielowarstwowe fulereny, które w środowisku naukowym zyskały wdzięczną nazwę nanocebulek węglowych (Carbon Nano-Onions – CNOs).

Idealna nanocebulka węglowa jako rdzeń powinna posiadać najprostszy fuleren C_{60} , a każda jej następna warstwa – mieć ściśle określoną liczbę atomów węgla, którą można wyznaczyć przy użyciu poniższego wzoru:

$$N = R \times n^2,$$

gdzie: N – liczba atomów węgla w danej warstwie; n^2 – numer warstwy, dla której obliczana jest liczba atomów węgla; R – wartość stała i wynosi 60 [Bates, Scuseria 1998].



Rys. 1. Zdjęcia z transmisyjnego mikroskopu elektronowego nanocebulek węglowych: a), c) wysokiej i b), d) niskiej rozdzielczości, otrzymanych a), b) metodą łukowego wyładowania pod wodą, c), d) z wygrzewania nanodiamentu. Skala a), c) 5 nm oraz b), d) 20 nm

Fig. 1. a) high- and b) low-resolution TEM images of CNOs from arcing under water. c) high- and d) low-resolution TEM images of CNOs from nanodiamonds. Scale bars represent a), c) 5 nm and b), d) 20 nm

Źródło: [Palkar i in. 2007].

Source: [Palkar et al. 2007].

Odległość między warstwami fulerenowymi w nanocebulkach odpowiada odległości między warstwami w pirolitycznym graficie (0,334 nm) [Al-Jishi, Dresselhaus 1982; Bacon 1960] i jest przede wszystkim wynikiem niespecyficznych oddziaływań van der Waalsa pomiędzy sąsiadującymi powłokami [Bartelmeß, Giordani 2014]. Liczba powłok oraz średnica nanocebulek węglowej zależą od stosowanej metody syntezy, co stanowi podstawę podziału na „małe” nanocebulki zawierające do 10 nanowarstw oraz „duże”, które posiadają ich kilkanaście lub nawet kilkadziesiąt [Sano i in. 2001; Tomita i in. 2001]. Na rys. 1 zostały przedstawione zdjęcia z transmisyjnego mikroskopu elektronowego „małych” i „dużych” CNOs [Palkar i in. 2007].

Małą popularność nanocebulek węglowych można tłumaczyć z jednej strony brakiem ich komercyjnej dostępności na rynku, z drugiej zaś trudnościami pojawiającymi się na etapie związanym z ich syntezą. Niemniej jednak wiedza na temat CNOs staje się coraz szersza, o czym mogą świadczyć liczne prace naukowe, których liczba z roku na rok znacząco rośnie. Kluczowym aspektem zastosowania CNOs w pracach badawczych związanych z żywymi organizmami jest brak ich toksyczności [Łuszczyn i in. 2010]. Zatem podstawą niniejszej pracy przeglądowej jest przedstawienie aplikacyjności nanocebulek węglowych w biomedycynie – dziedzinie mającej zastosowanie m.in. w diagnostyce, profilaktyce czy leczeniu chorób. W ostatnich kilku latach pojawiły się obiecujące i niezmiernie interesujące prace podejmujące tematykę zastosowania CNOs jako znaczników fluoroscencyjnych, nośników leków czy detektorów substancji aktywnych.

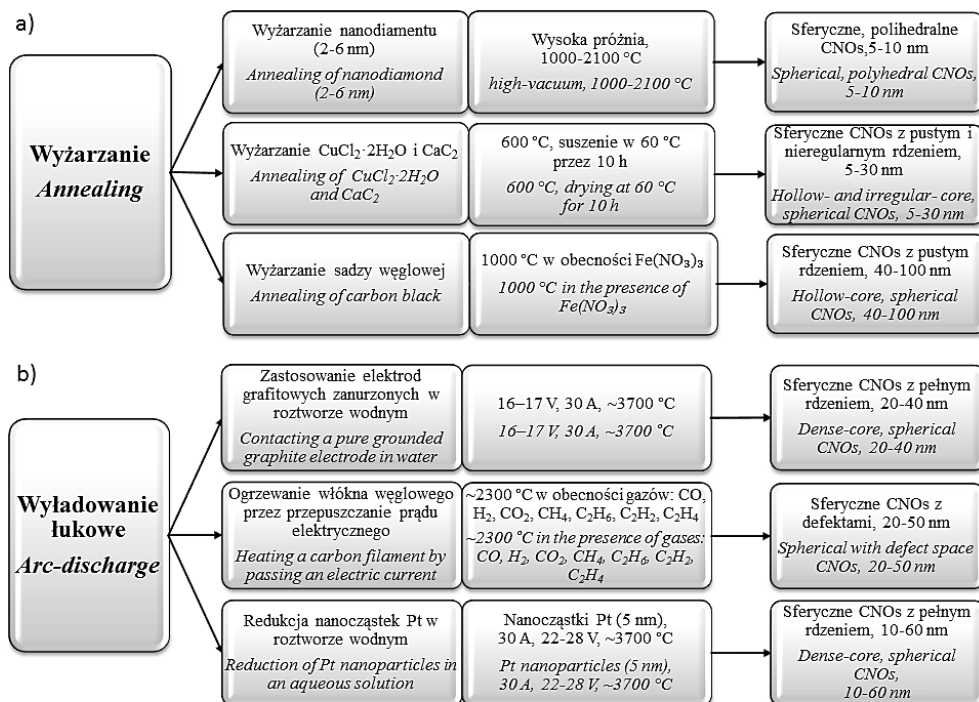
2. Charakterystyka nanocebulek węglowych

