Hydrothermische synthese van koolstofnanodots uit rundergelatine en PHM3-microalgenstam voor antikankeren bioimaging-toepassingen

Mishal Amjad a, Maheen Iqbal b, Amir Faisal b, Arshad Mahmood Junjua c, Irshad Hussain d, Syed Zajif Hussain d, Db Hamed A. Ghramh ef, Khalid Ali Khan ef en Hussnain Ahmed Janjua * a Department of Industrial Biotechnology, Atta-ur-Rahman School of Applied Biosciences, National University of Science and Technology, Islamabad, Pakistan. Email: hussnain.janjua@asab.nust.edu.pk; janjua.hussnain@gmail.com_b Afdeling Biologie, Syed Babar Ali School of Science and Engineering, Lahore University of Management and Sciences, Lahore, Pakistan

Nationaal Instituut voor Laser en Optronics, Islamabad, Pakistan
Afdeling Scheikunde en Chemische Technologie, Syed Babar Ali School of Science and Engineering, Lahore University of Management Sciences, Lahore, Pakistan
Eenheid van Bijenonderzoek en Honingproductie, Afdeling Biologie, Faculteit of Science, King Khalid University, PO Box 9004, Abha 61413, Saoedi-Arabië
Research Center for Advanced Material Science (RCAMS), King Khalid University, PO Box 9004, Abha 61413, Saoedi-Arabië

Ontvangen 15 maart 2019, geaccepteerd 17 mei 2019

Voor het eerst gepubliceerd op 14 juni 2019

Abstract

Halfgeleider kwantumdots (QD's) zijn favoriete kandidaten voor veel toepassingen, vooral voor potentieel gebruik als optische bioimaging-agentia. Maar het belangrijkste probleem van QD's is toxiciteit. In de huidige studie werden koolstofnanodots gesynthetiseerd met behulp van een groene hydrothermische benadering van gelatine-eiwit met behulp van een eerder vastgesteld protocol. De PL-eigenschappen en toepassingen van de gesynthetiseerde CG (bovine gelatine) nanodots waren echter opmerkelijk verschillend van die van eerder gerapporteerde gelatinekoolstofstippen. CG (bovine gelatine) nanodots hadden afmetingen die groter waren dan de Bohr-excitonstraal, maar hadden nog steeds QD-achtige fluorescentiekenmerken. Bovendien toonden de resultaten van fluorescentiespectroscopie een afstembaar PL-emissieprofiel aan bij verschillende excitatiegolflengten. Ten tweede werden koolstofnanodots ook gesynthetiseerd uit algenbiomassa van*Pectinodesmus* sp. *via* een groene hydrothermische benadering, aangeduid als CA (PHM3-algen) nanodots. Een onderzoek naar de PL-eigenschappen en de chemische oppervlaktesamenstelling van CG (rundergelatine) en CA (PHM3-algen) nanodots suggereerde dat de chemische samenstelling van het oppervlak de oppervlaktetoestanden die hun PL-eigenschappen rechtstreeks beïnvloeden, aanzienlijk verandert. CG (bovine gelatine) nanodots werden gebruikt voor beeldvorming van planten- en bacteriële cellen met een goede beeldgevoeligheid vergelijkbaar met giftige halfgeleider kwantumstippen. Bovendien suggereerden de resultaten van *in vitro* -onderzoeken goede eigenschappen tegen kanker van CA (PHM3-algen) en CG (rundergelatine) nanodots met minimale GI50-waarden van 0,316 ± 0,447 ng ml -1 (*n* = 2) en 8,156 ± 6,596 ng ml -1(*n* = 2) voor HCC 1954 (borstkanker) en respectievelijk 0,542 ± 0,715 ng ml -1 (*n* = 2) en 23.860 ± 14,524 ng ml -1 (*n* = 2) voor HCT 116 (darmkanker) cellijnen.

1. Inleiding

Fluorescerende nanodeeltjes met een kleine afmeting, met name gouden en zilveren nanoclusters 2.3, zijn op grote schaal gebruikt in bio-imaging-toepassingen, maar ze hebben een zeer slechte fotostabiliteit. Evenzo zijn verschillende organische kleurstoffen zoals cyanine, fluoresceïne, rhodamine en groen fluorescerende eiwitten ook gebruikt in celbeeldvormingstoepassingen; 45, organische kleurstoffen hebben echter aanzienlijk te lijden van fotochemische afbraak en fotobleken, die cellulaire tracking op lange termijn beperken 💿 en groene fluorescerende eiwitten zijn berucht voor het vertonen van vals-positieve expressie als gevolg van autofluorescentie op de achtergrond. Halfgeleider-kwantumdots, bijvoorbeeld cadmiumselenide (CdSe), zijn superieur aan fluorescerende eiwitten en andere organische kleurstoffen wat betreft hun optische prestaties, beeldgevoeligheid en weerstand tegen metabolische afbraak8, maar ze hebben ook hun eigen problemen die moeten worden aangepakt. Naast hun beruchte celcytotoxiciteitsprobleem 🛐 hebben deze kwantumdots oppervlaktedefecten die de recombinatie van elektronen en gaten kunnen beïnvloeden door als oppervlaktevallen te fungeren, waardoor fluorescentie knippert. 🔟 Halfgeleider kwantumstippen hebben een vrij lange levensduur die de biologische afbraak verstoort. II Bovendien is de synthese van blauwe emitterende halfgeleider kwantumstippen een moeilijk proces omdat ze kleinere afmetingen vereisen dan andere kleuremitterende stippen. 11

Koolstof wordt over het algemeen beschouwd als een niet-toxisch element, nauwelijks in dezelfde groep als zware metalen die halfgeleiderkwantumdots bevatten en is een veelbelovend alternatief vanwege zijn chemische stabiliteit, goede dispergeerbaarheid in water en lage fotobleking. Koolstofstippen hebben potentieel aangetoond voor bio-imaging, medicijnafgifte, fotokatalyse, energieconversie, fluorescerende inkten en detectietoepassingen. 12-14 Vanuit een bioimaging-toepassing zijn prospectieve identificatie, classificatie, karakterisering en microscopische visualisatie van bacteriën essentiële benchmarks voor verschillende toepassingen in de microbiologie en geneeskunde. De huidige methoden in de microbiologie pakken bacteriën op populatieniveau aan en detectie wordt uitgevoerd door visualisatie van bacteriekolonies of door indirecte detectie van door bacteriën uitgescheiden metabolieten. Nauwkeurige bacteriële detectie vereist identificatie van individuele bacteriële cellen, en voor dit doel zijn verschillende kleurtechnieken gebruikt, ofwel fluorescerende kleurstoffen of in sommige gevallen QD's; Fluorescerende kleurstoffen zijn echter duur, gevoelig voor fotobleking, giftig en moeilijk op te lossen in water. Daarom is een eenvoudig en goedkoop beeldvormend middel nodig om de morfologische details van bacteriële cellen te visualiseren.

