

Antimikrobni učinak fulerena

Čakalović, Lorena

Undergraduate thesis / Završni rad

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:109:589505>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-23**



image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO – TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

Lorena Čakalović

Antimikrobni učinak fulerena

završni rad

Osijek, 2014.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

Završni rad

Antimikrobni učinak fulerena

Biokemija

Predmetni nastavnik: izv. prof. dr. sc. Ivica Strelec

Student/ica:

Lorena Čakalović

(MB: 3433/11)

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Ivica Strelec

Predano (datum):

Pregledano (datum):

Ocjena:

Potpis mentora:

Antimikrobni učinak fulerena

SAŽETAK

Buckminsterov fuleren C_{60} , sferična je molekula oblika nogometne lopte koja je zbog svojih kemijskih svojstava pronašla značajnu primjenu u kemiji, kozmetici, medicini i elektroni. Povećani zahtjevi za industrijsku proizvodnju fulerena stvaraju bojazan da bi izlivanje fulerena iz tvornica u okoliš moglo dovesti do značajnog utjecaja po mikrofloru. Stoga je cilj ovog rada bio prikazati trenutačna saznanja o antimikrobnom učinku nanočestica fulerena.

Ključne riječi: antimikrobni učinak, fulereni

Antimicrobial Activity of Fullerene

SUMMARY

Buckminster fullerene, C₆₀ is spherical molecule with the shape of soccer ball. Due to its unique chemical properties it has found application in chemical and pharmaceutical industry, medicine and electronics. Increased demand for fullerene production has raised awareness of their potential environmental risks, especially for microorganisms. Therefore, the aim of this study was to review current information of antimicrobial activity of fullerenes.

Keywords: antimicrobial activity, fullerene

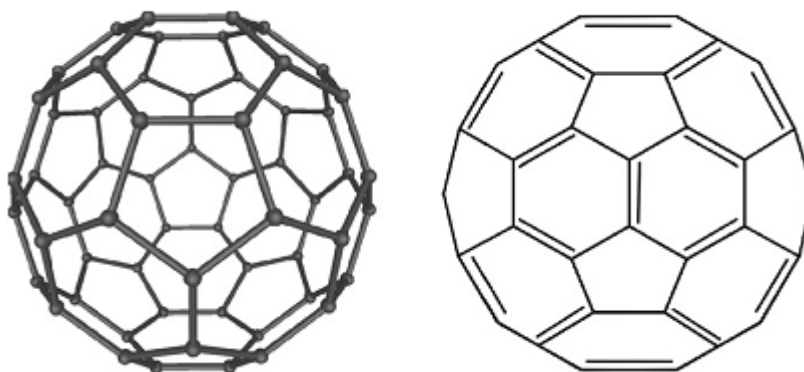
SADRŽAJ:

1.UVOD	1
2. NALAZIŠTE U PRIRODI I PROIZVODNJA.....	3
2.1. Povijest nastanka.....	3
2.2.Fulereni u prirodi	3
2.3. Sinteza fulerena	4
3. FULEREN U VODI.....	5
3.1. Načini pripreme vodenih otopina nanočestica fulerena.....	5
3.2. Oblik, veličina i stabilnost vodenih otopina nanočestica fulerena.....	7
4.ANTIMIKROBNI UČINAK FULERENA.....	11
5.LITERATURA	14

1.UVOD

Fulereni su treća alotropska modifikacija ugljika, a među njima najpoznatiji je tzv. Buckminsterov fuleren C_{60} , sferična molekula oblika nogometne lopte koji je dobio naziv po graditelju geodezijskih kupola, Buckminsteru Fulleru. (Talbot, 1999.).

Fulereni su simetrični i sferični, s promjerom od 0,7 nm (Talbot, 1999.). Sastoje se od 60 atoma ugljika koji tvore trodimenzionalnu strukturu od 20 šesterokutnih i 12 peterokutnih prstena, pri čemu svaki atom ugljika kroz sp^2 hibridizaciju tvori veze sa 3 susjedna atoma ugljika (**Slika 1**). Jedna od ključnih karakteristika fulerena je da niti jedan peteročlani prsten u sustavu fulerena ne dijeli brid sa susjednim petročlanim prstenom, što znači da svaki stabilni fuleren poštuje tzv. *Pravilo izoliranih pentagona* (Marković i Trajković, 2008.; Talbot, 1999.).



Skila 1. Fuleren C_{60} [Marković i Trajković, 2008.]

