

Universitatea „Al. I. Cuza“ Iași
Facultatea de Fizică

În atenția:

Vă facem cunoscut că în data de 20.09.2025, ora 11.00, în sala Cristian Eenăchescu, **doamna Ramona Mirela – Plesnicute** va susține în ședință publică teza de doctorat intitulată „**Nanoparticule de argint cu aplicații în biomedicină**”, în vederea obținerii titlului științific de Doctor în domeniul fundamental Științe exacte, domeniul Fizică.

Comisia de doctorat are următoarea componență:

Președinte
Prof.dr.Diana Mihaela MARDARE

Conducător științific
Prof. dr. habil. Dorina - Emilia CREANGĂ
Universitatea „Alexandru Ioan Cuza“ Iași, Facultatea de Fizică

Referenți
Prof.dr.habil. Cristina STAN, Universitatea Politehnica, Facultatea de Științe Aplicate, București
Conf.dr.habil. Lăcrămioara Anca OPRICĂ, Universitatea „Alexandru Ioan Cuza“ Iași, Facultatea de Biologie
CS II Daniel Dumitru HEREA, Institutul Național de Cercetare și Dezvoltare pentru Fizică Tehnică, Iași

Vă invităm să participați la ședința publică de susținere a tezei

CUPRINS

Introducere	4
<i>CAPITOLUL I. Materiale și metode utilizate în studiul sintezei, caracterizării microstructurale și optice precum și a determinării activității antimicrobiene a nanoparticulelor de argint</i>	9
I.1.Reactivii chimici și biologici, ustensilele de lucru folosite pentru procedurile de sinteză	9
I.2. Metoda sintezei prin reducere chimică cu citrat de sodiu	9
I.3. Protocoalele de sinteză cu reducători biologici (extract de ceai verde, lămâie, afine, mure	10
I.4. Expunerea la radiații ultraviolete a probelor de AgNP în suspensie	12
I.5. Caracterizarea activității reducătoare a extractelor de plante utilizate	12
I.6. Metoda spectrofotometrică de monitorizare a proprietăților plasmonice ale nanoparticulelor de argint	13
I.7. Metoda optică de vizualizare microscopică în câmp întunecat a emisiilor plasmonice ale AgNP	14
I.8. Metoda microscopiei electronice de scanare (SEM) pentru vizualizarea AgNP	14
I.9. Tehnica difracției radiațiilor X pentru studierea proprietăților de cristalinitate ale AgNP	15
I.10. Determinarea diametrului hidrodinamic și a stabilității suspensiilor coloidale de AgNP	15
I.11. Determinarea activității antimicrobiene	15
I.11.1. Metoda difuzimetrică	15
I.11.2. Tehnica timpului de omorâre (kill-time assay)	16
<i>CAPITOLUL II. Studiul comparativ al sintezei nanoparticulelor de argint prin reducere chimică cu citrat de sodiu și reducere biologică cu extract de ceai verde</i>	17
II.1. Rezultatele aplicării metodei Turkevich pentru sinteza chimică și a protocolului pentru sinteza biologică cu extract de ceai verde a AgNP.	17
II.2. Rezultatele analizei spectrale	18
II.3. Rezultatele analizei microstructurale	21
II.4. Rezultatele analizei elementale	22
II.5. Concluzii	24

<i>CAPITOLUL III. Studiul influenței expunerii la radiații ultraviolete asupra sintezei de AgNP</i>	25
III.1. Sinteza fotochimică prin reducere cu citrat trisodic și expunere la ultraviolete	26
III.2. Sinteza cu extract de lămâie și expunere la radiații ultraviolete	26
III.3. Rezultatele analizei microstructurale	27
III.4. Rezultatele analizei proprietăților de cristalinitate	28
III.5. Rezultatele investigațiilor spectrale și optice	29
III.6. Concluzii	33
<i>CAPITOLUL IV. Studiul comparativ al rezultatelor sintezei de AgNP cu diferiți reducători biologici – extract de lămâie, ceai verde, afine și mure. Determinarea activității antimicrobiene</i>	34
IV.1. Rezultatele determinării activității antioxidante a reducătorilor biologici	34
IV.2. Rezultatele analizei spectrale	36
IV.3. Rezultatele analizei prin microscopie optică în câmp întunecat	38
IV.4. Rezultatele analizei prin XRD	39
IV.5. Rezultatele analizei diametrului hidrodinamic și a potențialului Zeta	41
IV.6. Rezultatele determinării activității antimicrobiene	44
IV.6.1. Rezultatele aplicării metodei difuzimetrice pentru determinarea activității antimicrobiene a suspensiilor de AgNP	44
IV.6.2. Rezultatele aplicării metodei timpului de omorâre (<i>kill-time assay</i>) pentru determinarea activității antimicrobiene a suspensiilor de AgNP	46
IV.7. Concluzii	
Bibliografie selectivă	51
CONCLUZII GENERALE	53
Lista comunicărilor științifice și a articolelor publicate	55

Introducere

Studiile medicale actuale explorează noi posibilități de folosire a cunoștințelor și instrumentelor nanotehnologiei pentru prevenirea, tratamentul, diagnosticarea și controlul diferitelor boli. Utilizarea nanoparticulelor de argint cu diametre cuprinse între 1 și 100 nm prezintă un interes sporit datorită proprietăților lor unice bactericide, suprafeței totale mari raportată la volumul total, care permite atașarea multor tipuri de liganzi pentru funcționalizarea suprafeței acestora. Datorită proprietăților sale antimicrobiene, argintul a fost utilizat din antichitate pentru tratamentul și vindecarea diferitelor afecțiuni. Cu toate acestea, dezvoltarea tehnologiilor și o mai bună înțelegere a mecanismelor de acțiune ale argintului în prevenirea bolilor prin distrugerea microorganismelor au deschis ușa către utilizarea sa în nanomedicină. În această teză, la baza opțiunii de a studia sinteza biologică cu extracte vegetale a nanoparticulelor de argint, cu un randament bun și o toxicitate redusă, a stat posibilitatea obținerii unor efecte antimicrobiene semnificative, prin mecanisme de acțiune specifice.

Lucrarea de doctorat cu titlul „Nanoparticule de argint cu aplicații în biomedicină” este structurată în patru capitole, plus partea de introducere și partea de concluzii finale. Cele trei obiective ale tezei sunt următoarele:

Studiul comparativ al sintezei de nanoparticule de argint prin reducerea ionilor de argint cu reactivi chimici, în paralel cu sinteza prin intermediul reducătorilor naturali;

Studiul influenței radiațiilor ultraviolete asupra probelor de nanoparticule de argint (AgNP) sintetizate chimic dar și a particulelor de argint prietenoase cu mediul, cu propunerea unui protocol experimental în două etape – reducerea termică și fotoreducerea;

Studiul comparativ al eficienței diferitelor extracte vegetale (lămâie, ceai verde, afine, mure) pentru reducerea ionilor de argint, evidențierea proprietăților microstructurale

și optice a probelor de AgNP, precum și determinarea activității antimicrobiene prin două tehnici specializate.

Introducerea cuprinde două părți – sinteza, caracterizarea și aplicațiile biomedicale ale nanoparticulelor de argint; direcțiile actuale de cercetare. Partea axată pe sinteza nanoparticulelor de argint analizează succint metodele fizice, chimice și biologice de obținere a AgNP. Caracterizarea nanoparticulelor de argint include determinarea dimensiunii și formei, încărcării electrice, conductivității electrice și punctului de topire, proprietăților optice și proprietăților biologice (activitatea antimicrobiană, activitatea antifungică, activitatea antivirală, activitatea antitumorală).

Capitolul I prezintă materialele și metodele utilizate în studiul sintezei, caracterizării microstructurale și optice precum și a determinării activității antimicrobiene a nanoparticulelor de argint, cuprinzând 11 subcapitole care se referă la: *Reactivii chimici și biologici* utilizați, *ustensilele și dispozitivele* de lucru folosite pentru procedurile de sinteză; *Metoda de sinteză* prin reducere chimică cu citrat de sodiu; *Protocoloalele de sinteză cu reducători biologici* (reducerea cu extract de ceai verde, reducerea cu extract de lămâie, reducerea cu extract de afine și mure); *Expunerea la radiații ultraviolete* a probelor de AgNP în suspensie; *Caracterizarea activității reducătoare* a extractelor de plante utilizate; *Metoda spectrofotometrică de monitorizare* a proprietăților plasmonice ale nanoparticulelor de argint; *Metoda optică de vizualizare microscopică* în câmp întunecat a emisiilor plasmonice ale AgNP; *Metoda microscopiei electronice de scanare* (SEM) pentru vizualizarea AgNP; *Tehnica difracției radiațiilor X* pentru studierea proprietăților de cristalinătate ale AgNP; *Determinarea diametrului hidrodinamic și a stabilității* suspensiilor coloidale de AgNP; *Determinarea activității antimicrobiene* (metoda difuzimetrică și tehnica timpului de omorâre).

Capitolul II este un studiu comparativ al sintezei nanoparticulelor de argint prin reducere chimică cu citrat de sodiu și prin reducere biologică cu extract de ceai verde, și cuprinde la rândul său cinci subcapitole care conțin: *Rezultatele aplicării metodei Turkevich* pentru sinteza chimică și a protocolului pentru sinteza biologică cu extract de ceai verde a AgNP; *Rezultatele analizei spectrale*; *Rezultatele analizei microstructurale*; *Rezultatele analizei elementale* și *Concluzii*. Rezultatele prezentate evidențiază eficiența metodei de sinteză biologică cu extract de ceai verde. Utilizarea reducătorilor naturali, polifenoli, flavone și altele conferă o mai mare biocompatibilitate suspensiei de nanoparticule de argint și asigură protecția mediului, reducând posibilele efecte citotoxice.

Capitolul III este destinat studiului influenței expunerii la radiații ultraviolete asupra sintezei de AgNP, și conține cinci subcapitole ce se ocupă de: *Sinteza fotochimică* prin reducere cu citrat trisodic și expunere la radiații ultraviolete; *Sinteza cu extract de lămâie* și expunere la radiații ultraviolete; și caracterizarea acestora prin: *Rezultatele analizei microstructurale*; *Rezultatele analizei proprietăților de cristalinitate*; *Rezultatele investigațiilor spectrale și optice*. La partea de concluzii, se subliniază faptul că radiațiile UV-C influențează sinteza chimică cu citrat trisodic, ca și pe cea biologică cu extract de lămâie, în condițiile în care modificările au fost evidențiate prin investigații spectrale și de microscopie optică în câmp întunecat.

Capitolul IV prezintă studiul comparativ al rezultatelor sintezei de AgNP cu diferiți reducători biologici (extract de lămâie, ceai verde, afine și mure) pentru aplicații în microbiologie și include 6 subcapitole și concluzii, respectiv: *Rezultatele determinării activității antioxidante* a reducătorilor biologici; *Rezultatele analizei spectrale*; *Rezultatele analizei prin microscopie optică în câmp întunecat*; *Rezultatele analizei prin XRD*; *Rezultatele*

determinării diametrului hidrodinamic și a potențialului Zeta; Rezultatele determinării activității antimicrobiene (rezultatele aplicării metodei difuzimetrice pentru determinarea activității antimicrobiene a suspensiilor de AgNP și rezultatele aplicării metodei timpului de omorâre – kill-time assay – pentru determinarea activității antimicrobiene a suspensiilor de AgNP). Concluziile subliniază faptul că nanoparticulele de argint sintetizate cu reducători naturali din extracte vegetale sunt adecvate pentru aplicații biomedicale, din punct de vedere al granularității - de ordinul zecilor de nanometri și al stabilității suspensiilor de AgNP. Stabilitatea suspensiilor de nanoparticule de argint s-a dovedit a fi asigurată de repulsia predominant sterică în cazul probelor de AgNP-lămâie și AgNP-ceai verde; pentru suspensiile de AgNP sintetizate cu fructe de pădure, învelișul molecular mai bogat în ioni negativi asigură și o componentă semnificativă de respingere electrostatică.