De agronomische toepassing van nanotechnologie vereist een beter begrip van de interactie tussen nanodeeltjes en plantrespons. Metaaloxiden, zoals nano-TiO 2, kunnen de plantengroei verhogen 16 maar er is geen fluorescerende sonde om het transportsysteem te volgen om de mechanismen te verklaren die de plantengroei beïnvloeden. CdSe/ZnS-kwantumdots kunnen in vivo worden gebruikt als optische beeldvormingsmiddelen. Ze zijn echter giftig voor de organismen en hebben een negatieve invloed op het milieu. Daarom een niet-toxisch fluorescerend beeldvormend middel dat kan worden gebruikt om de voortgang van de opname van nutriënten/nanodeeltjes te volgen, hun transport te volgen en het nutriëntengehalte in de voedingsoplossing te markeren viaeen visuele meettechniek is vereist. Bovendien kan het beeldvormende middel helpen om de plantstructuur, fysiologische status en prestaties in verschillende omgevingen te kwantificeren, waarvan de kennis kan voldoen aan de eis van genotypering met hoge doorvoer. Carbon dots kunnen dus worden voorgesteld als een geavanceerd platform voor bioimaging-toepassingen vanwege hun fluorescentiekenmerken. Sinds hun ontdekking zijn er verschillende top-down methoden voorgesteld om fluorescerende koolstofstippen te synthetiseren. In deze benaderingen worden koolstofstippen gesynthetiseerd door middel van elektro-oxidatie, laserablatie met behulp van grafiet en zuur-ondersteunde chemische oxidatie. <u>17.12</u> Deze benaderingen vereisen echter zeer agressieve meerstaps chemische reacties, giftige reagentia en speciale apparatuur. Er zijn talloze bottom-up-methoden gemeld om koolstofstippen te synthetiseren die relatief eenvoudig, kosteneffectief en milieuvriendelijk zijn. Verscheidene van dergelijke benaderingen gebruiken glucose, glycol, sucrose, glycerol, citroenzuur enz. voor de synthese van koolstofstippen door hydrothermische behandeling 18 microgolfondersteunde benaderingen 19 en thermische ontleding. 20 Onlangs is er veel aandacht besteed aan het gebruik van natuurlijke hulpbronnen voor de synthese van koolstofnanodots via een hydrothermische carbonisatieroute, omdat deze route een minimale experimentele opstelling vereist; bovendien hebben gesynthetiseerde koolstofstippen vaak uitstekende PL-eigenschappen met een hoge kwantumopbrengst. Bijvoorbeeld carbonisatie van sinaasappelschillen, 21 sojamelk, 22 melk, 23 granaatappel, 24 en gram 25 wordt uitgevoerd. Ondanks enorm veel onderzoek is de fluorescentie-emissie van carbon dots nog

steeds niet duidelijk en is er een constante discussie over de bron van fluorescentie in carbon

dots. In feite vertonen koolstofstippen geproduceerd via diverse synthetische routes en

voorlopers vaak een ander optisch gedrag, aangezien de golflengte van de maximale intensiteit varieert afhankelijk van de koolstofbron, de syntheseroute en de oppervlaktepassiveringsmiddelen; 26 dus kan de verschillende aard van koolstofstippen worden bestudeerd om de complexe fotoluminescente emissie te begrijpen.

In de huidige studie worden koolstofnanodots bereid uit gelatine (type B geëxtraheerd uit runderen) en zoetwatermicroalgen (*Pectinodesmus* sp.). Gelatine is in feite een goedkoop polymeer afgeleid van huid, botten en bindweefsel van dieren zoals runderen, varkens, kippen en vissen 22 met goede medicinale en antioxiderende eigenschappen 22 en microalgen synthetiseren een reeks nutraceuticals zoals lipiden, mineralen, vitaminen, eiwitten en polysachariden en deze bioactieve verbindingen van algen hebben opmerkelijke activiteiten met het potentieel om kankerontsteking, oxidatieve stress en andere degeneratieve ziekten te genezen. 29 Gezien de bovengenoemde fascinerende geneeskrachtige eigenschappen, werden CG (rundergelatine) nanodots en CA (PHM3-algen) nanodots gesynthetiseerd via een hydrothermische carbonisatiemethode en werden ze verder gekarakteriseerd en getest op hun antikanker- en bio-imaging-eigenschappen.

2 Experimentele sectie

2.1 Synthese van fluorescerende CG (rundergelatine) nanodots

Voor de synthese van koolstofnanodots werd 1 g rundergelatine-eiwit van analytische kwaliteit (CAS 9000-70-8 Santa Cruz-biotechnologie) opgelost in 50 ml gedeïoniseerd water bij 50-60 ° C onder constant roeren gedurende 10-15 minuten. Het lichtgele mengsel werd in een Teflonautoclaaf gegoten en gedurende 3 uur op drie verschillende temperaturen verwarmd, *namelijk* 120 °C, 160 °C en 200 °C. Na de reactie werd de autoclaaf afgekoeld tot kamertemperatuur. De resulterende geelbruine oplossing werd gedurende 30 minuten bij 16.000 rpm gecentrifugeerd, gevolgd door filtratie met een spuit van 0,45 m om grote deeltjes te verwijderen en de resulterende donkergele oplossing van CG (rundergelatine) nanodots werd gebruikt voor verdere karakterisering.

2.2 Synthese van fluorescerende CA (PHM3-algen) nanodots

De algenstam *Pectinodesmus* sp. Stam PHM3 (LC159307) a werd in subcultuur gebracht in vloeibare BBM (Bold's basale media). Kolven met het inoculum van microalgen werden verlicht met een witte fluorescentielamp bij 100 mol fotonen per m2 per s met een lichtcyclus van 25 uur. Continue beluchting werd verzekerd met behulp van aquariumluchtpompen en de kweektemperatuur werd op 26-28 °C gehouden. Na 14 dagen groei werden de microalgen geoogst en gedroogd voor verdere experimenten.

Een droog gebroken poeder van microalgen (1 g) werd opgelost in 50 ml gedeïoniseerd water bij 50-60 ° C onder constant roeren gedurende 10-15 minuten. Het lichtgroene mengsel werd in de Teflon-autoclaaf gegoten en 3 uur op 200°C verwarmd. Na de reactie werd de autoclaaf afgekoeld tot kamertemperatuur. De resulterende donkergroene oplossing werd gedurende 30 minuten bij 16.000 rpm gecentrifugeerd, gevolgd door filtratie met een spuit van 0,45 m om grote deeltjes te verwijderen en de resulterende donkergroene oplossing van CA (PHM3-algen) nanodots werd gebruikt voor verdere karakterisering.

2.3 Karakterisering

2.3.1 Optische karakterisering. Synthese van koolstofnanodots werd aanvankelijk bevestigd door UV-vis-spectrofotometrie (UVD-2950, LA, VS) tussen 200-800 nm. Gedeïoniseerd water werd als referentie gebruikt voordat de absorptiespectra werden geregistreerd. De concentratie van koolstofnanodots werd gemeten met behulp van de wet van Beer-Lambert; de molaire extinctiecoëfficiënt van koolstofnanodeeltjes was $1,0 \times 105 \text{ M} - 1 \text{ cm} - 1$. De fluorescentiespectra werden opgenomen met een Configuration-Fluoromax-4C-1426D-4115-FM-spectrofotometer. De fotostabiliteit werd onderzocht onder continue verlichting van een 365 nm UV-lamp (UVP). Een OPTIKA B-350 fluorescentiemicroscoop uitgerust met een DCM 130, een blauw excitatiefilter (λ = 450-480 nm) en een groen excitatiefilter (λ = 510-550 nm) werd gebruikt voor beeldvormingsexperimenten.

2.3.2 Morfologie. De morfologie van de koolstofnanodots werd gekarakteriseerd met behulp van SEM (Joel JSM-6490LA, Tokyo, Japan); het scannen werd gedaan bij 20 eV bij een vergroting van 50 000×. Voor SEM-analyse werd een druppel CG (rundergelatine) en CA (PHM3) nanodots toegevoegd aan 10 ml gedeïoniseerd water en onder een lamp gedroogd. De procedure werd gevolgd door goudcoating van het monster voor oppervlaktegeleiding met behulp van een sputtercoater. Het monster werd na het coaten op stompen geplaatst met behulp van geleidende tape voor analyse. EDS van monsters werd uitgevoerd bij 20 eV en sondestroom 1 mA, om koolstofnanodots te detecteren. *XRD-analyse werd uitgevoerd op een STOE* theta/theta-diffractometer (XRD) met behulp van Cu Ka-straling (= 1,5406). Zeta-potentiaalmetingen van de koolstofnanodots werden uitgevoerd met behulp van een Zetasizer Ver. 7,10 bij 25°C bij pH 7 in een waterig medium.