Iako ima 60 jednostrukih i 30 dvostrukih naizmjeničnih veza, zbog male, ali ipak značajne zakrivljenosti dolazi do delokalizacije π elektrona što uzrokuje da fuleren posjeduje karakteristike aromatskih ugljikovodika (Talbot, 1999.). Upravo delokalizacija π elektrona u molekuli fulerena omogućuje da fulereni djeluju kao hvatači i neutralizatori slobodnih radikala, odnosno antioksidansi (Marković i Trajković, 2008.; Talbot, 1999.). Međutim, osim kao hvatači radikala, ove se molekule pod djelovanjem UV zračenja ponašaju kao prooksidansi (Marković i Trajković, 2008.). Upravo zbog antioksidativnih/prooksidativnih svojstava fulereni se sve više koriste u kemijskoj i farmaceutskoj industriji i potom dolaze u

okoliš. Štoviše, njihova uporaba u drugim industrijama poput elektroničke, te povećani zahtjevi za njihovu proizvodnju stvara bojazan da bi izlivanje ovih kemikalija iz tvornica u okoliš moglo negativno utjecati na mikrofloru. Sve je to navelo znanstvenike da počnu proučavati utjecaj fulerena i njegovih derivata na živi svijet i to od najjednostavnijih: bakterija, gljivica, preko složenijih višestaničnih organizama u želji da saznaju kakav će imati utjecaj na okoliš, a potom i utjecaj na samog čovjeka.

2. NALAZIŠTE U PRIRODI I PROIZVODNJA

2.1. Povijest nastanka

Iako je fuleren prvo pronađen u laboratoriju 1985. godine, a tek onda u prirodi, slobodno se može reći da fulereni nastaju u prirodi i to izgaranjem organskih spojeva pri visokim temperaturama i tlakovima i smanjenoj količini kisika, ili kao rezultat udara groma (Talbot, 1999.; Daly i sur., 1993.; Melezhik i sur., 2004.). Potvrda da su fulereni prisutni u prirodi od ranih dana (od prije 65 milijuna godina) dolazi iz analize vapnenca i gline iz razdoblja krede u kojima su pronađene visoke razine iridija, čađi, ugljena i fulerena (Talbot, 1999.). Trenutačna teorija o njihovom formiranju u prirodi u tako ranom razdoblju temelji se na udaru meteorita u Zemlju prije 65 milijuna godina što je uzrokovalo velike šumske požare i nestašicu kisika. Otkriće 65 milijuna starog kratera na dnu oceana u Meksičkom zaljevu djelomično potvrđuje ovu teoriju (Talbot, 1999.).

2.2. Fulereni u prirodi

U prirodi se fuleren nalazi u 2 kamena: fulguritu (**Slika 2**) i šungitu (**Slika 3**). Fulgurit je kamen granaste strukture koji nastaje kada grom udari u zemlju koja sadrži borove iglice i češere, dok šungit nastaje kada se ugljični materijal nađe u pukotinama kamena u kojem je visoki tlak (Talbot, 1999.).



Slika 2. Fulgurit [Daly i sur., 1993.]



Slika 3. Šungit [Malezhik i sur., 2004.]

2.3. Sinteza fullerena

Zbog svoje široke primjene u komercijalne svrhe fulereni se moraju proizvoditi. Trenutačno jedini način proizvodnje fullerena je udar električnog luka između dvije grafitne elektrode u atmosferi s helijem (Talbot, 1999.).

3. FULEREN U VODI

Iako je čisti fuleren hidrofoban i doslovce netopiv u vodi, budući mu topljivost iznosi $1,3 \times 10^{-11}$ mg/mL, odnosno $1,3 \times 10^{-8}$ ppm (Fortner i sur., 2005.), on ipak u vodi može tvoriti stabilne, koloidne nakupine koje se nazivaju „nano-C₆₀“. Prema Fortneru i suradnicima (2005.) formiranje i stabilnost nanočestica fulerena nastalih nakon dužeg izlaganja vodi može se protumačiti činjenicom da površinski sloj nanočestica fulerena sadrži dio djelomično oksidiranih i/ili hidroksiliranih ugljika koji imaju sposobnost otapanja u vodi, te stabiliziraju hidrofobne jezgre ovih nanočestica. Pri tome je ključno naglasiti da nanočestice fulerena sadrže veliki broj fullerenskih molekula u svom sastavu. Naime, promjer nanočestica fulerena ovisno o načinu pripreme i varira od 5-500 nm, a veličina molekule fulerena je svega 0,7 nm, što upućuje da u sastav nanočestica fulerena ulazi velik broj fullerenskih molekula. Pri tome je ključno naglasiti i sljedeće, u procesu nastajanja nanočestica fulerena fizikalna i kemijska svojstva fulerena mijenjaju se iz temelja (Fortner i sur., 2005).