2.1. Synteza CNOs

Obecnie używa się kilku metod syntezy CNOs. Jedną z najbardziej popularnych jest prosty proces produkcji opracowany przez Kuznietzowa, polegający na wyżarzaniu nanodiamentu w atmosferze gazu obojętnego pod obniżonym ciśnieniem i w temperaturze w zakresie 1500-1800°C [Kuznetsov i in. 2008]. Poddanie materiału wyjściowego działaniu odpowiednio wysokiej temperatury sprzyja tworzeniu się sferycznych struktur węglowych. Szacuje się, iż podczas tej syntezy w 90% powstają „małe” nanocebulki węglowe, posiadające od 6 do 8 warstw węglowych oraz średnicę 5-6 nm. Wadą tej metody są wysokie koszty.

Innym sposobem jest wyładowanie łukowe w roztworze wodnym z zastosowaniem elektrod grafitowych, podczas którego wytwarzane są „duże” CNOs [Fan i in. 2012; Guo i in. 2009; Sano i in. 2001]. Proces ten polega na przyłożeniu potencjału o wartości ok. 16-17 V do dwóch prętów grafitowych o wysokiej czystości, znajdujących się pod wodą. Wskutek przyłożonego potencjału na powierzchni elektrody ma miejsce sublimacja CNOs. Metoda ta jest dość prosta oraz tania, jednak poza nanocebulkami węglowymi otrzymuje się dużo produktów ubocznych.

Na podstawie doniesień literaturowych na rys. 2 zostały przedstawione szczegółowe warunki podstawowych metod otrzymywania CNOs, takich jak: wyżarzanie (rys. 2a) i wyładowanie łukowe (rys. 2b).



Rys. 2. Schemat przedstawiający szczegółowe warunki i powstające produkty podstawowych metod syntezy CNOs poprzez a) wyżarzanie i b) wyładowanie łukowe

Fig. 2. Schematic diagram of two basic methods used for CNO synthesis: a) annealing and b) arc-discharge

Źródło: opracowanie własne na podstawie literatury [Fan i in. 2012; Guo i in. 2009; Han i in. 2011; Kuznetsov i in. 1994; Lian i in. 2008; Sano i in. 2001].

Source: own study based on literature [Fan et al. 2012; Guo et al. 2009; Han et al. 2011; Kuznetsov et al. 1994; Lian et al. 2008; Sano et al. 2001].

Do syntezy struktur CNOs stosowane są również takie metody, jak piroliza [Garcia-Martin i in. 2013], implantacja jonów [Cabioc'h i in. 1998], osadzanie się par [Chen i in. 2001] czy laserowa irradycja [Hu i in. 2009].

2.2. Właściwości fizykochemiczne CNOs

Właściwości fizykochemiczne nanocebulek węglowych są ściśle związane z ich budową, jak również liczbą warstw. Zarówno „małe”, jak i „duże” CNOs posiadają dużą powierzchnię właściwą w stosunku do ich objętości oraz niewielką gęstość.

Powierzchnia właściwa „dużych” CNOs wynosi ok. $984,3\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$, zatem jest znacznie większa niż powierzchnia jedno- i wielowarstwowych nanorurek węglowych [Sano i in. 2002], powierzchnia właściwa zaś „małych” nanocebulek węglowych jest na poziomie $380\text{-}600\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ [Płońska-Brzezińska, Echegoyen 2013]. Duża powierzchnia właściwa powoduje zwiększenie adsorpcji związków biologicznie czynnych. Ponadto posiadają one dobre właściwości tribologiczne [Joly-Pottuz i in. 2010; Joly-Pottuz i in. 2008] oraz są stabilne w atmosferze powietrza do ok. 600°C [Płońska-Brzezińska i in. 2013b; 2014].

Co więcej, „małe” CNOs wykazują wyższą reaktywność niż CNOs posiadające od kilkunastu do kilkudziesięciu warstw fulerenowych. Spowodowane jest to licznymi defektami w sieci węglowej małych nanocebulek oraz obecnością atomów węgla o hybrydyzacji sp^2 na powierzchni nanocząstki [Niyogi i in. 2002]. Jednocześnie wiadomo, iż z powodu sferycznej budowy możliwa jest funkcjonalizacja całej powierzchni, a nie tylko ich końców, jak w przypadku nanorurek węglowych, co prowadzi do wzrostu ich reaktywności. Modyfikacji jednak ulega tylko zewnętrzna powłoka, pozostałe zostają nienaruszone. CNOs wykazują wówczas większą dyspersyjność w wielu rozpuszczalnikach, co daje szersze możliwości ich zastosowania. Nanocebulki węglowe charakteryzują się wyższą wartością przewodnictwa niż C_{60} . Sęk i in. przeprowadzili szereg eksperymentów, podczas których dokonano pomiaru przewodnictwa niemodyfikowanej cząsteczki CNOs za pomocą skaningowej mikroskopii transmisyjnej, która wynosiła $\sim 71,8\mu\text{S}$ [Sęk i in. 2013]. Wartość ta jest znacznie wyższa niż dla fulerenu C_{60} ($\sim 14,1\text{mS}$) i jednocześnie bliska wartości obserwowanej dla przewodników metalicznych [Sęk i in. 2013].