CAPITOLUL I. Materiale și metode utilizate în studiul sintezei, caracterizării microstructurale și optice precum și a determinării activității antimicrobiene a nanoparticulelor de argint

I.1. Reactivii chimici și biologici, ustensilele de lucru folosite pentru procedurile de sinteză

Pentru sinteza biologică s-au utilizat atât azotatul de argint și citratul trisodic dihidrat, cât și extracte vegetale din fructe proaspete (lămâie, afine, mure) sau din frunze uscate de ceai verde. Reactivii chimici și biologici au fost cântăriți, iar suspensiile apoase au fost obținute prin agitarea magnetică a soluțiilor apoase pe o plită încălzită electric și controlată cu ajutorul unui termometru.

Pentru separarea materialului biologic s-au folosit filtre de hârtie poroasă, iar centrifugarea extractelor de lămâie a fost realizată cu ajutorul unei centrifugi de mare viteză, la 15000 rot/min.

I.2. Metoda sintezei prin reducere chimică cu citrat de sodiu

Sinteza chimică a AgNP s-a realizat aplicând metoda lui Frens de sinteză a nanoparticulele de aur (Kimling și colab., 2006). Mai exact 5 mL de citrat trisodic dihidrat (TSC) 1% s-au adăugat la 50 mL de AgNO_3 0,001 M.

Pentru a obține concentrația de 0,001M a azotatului de argint s-au dizolvat 0,0084 g AgNO_3 în 50 mL apă distilată. Amestecul s-a supus încălzirii la aproximativ 85 °C sub agitare magnetică (700 rpm) până când lichidul s-a colorat și a devenit galben pal (Figura I.1.).

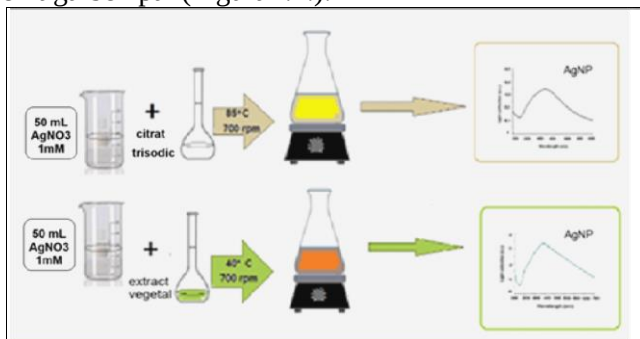
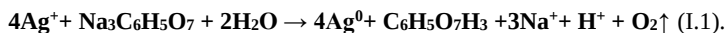


Figura I.1. Schema procedeei de sinteză de nanoparticule de argint prin metoda chimică și metoda biologică (după Plesnicute și colab., 2023).

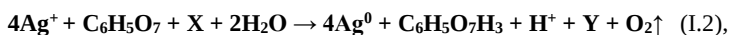


Reacția (1) arată că odată cu reducerea argintului se produce și disocierea ionilor de sodiu precum și degajarea de oxigen molecular.

I.3. Protocoalele de sinteză cu reducători biologici (extract de ceai verde, lămâie, afine, mure

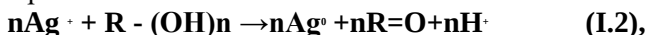
I.3.1. *Reducerea cu extract de lămâie* s-a realizat prin sinteza biologică după metoda lui Dhulappanavar și colab., (2011). Am procedat la extragerea sucului din fructe

proaspete de lămâie, și centrifugarea acestuia la 5000 rpm timp de 15 minute pentru a separa fibrele de lichidul supernatant – soluția complexă de antioxidanți. Un volum de 12,5 mL din supernatantul obținut a fost utilizat pentru reducerea argintului din 50 mL de soluție de 1 mM AgNO₃. Amestecul a fost încălzit la 80 °C sub agitare magnetică (800 rpm) până la schimbarea culorii spre maroniu. Reducerea argintului cu antioxidanți din fructe de lămâie poate fi descrisă calitativ astfel:



unde C₆H₅O₇ este acidul citric, X este un alt antioxidant din sucul de lămâie (din clasa polifenolilor, a flavonelor etc) care susține reducerea ionilor de argint și care se transformă în forma sa oxidată, Y.

I.3.2. *Reducerea cu extract de ceai verde* s-a realizat conform metodei lui (Nakhjavani și colab., 2017), prin care 7g de frunze uscate de ceai verde au fost zdrobite într-un mojar de granit și hidratate cu 400 mL apă distilată într-un balon Erlenmeyer. Amestecul a fost încălzit timp de 50 min la aproximativ 60 °C și apoi fiert încă 10 minute. Între timp, s-a preparat o soluție de 1 mM din 0,0084 g de AgNO₃ în 50 mL de apă distilată, la care s-a adăugat 5 mL din extractul de ceai verde la temperatura camerei. Amestecul a fost încălzit 5 minute la 40 °C în condiții de agitare magnetică la 700 de rotații pe minut. După ce amestecul a fost lăsat să se răcească la temperatura camerei, s-a produs o schimbare a culorii de la galben la cafeniu, indicând formarea de nanoparticule de argint. Reacția generală de reducere a ionilor de argint de către componentele fenolice din ceaiul verde este:



unde R este o grupare fenil care se oxidează, iar n este numărul de grupări hidroxil oxidate de argintul ionic (care se reduce).

I.3.3. *Reducere cu extract de afine și cu extract de mure* s-a realizat după metoda lui *Li și colab., (2017)*, și a lui *Kumar și colab., (2017)*. Pentru reducerea ionilor de argint s-a folosit un extract proaspăt de afine (5 g) și respectiv de mure (5 g). La 5 mL din extractul de fructe (realizat la 60 °C în 50 mL apă distilată și prezentând culoare roșiatică), a fost adăugat 50 mL AgNO₃ (1 mM) și amestecul a fost supus încălzirii la 60 °C sub agitare magnetică la 700 rpm, timp de 60 min, până când s-a obținut virarea colorației amestecului către o nuanță de culoare portocalie.

I.4. Expunerea la radiații ultraviolete a probelor de AgNP în suspensie

Pentru eficientizarea sintezei cu extract de lămâie s-a procedat la iradierea cu radiații ultraviolete. Expunerea la radiații UV a probelor de AgNP în suspensie s-a realizat cu ajutorul unei lămpi UV-C, ce emite la 253,7 nm lungime de undă și puterea 30 W. Tubul are o lungime $L = 0,87$ m iar distanța de la tub la probă a fost $D = 0,25$ m. Proba care conținea 10 mL de suspensie de AgNP într-un vas Petri neacoperit cu diametrul de 3 cm a fost plasată sub tubul de UV-C, la distanța D . Timpul de expunere a probei a fost de la 10 până la 30 min, astfel că energia absorbită de probă a variat între 3,5 și 11,5 J (rel. (I.3)). Pentru a preîntâmpina încălzirea probei s-au făcut pauze de câte 10 minute:

$$E = I \times S \times t \quad (\text{I.3})$$

I este iradianța dată de formula lui Keitz, S fiind suprafața vasului în care se află proba iar t este durata iradierii (rel. I.4):

$$P = 2\pi DLI / (2\alpha + \sin 2\alpha) \quad (\text{I.4})$$

D fiind distanța de la centrul lămpii la probă, P este puterea lămpii în UV-C, L este lungimea lămpii, α este jumătatea unghiului (în radiani) sub care se vede lampa din centrul probei ($\tan \alpha = L/2D$).

I.5. Caracterizarea activității reducătoare a extractelor de plante utilizate

Pentru prepararea extractelor de fructe s-au folosit 80% metanol și aproximativ 0,02 g de probe de fructe uscate care au fost omogenizate în solvent. După agitarea magnetică timp de 30 de min, preparatul a fost supus centrifugării la 3000 rpm timp de 15 min. Supernatantul a fost păstrat la 4 °C, pentru a fi ulterior folosit.

I.5.1. *Determinarea conținutului total de polifenoli* a constat în amestecarea extractului vegetal cu reactivul Folin-Ciocalteu prin agitare continuă și adăugarea, după 4 minute, a carbonatului de sodiu, Na_2CO_3 , 15%. Absorbanța soluției de culoare albastră care rezultă se citește după două ore la 765 nm, față de martor (apă distilată), utilizând o curbă de etalonare care dă absorbanța ca funcție de concentrația unei soluții standard de acid galic.

I.5.2. *Determinarea conținutului total de flavone* s-a determinat urmând o metodă spectrofotometrică - *Dewanto și colab., (2002)*. În extractul vegetal dispersat în metanol și apă distilată se adăugă o soluție de azotit de sodiu, NaNO_2 5% în fiecare eprubetă. La cinci minute se adăugă soluție 10% de clorură de aluminiu, $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ și apoi, la șase minute, se adăugă hidroxid de sodiu, NaOH 1,0 M; apoi se completează cu apă. Pentru soluția rezultată (de culoare roz), s-a obținut un maxim de absorbanță la 510 nm. S-a utilizat o curbă de etalonare care dă absorbanța luminii ca funcție de concentrația unei soluții standard de catechină.

I.5.3. *Capacitatea de captare a radicalilor liberi DPPH* (α , α -difenil- β -picrilhidrazil) – activitatea antioxidantă totală s-a determinat cu ajutorul metodei spectrofotometrice a lui *Molyneux (2004)*. S-a preparat o soluție de DPPH 0,1 mM în metanol și s-a folosit cât timp era proaspătă, și anume, 2 mL din această soluție s-au amestecat cu 20 μL de extract metanolic din fiecare dintre eșantioanele vegetale. Soluția martor a conținut DPPH în 80% metanol.

Scăderea absorbantei produsului format, albastru-violet, s-a determinat după 20 min la 517 nm și procentul (%) de activitate de inhibare s-a calculat folosind următoarea formulă (I.5):

$$\% \text{ InhibareDPPH} = (1 - A_E / A_0) \times 100 \quad (\text{I.5})$$

unde A_E este absorbanta probei cu extract iar A_0 este absorbanta soluției de DPPH în metanol.

I.6. Metoda spectrofotometrică de monitorizare a proprietăților plasmonice ale nanoparticulelor de argint

Analizele noastre au sugerat faptul că, prin comparație cu sinteza chimică, AgNP obținute prin sinteza biologică, au prezentat o creștere a intensității benzii de absorbție, până la finalizarea procesului de nucleație, în mediul de reacție cu reducători biologici. Pe de altă parte, rezultatul acestui proces s-a concretizat în deplasarea poziției benzii către lungimi de undă mai mari decât în cazul AgNP sintetizate chimic.

I.7. Metoda optică de vizualizare microscopică în câmp întunecat a emisiilor plasmonice ale AgNP

Nanoparticulele de argint prezintă proprietatea de emisie luminoasă datorită rezonanței plasmonice în lumina vizibilă. Această proprietate a nanoparticulelor de argint permite vizualizarea lor prin microscopie optică în tehnica de câmp întunecat.

Deși nanoparticulele de argint sunt imposibil de observat într-un microscop optic în câmp luminos, efectul de emisie plasmonică a AgNP în vizibil permite observarea lor prin microscopia în câmp întunecat, căci acestea apar ca niște spoturi luminoase cu dimensiune micrometrică, a căror dimensiune este cu două ordine de mărime mai mare decât dimensiunea nanoparticulelor.

Pentru determinarea dimensiunii medii a nanoparticulelor de argint s-a utilizat softul ImageJ, cu ajutorul căruia s-au măsurat diametrele a peste 100 de

nanoparticule plasmonice pentru care s-a obținut o histogramă de distribuție a dimensiunilor diametrelor. Dimensiunea mediană a nanoparticulelor se poate obține din fitarea lognormală a histogramei, permițând și determinarea deviației standard, prin utilizarea unui software Origin 2018.