3.1. Načini pripreme vodenih otopina nanočestica fulerena

Danas se u pripremi stabilnih koloidnih vodenih otopina nanočestica fulerena koriste dvije metode:

- ◆ priprema nanočestica fulerena dugotrajnim miješanjem (oko 30 dana) fulerena u vodi, te
- ◆ priprema nanočestica fulerena uz izmjenu otapala

Priprema nanočestica fulerena u vodi (aqua/nC₆₀) najčešće se provodi miješanjem određene odvage fulerena (0,4 do 1 g fulerena) u 1L vode niske vodljivosti (Milli Q voda) u razdoblju od 2 do 4 tjedna. Potom se navedena suspenzija nanočestica fulerena smeđe boje dodatno pročišćava filtracijom kroz filter papir Whatman 1, a dobiveni filtrat dodatno pročišćava kroz filtere veličine pora 450 i/ili 220 nm, kako bi se dobile nanočestice fulerena veličine manje od 450 ili 220 nm pri čemu je otopina nanočestica fulerena zlataste boje (**Slika 4**) (Lyon i sur., 2006.; Marković i Trajković, 2008.).



Slika 4. Vodena otopina nanočestica fulerena
[Izvor:Laboratorij za biokemiju Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, 2014.]

Priprema nanočestica fulerena u vodi uz izmjenu otapala provodi se na dva najčešće primjenjivana načina:

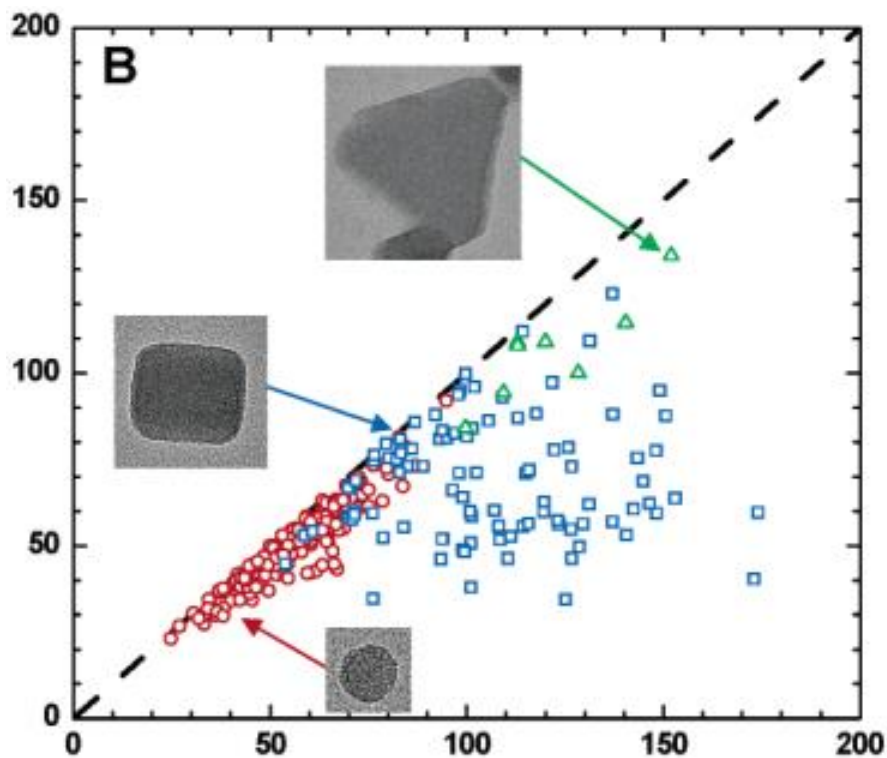
- a) **pripremom otopine fulerena u tetrahidrofuranu (THF/nC₆₀)** slijeđenu filtracijom kroz filter veličine pora 450 i/ili 220 nm, dodatku tako pripremljenog filtrata u vodu uz snažno miješanje, i potom uklanjanju organskog otapala (tetrahidrofurana) primjenom vakuum filtracije (Lyon i sur., 2006),(**Slika 5 II**) , ili
- b) **pripremom otopine fulerena u toluenu (Tol/nC₆₀)**, (**Slika 5, I**), koja se dodaje u vodu i potom primjenom ultrazvuka ispari toluen, a dobivena vodena otopina nanočestica fulerena u vodi dodatno pročisti filtracijom kroz filtere veličine pora 450 i/ili 220 nm (Lyon i sur., 2006)



Slika 5. Fuleren otopljen u: i) toluenu, ii) tetrahidrofuranu [Fortner i sur. 2005.]