3. Potencjalne zastosowanie nanocebulek węglowych

Nanocebulki węglowe są materiałem posiadającym obiecujące właściwości fizykochemiczne, dzięki czemu mają szansę znaleźć zastosowanie w wielu dziedzinach. Dzięki dobrym właściwościom tribologicznym są one stosowane jako dodatek do smarów, które mogą być używane w bardzo niskiej temperaturze. Jest to możliwe z uwagi na to, że poza odpornością na ścieranie nanostruktury te posiadają dużą tolerancję termiczną.

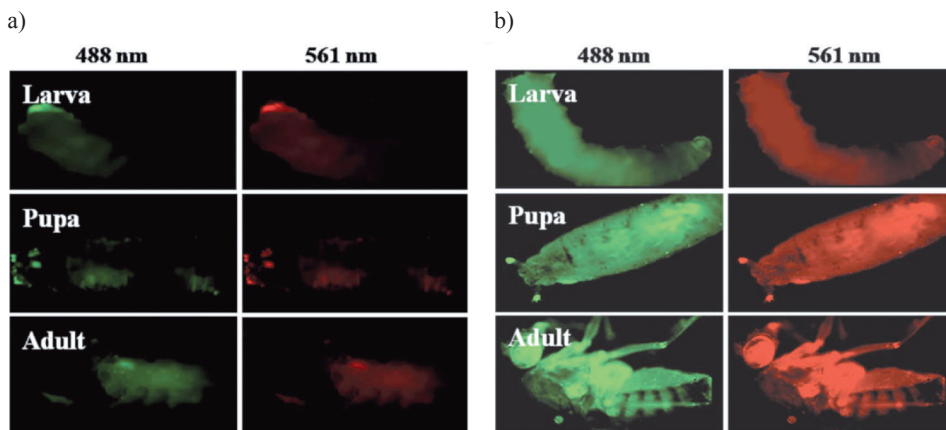
Ze względu na unikatowe właściwości nanocebulek węglowych, które opisane są w podrozdziale 2.2, mogą być one wykorzystane jako materiał elektrodowy w superkondensatorach [Borghain i in. 2012; Pech i in. 2010; Płońska-Brzezińska, Echegoyen 2013], substancja akceptorowa w organicznych ogniwach fotowoltaicznych [Rettenbacher i in. 2007], do budowy baterii litowo-jonowych [Han i in. 2011; Wang i in. 2013], ekranów elektromagnetycznych [Kuznetsov i in. 2008; Maksimenko i in. 2007; Shenderova i in. 2008] czy do magazynowania gazów [Hu i in. 2009]. Posiadają również właściwości katalityczne i mogą katalizować proces np. w dehydrogenacji etylobenzenu do styrenu [Keller i in. 2002; Su i in. 2007].

Popularność i zastosowanie CNOs zyskują również w takich dziedzinach, jak nanomedycyna oraz biochemia. Wykorzystanie ich potencjału pozwoli na badania *in vivo* przemian zachodzących w żywych organizmach, jak również może przyczynić się do usprawnienia diagnostyki medycznej.

3.1. Nanocebulki węglowe i ich właściwości fluorescencyjne

Bioobrazowanie staje się jedną z najważniejszych technik badawczych. Stanowi obecnie całą gamę narzędzi stosowanych w biologii komórki. W przeciwieństwie do metod biochemicznych, umożliwia lokalizację molekuł w pojedynczych komórkach. Tymczasem mikroskopia fluorescencyjna znajduje coraz szersze zastosowanie w badaniu podstaw procesów molekularnych zachodzących w żywych organizmach [Delańko i in. 2013]. Opiera się ona na zjawisku fluorescencji polegającym na emisji promieniowania podczas przejścia cząsteczki ze stanu wzbudzonego do stanu podstawowego. Szacuje się, iż po zaniku czynnika wzbudzającego następuje szybki zanik emisji w czasie około 10^{-8} s [Lakowicz 2007; Marcu i in. 2014]. Wysoka czułość mikroskopii fluorescencyjnej pozwala na jej zastosowania kliniczne. Rutynowo wykonuje się oznaczenia ilościowe aminokwasów, ryboflawiny, tiaminy czy kwasu foliowego we krwi i innych płynach fizjologicznych, szczególnie wtedy, gdy jest dostępna jedynie niewielka ilość próbki [Stochel i in. 2009].