2.3.3 Chemische samenstelling. FTIR-analyse werd uitgevoerd met behulp van een PerkinElmer Spectrum-100-spectrometer met een scangolflengtebereik van 450-4000 cm 1. CG (bovine gelatine) nanodots, CA (PHM3 algen) nanodots, rundergelatine en PHM3 algenextract werden geanalyseerd op de aanwezigheid van functionele groepen op het oppervlak.

2.4 Antikankeractiviteit

Kankercellijnen HCC 1954 (menselijke borstkankercellen) en HCT 116 (menselijke colorectale kankercellen) waren afkomstig van ATCC. Voor antikankeractiviteit werd sulforhodamine B (SRB) proliferatietest gebruikt. Cellen van elke cellijn (HCC 1954 humane borstkankercellen en HCT 116 humane colorectale kankercellen) werden uitgezaaid met geoptimaliseerde zaaidichtheid in platen met 96 putjes en overnacht geïncubeerd bij 37°C in een bevochtigde incubator met 5% co2 . Negen drievoudige verdunningen (vanaf 5000 ng ml –1) van CG (rundergelatine) en CA (PHM3-algen) nanodots werden aan de cellen toegevoegd. Cellen behandeld met CG (rundergelatine) en CA (PHM3-algen) nanodots in platen met 96 putjes werden verder geïncubeerd bij 37°C in de bevochtigde incubator met 5% co2gedurende 72 uur, alvorens verder te gaan met de sulforhodamine B (SRB) test. Na 72 uur incubatie met de CA (PHM3-algen) en CG (bovine gelatine) nanodots, werden de cellen gefixeerd met ijskoude trichloorazijnzuur TCA (3%

eindconcentratie) bij 4 ° C gedurende ten minste 2 uur. De platen werden vervolgens 4 keer gewassen met water en 20 minuten in een oven van 37°C gedroogd. Gefixeerde cellen werden vervolgens gekleurd door 100 l 0,05% SRB-oplossing per putje toe te voegen, gevolgd door incubatie gedurende ten minste 30 minuten bij kamertemperatuur. De SRB-oplossing werd van de platen verwijderd door vier keer te wassen met 1% azijnzuur (in water) en de platen werden 20 minuten in een oven van 37°C gedroogd. Aan elk van deze gedroogde platen werd 100 l 10 mM Tris (pH 10,5) per putje toegevoegd met behulp van een multidrop-dispenser en gedurende 5 minuten op een platenschudder geplaatst om SRB op te lossen. Een plaatlezer werd vervolgens gebruikt om de optische dichtheid in drievoud te meten bij een golflengte van 490 nm. GI50 waarden werden vervolgens bepaald uit de grafiek van de dosis-responscurve tussen log van CA (PHM3-algen) en CG (bovine gelatine) nanodot-concentratie en percentage celgroeiremming met behulp van GraphPad PRISM-software.

2.5 E. coli -beeldvormingsexperiment

E. coli werd gekweekt in een schone steriele omgeving. De verbruiksartikelen die werden gebruikt voor het kweken van *E. coli* werden gesteriliseerd in een autoclaaf gedurende 2 uur bij een druk van 15 psi. *E. coli* werd gekweekt in steriel LB-medium dat 1 g gistextract, 2 g trypton en 1,0 g NaCl in 100 ml gedestilleerd water bevatte. Met behulp van een streaking-lus werd een kolonie uit de *E. coli* LB-agarplaat geplukt en in LB-media geïncubeerd. Bacterieculturen werden overnacht bij 37 ° C in een schudincubator gekweekt. Na een nacht schudden werd ongeveer 1,5 ml kweekmedium gedurende 10 minuten bij 10.000 rpm gecentrifugeerd om het supernatant weg te gooien, en de bacteriële pellet werd gewassen en opnieuw gesuspendeerd in 1 ml 0,01 M PBS-buffer.

CG (bovine gelatine) nanodot (200 l) oplossingen met een concentratie van 2 mg ml -1 en 4 mg ml -1 werden bereid voor de reactie met 400 µl *E. coli* (10 –7 cfu ml -1) gedurende 3 uur bij 37 °C onder zacht schudden. Voor het controle-experiment werden bacteriële cellen geïncubeerd in PBS-buffer. Na 3 uur werden deze oplossingsmengsels gedurende 10 minuten bij 10.000 rpm gecentrifugeerd om ongebonden CG (rundergelatine) nanodots te verwijderen, het supernatant werd weggegooid en de verkregen pellet werd driemaal gewassen met 0,01 M PBS en opnieuw gesuspendeerd in 0,01 M PBS-oplossing. Voor beeldvormingsexperiment werd 20 l bacteriële celsuspensie geïmmobiliseerd op een microscopisch glaasje met behulp van agarosepads van 1 x 1 cm.

2.6 Beeldvorming van Allium cepa (ui) epidermale cellen

De epidermale laag cellen werd met behulp van een mes van een ui afgepeld. De cellen werden gewassen met PBS-buffer en de epidermale laag van cellen werd gedurende 16 uur bij kamertemperatuur geïncubeerd in 2 mg ml -1 CG (rundergelatine) nanodot-oplossing. Na 16 uur werden de epidermale cellen tweemaal gewassen met PBS-buffer om ongebonden CG (rundergelatine) nanodots te verwijderen. Controle-epidermale cellen werden geïncubeerd in PBS-buffer zonder CG (rundergelatine) nanodots. Voor het beeldvormende experiment werd de epidermale laag van cellen overgebracht naar het microscopische objectglaasje.

3. Resultaten en discussie

3.1 Optische kenmerken van CG (rundergelatine) en CA (PHM3-algen) nanodots

Zoals getoond in Fig. la en Fig. 2a , leverde hydrothermische behandeling van gelatine en microalgen bij 200 ° C gedurende 3 uur respectievelijk een donkergele en donkergroene kleur op, wat wijst op de vorming van koolstofnanodots.







Fig. 2 (a) Illustratie van het bereidingsproces van CA (PHM3-algen) nanodots door hydrothermische carbonisatie. (b) UV-zichtbaar absorptiespectrum en (c) fluorescentiespectrum van de als voorbereide CA (PHM3-algen) nanodots bij verschillende excitatiegolflengten.

De synthese van koolstofnanodots werd aanvankelijk bevestigd door het UV-zichtbare absorptiespectrum. Het UV-vis absorptiespectrum van CG (rundergelatine) nanodots getoond in Fig. 1b vertoont een absorptiepiek bij $\lambda max = 268$ nm die te wijten is aan $\pi - \pi^*$ overgangen van CC (= aromatische koolstof) bindingen en een brede schouderstart van 300 nm wat te wijten is aan n- π^* van =CO (carbonyl) bindingen en andere zuurstofbevattende functionele groepen. In het geval van CA (PHM3-algen) nanodots (<u>Fig. 2b</u>), een absorptiepiek bij 236 nm en een andere kleine piek bij 254 nm liggen beide in het bereik van π - π * -overgangen van CC- =bindingen en een schouderbocht bij 300 nm overeenkomend met n- π^* van =CO bindingen en andere geoxygeneerde functionele groepen. 33-35 Merk op dat de absorptieband die overeenkomt met $n-\pi^*$ breder is voor CG (bovine gelatine) nanodots dan die van CA (PHM3-algen) nanodots. Het verschil kan te wijten zijn aan variaties in de oppervlaktechemie van twee soorten nanodeeltjes. De PL-spectra van CG (rundergelatine) nanodots onder verschillende excitatiegolflengten getoond in Fig. 1c laat zien dat de PL-intensiteit toeneemt met een toename van de excitatiegolflengte, en de PL-intensiteit toeneemt van 360 nm (excitatiegolflengte) tot 400 nm (excitatiegolflengte) waarbij de sterkste intensiteit wordt waargenomen die overeenkomt met de emissiemaxima bij 472 nm. De fluorescentie-intensiteit hangt af van het aantal deeltjes dat wordt geëxciteerd bij een specifieke golflengte, aangezien maximale CG (bovine gelatine) nanodots werden geëxciteerd bij 400 nm (excitatiegolflengte), wat resulteerde in een verhoogde PL-intensiteit. De emissiepieken worden verschoven naar hoge golflengten met afnemende intensiteiten met een verdere toename van de excitatiegolflengte. Onder de bestraling van een 365 nm UV-lamp wordt de waterige oplossing van CG (bovine gelatine) nanodots blauw (Fig.