3.2. Oblik, veličina i stabilnost vodenih otopina nanočestica fulerena

Oblik nanočestica fulerena može varirati od okruglog, preko četvrtastog do trokutastog oblika. Tako su nanočestice manjeg promjera okruglog oblika, srednje i velike nakupine četvrtastog, dok su jako velike čestice trokutastog oblika (**Slika 6**), (Fortner i sur., 2005.).

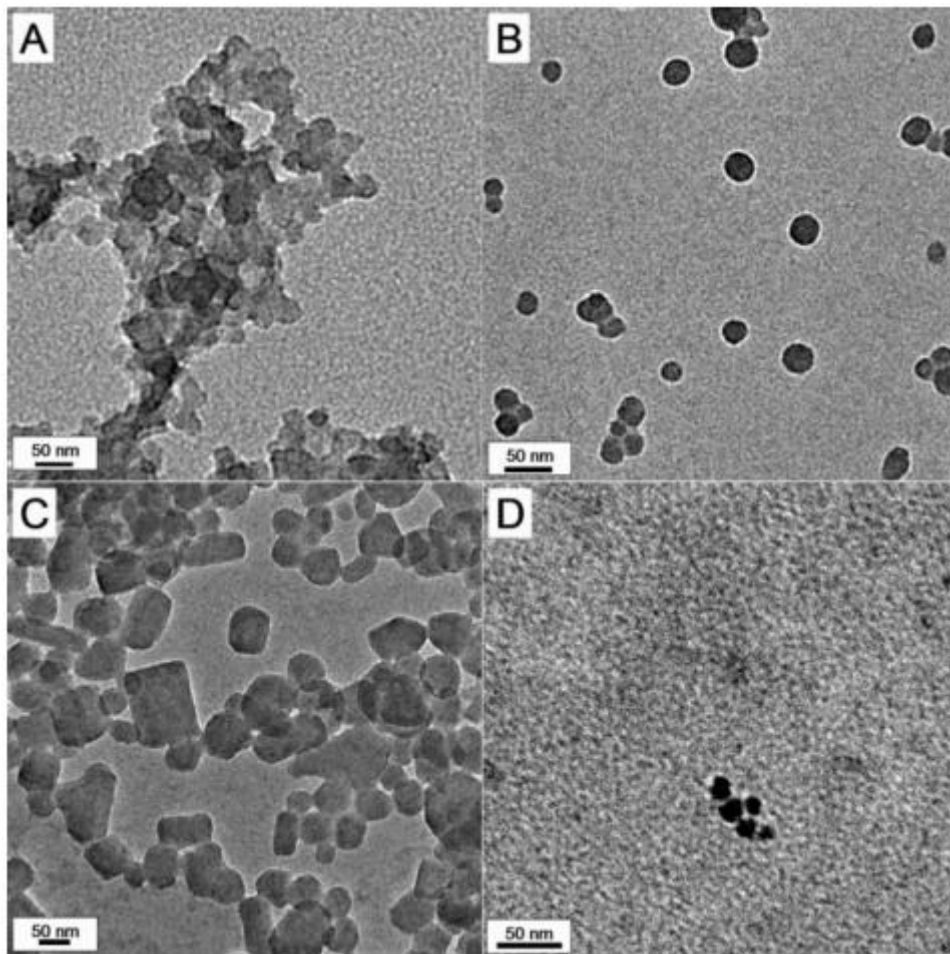


Slika 6. Oblik nanočestica fulerena ovisno o njihovom promjeru [Fortner i sur., 2005]

Kakav će biti oblik i veličina stabilnih vodenih nanočestica fulerena ovisi o primijenjenoj metodi pripreme (izmjena otapala ili dugotrajno miješanje u vodi), a u slučaju pripreme nanočestica fulerena uz dugotrajno miješanje u vodi o pH vode kao i o brzini dodavanja vode u fuleren. (Fortner i sur., 2005.).