Od niedawna nanostruktury węglowe znalazły również zastosowanie jako wskaźniki fluorescencyjne. Ghosh i in. wykorzystali nanocebulki węglowe jako wskaźnik fluorescencyjny do bioobrazowania *in vivo* stadiów rozwoju prostego, a zarazem modelowego organizmu, jakim jest *Drosophila melanogaster*, popularnie nazywana muszką owocową [Ghosh i in. 2011]. Rozpuszczalne w wodzie wielowarstwowe fulereny, otrzymane poprzez pirolizę odpadów drzewnych, zostały łatwo zmieszane z pożywieniem muszek owocowych, a następnie podane im do spożycia. CNOs otrzymane powyższą metodą charakteryzują się rozmiarami o średnicy na poziomie 30 nm, jednakże dzięki dużej dyspersyjności w wodzie są one łatwo przyswajalne przez organizmy żywe, gdyż nie tworzą agregatów. Na podstawie tych badań stwierdzono, że są one również łatwo wydalane z organizmu. Okazało się, iż zaprzestanie dodawania do pożywienia nanocebulek węglowych powoduje stopniowe obniżenie stopnia fluorescencji przez muszki owocowe, a jednocześnie jego wzrost w ich odchodach, co świadczy o łatwości wydalania kontrastu w postaci wielowarstwowych fulerenów. Dzięki właściwościom fluoroscencyjnym CNOs możliwe było zarejestrowanie 12-dniowego cyklu rozwojowego *Drosophila melanogaster*, począwszy od stanu larwalnego, aż do osiągnięcia stanu dojrzałości – przy użyciu fluorescencyjnego mikroskopu optycznego (rys. 3). Warto podkreślić fakt, iż monitorowanie muszek owocowych pozwoliło na wyodrębnienie dodatkowych faz rozwojowych w stanie larwalnym oraz możliwość dokładnej obserwacji narządów wewnętrznych, takich jak przełyk, ślinianki, jelito środkowe, moczowód itp. [Ghosh i in. 2011].



Rys. 3. a) Zdjęcia autofluorescencyjne różnych stadiów rozwoju *Drosophila melanogaster* od stanu larwalnego do stanu dojrzałości; b) Zdjęcia fluorescencyjne muszki owocowej karmionej pożywieniem z dodatkiem nanocebulek węglowych. Obrazowanie było wykonane przy dwóch różnych długościach fali: 488 i 561 nm

Fig. 3. a) Autofluorescence images of different developmental stages of *Drosophila melanogaster* from larva to adult; b) Water-soluble carbon nano-onion-fed *Drosophila melanogaster*. Imaging was done for two different wavelengths: 488 and 561 nm

Źródło: [Ghosh i in. 2011].

Source: [Ghosh et al. 2011].

Analogicznie znakowane wielościennymi fulerenami zostały prymitywne prokariotyczne organizmy *Escherichia coli* (*E. coli*) [Dubey i in. 2014] oraz bardziej złożone eukarionty *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) [Sonkar i in. 2012]. Umożliwiło to obserwację zależności łańcucha pokarmowego, a także potencjalne wykorzystanie organizmów jednokomórkowych jako swoistych transporterów materiału fluorescencyjnego, jakim są nanocebulki węglowe w organizmach bardziej złożonych, np. *C. elegans* [Sonkar i in. 2012].

W 2014 r. Bartelmess i in. sfunkcjonalizowali „małe” CNOs, otrzymane z wyżarzania nanodiamentu, poprzez unieruchomienie na ich powierzchni wysoko fluoryzującego barwnika, dipirometanu boru (BODIPY) [Bartelmess i in. 2014]. Uzyskanie wysokiej intensywności fluorescencji wykazywanej przez zmodyfikowaną nanocebulkę fluoroforem BODIPY pozwala na jej łatwą penetrację komórkową oraz obrazowanie wysokiej jakości ludzkiego nowotworu piersi MCF-7.

Bazując na opisanych w literaturze wynikach badań doświadczalnych, opracowano prostą i nieinwazyjną metodę umożliwiającą fluoroscencyjne obrazowanie żywych organizmów przy użyciu optycznego mikroskopu fluorescencyjnego. Zostało również dowiedzione, iż nanocebulki są nietoksycznym materiałem, który może być stosowany jako materiał kontrastowy [Bartelmess i in. 2014; Dubey i in. 2014; Sonkar i in. 2012].

3.2. Toksyczność CNOs

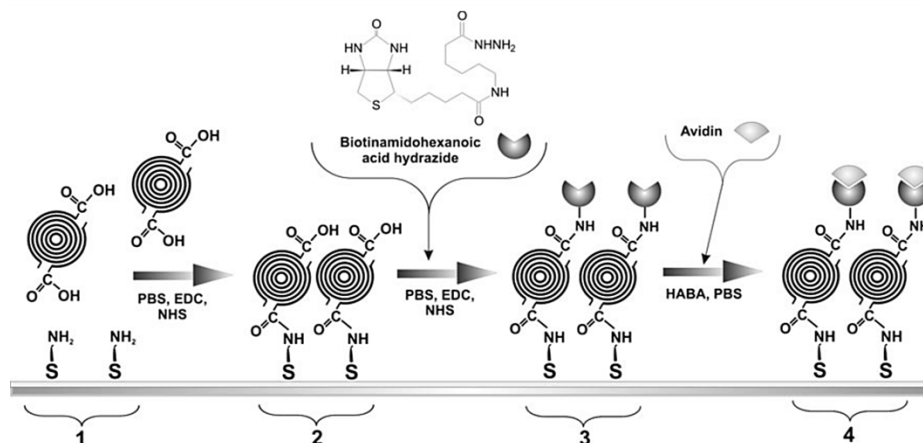
W nawiązaniu do powyższych badań, oprócz obrazowania zostały również wykonane testy toksyczności nanocebulek węglowych [Bartelmess i in. 2014]. Jest to niezmiernie ważne zagadnienie, gdyż pojawiało się wiele prac dotyczących toksyczności nanomateriałów węglowych, np. nanorurek węglowych, które negatywnie wpływały na organizmy żywe [Du i in. 2013]. Pojawiały się również spekulacje, iż mogą one, analogicznie do włókien azbestu, osadzać się w płucach [Poland i in. 2008].