1a). In het geval van CA (PHM3-algen) nanodots zijn de spectraallijnen sterk rood verschoven (Fig. 2c). De spectraallijnen van CA (PHM3-algen) nanodots vertonen geen significante verandering in de emissiegolflengte wanneer de excitatiegolflengte werd verhoogd van 300 nm naar 440 nm; een verdere toename van de excitatiegolflengte veroorzaakt echter een scherpe roodverschuiving waarbij de maximale intensiteit bij een excitatiegolflengte van 480 nm overeenkomt met een emissiegolflengte van 548 nm; de emissie-intensiteit neemt af met roodverschuiving wanneer de excitatiegolflengte wordt verhoogd tot 500 nm. Deze excitatieafhankelijke emissie die wordt waargenomen in CA (PHM3-algen) en CG (bovine gelatine) nanodots is vergelijkbaar met die in de andere gedocumenteerde koolstofstippen. 21.24.36

De reden voor dit excitatie-afhankelijke emissiegedrag kan het bestaan van verschillende deeltjesgroottes of de verdeling van verschillende oppervlakte-energietoestanden op het oppervlak van CG (rundergelatine) en CA (PHM3-algen) nanodots zijn. Onder de bestraling van een 365 nm UV-lamp wordt de waterige oplossing van CA (PHM3-algen) nanodots groen (<u>Fig.</u>

2a). Bovendien is de intensiteit van PL-spectra van CA (PHM3-algen) nanodots laag in vergelijking met CG (rundergelatine) nanodots; de verminderde intensiteit kan worden toegeschreven aan het aantal deeltjes dat wordt geëxciteerd bij een specifieke golflengte. In CA (PHM3-algen) nanodots werd een kleiner aantal deeltjes geëxciteerd bij de excitatiegolflengte in vergelijking met CG (bovine gelatine) nanodots of als alternatief kan de verdeling van oppervlaktetoestanden die een stralingsrecombinatie mogelijk maken minder zijn in CA (PHM3algen).

3.2 Morfologie en structurele eigenschappen van CG (rundergelatine) en CA (PHM3-algen) nanodots

Het scanning-elektronenmicroscopiebeeld van respectievelijk CG (rundergelatine) en CA (PHM3algen) nanodots bij verschillende vergrotingen wordt getoond in Fig. 3a-f en 5a-f . SEM-analyse van CA (PHM3-algen) nanodots toonde enige agglomeratie met de sferische morfologie van deeltjes. Evenzo toonde SEM-analyse van CG (rundergelatine) nanodots een bolvormige morfologie; deeltjes zijn echter goed van elkaar gescheiden. In SEM-analyse bevinden alle deeltjes zich in het nanobereik met een gemiddelde diameter van 67 nm voor CA (PHM3-algen) nanodots en 59 nm in het geval van CG (bovine gelatine) nanodots zoals weergegeven in Fig. 4 en 6 (<u>Tabellen 1</u> en 2) respectievelijk. De grootte van de gesynthetiseerde koolstof nanodots (CG (rundergelatine) en CA (PHM3-algen)) is in overeenstemming met eerder gerapporteerde maten; 37 het groottebereik van beide koolstofnanodots is echter groter dan de Bohr-excitonstraal, wat suggereert dat het kwantumopsluitingseffect niet kan worden waargenomen in CG (bovine gelatine) en CA (PHM3-algen) nanodots, aangezien het kwantumopsluitingsmechanisme de grootte van nanodots vereist kleiner zijn dan de Bohrexcitonstraal. 38 Het is dus redelijk om te concluderen dat de fotoluminescentie van CG (rundergelatine) en CA (PHM3-algen) nanodots gerelateerd kan zijn aan oppervlaktedefecttoestanden vanwege het voorkomen van verschillende functionele

groepen. Het röntgendiffractiepatroon (XRD) van CG (rundergelatine) en CA (PHM3-algen) nanodots onthult dat CG (rundergelatine) nanodots (Fig. 7A(a)) een zeer brede piek vertonen bij 2 θ = 24,0° die wordt toegewezen aan de 002 diffractiepatronen van grafietkoolstof. De afstand tussen de lagen bepaald op basis van de 002-piek komt overeen met *d* 002 = 0,34 nm, wat vergelijkbaar is met die van eerder gedocumenteerde koolstofnanodots. 32.40 Evenzo is het XRDpatroon van CA (PHM3-algen) nanodots in Fig. 7A (b) geeft een brede piek weer die is gepositioneerd op 2 *A* = 22°, *toegewezen aan de* 002 diffractiepatronen van grafietkoolstof met een tussenliggende afstand van *d002* = 0,36 nm, die iets hoger is dan die van grafiet (0,34 nm); de grotere afstand tussen de lagen duidt op een slechte kristallisatie. Een andere scherpe piek gecentreerd op 44 ° komt overeen met de 101 vlakken die ontstaan door de diffractie in het vlak van grafeenachtige structuren van CA (PHM3-algen) nanodots 41 en een zwakke piek waargenomen bij 64 ° kan te wijten zijn aan de diffractie van sp 3zoals koolstof. Het röntgendiffractiepatroon (XRD) onthult de aanwezigheid van een amorf koolstofframe in CG (rundergelatine) en CA (PHM3-algen). De amorfe structuur kan te wijten zijn aan het bestaan van overvloedige functionele groepen.





Size Distribution by Number











	(dnm)	% intens	siteit St. dev. (dn)
Z -gemiddelde (d.nm): 67	Piek 1 100.1	93,0	45,56
nm	Piek 2 13.13	6.4	3.940
	Piek 3 4.452	0,6	0.7293

Tabel 2 Analysegegevens van deeltjesgrootte van nanodots van CG (rundergelatine)

	Maat (dnm)	% intensiteit	St. dev. (dn)
Z -gemiddelde (d.nm): 59,45	Piek 1 64.36	84.8	28,68
nm	Piek 2 1205	13.6	789,7
	Piek 3 4513	1.6	735.1





3.3 Chemische samenstelling van CG (rundergelatine) en CA (PHM3-algen) nanodots

Oppervlaktechemie en functionele oppervlaktegroepen van CA (PHM3-algen) nanodots en CG (rundergelatine) nanodots werden geanalyseerd door middel van FTIR-analyse. In het geval van CA (PHM3-algen) nanodots (Fig. 7B) is de intensiteit van de piek bij 3286 cm 1 relatief laag, wat aangeeft dat de meeste O-H- en N-H-groepen worden verbruikt in het hydrothermale proces; vergelijkbaar is het geval met pieken bij 2920 cm 1 en 2852 cm 1, de lagere intensiteit van de piek die overeenkomt met carbonylgroepen v (=CO) bevestigt de ontleding van -COOH-bindingen tijdens het hydrothermische proces. De piek op 1636 cm –1wordt geassocieerd met de

rekfrequentie van =CO van aromatische carbonylgroepen, de piek bij 1440 cm -1 is geassocieerd met aromatische CC =bindingen, 🕢 de piek bij 1524 cm -1 is geassocieerd met de trillings- en vervormingsband van N-H, wat aangeeft het bestaan van aminobevattende functionele groepen 🗋 en de piek bij 1370 cm 1 is geassocieerd met C-N- en N-H-groepen, wat de vorming van amidebindingen als gevolg van de dehydratatiereactie tussen carboxyl- en aminogroepen bevestigt. 🕢 In CA (PHM3-algen) nanodots zijn de banden die overeenkomen met C-O aanwezig en worden ze meestal aangetroffen in geoxideerde koolstof, 🛶 vandaar een goede oxidatie van CA (PHM3-algen) nanodots.