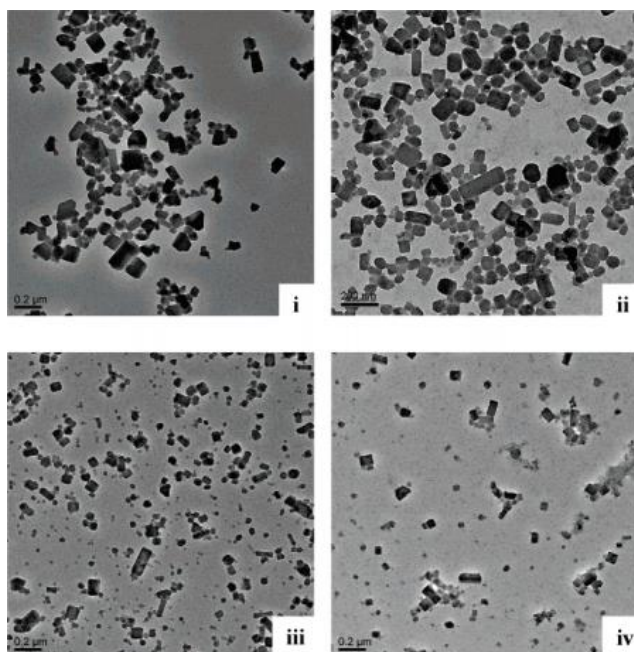
Tako se pripremom vodenih otopina nanočestica fulerena uz izmjenu otapala dobivaju nanočestice fulerena najčešće manje od 100 nm, a u slučaju pripreme vodenih otopina uz dugotrajno miješanje u vodi nanočestice veličine od 50 do čak 500 nm (Lyon i sur., 2006.; Marković i Trajković, 2008). Štoviše, prema Lyon i suradnicima (2006.) se pripremom nanočestica fulerena u vodi uz izmjenu organskog otapala poput toluena mogu dobiti nanočestice veličine manje od 2 nm. Ista se veličina nanočestica dobiva u slučaju

dodatne stabilizacije dodatkom polivinilpirolidona (**PVP/nC₆₀**) koji oblaže nanočestice fulerena (**Slika 7**)



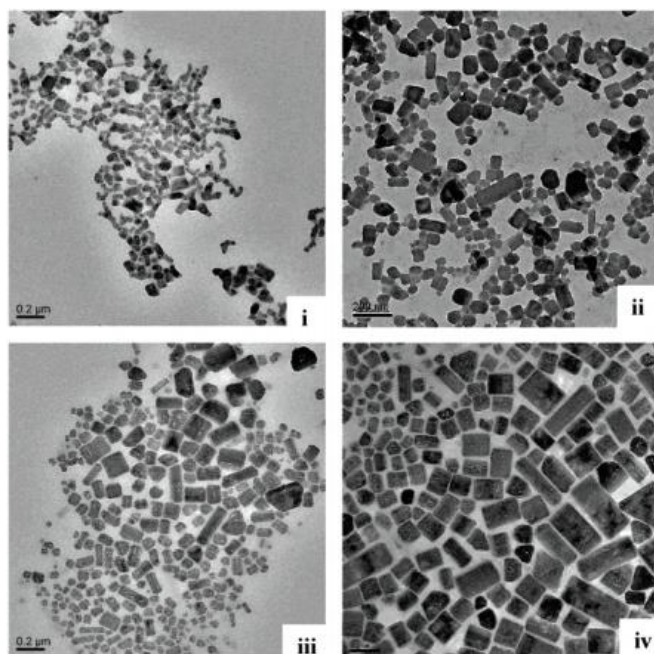
Slika 7. Transmisijska elektronska mikroskopija vodenih otopina nanočestica fulerena pripremljenih direktnim miješanjem u vodi ili uz izmjenu organskog otapala. A) vodena otopina nanočestica fulerena pripremljena miješanjem fulerena u vodi B) vodena otopina nanočestica fulerena pripremljena izmjenom organskog otapala (toluena) C) vodena otopina nanočestica fulerena pripremljena izmjenom organskog otapala (tetrahidrofurana)THF/nC₆₀, vodena otopina nanočestica fulerena obložena polivinilpirolidonom [Lyon i sur. 2006]

Veličina nanočestica ovisna je i o primijenjenom pH. Tako su Fortner i sur. (2005.) ispitivanjem utjecaja pH na veličinu nastalih nanočestica pronašli da pri višim pH vrijednostima nastaju manje nanočestice, dok pri nižim vrijednostima nastaju veće nanočestice fulerena (**Slika 8**).