I.8. Metoda microscopiei electronice de scanare (SEM) pentru vizualizarea AgNP

Tehnica EDAX a permis identificarea precisă a elementelor chimice ce se găsesc la suprafața probelor, putând efectua o analiză cantitativă a zonei din imaginea analizată. S-au efectuat analize de compoziție elementală prin EDAX. pe zone selectate din fiecare probă.

Pentru prelucrare, fondul spectrelor a fost selectat manual, iar software-ul TEAMS a fost folosit pentru măsurători cu calcularea automată a compoziției chimice în procente relative pentru principalele elemente detectabile din probe.

I.9. Tehnica difracției radiațiilor X pentru studierea proprietăților de cristalinătate ale AgNP

Structura nanoparticulelor metalice cristaline, analizate prin penetrarea razelor X în material, a condus la obținerea unui model de difracție care arată că s-au format structuri cristaline. Maximele de difracție pentru argint au fost identificate ca fiind conforme standardelor JCPDS nr. 19-0629, care denotă cristalizarea cubică a nanoparticulelor de argint.

I.10. Determinarea diametrului hidrodinamic și a stabilității suspensiilor coloidale de AgNP

S-a efectuat măsurarea diametrului hidrodinamic și a potențialului Zeta cu analizorul de dimensiuni a particulelor submicronice.

Diametrul hidrodinamic al nanoparticulelor determinat prin DLS (dynamic light scattering) este în general mai mare decât dimensiunea particulei măsurate prin microscopie

electronică, datorită formării stratului dublu de solvent (în cazul nostru, solventul este apă) în jurul unei particule.

De asemenea, potențialul Zeta se măsoară la nivelul stratului dublu și indică gradul de stabilitate al suspensiei de nanoparticule.

I.11. Determinarea activității antimicrobiene

Activitatea antimicrobiană a AgNP a constat în aplicarea a două metode diferite, și anume, metoda difuzimetrică și tehnica timpului de omorâre.

I.11.1. Metoda difuzimetrică

Metoda difuzimetrică a constat în pregătirea de suspensii bacteriene echivalente cu etalonul standard 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ ufc/mL - ufc=unități formatoare de colonii) din germenii standard *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram pozitiv) și *Escherichia coli* ATCC25922 (Gram negativ). Suspensiile s-au etalat prin ștergere cu un tampon de exudat pe suprafața mediului de cultură solidificat Mueller Hinton-Agar (Oxoid), distribuit inițial în plăci Petri sterile. Ulterior, s-au repartizat discuri de hârtie de filtru sterile (Ø6 mm), peste care s-a pipetat 10 μ L de suspensie de AgNP, cu ajutorul unei pipete automate. După ce plăcile s-au incubat 24 ore la 37 °C, s-a determinat diametrul zonelor de inhibiție a creșterii microbiene ce apar ca translucide pe fond opac. Măsurătorile s-au repetat de trei ori, iar rezultatele obținute au fost exprimate ca valori medii și cu deviațiile standard.

I.11.2. Tehnica timpului de omorâre (kill-time assay)

Tehnica timpului de omorâre (kill-time assay, Sim et al., 2014) se referă la determinarea activității bactericide în cazul nostru - pe tulpini *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC25922. Din culturile de 24 ore s-au realizat suspensii cu o densitate celulară de $1,5 \times 10^8$ celule/mL. În tuburi Eppendorf sterile s-a distribuit 0,9 mL suspensie microbiană și 0,1 mL suspensie de nanoparticule de AgNP (sintetizate cu afine=A, cu ceai verde=C, cu lămâie=L,

cu mure=M). La timpii de evaluare prestabiliți (T0 - cultură martor; T1-6 ore; T2-12 ore, T3-24 ore, T4-48 ore, T5-72 ore), s-au prelevat câte 100 μ L suspensie bacteriană tratată cu AgNP și s-a repartizat în plăci Petri sterile peste care s-a adăugat mediul de cultură Mueller-Hinton Agar (Oxoid), topit și răcit la 45 °C, pentru a nu influența viabilitatea celulară. După omogenizare, probele au fost incubate la termostat (37 °C) timp de 24 ore. Examinarea a constatat în numărarea coloniilor microbiene formate pe și în structura mediului de cultură. Numărul de colonii (ufc/mL - unități formatoare de colonii/mL) a fost raportat logaritmice pentru a se determina procentul de reducere logaritmice, știind că 1Log_{10} este echivalent cu 90% omorâre microbiană în timp ce 6Log reprezintă 99,9999% distrugere de celule microbiene.

CAPITOLUL II. Studiul comparativ al sintezei nanoparticulelor de argint prin reducere chimică cu citrat de sodiu și reducere biologică cu extract de ceai verde

Sinteza chimică a nanoparticulelor de argint este practic cea mai larg folosită metodă de reducere a ionilor de argint disociați din azotatul de argint în soluție, utilizând acest precursor convenabil din punct de vedere a costurilor și care implică proceduri necomplicate de lucru. Dezvoltarea metodelor biologice (*Liaqat, și colab., 2022, Alamier și colab., 2023*) bazate pe extracte vegetale a scos în evidență noi posibilități de optimizare a sintezei de nanoparticule de argint care să fie și protectoare față de mediu, având în vedere că, în final, după utilizarea în orice domeniu, tehnic sau biomedical, aceste particule ajung în mediu, interferând cu toate componentele biosferei.

II.1. Rezultatele aplicării metodei Turkevich pentru sinteza chimică și a protocolului pentru sinteza biologică cu extract de ceai verde a AgNP.

În cadrul acestui studiu, particulele de AgNP au fost sintetizate întâi chimic, pornind de la metoda Turkevich

pentru sinteza AuNP și modificată după Frens (*Xia și colab.*, 2016) în ceea ce privește temperatura de sinteză. Suspensia obținută a fost lăsată să se răcească la temperatura camerei. Apoi, s-a procedat conform unui studiu al lui *Nakhjavani și colab.*, (2017), pentru un extract apos de frunze uscate de ceai verde, în care s-a adăugat o soluție de AgNO_3 în apă distilată, după cum s-a arătat în capitolul anterior. Amestecul a fost încălzit la 40 °C, iar dovada vizuală a formării nanoparticulelor a fost virarea culorii de la galben pal la cafeniu. Pentru a dovedi faptul că în aceste suspensii s-au sintetizat nanoparticule de argint, atât prin metoda chimică cât și prin cea biologică, au fost realizate o serie de analize spectrofotometrice și microstructurale ale căror rezultate au fost prezentate comparativ (*Plesnicute și colab.*, 2024).

II.2. Rezultatele analizei spectrale

Rezultatele analizei spectrale au arătat că AgNP sintetizate prin metoda chimică, cu citrat trisodic, au prezentat banda de absorbție caracteristică argintului nanostructurat, ca în Figura II.1.

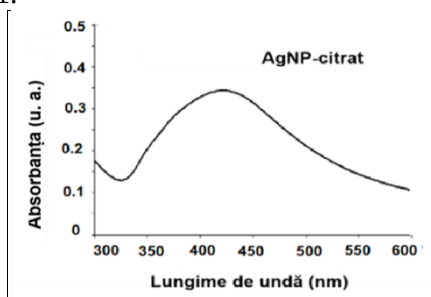


Figura II.1. Banda de absorbție a luminii caracteristică AgNP rezultate din sinteza chimică cu citrat trisodic ilustrează formarea nanoparticulelor. u.a. – unități de absorbanță

Fenomenul de rezonanță plasmonică localizată de suprafață este caracteristic particulelor de AgNP acoperite cu citrat trisodic (*Oprica și colab.*, 2020) cu absorbanță maximă la 425 nm. Capacitatea modestă a citratului de reducere a

ionilor de argint explică intensitatea relativ mică din maximul benzii de aproximativ 0,34 u.a. Prin metoda biologică, AgNP au fost sintetizate utilizând un extract de frunze uscate de ceai verde. Banda caracteristică a suspensiei de AgNP proaspăt sintetizată cu ceai verde (30 min după răcire la temperatura camerei) confirmă capacitatea de reducere a extractului vegetal utilizat. Maximul de absorbție obținut prin metoda biologică este la 447 nm cu o intensitate de 2,35 u.a. (Fig. II.2. a). Se poate spune că și concentrația de nanoparticule de argint din proba de AgNP-ceai verde este de circa opt ori mai mare decât în proba de AgNP-citrat. Mai departe, am studiat posibilitatea de optimizare a protocolului de sinteză și, pentru început, s-a efectuat o centrifugare de 10 min la 1500 rpm, cu înlăturarea supernatantului și resuspendarea în 50 mL de apă distilată, iar o nouă înregistrare spectrală a pus în evidență o scădere la 0,41 u.a. a intensității benzii de absorbție caracteristice probei de AgNP-ceai verde. Acest fapt poate fi explicat prin aceea că indicele de refracție și constanta dielectrică a mediului din vecinătatea nanoparticulelor se modifică prin resuspendare în apă distilată, deoarece învelișul molecular se modifică după eliminarea unor componente nereacționate din extractul de ceai verde, prin centrifugare.

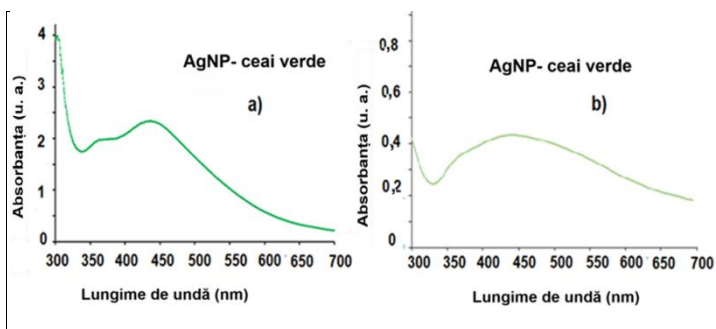


Figura II. 2. a) Spectrul de absorbție caracteristic suspensiei de AgNP-ceai verde după timp de 30 min; b) banda de absorbție după centrifugare și resuspendare în apă distilată.

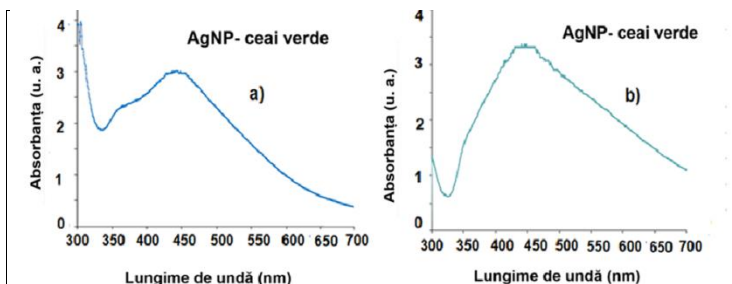


Figura II.3. Spectrul de absorbție caracteristic probelor de AgNP-ceai verde, a) la 2,5 ore după resuspendare și b) la 72 ore după resuspendare, în condiții de depozitare la temperatura camerei.

Pentru studierea în continuare a procedurii de sinteză biologică a AgNP, după resuspendarea depozitului în apă distilată, suspensia a fost lăsată să se stabilizeze la temperatura camerei timp de trei ore de la sinteza inițială. S-a obținut o creștere semnificativă a maximului benzii de absorbție de până la 3,05 u. a. (Fig. II.3.a) cu o ușoară deplasare a poziției în scara lungimilor de undă, spre valori mai mari, la 448 nm (Tabelul II.1).

Tabelul II.1. Caracteristicile benzilor de absorbție ale probelor de AgNP.