Dodatkowym potwierdzeniem nietoksyczności CNOs były badania prowadzone w 2010 r., podczas których zostały zastosowane popularne testy cytotoxycywności MTS (test z użyciem soli (3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-5-(3-karboxymetoksyfenyl)-2-(4-sulfonofenyl)-2H-tetrazolowej) [Łuszczyn i in. 2010]. Opierają się one na zdolności dehydrogenazy mitochondrialnej – enzymu zawartego wyłącznie w mitochondriach żywych komórek – do przekształcania bezbarwnej soli tetrazolowej do barwnego formazanu, którego poziom można łatwo oznaczyć spektrofotometrycznie [Łuszczyn i in. 2010]. Innymi słowy, metoda ta pozwala na oszacowanie liczby komórek zdolnych do przeżycia w danych warunkach. Wyniki wskazują na doskonałą cytokompatybilność dla trzech różnych stężeń CNOs (30, 300, 3000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), a tym samym prawie stuprocentową przeżywalność komórek. Świadczy to o tym, że CNOs są niecytotoksyczne w szerokim zakresie stężeń i mogą być bezpiecznie stosowane w nanomedycynie i biotechnologii [Łuszczyn i in. 2010].

3.3. Biosensory oparte na CNOs

Na podstawie powyższych badań nad toksycznością CNOs został skonstruowany biosensor oparty na wielościennych fulerenach [Łuszczyn i in. 2010]. Okazało się, iż powierzchnia nanocebulek węglowych sfunkcjonalizowana grupami karboksylowymi może posłużyć jako matryca do „zbudowania” układów supramolekularnych pełniących funkcję detekcyjną awidyny poprzez oddziaływanie z biotyną. Podstawą bioczuJNIka był szklany slajd pokryty warstwą złota z unieruchomioną monowarstwą substancji samoorganizującej się, jaką była cysteamina z wolną grupą aminową, poprzez którą nastąpiło przyłączenie utlenionych (z grupami karboksylowymi) nanocebulek węglowych (rys. 3) [Łuszczyn i in. 2010].

Warto podkreślić, iż jest to pierwszy biosensor oparty na nanocebulkach węglowych posiadających zdolność oddziaływania lub tworzenia wiązań chemicznych ze związkami biologicznymi bez obniżenia ich bioaktywności. Podstawą jego funkcjonowania była detekcja awidyny za pomocą zmodyfikowanych przez biotynę CNOs. Na podstawie zebranych dotychczas informacji można stwierdzić, iż nanocebulki węglowe mają szansę na wykorzystanie ich jako nanoplatfomy do unieruchamiania biomolekuł, gdyż zachowują one swoją aktywność biologiczną oraz obniżają granicę oznaczalności.



Rys. 4. Schemat budowy biosensora „warstwa po warstwie”; złoto/cysteamina/utlenione CNOs/biotyna/awidyna

Fig. 4. Schematic illustration of the biosensor preparation of a) Au/cysteamine/ox-CNOs/biotin/avidin

Źródło: [Łuszczyn i in. 2010].

Source: [Łuszczyn et al. 2010].

Powyższe badania przedstawiają możliwości zastosowania CNOs w bioczuJNIkach opartych na budowie warstwowej, tzw. *layer-by-layer*, dlatego też warto w tym miejscu wspomnieć, iż nie była to jedyna praca, w której wykorzystano CNOs do detekcji substancji aktywnych. W 2012 r. zmodyfikowane nanocebülki węglowe poli(chlorkiem diallilodimetyloamonowym) (PDDA) zostały poddane próbie elektrochemicznego oznaczenia dopaminy [Breczko i in. 2012]. Obecność materiału węglowego pozwala na adsorpcję związków biologicznie czynnych, powodując zwiększenie czułości danej metody analitycznej, przy jednoczesnym obniżeniu granicy oznaczalności. Co więcej, oznaczenie dopaminy miało miejsce w obecności kwasów askorbinowego i moczowego, związków występujących w biologicznych próbkach rzeczywistych [Breczko i in. 2012]. Okazało się, iż kompozyt materiału węglowego z PDDA pozwala na selektywne oznaczenie dopaminy w próbce na poziomie stężeń: od $4 \cdot 10^{-3}$ do $5 \cdot 10^{-5}$ mol·l⁻¹.