In het geval van CG (rundergelatine) nanodots, Fig. 7C , komt de absorptiepiek bij 3446 cm -1 overeen met ν (O–H) en ν (N–H) rektrillingen; deze functionele groepen verbeteren de stabiliteit van koolstof nanodots in waterige media. Een absorptierek met een enigszins lage frequentie wordt waargenomen bij 2076 cm 1 en wordt geassocieerd met C-H-bindingen. De piek bij 1639 cm 1 is geassocieerd met aromatische carbonylgroepen. 42 Evenzo zijn twee prominente pieken die worden waargenomen in CG (rundergelatine) nanodots bij 1464 cm 1 en 1403 cm -1 geassocieerd met amide III C-N-bindingen en C=C-obligaties respectievelijk. Algemene FTIR-resultaten geven aan dat de CG (bovine gelatine) en CA (PHM3algen) nanodots amino-, hydroxyl- en carboxylgroepen op het oppervlak hebben en deze functionele groepen kunnen de belangrijkste bron zijn van oppervlaktetoestanden van deze koolstofnanodots. Vergeleken met CG (rundergelatine) nanodots, zijn er een absorptiepiek bij 3282 cm 1 met verzwakte intensiteit en een extra absorptiepiek bij 1746 cm -1 overeenkomend met =CO-groepen in CA (PHM3-algen) nanodots. Deze resultaten wijzen op de verbeterde oppervlakte-oxidatie van CA (PHM3-algen) nanodots, aangezien tijdens het hydrothermale proces veel peroxylradicalen (HCOO[•]) worden gevormd die zeer goede oxidatiemiddelen zijn. 45 Algenbiomassa bevat een complex mengsel van eiwitten, koolhydraten en lipiden, wat leidt tot de vorming van een grote hoeveelheid peroxylradicalen tijdens het hydrothermale proces, waardoor de oxidatie van het oppervlak toeneemt. Bovendien zijn de pieken in CA (PHM3-algen) nanodots voor de absorptie-intensiteit van N–H en de C–N-groepen sterker, wat aangeeft dat er meer aminogroepen aanwezig zijn in CA (PHM3-algen) nanodots in vergelijking met CG (rundergelatine) nanodots . Aminogroepen creëren een sterk energieniveau vanwege hun verbeterde elektronendonerende eigenschappen, maar het eenzame elektronenpaar in de stikstof van functionele aminogroepen verkleint de energiekloof tussen de HOMO en LUMO voor oppervlaktedomeinen van koolstofnanodots; 46 dus oppervlaktefunctionalisering met deze groepen kan een roodverschuiving veroorzaken in het PL-spectrum van CA (PHM3-algen) nanodots. Van hydroxylgroepen is niet gemeld dat ze een afname van de HOMO-LUMO-kloof veroorzaken; de mogelijke reden zou kunnen liggen in het meer elektronegatieve karakter van zuurstofatomen dan van stikstofatomen en als gevolg daarvan veroorzaakt de elektronische wolkenactiviteit van OH-groepen geen vermindering van de HOMO-LUMOkloof. Carboxylgroepen hebben het minste elektronendonerende vermogen en bijgevolg creëren

deze groepen een klein energieniveau.

Over het algemeen suggereren FTIR-resultaten een verhoogde oppervlakte-oxidatie in CA (PHM3-algen) nanodots en een verhoogde hoeveelheid aminogroepen in CA (PHM3-algen) nanodots in vergelijking met CG (rundergelatine) nanodots; beide factoren kunnen een afname van de HOMO-LUMO-gap a veroorzaken , wat consistent is met de waargenomen roodverschuiving in de PL-spectra van CA (PHM3-algen) nanodots. Op basis van de FTIRresultaten toont Fig. 7D de oppervlaktesamenstelling van CG (rundergelatine) (links) en CA (PHM3-algen) nanodots (rechts) samen met het digitale beeld onder UV-excitatie en laat zien hoe oppervlaktechemie een opmerkelijke impact kan hebben op de PL-eigenschappen.

3.4 Celcytotoxiciteit

De gesynthetiseerde koolstofnanodots, CG (rundergelatine) en CA (PHM3-algen) nanodots, werden getest op hun antiproliferatieve activiteiten tegen HCC1954 (borstkanker) en HCT116 (darmkanker) cellijnen in een 3-daagse SRB-proliferatietest. Fig. 8a en b tonen het dosisafhankelijke effect van CG (bovine gelatine) en CA (PHM3-algen) nanodots op de levensvatbaarheid van borstkanker (HCC1954) en colorectale kanker (HCT116) cellijnen. De GI50 waarden van CG (rundergelatine) nanodots in HCT116- en HCC1954-cellijnen waren respectievelijk 23.860 ± 14.524 (n = 2) ng ml -1 en 8.156 ± 6.596 (n = 2) ng ml -1 . De GI 50 waarden van CA (PHM3-algen) nanodots waren aanzienlijk lager bij 0, 542 \pm 0, 715 (n = 2) ng ml -1 en 0,316 \pm 0,447 (*n* = 2) ng ml -1 voor respectievelijk HCT116- en HCC1954-cellijnen (<u>Tabel 3</u>). De CA (PHM3-algen) nanodots vertonen daarom een 44- en 26-voudige potentie in vergelijking met CG (rundergelatine) nanodeeltjes in HCT116- en HCC1954-cellijnen; in vergelijking met de antikankeractiviteit van sommige gerapporteerde koolstofpunten, hebben zowel CG (bovine gelatine) als CA (PHM3-algen) nanodots een uitstekende groeiremmingsefficiëntie, bijvoorbeeld de GI 50 -waarden van van groene thee afgeleide koolstofnanodots voor MCF-7, MDA-MB-231 en HeLa-cellen waren 1,75, 0,15 en 0,072 mg ml -1, respectievelijk. 🜆 Evenzo verminderden van zwarte peper en gember afgeleide koolstofstippen de levensvatbaarheid van LN229-cellen met 75% bij 2 mg ml -1 en MCF-7 met 64% bij 5 μg ml -1 , respectievelijk 49.50 , terwijl in de huidige studie, zowel CG (rundergelatine) als CA (PHM3-algen) nanodots remden volledig de levensvatbaarheid van zowel HCC 1954- als HCT 116-cellijnen bij ng ml -1 concentraties. In het geval van CG (bovine gelatine) nanodots is er geen verwijzing gemaakt in eerder gerapporteerde gelatine carbon dots **1** over hun antikankeractiviteit. In feite worden de biologische eigenschappen van eiwitten sterk beïnvloed door hun molecuulgewicht, structurele bevestiging, verwerkingsomstandigheden en, nog belangrijker, aminozuursamenstelling. 51 De verschillende aard van gelatine-eiwitten en hun extractiebron kunnen de reden zijn voor het waargenomen gedrag tegen kanker. Hoewel het mechanisme dat de krachtige antiproliferatieve activiteiten van CA (PHM3-algen) en CG (rundergelatine) nanodots onderstreept niet is onderzocht, is in het geval van koolstofnanodots gemeld dat toxiciteit voornamelijk afhangt van het syntheseprotocol en het gebruikte uitgangsmateriaal voor synthese. 52 Er is aangetoond dat hydrolyse van gelatineeiwitten bepaalde bioactieve hydrolysaten produceert met goede antikanker- en antioxiderende eigenschappen; 53 bovendien is er een lijst van biologisch actieve verbindingen die aanwezig

zijn in algen met gerapporteerde antioxiderende eigenschappen en het potentieel om kanker te genezen. A In de huidige studie heeft hydrothermische carbonisatie mogelijk bepaalde bioactieve verbindingen geproduceerd die mogelijk verantwoordelijk zijn voor het verlenen van antikankeractiviteit aan CG (rundergelatine) en CA (PHM3-algen) nanodots. Verder is er een verband gemeld tussen de toxische effecten van van gember en groene thee afgeleide koolstofstippen en een verhoogde ROS-productie. 48.50.55 Vergelijkbare mechanismen kunnen verantwoordelijk zijn voor de antiproliferatieve effecten van CA (PHM3-algen) en CG (rundergelatine) nanodots.