Reducător	Intensitatea benzii de absorbție (u. a.)	Poziția maximului benzii de absorbție caracteristice (nm)
Citrat trisodic	0,344	425
Ceai verde, la 30 min	2,354	447
Ceai verde, la 3 ore	3,055	448
Ceai verde, la 72 ore	3,374	445

Apoi proba a fost păstrată până la un timp total de 72 ore la temperatura camerei. Analiza spectrală a evidențiat un

maxim de absorbție situat la 445 nm și o creștere a intensității benzii, până la 3,374 u. a. (Fig. II.3.b). Menținerea acestei intensități a benzii de absorbție după prelungirea în continuare a perioadei de depozitare, denotă finalizarea procesului de reducere a ionilor de argint din mediul de reacție în cele 72 de ore de păstrare la frigider. În timpul procesului de stabilizare prin maturare (reducere lentă în timp) al suspensiilor de AgNP, aceste molecule antioxidante s-au consumat în reacții cu ionii de argint rămași nereduși în timpul procesului de sinteză biologică. O posibilă dovadă a acestei afirmații o reprezintă scăderea absorbanței în spectrul de sub 300 nm, însoțită însă de o creștere a intensității benzii caracteristice de absorbție a AgNP până la 3,37 u.a. De aici putem deduce că în acest interval de două ore s-au format noi nanoparticule de argint. Lipsa altor modificări spectrale ne face să concluzionăm că procesul de nucleație al nanoparticulelor de argint s-a încheiat, într-adevăr suspensia rămânând stabilă timp de două luni (*Plesnicute și colab., 2003*).

În același timp suspensia de AgNP obținută prin metoda chimică și lăsată să se maturizeze pentru același interval de timp nu a condus la modificări – similar metodei biologice.

S-a observat așadar că sinteza propusă aici beneficiază de avantajul acoperirii nanoparticulelor cu antioxidanți naturali, fapt extrem de util pentru aplicații biomedicale.

II.3. Rezultatele analizei microstructurale

Rezultatele analizei microstructurale obținute prin analiza microgرافیilor SEM pentru proba AgNP sintetizată chimic (Fig. II.4.) prezintă formațiuni de particule dispersate (marcate cu cercuri negre) dar și asociații de câte 2-4 particule (marcate cu pătrate galbene).

Imaginea SEM a probei de AgNP sintetizată (Fig.II.5.) cu extract de ceai verde pune în evidență o mai mare concentrație de particule într-o mare diversitate de dimensiuni.

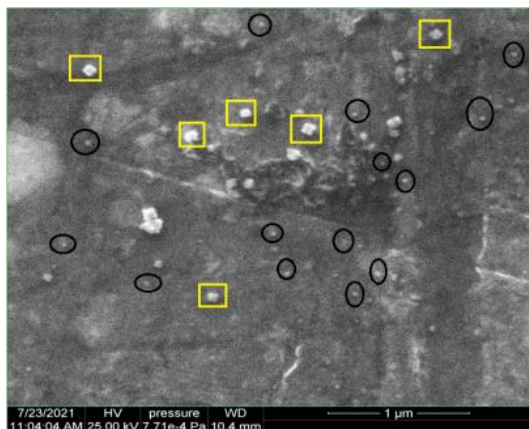


Figura II.4. Imagine SEM înregistrată pentru proba de AgNP-citrat, care evidențiază dimensiuni sub 20 nm

Se pot observa nanoparticule cu dimensiuni de până la 50 nm și diferite agregate de particule sub formă cubică, care pot ajunge să aibă dimensiuni de sute de nanometri.

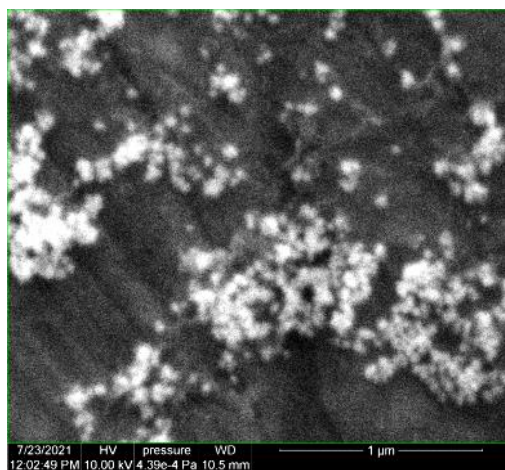


Figura II.5. Imagine SEM înregistrată pentru proba de AgNP-ceai verde, ce evidențiază dimensiuni sub 50 nm.

Aceste diferențe dimensionale, între AgNP obținută chimic și respectiv biologic, erau de așteptat, datorită încărcăturii suplimentare cu material biologic la suprafața nanoparticulelor sintetizate cu extract de ceai verde. De asemenea, epuizarea ionilor de argint prin reacțiile de reducere tardive în timpul îmbătrânirii suspensiilor justifică densitatea mare de nanoparticule formate conform imaginii SEM (Fig. II.5.). Diametrele mai mari pentru AgNP-ceai verde sunt în concordanță cu deplasarea spre roșu a benzii de absorbție (*Paramelle și colab., 2014*).

II.4. Rezultatele analizei elementale

Rezultatele analizei elementale prin EDAX au pus în evidență un maxim foarte intens, care corespunde suportului de aluminiu.

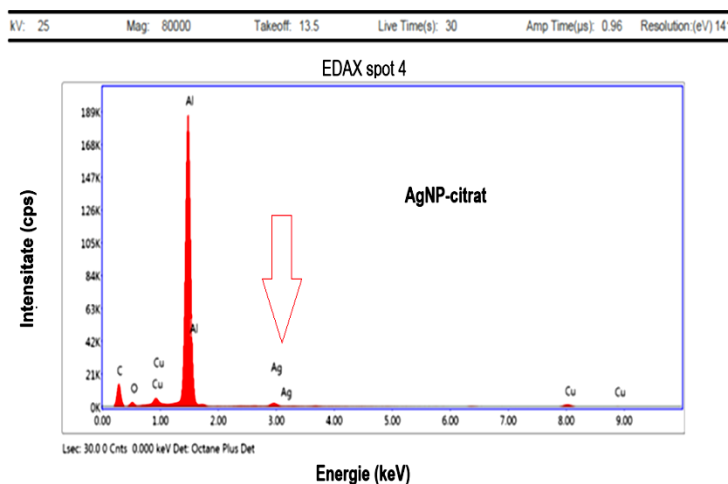


Figura II.6. Rezultatul analizei elementale efectuată pentru proba de AgNP-citrat.

Tabelul II.2. Rezultatele analizei elementale pentru AgNP-citrat.

Element/Linie de emisie atomică	Pondere masică (%)	Pondere atomică /abundență (%)	Eroare(%)
CK	53,56	60,41	9,06
OK	10,94	10,54	10,32
CuK	0,63	0,16	4,24
AlK	34,31	19,80	4,67
AgL	0,65	0,09	7,80

Se mai pot distinge maxime înguste mai mici ca intensitate, ce corespund prezenței carbonului, oxigenului, cuprului și argintului (în această ordine). Pondere atomică și cea masică a acestor elemente chimice prezente în suspensia sintetizată chimic se regăsesc în Tabelul II.2. Carbonul și oxigenul provin din componente de natură organică (cum ar fi ionii de citrat care se găsesc fie la suprafața nanoparticulelor sau sub formă de ioni nereduși). Analiza elementală EDAX asupra probei de AgNP sintetizată prin reducere biologică cu extract de ceai verde s-a realizat similar. Se observă linii mai intense pentru carbon și oxigen comparativ cu proba sintetizată chimic. Aceste vârfuri mai intense pot fi asociate conținutului de carbon și oxigen a compușilor rămași din extractul de ceai verde (Fig.II.7.).

Tabelul II.3. Rezultatele analizei elementale pentru AgNP-ceai verde

Element/linie de emisie atomică	Ponderea masică (%)	Abundența atomică (%)	Eroare (%)
CK	51,71	66,21	10,47
OK	18,54	17,82	11,67
CuL	1,40	0,34	14,74
MgL	0,19	0,12	33,96
AlK	26,91	15,33	4,13
AgL	1,35	0,18	20,98

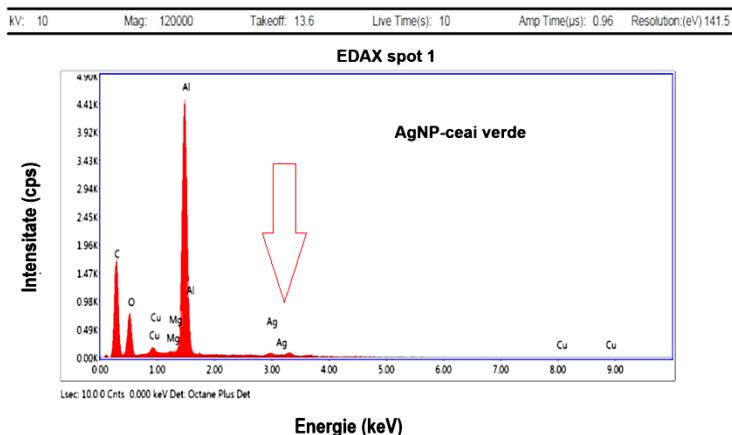


Figura II.7. Rezultatul analizei elementale efectuată pentru proba de AgNP-ceai verde.

În Tabelul II.3. sunt prezentate ponderile atomică și masică ale elementelor chimice analizate pentru proba de AgNP-ceai verde. Ponderea argintului este 1,35% din greutatea elementelor probei în punctul analizat și 0,18% din abundența elementelor, confirmând creșterea, față de proba sintetizată prin metoda chimică, a concentrației de nanoparticule din proba sintetizată prin metoda biologică.

II.5. Concluzii

Prin aplicarea ambelor tehnici de reducere a ionilor de argint s-a reușit obținerea de suspensii stabile de nanoparticule de argint cu proprietăți fizico-chimice comparabile cu cele ale produselor similare descrise în literatura de specialitate. Rezultatele analizei spectrale au arătat prezența proprietăților plasmonice ale argintului nanostructurat, maximele de absorbție fiind la lungimile de undă 425. de nm (metoda chimică) și respectiv 445 nm (metoda biologică), ceea ce

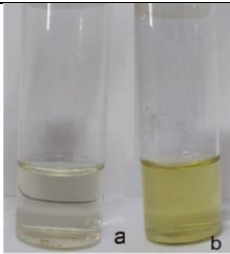
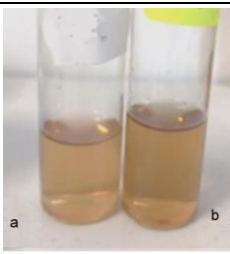
sugerează particule relativ mai mari în cel de-al doilea caz, în concordanță cu rezultatele investigației microstructurale prin microscopie electronică – particule de până la 20 nm și respectiv 50 nm. Intensitatea sensibil mai mare a benzii de absorbție a probei de AgNP-ceai verde este în concordanță cu conținutul mai mare de argint nanostructurat evidențiat de analiza elementală. Toate aceste rezultate scot clar în evidență eficiența remarcabilă a metodei de sinteză biologică cu extract de ceai verde. Utilizarea reducătorilor naturali, polifenoli, flavone și altele conferă o mai mare biocompatibilitate suspensiei de nanoparticule de argint, ce pot fi destinate aplicațiilor farmaceutice, cosmetice etc. (Zahoor *et al.*, 2021) și asigură și protecția mediului, reducând posibilele efecte citotoxice.

CAPITOLUL III. Studiul influenței expunerii la radiații ultraviolete asupra sintezei de AgNP

Având ca obiectiv sinteza de nanoparticule prietenoasă cu mediul, am proiectat un experiment în care să utilizăm ionii de citrat din surse naturale și anume din acidul citric conținut în fructe. Pe de altă parte, am urmărit să îmbunătățim eficiența sintezei, aplicând iradierea cu radiații ultraviolete. Datorită efectului acestor radiații asupra apei, și anume generarea de radicali liberi de hidroxil, se obține îmbunătățirea capacității reducătoare a mediului de reacție. În acest studiu am urmărit să propunem un protocol în două etape, pentru obținerea eficientă de nanoparticule de argint prietenoase cu mediul, și anume reducerea termică și fotoreducerea.

III.1. Sinteza fotochimică prin reducere cu citrat trisodic și expunere la ultraviolete

Prima etapă s-a derulat similar cu cele descrise în capitolul anterior, folosind 50 mL citrat trisodic dihidrat 1% și 50 mL de soluție de AgNO_3 1 mM.