Badania te są niezmiernie istotne z medycznego punktu widzenia, gdyż dopamina jest jednym z najważniejszych neuroprzekaźników u ssaków i odgrywa kluczową rolę w centralnym układzie nerwowym, pomaga kontrolować ośrodek przyjemności i bólu w mózgu, regulować ruch i reakcje emocjonalne. Prawidłowy poziom dopaminy odgrywa znaczącą rolę w zdrowiu psychicznym i fizycznym [Schultz 2007]. Niedobór tego hormonu może powodować zaburzenia neurologiczne, a w konsekwencji prowadzić do choroby Parkinsona lub schizofrenii [Huang i in. 2008]. Co więcej, na szczególną uwagę zasługują dodatkowe oznaczenia, które zostały wykonane na dostępnym komercyjnie leku zawierającym substancję aktywną – metyldopę.

3.4. Nanocebulki węglowe jako nośniki substancji aktywnych

Warto również podkreślić, iż oprócz powyższych przykładów prowadzone były też badania nad modyfikacją nanocebulek węglowych, co stworzyło możliwości wykorzystania ich w roli nośników substancji aktywnych [Płońska-Brzezińska i in. 2013a]. Innowacyjność badań związana z wykorzystaniem nanocebulek węglowych jako nośników leków, przy braku komercyjnie dostępnych CNOs, powoduje, iż obecnie nie ma zbyt wielu podobnych przykładów badań opisanych w literaturze. Aczkolwiek istnieją badania podstawowe, takie jak testy na toksyczność CNOs, omówione już w podrozdziale 3.2, tym samym ukazując, iż nanocebulki węglowe są materiałem nieszkodliwym, co daje duże nadzieje na ich zastosowanie w biomedycynie jako transporterów leków.

Powierzchnia węglowa wykorzystana została jako matryca do przyłączenia polistyrenu 4-winylopirolidonu lub mieszaniny glikolu polietylenowego i polisorbatu 20 [Płońska-Brzezińska i in. 2013a]. Tak sfunekcjonalizowane CNOs są podstawą do unieruchomienia związków polifenolowych, które posiadają właściwości antyoksydacyjne i działają profilaktycznie w walce z chorobami nowotworowymi i układu krążenia [Manach i in. 2004]. Ponadto polifenole modulują aktywność szeregu enzymów i receptorów komórkowych [Middleton i in. 2000]. Dane literaturowe pozwalają na stwierdzenie, iż CNOs z unieruchomioną substancją aktywną, np. kwercetyną, mogą pełnić funkcję transportową leków w organizmach żywych [Płońska-Brzezińska i in. 2013a].

4. Podsumowanie

Analiza dostępnych danych literaturowych i opisanych w nich badań wskazuje na szerokie spektrum możliwości zastosowania materiału węglowego w badaniach biologicznych, zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*. Nanocebulki są materiałem posiadającym wiele zalet i niewątpliwie są konkurencją dla pozostałych nanostruktur węglowych. Dotychczasowe badania pokazały, iż CNOs odznaczają się lepszymi właściwościami niż pozostałe struktury węglowe, posiadają dużą powierzchnię w stosunku do objętości, niską gęstość oraz wielowarstwową strukturę. Cechuje je wyższa odporność termiczna czy przewodnictwo niż C_{60} oraz wyższa reaktywność niż CNTs. Dodatkowym atutem jest brak toksyczności, co umożliwia zastosowanie ich przy obserwacjach właściwości komórek czy zmian zachodzących w czasie ich rozwoju oraz kontrolę reakcji enzymatycznych i przemian chemicznych. Spore nadzieje wiąże się także z wykorzystaniem nanocebulek jako transporterów substancji aktywnych. Zastosowanie CNOs jako nanoplatform jest możliwe dzięki postępowi badań nad ich chemiczną modyfikacją. Przedstawione wyniki w niniejszej pracy przeglądowej podkreślają istotę wykorzystania nanocebulek węglowych jako doskonałych matryc do badań biologicznych i biomedycznych.