Fig. 8 (a) Antikankeractiviteit van CA (PHM3-algen) (rood) en CG (rundergelatine) (blauw) nanodots tegen HCC 1954-cellijnen en (b) antikankeractiviteit van CA (PHM3-algen) (rood) en CG (rundergelatine) (blauw) nanodots tegen HCT 116-cellijnen.

 Tabel 3 GI50-waarden van CG (rundergelatine) en CA (PHM3-algen) nanodots tegen HCT116- en

HCC1954-cellijnen

mobiele lijn	Koolstof nanodots	GI 50 (ng ml -1)
HCT116	CG (rundergelatine)	$23.860 \pm 14.52 (n = 2)$
	CA (PHM3-algen)	$0,542 \pm 0,715 (n = 2)$
HCC1954	CG (rundergelatine)	8.156 ± 6.596 ($n = 2$)
	CA (PHM3-algen)	$0,316 \pm 0,447 (n = 2)$

3.5 Zeer fluorescerende CG (bovine gelatine) nanodots voor bio-imaging

Omdat CG (bovine gelatine) nanodots een hoge PL-intensiteit vertonen, werden deze nanodots gebruikt voor beeldvormingsexperimenten van *E. coli* en uienepidermale cellen. Fig. 9 toont de fluorescentiebeelden van bacteriën (*E. coli*) die CG (bovine gelatine) nanodots gebruiken in twee verschillende concentraties, *namelijk* 2 mg ml -1 en 4 mg ml -1. De cel geïnternaliseerde koolstof nanodots werden afgebeeld onder helder veld, en blauwe (λ = 450-480 nm) en groene filters (λ = 510-550 nm). In bio-beeldvormingsexperimenten werden bacteriële cellen volledig geïmmobiliseerd op agarosekussentjes, hoewel agarose een onregelmatig oppervlak

vertoonde; agarose interfereert echter niet met het fluorescentiesignaal en maakt een perfecte, consistente, geïmmobiliseerde monolaag van cellen met een gemiddelde tot hoge celdichtheid mogelijk. Bacteriële cellen vertoonden gele fluorescentie onder het blauwe excitatiefilter (λ = 450-480 nm) en rode fluorescentie onder het groene excitatiefilter (λ = 510-550 nm). De fluorescentiebeelden toonden aan dat bacteriële cellen een bolvormige en staafvormige morfologie hebben. Zoals uit de afbeeldingen blijkt, is bij een concentratie van 2 mg ml −1 (Afb. <u>9b en c</u>) er werd een grotere fluorescentie-intensiteit waargenomen vergeleken met de fluorescentie-intensiteit bij een concentratie van 4 mg ml 1 (Fig. 9e en f); de reden hiervoor zou de agglomeratie van CG (gelatine) nanodots in een verhoogde concentratie kunnen zijn waardoor de cellen CG (rundergelatine) nanodots niet efficiënt konden opnemen. Fig. 9gi tonen de controlebeelden en er wordt geen fluorescentiesignaal gedetecteerd onder de blauwe en groene excitatiefilters, wat bevestigt dat de fluorescentie te wijten is aan CG (bovine gelatine) nanodots in plaats van de autofluorescentie van bacteriële cellen. Fig. 10 toont de fluorescentiebeelden van uienepidermis. Fluorescentiebeelden werden genomen onder helderveld, blauw filter (= 450-480 nm) en groen filter (= 510-550 nm). De fluorescentie wordt alleen waargenomen in Fig. 10b en c, wat bevestigt dat de fluorescentie te wijten is aan CG (bovine gelatine) nanodots; bovendien wordt fluorescentie voornamelijk waargenomen in de celwand en in sommige regio's van het cytoplasma van uiencellen, wat erop wijst dat CG (bovine gelatine) nanodots meestal in het celwandgebied werden verspreid, waarbij sommige in het cytoplasma drongen.



Bright fieldBlue excitation filterGreen excitation filterFig. 9 (a-c) Fluorescentiebeelden bij een concentratie van 2 mg ml -1 onder
helder veld en blauwe en groene excitatiefilters. (d-f) Fluorescentiebeelden
bij een concentratie van 4 mg ml -1 onder helder veld en blauwe en groene
excitatiefilters. (g-i) Controlebeelden van bacteriën onder helder veld en
blauwe en groene excitatiefilters verkregen met behulp van een
fluorescentiemicroscoop.



Bright fieldBlue excitation filterGreen excitation filterFig. 10 (a-c) Fluorescentiebeelden van uienepidermis onder helder veld, en
blauwe en groene excitatiefilters verkregen met behulp van een

fluorescentiemicroscoop en (d-f) controlebeelden onder helder veld, en blauwe en groene excitatiefilters.

4. Conclusie

In de huidige studie werden koolstofnanodots gesynthetiseerd door hydrothermische carbonisatie van algenbiomassa van *Pectinodesmus* sp. en type B gelatine-eiwit met rund als natuurlijke bron. CG (bovine gelatine) nanodots werden verder gebruikt voor bio-imagingtoepassingen in bacteriën en uiencellen vanwege hun hoge PL-intensiteiten en hoge fotostabiliteit; bovendien vertoonden zowel CA (PHM3-algen) als CG (rundergelatine) nanodots uitstekende antikankeractiviteit met een zeer lage GI 50waarde voor zowel HCC 1954 als HCT 116 kankercellijnen. De antikankeractiviteit van CA (PHM3-algen) nanodots was hoger dan die van CG (rundergelatine) nanodots. Bovendien suggereerden chemische karakterisering en PLeigenschappen van CA (PHM3-algen) en CG (rundergelatine) nanodots dat de PL-emissie afkomstig kan zijn van de oppervlaktedefecttoestanden van functionele groepen. Deze oppervlaktetoestanden bevatten carboxylgroepen, carbonylgroepen, amide-, hydroxylgroepen en andere geoxygeneerde defecttoestanden en de waargenomen roodverschuiving in het PLspectrum van CA (PHM3-algen) nanodots kan worden gerelateerd aan aminogroepen en een hoge mate van oppervlakteoxidatie, zoals beide factoren kunnen de HOMO-LUMO-kloof verkleinen. Zowel CA (PHM3-algen) als CG (rundergelatine) nanodots zijn veelbelovend voor bioimaging, biomedische en opto-elektronische toepassingen.

Belangenverstrengeling

Er zijn geen conflicten te melden.

Dankbetuigingen

De auteurs zijn zeer verplicht ASAB-NUST voor administratieve en technische ondersteuning, SCME-NUST voor SEM-, FTIR- en XRD-analyse, SNS-NUST voor hydrothermische autoclaven, IESE-NUST voor fluorescentiemicroscopie, SBASSE-LUMS voor SRB-assay en National Institute of Lasers en Optronics/PIEAS voor analyse van fluorescentiespectroscopie. De auteurs zijn ook Ifrah Tahir, Sundus Jabeen Amina en Hasnain Qasim dankbaar voor hun constante steun en hulp.

Referenties

- 1.Q. Liang, W. Ma, Y. Shi, Z. Li en X. Yang, Eenvoudige synthese van sterk fluorescerende koolstofkwantumstippen uit gelatine en hun lichtgevende eigenschappen en toepassingen, *Carbon*, 2013, **60**, 421-428, DOI: 10.1016/j.carbon.2013.04.055
 2.L. Díoz en DHA Pas, Elueroscerende zilveren nanoclusters, nanoschapl. 2011, **2** (5).
 - 2.I. Díez en RHA Ras, Fluorescerende zilveren nanoclusters, *nanoschaal*, 2011, **3** (5), 1963, 10.1039/c1nr00006c.

3.J.-W. Lin, C.-C. Huang en H.-T. Chang, Gouden nanodeeltjessondes voor de detectie van kwik-, lood- en koperionen, *Analyst*, 2011, 136 (5), 863-871 10.1039/c0an00652a.
4.E. Hemmer, N. Venkatachalam en H. Hyodo, *et al.*, Upconverting en NIR-uitzendende op zeldzame aarde gebaseerde nanostructuren voor NIR-bioimaging, *Nanoscale*, 2013, 5 (23), 11339, 10.1039/c3nr02286b.