	
Figura III.1. a) proba AgNP neiradiată; b) proba expusă la UV-C 30 min	Figura III.2. a) AgNP cu extract de lămâie înainte de iradiere; b) proba expusă la UV-C 30 min.

Prin încălzire la aproximativ 80 °C, sub agitare magnetică continuă la 800 rpm, culoarea amestecului a devenit galben pal. A doua etapă a constat în expunerea la radiații UV-C (descrisă într-un capitol anterior) pentru timpi de până la 30 min (10-20-30 min cu pauze de 10 min), urmărind ajustarea duratei procesului și a costurilor. Suspensia iradiată este mai intens colorată decât cea neiradiată, ca urmare a continuării a reacției de reducere sub influența radiațiilor ultraviolete (Figura III.1. a, b).

III.2. Sinteza cu extract de lămâie și expunere la radiații ultraviolete

În prima etapă, extractul proaspăt de pulpă de lămâie a fost preparat prin centrifugare, așa cum s-a arătat într-un capitol anterior (12,5 mL volum de supernatant a fost lăsat să reacționeze cu 50 mL de AgNO_3 1 mM). În a doua etapă, proba a fost iradiată la fel ca și proba de AgNP sintetizată cu citrat trisodic, pentru durate de timp de 10-20-30 min.

S-a observat că, în suspensia iradiată, culoarea s-a schimbat de la bej către cafeniu deschis, sugerând continuarea reducerii ionilor liberi de argint din mediul de reacție, deci creșterea concentrației de AgNP (Figura III.2. a, b).

III.3. Rezultatele analizei microstructurale

Rezultatele analizei microstructurale conform imaginilor SEM (Fig. III.3.a) corespunătoare probei de AgNP obținută prin metoda fotochimică, prezintă atât nanoparticule bine dispersate, cu dimensiuni de aproximativ 20 nm, cât și sub formă de mici agregate, cu dimensiuni de peste 100 nm (în pătrate galbene). Imaginea SEM pentru proba de AgNP sintetizată cu extract de lămâie și expunere la radiații UV-C sugerează o creștere a densității de nanoparticule, unele fiind clar individualizate, altele fiind sub formă de clustere de dimensiuni mici, de până la 50 nm (conform Fig.III.3.b).

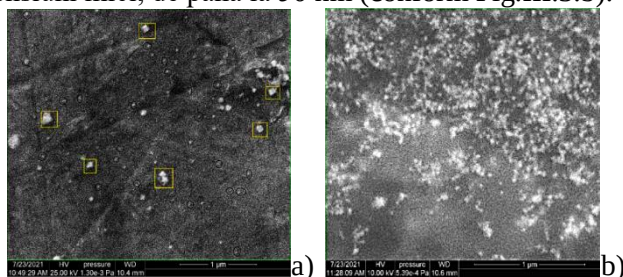


Figura III.3. Imagini SEM a) proba de AgNP-citrat; b) proba de AgNP - lămâie.

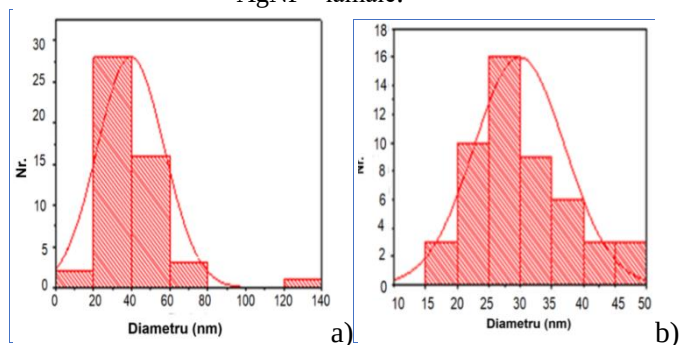


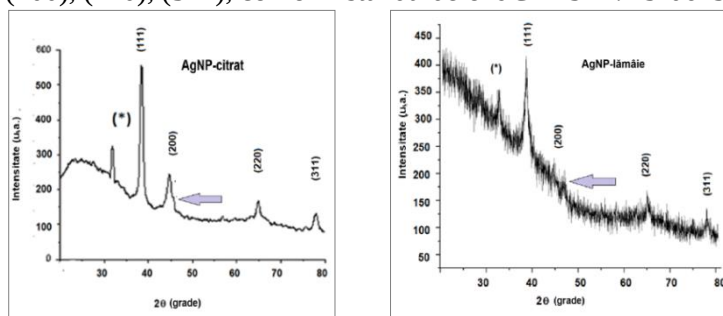
Figura III.4. Histogramele diametrului particulelor de AgNP obținute din înregistrările SEM pentru: a) AgNP-citrat; b) AgNP-lămâie.

Se poate presupune că această organizare din suspensia coloidală este rezultatul acoperirii nanoparticulelor cu molecule organice din extractul de lămâie (vitamine, flavonoide, carotenoide, pectine etc), influențând atât dimensiunea, cât și morfologia acestora.

Conform histogramelor valorilor diametrelor particulelor sintetizate pentru imaginile SEM, rezultă că, pentru prima probă, (Fig.III.4 a) valoarea medie este de 29,8 nm, iar pentru a doua probă, după iradiere (Fig.III.4 b), s-a obținut o creștere, cu valoarea mediană, de 39,5 nm.

III.4. Rezultatele analizei proprietăților de cristalinitate

Rezultatele analizei proprietăților de cristalinitate utilizând metoda XRD au evidențiat cristalizarea cubică a probelor de AgNP pe baza identificării maximelor de difracție caracteristice, și anume picurile date de indicii Miller (111), (200), (220), (311), conform standardelor JCPDS nr. 19-0629.



a) b)
Figura III.5. Difractogramele pentru: a) proba de AgNP obținută ci citrat prin metoda fotochimică; b) proba deAgNP cu extract de lămâie și expunere la UV-C.

Pentru structurile nanoparticulelor din proba de AgNP sintetizată cu extract de lămâie și iradiere în UV-C (Fig.III.5. b) s-a evidențiat un zgomot mai intens decât în proba de AgNP sintetizată cu metoda fotochimică (Fig.III.5 a). *Gauri și*

colab. (2016) au arătat că generarea unor maxime de difracție similar celor notate de noi cu (*) ar putea sugera prezența unor cristale de AgO notate cu săgeată în Figura III.5.

III.5. Rezultatele investigațiilor spectrale și optice

Rezultatele investigațiilor spectrale și optice au pus în evidență pentru proba obținută prin sinteza cu citrat o bandă de absorbție (Fig. III.6) cu maximum situat la 421 nm și o intensitate de aproximativ 0,37 u.a. dovedind faptul că nanoparticulele sunt stabilizate prin acoperirea cu molecule de citrat. Proba de AgNP expusă la radiații UV-C (Figura III.6) prezintă o bandă de absorbție largă cu absorbție maximă de 0,57 u.a la 418 nm.

Putem spune că în proba neiradiată s-a produs o creștere cu 50% a intensității benzii, ca rezultat al efectului de creștere a concentrației de nanoparticule prin continuarea reducerii ionilor de argint. Deplasarea poziției benzii de absorbție spre albastru sugerează formarea de nanoparticule de dimensiuni mai mici decât în proba neiradiată (Figura III.6).

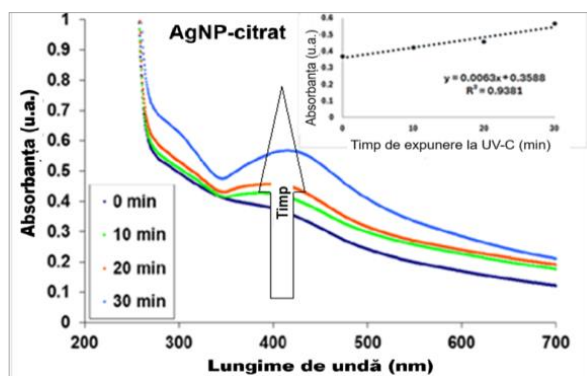


Figura III. 6. Influența radiațiilor UV-C asupra spectrului din vizibil al suspensiei de AgNP obținute prin sinteza cu citrat trisodic

Se constată creșterea liniară a maximului benzii de absorbție cu un coeficient de corelație liniară de $R^2=0,93$ (Figura III.6. insert), odată cu creșterea timpului de expunere.

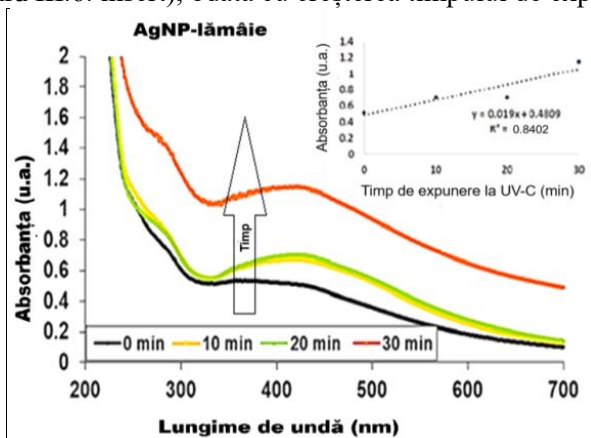


Figura III.7. Influența radiațiilor UV-C asupra spectrului din vizibil al suspensiei de AgNP cu extract de lămâie.

În figura III.7 este prezentată banda de absorbție a probei sintetizată cu extract de lămâie și iradiată în UV-C.

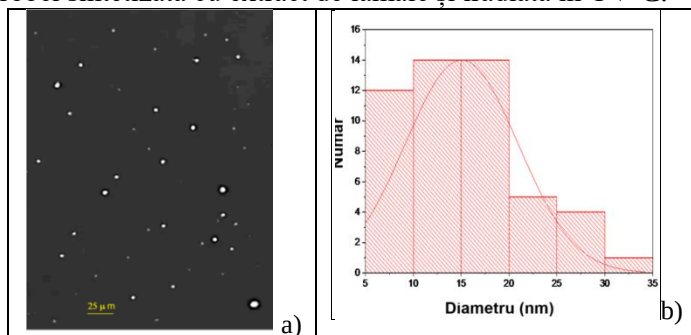


Figura III.8. Imagine microscopică în câmp întunecat (obiectiv $40\times$) pentru: a) proba de AgNP, înainte de expunerea la UV-C; b) histograma diametrelor (diametru mediu de 15,1 nm, și cu o deviație standard de 5,9 nm).

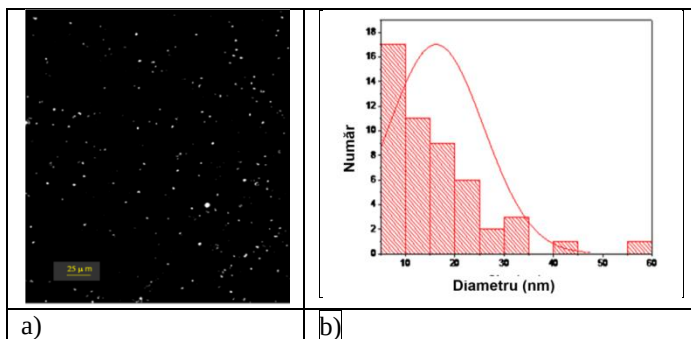


Figura III.9. Imagine prin microscopia optică în câmp întunecat (obiectiv de $40\times$) pentru: a) proba de AgNP, după de expunerea de 30 de min la UV-C. b) histograma diametrelor (valoarea diametrului de 16,2 nm, cu o deviație standard de 9,6 nm).

Înainte de iradiere, s-a înregistrat o bandă de absorbție largă, cu un maxim de absorbție de 0,52 u.a la 430 nm, confirmat în literatură, (*Alaallah și colab., 2023*). După finalizarea procesului de sinteză biologică, banda prezintă un maxim de absorbție de la 425 nm deplasat spre albastru și a cărei intensitate a crescut la 1,2 u.a.