Literatura

- Al-Jishi R., Dresselhaus G., 1982, *Lattice-dynamical model for graphite*, Phys. Rev. B, 26, s. 4514-4522.
- Bacon R., 1960, *Growth, Structure, and Properties of Graphite Whiskers*, J. Appl. Phys. 31, 283-290.
- Bartelmess J., De Luca E., Signorelli A., Baldrighi M., Becce M., Brescia R., Nardone V., Parisini E., Echegoyen L., Pompa P.P., Giordani S., 2014, *Boron dipyrromethene (BODIPY) functionalized carbon nano-onions for high resolution cellular imaging*, Nanoscale, 6, s. 13761-13769.
- Bartelmess J., Giordani S., 2014, *Carbon nano-onions (multi-layer fullerenes): chemistry and applications*, Beilstein J. Nanotechnol., 5, s. 1980-1998.
- Bates K.R., Scuseria G.E., 1998, *Why are buckyonions round?*, Theor. Chem. Acc., 99, s. 29-33.
- Borgohain R., Li J., Selegue J.P., Cheng Y.-T., 2012, *Electrochemical study of functionalized carbon nano-onions for high-performance supercapacitor electrodes*, J. Phys. Chem. C, 116, s. 15068-15075.
- Breczko J., Płońska-Brzezińska M.E., Echegoyen L., 2012, *Electrochemical oxidation and determination of dopamine in the presence of uric and ascorbic acids using a carbon nano-onion and poly-(diallyldimethylammonium chloride) composite*, Electrochimica Acta, 72, s. 61-67.
- Cabioc'h T., Kharbach A., Le Roy A., Rivière J.P., 1998, *Fourier transform infra-red characterization of carbon onions produced by carbon-ion implantation*, Chem. Phys. Lett., 285, s. 216-220.
- Chen X.H., Deng F.M., Wang J.X., Yang H.S., Wu G.T., Zhang X.B., Peng J.C., Li W.Z., 2001, *New method of carbon onion growth by radio-frequency plasma-enhanced chemical vapor deposition*, Chem. Phys. Lett., 336, s. 201-204.
- Deleńko K., Hyjek M., Kozłowska M., Sadowski M., Kołowerzo A., Bednarska-Kozakiewicz E., 2013, *Techniki bioobrazowania na poziomie komórkowym metody in situ – część I*, Postępy Biol. Komórki, 40.
- Du J., Wang S., You H., Zhao X., 2013, *Understanding the toxicity of carbon nanotubes in the environment is crucial to the control of nanomaterials in producing and processing and the assessment of health risk for human: A review*, Environ. Toxicol. Pharmacol., 36, 451-462.
- Dubey P., Tripathi K.M., Sonkar S.K., 2014, *Gram scale synthesis of green fluorescent water-soluble onion-like carbon nanoparticles from camphor and polystyrene foam*, RSC Adv., 4, s. 5838.
- Fan J.-C., Sung H.-H., Lin C.-R., Lai M.-H., 2012, *The production of onion-like carbon nanoparticles by heating carbon in a liquid alcohol*, J. Mater. Chem., 22, s. 9794.
- Garcia-Martin T., Rincon-Arevalo P., Campos-Martin G., 2013, *Method to obtain carbon nano-onions by pyrolysis of propane*, Cent. Eur. J. Phys., 11, 1548-1558.
- Ghosh M., Sonkar S.K., Saxena M., Sarkar S., 2011, *Carbon nano-onions for imaging the life cycle of drosophila melanogaster*, Small, 7, s. 3170-3177.
- Guo J., Wang X., Xu B., 2009, *One-step synthesis of carbon-onion-supported platinum nanoparticles by arc discharge in an aqueous solution*, Mater. Chem. Phys., 113, s. 179-182.
- Han F.-D., Yao B., Bai Y.-J., 2011, *Preparation of carbon nano-onions and their application as anode materials for rechargeable lithium-ion batteries*, J. Phys. Chem. C, 115, s. 8923-8927.
- Hu S., Bai P., Tian F., Cao S., Sun J., 2009, *Hydrophilic carbon onions synthesized by millisecond pulsed laser irradiation*, Carbon, 47, s. 876-883.
- Huang J., Liu Y., Hou H., You T., 2008, *Simultaneous electrochemical determination of dopamine, uric acid and ascorbic acid using palladium nanoparticle-loaded carbon nanofibers modified electrode*, Biosens. Bioelectron., 24, s. 632-637.
- Joly-Pottuz L., Bucholz E.W., Matsumoto N., Phillipot S.R., Sinnott S.B., Ohmae N., Martin J.M., 2010, *Friction properties of carbon nano-onions from experiment and computer simulations*, Tribol. Lett., 37, s. 75-81.