Slika 8. Utjecaj pH otapala na veličinu nanočestica fulerena [Fortner i sur., 2005]
 i) pH= 3,75, ii) pH=5, iii) pH=7, iv) pH=10,25

Osim primijenjenog pH na veličinu nanočestica fulerena značajno utječe i brzina kojom se dodaje voda. Naime, povećanjem brzine dodavanja vode veličina nanočestica se smanjuje, (**Slika 9**), (Fortner i sur., 2005.).



Slika 9: Utjecaj brzine dodavanja vode na veličinu nanočestica fulerena [Fortner i sur. 2005]
 i)1000ml H₂O/min, ii)500 ml H₂O/min, iii)250mlH₂O/min, iv) 63m H₂O /min

Stabilnost nanočestica fulerena u vodenoj otopini ovisi o ionskoj jakosti (Fortner i sur., 2005.). Nanočestice fulerena nisu stabilne u otopinama koje simuliraju morsku vodu ili bilo koje otopine čija je ionska jakost $\geq 0,1$ M , dok će u otopinama čija je ionska jakost 0,05 M i niža ostati stabilne i do 15 tjedana (Fortner i sur., 2005.).

4. ANTIMIKROBNI UČINAK FULERENA

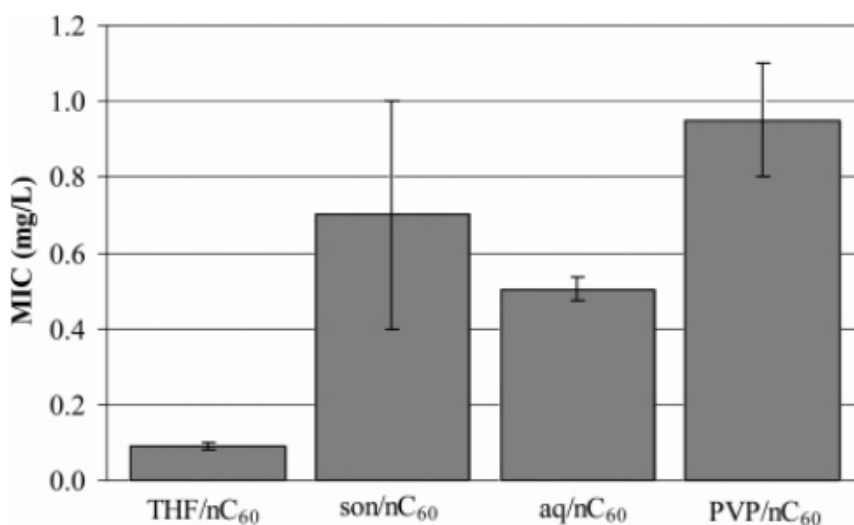
Istraživanja utjecaja nanočestica fulerena na rast mikroorganizama su oprečna. Naime, dok određena istraživanja upućuju na antimikrobni učinak nanočestica fulerena (Fortner i sur. 2005.; Lyon i sur. 2006.; Lyon i Avarez 2008.; Aquino i sur. 2010.), rezultati drugih istraživanja pokazuju da nanočestice fulerena uopće ne utječu na rast mikroorganizama (Haduck i sur. 2010.; Aoshima i sur. 2009.). Štoviše, oprečnost još više dolazi do izražaja kada se usporede rezultati istraživanja na istoj vrsti mikroorganizama i ustanovi da su dijametralno različiti (**Tablica 1**).

Razlozi tako oprečnih rezultata najvjerojatnije su rezultat načina pripreme nanočestica fulerena, njihove veličine, kao i primijenjene koncentracije.