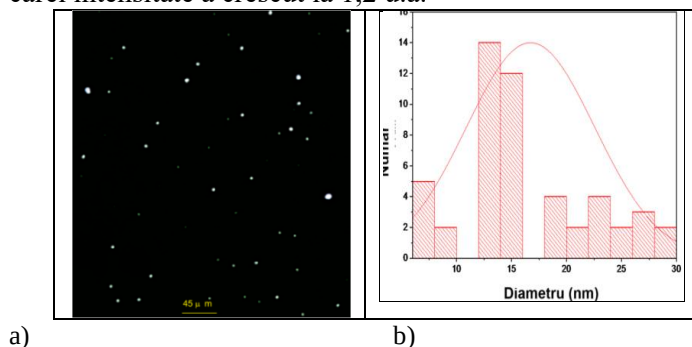


Figura III.10. Imagine microscopică captată în câmp întunecat (obiectiv de $40\times$) pentru: a) proba de AgNP sintetizată biologic, înainte de expunerea la radiații UV-C; b) histograma diametrelor (valoarea diametrului mediu este de 16,7 nm, abatere standard de 5,8 nm).

Se poate spune că prin iradiere procesul de reducere al ionilor de argint a continuat, conducând la creșterea concentrației de AgNP de dimensiuni mai mici în suspensie.

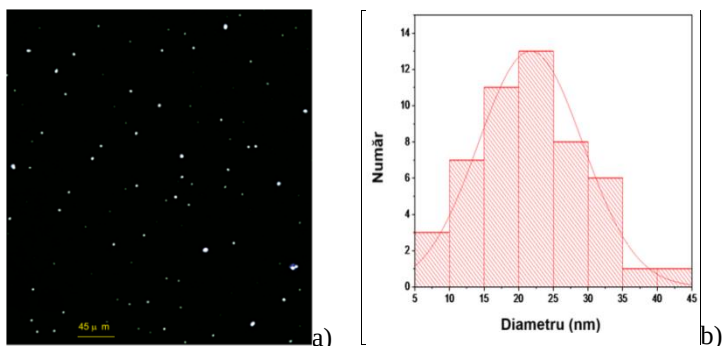


Figura III.11. Imagine captată prin microscopia optică în câmp întunecat (obiectiv de $40\times$) pentru: a) proba de AgNP sintetizată biologic, după expunerea de 30 de min la radiații UV-C; b) histograma diametrelor (valoarea diametrului mediu a devenit de 21,7 nm, iar abaterea standard de 7,6 nm).

Eficiența sintezei care crește odată cu utilizarea radiației ultraviolete a fost dovedită de intensitatea crescută a benzii de absorbție caracteristice, cu aproximativ 50% pentru AgNP sintetizate chimic și cu 130% pentru AgNP sintetizate biologic. Creșterea dimensiunii medii la proba iradiată în UV-C se datorează cel mai probabil aglomerării particulelor noi formate în prezența componentelor organice ale extractului de lămâie.

Dar principalul beneficiu al aplicării protocolului de sinteză în două etape, cu expunere la radiații ultraviolete, constă în creșterea concentrației de nanoparticule, datorită eficientizării reducerii ionilor de argint în urma formării de radicali liberi de hidroxil, prin fotoliza moleculelor de apă din mediul de reacție.

III.6. Concluzii

În cadrul acestui studiu s-a arătat că radiațiile UV-C influențează sinteza chimică cu citrat trisodic, ca și pe cea biologică cu extract de lămâie.

S-a constatat o creștere semnificativă a intensității benzii de absorbție caracteristice la ambele probe iradiate, ca urmare a creșterii concentrațiilor de nanoparticule, date de creșterea capacității de reducere din mediul de reacție, datorită radicalilor liberi de hidroxil eliberați sub impactul radiațiilor ultraviolete.

Modificările parametrilor dimensionali sunt datorate, pe de o parte, formării, în timpul iradierii, de noi particule de mici dimensiuni dar cu frecvență mare de apariție, iar, pe de altă parte, apariției unor rare aglomerate de particule acoperite de un înveliș organic comun care au dimensiuni mai mari decât în proba neiradiată. Aceste modificări au fost evidențiate prin investigații de microscopie optică în câmp întunecat, ceea ce reprezintă un element de originalitate, relativ la studiul de probe de AgNP prin metoda biologică.

Rezultatele obținute susțin proiectarea unui protocol de sinteză prin fotoreducere în două etape, care optimizează producerea de nanoparticule de argint utilizând extractul de lămâie și radiațiile ultraviolete – ambele din surse disponibile comerciale.

CAPITOLUL IV. Studiul comparativ al rezultatelor sintezei de AgNP cu diferiți reducători biologici – extract de lămâie, ceai verde, afine și mure. Determinarea activității antimicrobiene

IV.1. Rezultatele determinării activității antioxidante a reducătorilor biologici

Pentru compararea activității reducătoare a extractelor vegetale utilizate s-au determinat următorii parametri biochimici – conținutul total de polifenoli, conținutul total de

flavone și activitatea antioxidantă totală (determinări efectuate după protocoalele de analiză prezentate într-un capitol anterior).

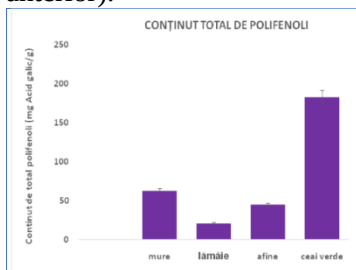


Figura IV.1. Conținutul de polifenoli în probele de extracte vegetale

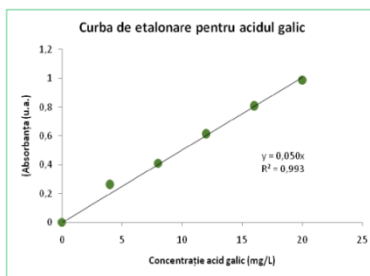


Figura IV.2. Curba de etalonare utilizată la determinarea conținutului total de polifenoli

Se poate vedea (Fig.IV.1) că extractele de fructe prezintă valori între circa 20 și aproximativ 60 de mg de acid galic (GAE) per gram de substanță uscată testată, determinările fiind făcute cu ajutorul curbei de etalonare (Fig. IV. 2) ce a rezultat ca o dependență liniară cu coeficient R^2 de 0,993.

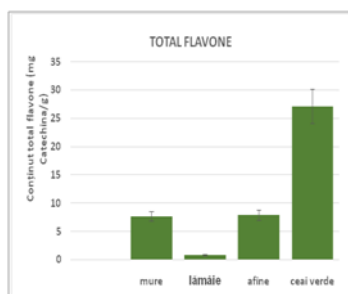


Figura IV.3. Conținutul total de flavone în extractele vegetale studiate.

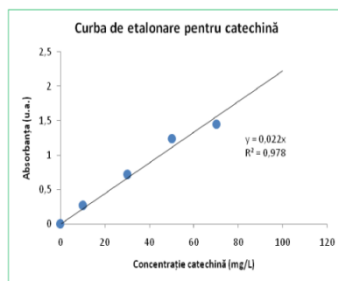


Figura IV.4. Curba de etalonare pentru determinarea conținutului de flavone

Fructele de pădure (mure și afine) au avut, în cazul de față, valori ale conținutului total de polifenoli apropiate între

ele și toate mai mari decât pentru extractul de lămâie. Se remarcă conținutul deosebit de mare de polifenoli al extractului de frunze de ceai verde – circa 120 mg acid galic per gram de substanță uscată din frunze de ceai. În graficele din figurile IV.3 și IV.4 sunt prezentate valorile conținuturilor de flavone, obținute pentru materialele vegetale utilizate în acest studiu, exprimate ca echivalenți de catechină (mg) per gram de substanță uscată. Curba de etalonare s-a obținut ca o dependență liniară între absorbanța luminii. Se evidențiază și aici conținutul mare de antioxidanți din categoria flavonelor în frunzele de ceai verde – circa 27 mg catechină per gram de substanță uscată, comparativ cu fructele de pădure – cu aproximativ 7,5 mg catechină per gram de substanță uscată (valoare medie cu deviație standard de 4%), în concordanță cu Gorinstein și colab. (2001).

Ca și în cazul antioxidanților din clasa polifenolilor și pentru flavone, fructele de pădure se dovedesc mai concentrate decât lămâia (circa 2 mg catechină pe gram de substanță uscată). Capacitatea antioxidantă totală (Fig. IV.5), determinată prin capacitatea de captare a radicalilor liberi de DPPH, a evidențiat proprietăți antioxidante similare pentru frunzele de ceai verde și fructele de mure (88-89%).

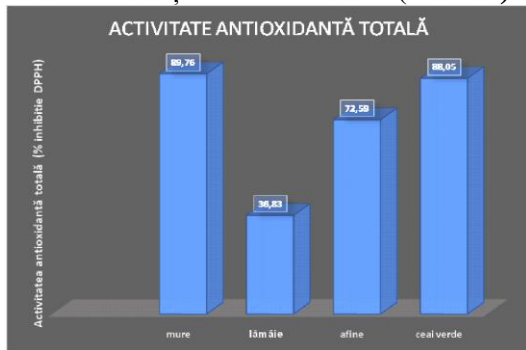


Figura IV.5. Activitatea antioxidantă totală a extractelor vegetale prin metoda DPPH.

Pentru fructele de afin s-a găsit circa 72%, iar pentru extractul proaspăt de lămâie s-a obținut circa 36%.

IV.2. Rezultatele analizei spectrale

Probele de AgNP au fost obținute utilizând extracte de fructe de lămâie (cu expunere de 30 min la radiații UV-C), mure, și afine, precum și de frunze de ceai verde (stabilizare timp de 72 de ore), în locul reducătorilor de sinteză chimică. Probele de suspensii coloidale de AgNP au prezentat o bandă de absorbție caracteristică a nanoparticulelor de argint (Figurile IV.6-7-8-9). Pentru toate experimentele s-a folosit un volum de 50 mL de azotat de argint 1 mM. Maximul benzii de absorbție caracteristice AgNP cu extract de lămâie (Fig. IV.6), având intensitatea maximă de 1,05 u.a., după 30 min de expunere la UV-C a fost identificat la 425 nm, banda prezentând semilărgime relativ mare, ceea ce indică polidispersia dimensională a nanoparticulelor din probă.

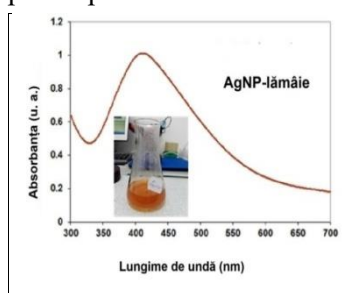


Figura IV.6. Banda de absorbție a probei de AgNP-lămâie

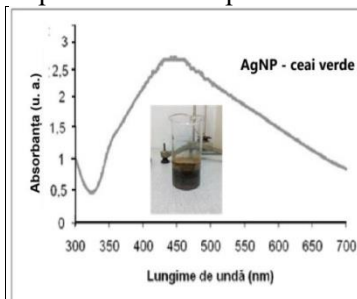


Figura IV.7. Banda de absorbție a probei de AgNP-ceai verde

Proba de AgNP-ceai verde (Fig. IV.7), a fost lăsată 30 de min la temperatura camerei după sinteză, până când intensitatea absorbției maxime s-a stabilizat la 2,7 u.a. la 450 nm lungime de undă.

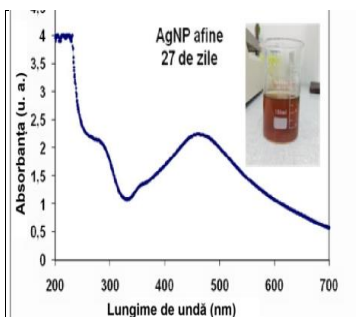


Figura IV.8. Banda de absorbție a probei de AgNP-afine

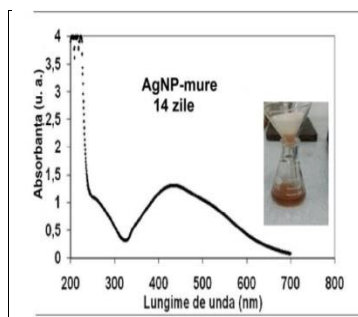


Figura IV.9. Banda de absorbție a probei de AgNP-mure

În figura IV.8 se poate vedea banda de absorbție a probei de AgNP-afine, stabilizată la intensitate maximă, după 27 de zile de la sinteză (depozitare la întuneric, în frigider).