5.J. Lippincott-Schwartz en GH Patterson, ontwikkeling en gebruik van fluorescerende eiwitmarkers in levende cellen, *wetenschap*, 2003, **300** (5616), 87-

91, DOI: 10.1126/wetenschap.1082520.

6.GW Chin en NP Cahill, Het verschijnen van met fluoresceïne gelabelde lymfocyten in lymfe na in vitro of in vivo labeling: de route van lymfocytrecirculatie door mesenteriale lymfeklieren, *Immunology*, 1984, **52** (2), 341-

347 CAS http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6429037, geraadpleegd op 22 november 2017.

7.O. Scholz, A. Thiel, W. Hillen en M. Niederweis, kwantitatieve analyse van genexpressie met een verbeterd groen fluorescerend eiwit. p6, *euro. J. Biochem.*, 2000, 267 (6), 1565-1570 KruisRef CAS PubMed http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10712585, geraadpleegd op 22 november 2017.

8.M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss en AP Alivisatos, Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels, *Science*, 1998, **281** (5385), 2013-

2016, DOI: 10.1126/wetenschap.281.5385.2013.

9.C. Kirchner, T. Liedl en S. Kudera, *et al.*, Cytotoxiciteit van colloïdale CdSe- en CdSe/ZnS-nanodeeltjes, *Nano Lett.*, 2005, **5** (2), 331-338, DOI: 10.1021/nI047996m.

10.X. Michalet, FF Pinaud en LA Bentolila, *et al.*, Quantum Dots voor levende cellen, in vivo beeldvorming en diagnostiek, *wetenschap*, 2005, **307** (5709), 538-544, DOI: 10.1126/wetenschap.1104274.

11.AP Alivisatos, Halfgeleiderclusters, Nanokristallen en Quantum Dots, *Wetenschap*, 1996, **271** (5251), 933-937, DOI: 10.1126/wetenschap.271.5251.933.

12.SY Lim, W. Shen en Z. Gao, Carbon quantum dots en hun

toepassingen, Chem. Soc. Rev., 2015, 44 (1), 362-381, 10.1039/C4CS00269E.

13.P. Miao, K. Han, Y. Tang, B. Wang, T. Lin en W. Cheng, recente ontwikkelingen in koolstofnanodots: synthese, eigenschappen en biomedische toepassingen, *nanoschaal*, 2015, **7** (5), 1586-1595, 10.1039/c4nr05712k.

14.F. Yuan, S. Li, Z. Fan, X. Meng, L. Fan en S. Yang, Shining carbon dots: synthese en biomedische en opto-elektronische toepassingen, *Nano Today*, 2016, **11** (5), 565-586, DOI: 10.1016/j.nantod.2016.08.006

15.P. Tallury, A. Malhotra, LM Byrne en S. Santra, Nanobio-imaging en detectie van infectieziekten, *Adv. Medicijnafgifte Rev.*, 2010, 62 (4-5), 424-437, DOI: 10.1016/j.addr.2009.11.014

16.L. Zheng, F. Hong, S. Lu en C. Liu, effect van Nano-TiO 2 op de sterkte van natuurlijk verouderde zaden en groei van spinazie, *Biol. Traceer Elem. Onderzoek*, 2005, **104** (1), 083-092, DOI: 10.1385/bter:104:1:083.

17.X. Dong, Y. Su en H. Geng, *et al.*, Snelle eenstapssynthese van N-gedoteerde koolstofstippen door ethanolamine te pyrolyseren, *J. Mater. Chem. C*, 2014, **2** (36), 7477-7481, 10.1039/c4tc01139b.

18.X. Li, S. Zhang, SA Kulinich, Y. Liu en H. Zeng, Engineering oppervlaktetoestanden van koolstofpunten om regelbare luminescentie te bereiken voor vaste-luminescente composieten en gevoelige Be 2+ -detectie, *Sci. Rep.*, 2015, **4** (1),

4976, DOI: 10.1038/srep04976.

19.X. Wang, K. Qu, B. Xu, J. Ren en X. Qu, door microgolven geassisteerde groene synthese in één stap van celdoorlatende meerkleurige fotoluminescente koolstofstippen zonder reagentia voor oppervlaktepassivering, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21** (8), 2445, 10.1039/c0jm02963g. 20.Y.-P. Sun, B. Zhou en Y. Lin, *et al.*, Quantum-Sized Carbon Dots voor heldere en kleurrijke fotoluminescentie, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128** (24), 7756-7757, DOI: 10.1021/ja062677d.

21.SY Lim, W. Shen en Z. Gao, Carbon quantum dots en hun toepassingen, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, 44 (1), 362-381, 10.1039/c4cs00269e.
22.C. Zhu, J. Zhai en S. Dong, Bifunctionele fluorescerende koolstofnanodots: groene synthese via sojamelk en toepassing als metaalvrije elektrokatalysatoren voor zuurstofreductie, *Chem. gemeenschappelijk.*, 2012, 48 (75), 9367, 10.1039/c2cc33844k.
23.L. Wang en HS Zhou, groene synthese van lichtgevende stikstof-gedoteerde

koolstofstippen uit melk en de beeldvormingstoepassing, anaal. Chem. , 2014, **86** , 8902-8905 KruisRef CAS PubMed.

24.BSB Kasibabu, SL D'souza en S. Jha, *et al.*, Eenstapssynthese van fluorescerende koolstofstippen voor het in beeld brengen van bacteriële en

schimmelcellen, Anal. Methoden , 2015, 7 (6), 2373-2378, 10.1039/c4ay02737j.

25.P. Das, M. Bose, S. Ganguly, S. Mondal, AK Das, S. Banerjee en NC Das, Groene benadering van fotoluminescente koolstofstippen voor beeldvorming van gramnegatieve bacteriën *Escherichia coli*, *Nanotechnologie*, 2017, **28** (19), 195501, DOI: 10.1088/1361-6528/aa6714.

26.MO Dekaliuk, O. Viagin, YV Malyukin en AP Demchenko, Fluorescerende koolstof nanomaterialen: "quantum dots" of nanoclusters?, *Phys. Chem. Chem. Fys.*, 2014, **16** (16), 16075-16084, **10.1039/c4cp00138a**.

27.R. Mohd Hafidz, Chemische en functionele eigenschappen van runder- en varkenshuidgelatine, *Int. Voedsel res. J.*, 2011, **18**, 813-817 Zoeken in PubMed https://pdfs.semanticscholar.org/2d56/a099d38741e9a4053b8f97296d37dca61

482.pdf, geraadpleegd op 14 december 2017.

28.S. Choonpicharn, S. Jaturasitha, N. Rakariyatham, N. Suree en H. Niamsup, Antioxidant en antihypertensieve activiteit van gelatinehydrolysaat van Nile tilapia skin, *J. Food Sci. technologie.*, 2015, **52** (5), 3134-3139, DOI: 10.1007/s13197-014-1581-6.

29.HHA El Baky en GS El-Baroty, gezond voordeel van bioactieve microalgen, *Journal of Aquatic Science*, 2013, **1** (1), 11-22, DOI: 10.12691/jas-1-1-3.

30.M. Khalid, N. Khalid, I. Ahmed, R. Hanif, M. Ismail en HA Janjua, vergelijkende studies van drie nieuwe zoetwatermicroalgenstammen voor de synthese van zilveren nanodeeltjes: inzichten in karakterisering, antibacteriële, cytotoxiciteit en antivirale activiteiten, *J. toepassing Fycol.*, 2017, 29 (4), 1851-1863, DOI: 10.1007/s10811-017-1071-0.
31.SO Skinner, LA Sepúlveda, H. Xu en I. Golding, Het meten van het aantal mRNA-kopieën in individuele *Escherichia coli* -cellen met behulp van fluorescente in situhybridisatie met één molecuul, *Nat. Protoc.*, 2013, 8 (6), 1100-

1113, DOI: 10.1038/nprot.2013.066.