Tablica 1 : Antimikrobni učinak nanočestica fulerena

Mikroorganizam	Vrsta nanočestice	Ispitivani raspon koncentracija	Veličina nanočestica (nm)	Antimikrobni učinak		Referenca
				Inhibicija rasta	MIC (ppb)	
<i>Bacillus subtilis</i>	THF/nC60	0,04-4 ppm	> 220	DA	< 400	Fotner i sur., 2005
	aqua/nC60	nije naveden	142,3 ~2	DA	750-1500 100-230	Lyon i sur., 2006
	THF/nC60		97,4 39,1	DA	600-800 8-10	
	Tol/nC60		~2	DA	400-600	
	PVP/nC60		~2	DA	600-1000	
	THF/nC60	nije naveden	> 220	NE	-	Aoshima i sur., 2009
<i>Escherichia coli</i>	THF/nC60	0,04-4 ppm	> 220	DA	> 400	Fotner i sur., 2005
	THF/nC60	nije naveden	> 220	NE	-	Aoshima i sur., 2009
	aqua/nC60	26 ppm	> 450	NE	-	Hadduck i sur., 2010
	THF/nC60	26 ppm	> 450	NE	-	
	Tol/nC60	26 ppm	> 450	NE	-	
	THF/nC60	1 ppm	>200	DA	-	Aquino i sur. 2010
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	aqua/nC60	31 ppm	> 450	NE	-	Hadduck i sur., 2010
	THF/nC60	31 ppm	> 450	NE	-	
	Tol/nC60	31 ppm	> 450	NE	-	

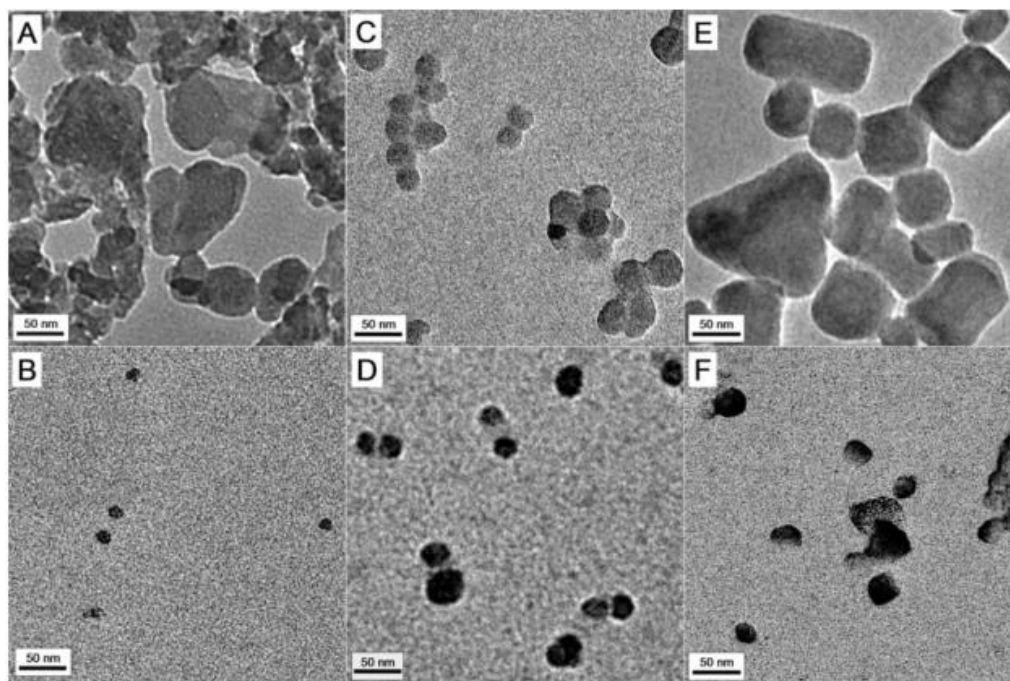
Da način pripreme nanočestica fullerena može imati utjecaj na antimikrobni učinak pokazuju istraživanja Lyon i suradnika (2006.) koji su ispitali antimikrobni učinak stabilnih vodenih otopina nanočestica fullerena pripremljenih: a) dugotrajnim miješanjem u vodi (aqua/nC60), b) uz izmjenu otapala (tetrahidrofuran – THF/nC60 ili toluen – Tol/nC60), ili c) uz stabilizaciju nanočestica polivinilpirolidonom (PVP/nC60) (**Slika 10**), te ustanovili da postoji razlika u antimikrobnom učinku, odnosno minimalnoj inhibitornoj koncentraciji. Za razliku od Lyon i sur. (2006.), istraživanja Haducka i suradnika (2010.) pokazala su da nanočestice fullerena pripravljene na tri načina (aqua/nC60, Tol/nC60 i THF/C60) uopće ne pokazuju antimikrobni učinak (**Tablica 1**). Štoviše, navedeni autori su pokazali da organska otapala (toluen i tetrahidrofuran) korištena u pripremi nanočestica fullerena pokazuju antimikrobni učinak, te zaključili da antimikrobni učinak uočen kod Lyon i suradnika (2006.) može biti rezultat zaostajanja organskih otapala u nanočesticama fullerena.