Banda de absorbție caracteristică din domeniul vizibil prezintă intensitate maximă de 2,3 la 458 nm lungime de undă. AgNP cu extract de mure au prezentat banda de absorbție caracteristică având maximul la lungimea de undă de 429 nm (Fig. IV.9) și intensitatea maximă de 1,3 u.a., stabilizată la această valoare după 14 zile (depozitare la întuneric, în frigider).

Având în vedere că am utilizat aceeași cantitate de azotat de argint în cazul sintezei fiecărei probe (50 mL AgNO_3 1 mM), se poate estima că eficiența cea mai mare este în cazul ceaiului verde, pentru care intensitatea din maximul benzii caracteristice a fost cea mai mare.

Iar din punct de vedere al timpului de stabilizare, s-ar putea spune că timpul de 30 de min pentru suspensia de ceai verde-AgNP este cel mai convenabil (fără expunere la radiații ultraviolete).

IV.3. Rezultatele analizei prin microscopie optică în câmp întunecat

În figurile de mai jos sunt redată capturile de imagini obținute la microscopul optic pentru probele de AgNP sintetizate cu extracte de plante.

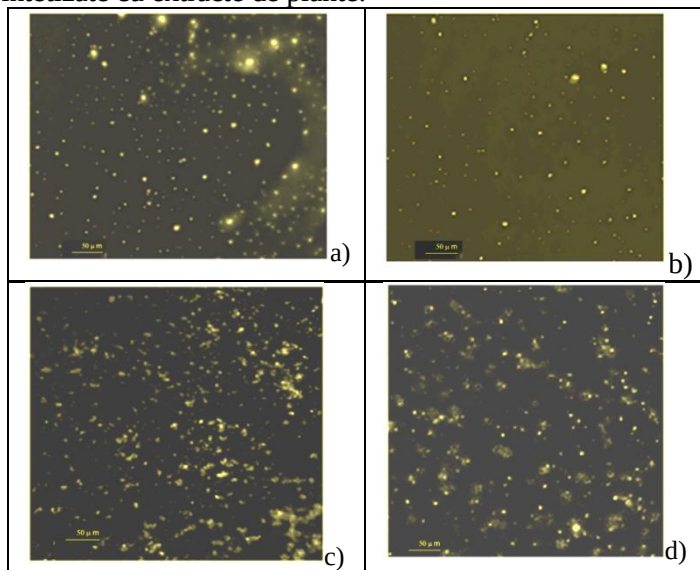


Figura IV.10. Rezultatele analizei prin microscopie optică în câmp întunecat pentru probele de: a) AgNP sintetizate cu extract de lămâie; b) AgNP sintetizate cu extract de ceai verde; c) AgNP sintetizate cu extract de afine; d) AgNP sintetizate cu extract de mure (obiectiv $40\times$).

Pentru AgNP sintetizate cu extract de lămâie, diametrele sunt cuprinse între 15 și 40 nm (Fig. IV.10.a), iar pentru AgNP sintetizate cu extract de ceai verde, între 15 și 55 nm (Fig. IV.10.b)-în accord cu *Hasan și colab. (2024)* care, prin tehnica SEM, au găsit că AgNP sintetizate cu ceai verde prezintă diametre între 35 și 50 nm. În cazul fructelor de pădure (Fig. IV.10.c, d) diametrele sunt cuprinse între 25 și 70

nm pentru AgNP-afine și, respectiv, 22 și 67 nm pentru AgNP-mure cu unele asocieri între nanoparticule vecine.

IV.4. Rezultatele analizei prin XRD

Proprietățile de cristalinitate au fost studiate prin aplicarea metodei bazate pe difracția radițiilor X, iar rezultatele obținute sunt redată mai jos.

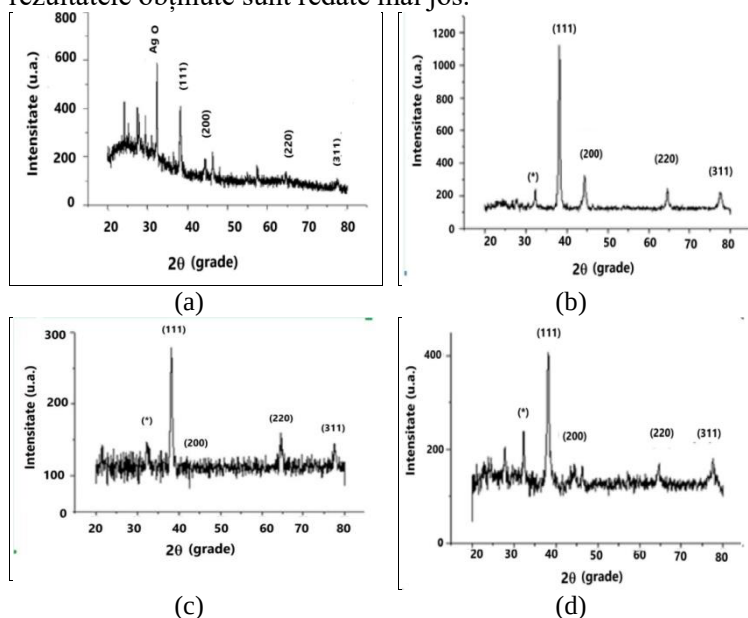


Figura IV.11.a-b. Rezultatele analizei XRD pentru a) AgNP-lămâie; b) AgNP-ceai verde.

Figura IV.11.c-d. Rezultatele analizei XRD pentru c) AgNP-afine; d) AgNP-mure.

Conform cu Figura IV.11.a-d, în difractogramele obținute pentru probe de AgNP sintetizate cu extracte vegetale se regăsesc maximele de difracție ale argintului (Tabelul IV.1). Conform standardelor JCPDS nr. 19-0629, toate cele patru probe de AgNP obținute au structura cristalină specifică, fiind acompaniate ocazional și de alte structuri cristaline, cum ar fi

argintul oxidat (AgO), al cărui maxim de difracție apare foarte pregnant în cazul probei de AgNP-lămâie (Fig. IV.11.a, notație (*)).

Tabelul IV.1. Rezultatele analizei XRD

Indicii (hkl)	(111)	(200)	(220)	(311)
AgNP-lămâie				
2 θ (°)	38,1507	44,3851	64,5451	77,4174
AgNP-ceai verde				
2 θ (°)	38,1621	-	64,5614	77,4921
AgNP-afine				
2 θ (°)	38,1596	44,3561	64,5354	77,4534
AgNP-mure				
2 θ (°)	38,1687	44,3262	64,5083	77,4353

La fel, între peak-urile de intensitate mică, comparabilă cu zgomotul de fond, pot fi unele care corespund componentelor organice cristaline din extractele vegetale. Înregistrările nu depășesc unghiul de 80 de grade.

IV.5. Rezultatele analizei diametrului hidrodinamic și a potențialului Zeta

Diametrul nanoparticulelor și potențialul Zeta s-au determinat prin metoda difuziei dinamice a luminii, iar rezultatele se prezintă în continuare.

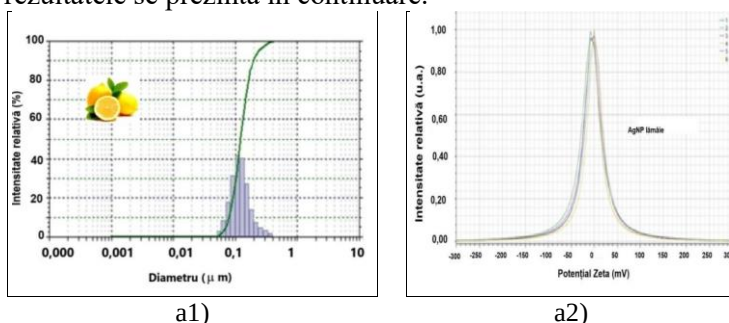


Figura IV.12.a1) Diametrul hidrodinamic de 120 nm, cu un indice de polidispersie PDI = 0,11; a2) potențialul Zeta pentru AgNP-lămâie de -2,88 mV.

Se poate presupune că particulele de argint sunt acoperite cu înveliș organic molecular cu o sarcină electrică negativă mică, dar care pot asigura, predominant, repulsia sterică, spațială în cadrul sistemului coloidal, mai mult decât repulsia electrostatică.

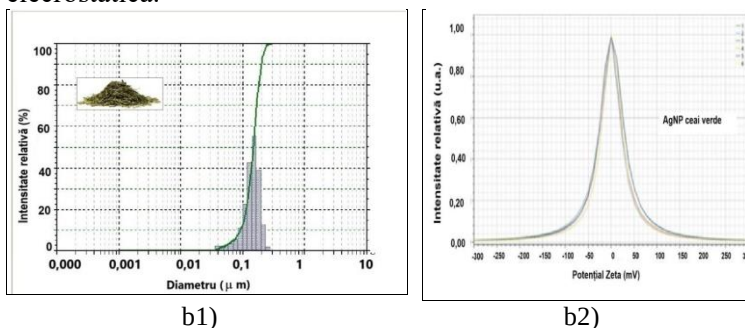


Figura IV.12.b1) Diametrul hidrodinamic de 121 nm și indicele PDI de 0,13; b2) potențialul Zeta pentru proba de AgNP-ceai verde de – 4,33 mV.

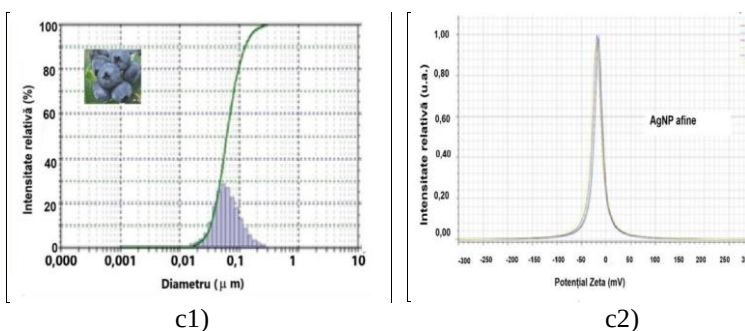


Figura IV.12.c1) Diametrul hidrodinamic de 61 nm și indicele PDI de 0,29 și c2) potențialul Zeta pentru AgNP-afine de 17,28 mV.

Toate aceste rezultate ale analizelor parametrilor fizico-chimici efectuate asupra suspensiilor de AgNP sintetizate de noi au evidențiat o granularitate fină și o stabilitate semnificativă

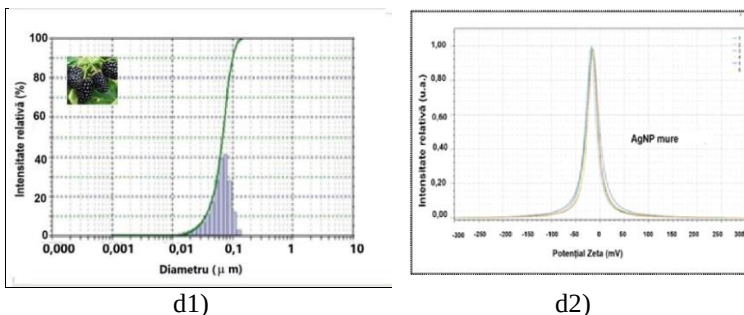


Figura IV.12.d1) Diametrul hidrodinamic de 67 nm și indicele PDI de 0,12 și d2) potențialul Zeta pentru AgNP-mure de – 18,04 mV.

în timp, ceea ce le recomandă pentru aplicații biomedicale. Astfel, în cele de mai jos, am prezentat rezultatele testării activității lor antimicrobiene.