- Joly-Pottuz L., Matsumoto N., Kinoshita H., Vacher B., Belin M., Montagnac G., Martin J.M., Ohmae N., 2008, *Diamond-derived carbon onions as lubricant additives*, Tribol. Int., 41, s. 69-78.
- Keller N., Maksimova N.I., Roddatis V.V., Schur M., Mestl G., Butenko Y.V., Kuznetsov V.L., Schlögl R., 2002, *the catalytic use of onion-like carbon materials for styrene synthesis by oxidative dehydrogenation of ethylbenzene*, Angew. Chem. Int. Ed., 41, 1885.
- Kuznetsov V.L., Chuvilin A.L., Butenko Y.V., Mal'kov I.Y., Titov V.M., 1994, *Onion-like carbon from ultra-disperse diamond*, Chem. Phys. Lett., 222, s. 343-348.
- Kuznetsov V., Moseenkov S., Ischenko A., Romanenko A., Buryakov T., Anikeeva O., Maksimenko S., Kuzhir P., Bychanok D., Gusinski A., Ruhavets O., Shenderova O., Lambin P., 2008, *Controllable electromagnetic response of onion-like carbon based materials*, Phys. Status Solidi B, 245, s. 2051-2054.
- Lakowicz J.R., 2007, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer Science & Business Media, New York.
- Lian W., Song H., Chen X., Li L., Huo J., Zhao M., Wang G., 2008, *The transformation of acetylene black into onion-like hollow carbon nanoparticles at 1000 °C using an iron catalyst*, Carbon, 46, s. 525-530.
- Luszczyn J., Płońska-Brzezińska M.E., Palkar A., Dubis A.T., Simionescu A., Simionescu D.T., Kalska-Szostko B., Winkler K., Echegoyen L., 2010, *Small noncytotoxic carbon nano-onions: first covalent functionalization with biomolecules*, Chem.–Eur. J., 16, s. 870-880.
- Maksimenko S.A., Rodionova V.N., Slepyan G.Y., Karpovich V.A., Shenderova O., Walsh J., Kuznetsov V.L., Mazov I.N., Moseenkov S.I., Okotrub A.V., Lambin P., 2007, *Attenuation of electromagnetic waves in onion-like carbon composites*, Diam. Relat. Mater., 16, s. 1231-1235.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L., 2004, *Polyphenols: Food sources and bioavailability*, Am. J. Clin. Nutr., 79, s. 727-747.
- Marcu L., French P.M., Elson D.S., 2014, *Fluorescence lifetime spectroscopy and imaging: principles and applications in biomedical diagnostics*, CRC Press, Boca Raton.
- Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T.C., 2000, *The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer*, Pharmacol. Rev., 52, s. 673-751.
- Niyogi S., Hamon M.A., Hu H., Zhao B., Bhowmik P., Sen R., Itkis M.E., Haddon R.C., 2002, *Chemistry of single-walled carbon nanotubes*, Acc. Chem. Res., 35, 1105-1113.
- Palkar A., Melin F., Cardona C.M., Elliott B., Naskar A.K., Edie D.D., Kumbhar A., Echegoyen L., 2007, *Reactivity differences between carbon nano onions (cnos) prepared by different methods*, Chem. – Asian J., 2, s. 625-633.
- Pech D., Brunet M., Durou H., Huang P., Mochalin V., Gogotsi Y., Taberna P.-L., Simon P., 2010, *Ultra-high-power micrometre-sized supercapacitors based on onion-like carbon*, Nat. Nanotechnol., 5, s. 651-654.
- Płońska-Brzezińska M.E., Bruś D.M., Brezko J., Echegoyen L., 2013a, *Carbon nano-onions and biocompatible polymers for flavonoid incorporation*, Chem. – Eur. J. 19, s. 5019-5024.
- Płońska-Brzezińska M.E., Bruś D.M., Molina-Ontoria A., Echegoyen L., 2013b, *Synthesis of carbon nano-onion and nickel hydroxide/oxide composites as supercapacitor electrodes*, RSC Adv., 3, s. 25891.
- Płońska-Brzezińska M.E., Echegoyen L., 2013, *Carbon nano-onions for supercapacitor electrodes: recent developments and applications*, J. Mater. Chem. A 1, s. 13703-13714.
- Płońska-Brzezińska M.E., Molina-Ontoria A., Echegoyen L., 2014, *Post-modification by low-temperature annealing of carbon nano-onions in the presence of carbohydrates*, Carbon, 67, s. 304-317.
- Poland C.A., Duffin R., Kinloch I., Maynard A., Wallace W.A.H., Seaton A., Stone V., Brown S., MacNee W., Donaldson K., 2008, *Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study*, Nat. Immunol., 3, s. 423-428.
- Rettenbacher A.S., Perpall M.W., Echegoyen L., Hudson J., Smith D.W., 2007, *radical addition of a conjugated polymer to multilayer fullerenes (Carbon Nano-onions)*, Chem. Mater., 19, s. 1411-1417.

- Sano N., Wang H., Alexandrou I., Chhowalla M., Teo K.B.K., Amaratunga G.A.J., Imura K., 2002, *Properties of carbon onions produced by an arc discharge in water*, J. Appl. Phys., 92, s. 2783-2788.
- Sano N., Wang H., Chhowalla M., Alexandrou I., Amaratunga G.A.J., 2001, *Synthesis of carbon "onions" in water*, Nature, 414, s. 506-507.
- Schultz W., 2007, *Multiple dopamine functions at different time courses*, Annu Rev Neurosci., 30, 259-288.
- Sek S., Breczko J., Płońska-Brzezińska M.E., Wilczewska A.Z., Echegoyen L., 2013, *STM-based molecular junction of carbon nano-onion*, ChemPhysChem, 14, s. 96-100.
- Shenderova O., Grishko V., Cunningham G., Moseenkov S., McGuire G., Kuznetsov V., 2008, *Onion-like carbon for terahertz electromagnetic shielding*, Diam. Relat. Mater., 17, s. 462-466.
- Sonkar S.K., Ghosh M., Roy M., Begum A., Sarkar S., 2012, *Carbon nano-onions as nontoxic and high-fluorescence bioimaging agent in food chain—an in vivo study from unicellular e. coli to Multicellular C. elegans*, Mater. Express, 2, s. 105-114.
- Stochel G., Stasicka Z., Brindell M., Macyk W., Szacilowski K., 2009, *Bioinorganic photochemistry*, John Wiley & Sons, New York.
- Su D., Maksimova N.I., Mestl G., Kuznetsov V.L., Keller V., Schlögl R., Keller N., 2007, *Oxidative dehydrogenation of ethylbenzene to styrene over ultra-dispersed diamond and onion-like carbon*, Carbon, 45, s. 2145-2151.
- Tomita S., Sakurai T., Ohta H., Fujii M., Hayashi S., 2001, *Structure and electronic properties of carbon onions*, J. Chem. Phys., 114, s. 7477.
- Wang Y., Yan F., Liu S.W., Tan A.Y.S., Song H., Sun X.W., Yang H.Y., 2013, *Onion-like carbon matrix supported Co₃O₄ nanocomposites: A highly reversible anode material for lithium ion batteries with excellent cycling stability*, J. Mater. Chem. A, 1, s. 5212.