Slika 10. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) nanočestica fullerena pripremljenih uz izmjenu otapala (THF/nC60 i son/nC60), dugotrajnim miješanjem u vodi (aq/nC60) i stabiliziranih polivinilpirolidonom (PVP/nC60) [Lyon i sur., 2005]

Iz svega navedenog može se zaključiti da način pripreme nanočestica fullerena ima utjecaj na antimikrobni učinak, ali i da se taj utjecaj može promatrati kroz možebitni inhibitorni učinak organskih otapala koji se koriste tijekom pripreme nanočestica.

Da veličina nanočestica fullerena ima značajan utjecaj na antimikrobni učinak pokazuju istraživanja Lyon i sur. (2006.) koji su nanočestice fullerena razdvojili na dvije grupe: velike i male (**Slika 11**) i zatim su promatrali njihovu antibakterijsku aktivnost na *B. subtilis* (**Tablica 1**).



Slika 11. Veličina i oblik nanočestica fullerena. A)velike čestice aq/nC₆₀, B)male čestice aq/nC₆₀, C)velike čestice toulén/nC₆₀, D)male čestice toulén/nC₆₀, E)velike čestice THF/nC₆₀, F)male čestice THF/nC₆₀ [Lyon i sur., 2006.]

Ustanovljeno je da čestice manjeg promjera posjeduju jači antimikrobni učinak, odnosno pokazuju niže vrijednosti minimalnog inhibitornog učinka (MIC). Tako je analizom inhibicijskog učinka nanočestica fullerena pripremljenim uz izmjenu tetrahidrofurana (THF/nC₆₀) ustanovljeno da male nanočestice fullerena posjeduju MIC vrijednost koja je bila oko 80 puta niža od MIC vrijednosti za velike čestice istog uzorka, dok je u slučaju pripreme nanočestica dugotrajnim miješanjem u vodi ustanovljeno da je MIC vrijednost za male nanočestice 6,8 puta niža nego za velike nanočestice (Lyon i sur. 2006.).

5.LITERATURA

1. Aoshima H., Kokubo K., Shirakawa S., Ito M., Yamana S., Oshima T.: Antimicrobial activity of fullerenes and their hidroxyLATEDderivates. *Biocontrol Science* 14(2):69-72, 2009.
2. Aquino A., Chan J., Giolman K., Loh M.: The effect of a fullerene water suspension on the growth, cell viability and membrane integrity if *Escherichia coli* B23. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology* 14:13-20, 2010.
3. Daly T.K., Buseck P.R., Williams P., Lewis C.F.: Fullerenes from a fulgurite. *Science*259, 1993.
4. FortnerJ.D., Lyon D., Sayes C. M., Body A. M., Falkner J.C., Hotze M., Alemany L.B., Tao Y.J., Guo W., Ausman K.D., Colvin L., Hughes J.B.: C₆₀ in water: nanocrystal formation and microbial response. *Environmental Science&Tehnology* 39:4307-4316, 2005.
5. Hadduck A.N., Hindagolla V., Contreras A.E., Li Q., Bakalinsky A.T.: Does aqueous fullerene inhibit the growth of *Saccharomyces cerevisiae* or *Escherichia coli*? *Applied and environmental microbiology* 76(24):8239–8242, 2010.
6. Lyon D.Y., Adams L.K., Falkner J.C., Alvarez P.J.J.: Antibacterial activity of fullerene water suspension: Effect of preparation method and particle size. *Environmental Science&Tehnology*40:4360-4366, 2006.
7. Lyon D.Y., Alvarez P.J.J.: Fullerene water suspension (nC) exerts antibacterial effects via ROS- Independet protein oxidation. *Enviromental science & tehnology* 42(21), 8127-8132, 2008.
8. Marković Z., Trajković V.: Biomedical potential of the reactive oxygen species generation and quenching by fullerenes (C₆₀). *Biomaterials* 29: 3561-3573, 2008.
9. Melezhik V.A., Filippov M.M., Romashikin A.E:A giant Palaeoproterozoic deposit of shungite in NW Russia: genesis and practical applications. *Ore geology reviews* (24) 135-154, 2004.
10. Talbot C.: Fullerene and nanotube chemistry: an update. *School Science Review* 81(295):37-48, 1999.