32.P. Dubey, KM Tripathi, R. Mishra, A. Bhati, A. Singh en SK Sonkar, een eenvoudige eenstaps hydrothermische route naar wateroplosbaarheid van koolstofkwantumdots van soja-nuggets voor beeldvormingstoepassingen, *RSC Adv.*, 2015, **5** (106), 87528-87534, **10.1039/c5ra14536h**.

33.P. Song, L. Zhang en H. Long, *et al.*, Een multianalyt fluorescerend meetsysteem voor koolstofstippen, geconstrueerd op basis van specifieke herkenning, *RSC Adv.*, 2017, **7** (1), 28637-28646, **10.1039/c7ra04122e**.

34.S. Saxena, TA Tyson, S. Shukla, E. Negusse, H. Chen en J. Bai, Onderzoek naar structurele en elektronische eigenschappen van grafeenoxide, *Appl. Fys. Let.*, 2011, **99** (1), 3-6, DOI: 10.1063/1.3607305.

35.W. Kwon, S. Do, J.-H. Kim, M. Seok Jeong en S.-W. Rhee, controle van fotoluminescentie van koolstofnanodots via oppervlaktefunctionalisatie met behulp van para-gesubstitueerde anilines, *Sci. Rep.*, 2015, **5** (1), 12604, DOI: 10.1038/srep12604.

36.B. De en N. Karak, Een groene en gemakkelijke benadering voor de synthese van in water oplosbare fluorescerende koolstofstippen uit bananensap, *RSC Adv.*, 2013, **3** (22), 8286, **10.1039/c3ra00088e**.

37.KM Tripathi, A. Bhati en A. Singh, *et al.*, Van de traditionele manier van pyrolyse tot afstembare fotoluminescente in water oplosbare koolstof-nano-uien voor celbeeldvorming en selectieve detectie van glucose, *RSC Adv.*, 2016, 6 (44), 37319-37329, 10.1039/c6ra04030f.

38.JCG Esteves da Silva en HMR Gonçalves, analytische en bioanalytische toepassingen van koolstofstippen, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2011, **30** (8), 1327-

1336, DOI: 10.1016/j.trac.2011.04.009.

39.S. Mohapatra, S. Sahu, N. Sinha en SK Bhutia, Synthese van een op koolstof-dot gebaseerde fotoluminescente sonde voor selectieve en ultragevoelige detectie van Hg 2+ in water en levende cellen, *Analyst*, 2015, **140** (4), 1221–1228,

10.1039/c4an01386g .

40.S. Zhu, Q. Meng en L. Wang, *et al.*, Zeer fotoluminescente koolstofpunten voor meerkleurige patronen, sensoren en bio-imaging, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2013, **52** (14), 3953–3957, DOI: 10.1002/anie.201300519.

41.SS Jones, P. Sahatiya en S. Badhulika, One step, high yield synthese van amfifiele koolstofkwantumstippen afgeleid van chiazaden: een solvatochrome studie, *New J. Chem.*, 2017, **41** (21), 13130-13139, **10.1039/c7nj03513f**.

42.RR Gaddam, D. Vasudevan, R. Narayan en KVSN Raju, controleerbare synthese van biosourced blauwgroene fluorescerende koolstofstippen van kamfer voor de detectie van zware metaalionen in water, *RSC Adv.*, 2014, **4** (100), 57137-57143,

10.1039/c4ra10471d .

43.C. Zhang, Y. Xiao en Y. Ma, *et al.*, Algenbiomassa als een voorloper voor de synthese van stikstof- en zwavel-co-gedoteerde koolstofstippen: een betere sonde in Arabidopsisbewakingscellen en wortelweefsels, *J. Photochem. Fotobiol., B*, 2017, **174**, 315-

322, DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2017.06.024.

44.S. Lu, S. Guo en P. Xu, *et al.*, Hydrothermische synthese van met stikstof gedoteerde koolstofstippen met real-time live-celbeeldvorming en penetratiemogelijkheden voor bloed-hersenbarrières, *Int. J. Nanomed.*, 2016, **11**, 6325–6336, DOI: 10.2147/ijn.s119252.

45.Z. Zhang, Y. Pan, Y. Fang, L. Zhang, J. Chen en C. Yi, Tuning fotoluminescentie en oppervlakte-eigenschappen van koolstof nanodots voor chemische detectie, *Nanoscale*, 2016, **8** (1), 500-507, 10.1039/c5nr06534h.

46.T.-T. Zhang, J.-F. Jia en H.-S. Wu, Substituent en oplosmiddeleffecten op elektronische structuur en spectrale eigenschap van ReCl (CO) 3 (N \land N) (N \land N = Glyoxime): DFT en TDDFT theoretische studies, *J. Phys. Chem. A*, 2010, **114** (46), 12251-12257, DOI: 10.1021/jp104458u.

47.SH Jin, DH Kim, GH Jun, SH Hong en S. Jeon, het afstemmen van de fotoluminescentie van grafeen Quantum Dots door het ladingsoverdrachtseffect van functionele groepen, *ACS Nano*, 2013, **7** (2), 1239-1245, DOI: 10.1021/nn304675g.

48.P.-C. Hsu, P.-C. Chen, C.-M. Ou, H.-Y. Chang en H.-T. Chang, Extreem hoge remmingsactiviteit van fotoluminescente koolstofnanodots in de richting van kankercellen, *J. Mater. Chem. B*, 2013, **1** (13), 1774, 10.1039/c3tb00545c.

49.N. Vasimalai, V. Vilas-Boas en J. Gallo, *et al.*, Groene synthese van fluorescerende koolstofstippen van kruiden voor in vitro beeldvorming en remming van tumorcelgroei, *Beilstein J. Nanotechnol.*, 2018, 9 (1), 530-544, DOI: 10.3762/bjnano.9.51.
50.VJ Sawant en SR Bamane, antioxidant, katalytisch reducerende en antikanker eigenschappen van hydrothermisch groene gesynthetiseerde gember afgeleide koolstof nanodots, *Asian Journal of Organic & Medicinal Chemistry*, 2016, 1 (4), 112-

117, DOI: 10.14233/ajomc.2016.AJOMC-P34.

51. JE Kinsella, eiwitstructuur en functionele eigenschappen: emulgering en smaakbindende effecten, 1982, blz. 301-326, DOI: 10.1021/bk-1982-0206.ch012.
52. P. Pierrat, R. Wang en D. Kereselidze, et al., Efficiënte in vitro en in vivo pulmonale afgifte van nucleïnezuur door op koolstofpunten gebaseerde nanodragers, Biomaterials, 2015, 51, 290-302, DOI: 10.1016/j.biomaterialen.2015.02.017.

53.A. Alemán, E. Pérez-Santín, S. Bordenave-Juchereau, I. Arnaudin, MC Gómez-Guillén en P. Montero, Squid-gelatinehydrolysaten met antihypertensieve, kankerbestrijdende en antioxiderende werking, *Food Res. Int.*, 2011, **44** (4), 1044-

1051, DOI: 10.1016/j.foodres.2011.03.010.

54.H. Admassu, W. Zhao, R. Yang, MAA Gasmalla en E. Alsir, ontwikkeling van functionele voedingsmiddelen: zeewier (algen) ongerept potentieel en alternatieve hulpbronnen - een overzicht, *International Journal of Scientific & Technology Research*, 2015, 4 (9), 108–115 Zoeken in PubMed. Opgehaald van http://www.ijstr.org.
55.C.-L. Li, C.-M. Ou en C.-C. Huang, *et al.*, Koolstofstippen bereid uit gember die een efficiënte remming van menselijke hepatocellulaire carcinoomcellen vertonen, *J. Mater. Chem. B*, 2014, 2 (28), 4564, 10.1039/c4tb00216d.