Pentru proba de nanoparticule de AgNP-mure (Fig. IV.12.d1) s-a obținut diametrul D_h de 67 nm și indicele PDI de 0,12. Potențialul Zeta pentru suspensia de AgNP-mure (Fig. IV.12.d2) a fost de -18,04 mV, astfel că se poate spune că cele două suspensii la care s-au utilizat pentru sinteză extracte de fructe de pădure se comportă similar, având diametrul particulelor de valori în concordanță și cu cele ce au rezultat din microscopia optică în câmp întunecat.

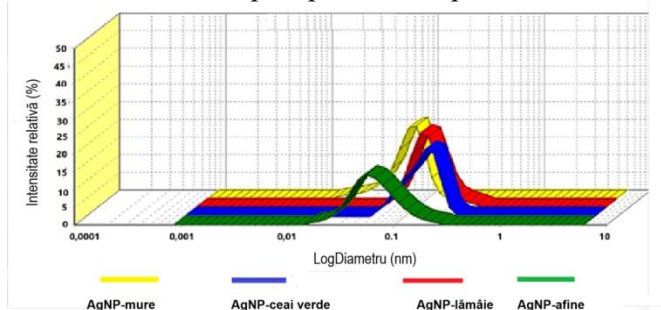


Figura IV.12.e. Comparație între diametrele hidrodinamice obținute pentru probe de AgNP sintetizate cu extracte de plante.

De aici se poate deduce că învelișul organic al miezurilor de argint nu este la fel de mare ca la probele sintetizate cu lămâie și ceai verde, unde diametrul particulelor coloidale este aproape dublu (în timp ce valorile obținute prin microscopia optică în câmp întunecat sunt destul de apropiate la toate probele studiate). Stabilitatea probelor sintetizate cu fructe de pădure este asigurată atât de repulsia electrostatică, cât și de cea sterică, după cum rezultă din valorile potențialului Zeta, spre deosebire de celelalte două probe unde natura învelișului organic, molecular, mai consistent, conduce la o încărcare electrică mică și, deci, la predominanța repulsiei sterice în sistemul coloidal.

IV.6. Rezultatele determinării activității antimicrobiene

Pentru testarea activității antimicrobiene a probelor de AgNP s-au utilizat germeni microbieni din colecțiile standard ATCC, și anume *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli* ca specii reprezentative pentru patogenii umani cu răspândire largă.

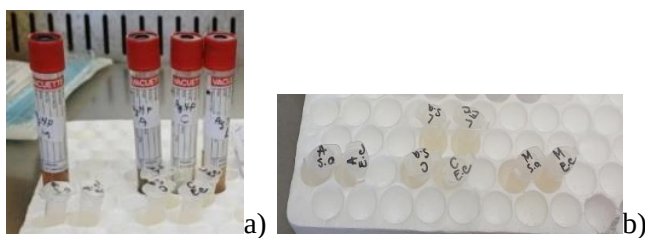


Figura IV.13.a) Eșantioanele de AgNP și b) eșantioanele de preparate microbiene.

Au fost aplicate atât metoda clasică, a difuziei agentului antimicrobian în mediul de cultură al microorganismelor, cât și tehnica timpului de omorâre, ambele prezentate în capitolul dedicat metodelor și tehnicilor experimentale aplicate în această teză.

IV.6.1. Rezultatele aplicării metodei difuzimetrice pentru determinarea activității antimicrobiene a suspensiilor de AgNP

În imaginile fotografice din Figura IV.14 se vede că, în jurul rondelurilor îmbibate cu suspensii de argint, avem o inhibare a creșterii microbiene, mediul de cultură inoculat uniform cu germeni patogeni fiind transparent, în timp ce restul suprafeței prezintă un aspect opac, din cauza coloniilor de germeni care s-au dezvoltat neafectate de argint.

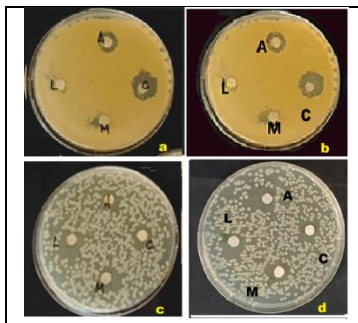


Figura IV.14. Imagini ale cutiilor Petri cu zone de inhibiție a creșterii microbiene. Notății A-AgNP-afine, L-AgNP-lămâie, M-AgNP-mure și C-AgNP-ceai verde.

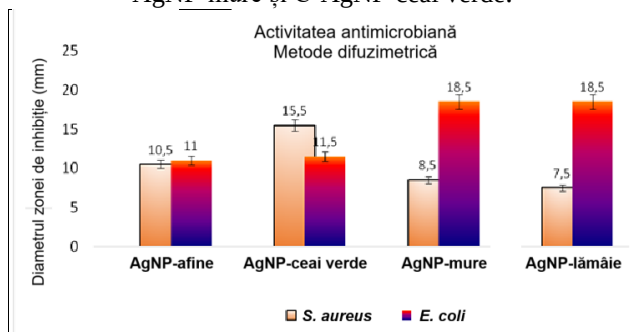


Figura IV.15. Rezultatele metodei difuzimetrice pentru cei doi germeni patogeni.

În zona de inhibiție a creșterii microbiene s-a produs difuzia nanoparticulelor de argint din rondelurile îmbibate cu

fiecare suspensie dintre cele patru studiate de noi, ceea ce a avut ca efect distrugerea microorganismelor pe o rază de câțiva mm. Activitatea antimicrobiană a agentului testat crește odată cu creșterea zonei de inhibiție. Pentru bacteria *S. aureus* cea mai mare activitate antimicrobiană s-a obținut în cazul probei de AgNP-ceai verde, pentru care diametrul zonei de inhibiție a fost de peste 15 mm, iar cea mai mică în cazul AgNP-lămâie (7,5 mm), față de AgNP sintetizate cu fructe de pădure cu 8,5 și respectiv 10,5 mm pentru AgNP-afine și respectiv AgNP-mure. În cazul bacteriei *E. coli*, diametrele medii cele mai mari s-au obținut pentru AgNP-lămâie și AgNP-mure (18,5 mm în ambele cazuri) în timp ce, pentru celelalte două suspensii de argint s-a obținut 11,0-11,5 mm. *Dermibas și colab. (2017)* au evidențiat zone de inhibiție a creșterii microbiene corespunzătoare particulelor de AgNP sintetizate cu extract de mure, cu diametrul de 11 mm pentru *E. coli*, și 16 mm pentru *S. aureus*, date cu care și rezultatele noastre sunt în bună concordanță.

IV.6.2. Rezultatele aplicării metodei timpului de omorâre (kill-time assay) pentru determinarea activității antimicrobiene a suspensiilor de AgNP

Pentru a obține noi informații referitoare la activitatea antimicrobiană a probelor de AgNP sintetizate (folosind extracte vegetale în loc de reducători de sinteză chimică) a fost aplicată și tehnica timpului de omorâre pentru doi germeni reprezentativi, *S. aureus* și *E. coli* (Fig. IV.16).



**Figura IV. 16 a. AgNP Lămâie
Staphylococcus aureus**



**Figura IV. 16 b. AgNP Lămâie
- Escherichia coli**

Cu cât este mai puternică activitatea antimicrobiană a unei probe de AgNP, cu atât scăderea la zero a numărului de celule microbiene se petrece după un timp de interacțiune mai mic.

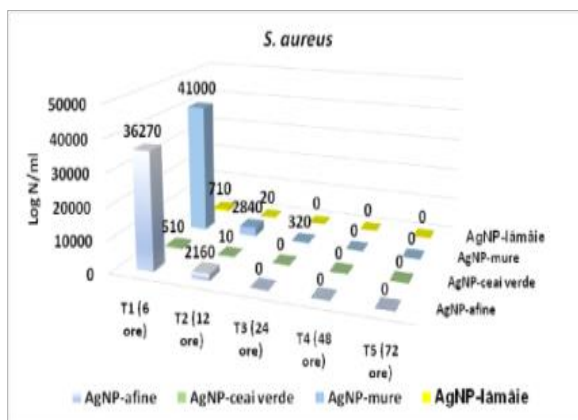


Figura IV.17. Rezultatele aplicării tehnicii timpului de omorâre pentru *S. aureus*.

În figura IV.17. se pot vedea timpii de omorâre obținuți pentru *S. aureus* conform prelucrării datelor din figurile IV.16.a-d. Probele de AgNP sintetizate cu extracte de fructe de pădure (afine și mure) prezintă anihilarea creșterilor microbiene ale germenilor *S. aureus* după T3=24 de ore (AgNP-afine) și respectiv T4=48 de ore (AgNP-mure), cu pornire de la niveluri relativ mari ale densității microbiene relevate pentru primul timp de observare, de 6 ore (Fig. IV.17), și anume $\log N/mL=36270$ pentru AgNP-afine și $\log N/mL=41000$ pentru AgNP-mure.

Proba de AgNP-ceai verde, ca și cea de AgNP-lămâie prezintă eficacitate semnificativ mai mare contra bacteriei *S. aureus*, care se distruge total la T3=24 de ore de interacțiune, cu pornire de la niveluri considerabil mai mici la momentul de observare, de la T1=6 ore, de $\log N/mL=510$ pentru AgNP-ceai verde și respectiv $\log N/mL=710$ pentru AgNP-lămâie.

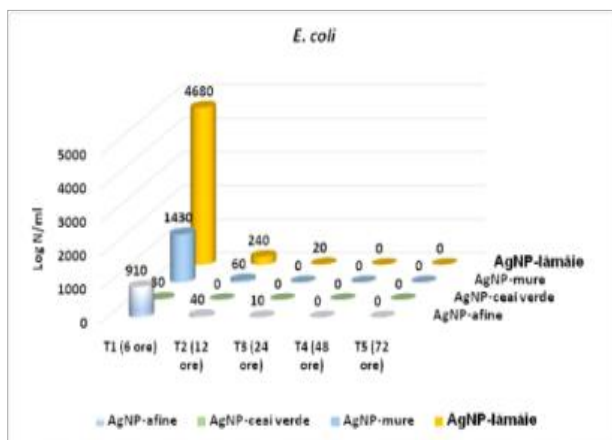


Figura IV.18. Rezultatele aplicării tehnicii timpului de omorâre pentru *E. coli*.

În figura IV.18. se pot vedea timpii de omorâre obținuți pentru *E.coli* conform prelucrării datelor din figurile IV.16.e-h. Inițial, supraviețuirea celulelor de *E. coli* (Fig. IV.18.) după T1=6 ore de interacțiune cu nanoparticulele de argint este dată de valorile lui LogN/mL=4680 (AgNP-lămâie), logN/mL=1430 (AgNP-mure), logN/mL=910 (AgNP-afine) și 30 (AgNP-ceai verde). Proba de AgNP-ceai verde anulează creșterea microbiană a germenilor *E. coli* după T2=12 ore, fiind cea mai eficientă dintre cele patru probe studiate de noi. La T3=24 de ore se anulează și creșterea microbiană corespunzătoare probei de AgNP-mure iar la T4=48 de ore se reduc la zero și valorile corespunzătoare celorlalte două probe (AgNP-afine și AgNP-lămâie). Loo și colab. (2018) au demonstrat eficiența antimicrobiană a unor particule de AgNP sintetizate cu extract de ceai indian contra lui *E. coli* cu un timp de 1-2 ore pentru efectul letal.

Studierea citotoxicității ionilor de argint (Ershov și colab., 2023) a prilejuit propunerea câtorva ipoteze privind mecanismele de interacțiune ale acestora cu celulele vii –

ipoteze care se pot prelua și în cazul nanoparticulelor de argint, de la suprafața cărora se pot elibera atomi de argint reoxidați, sub formă de Ag^+ . În paralel se studiază și mecanismele prin care particulele de AgNP interacționează cu structurile celulare. Ionii de Ag^+ care ajung la suprafața unei celule bacteriene întâlnesc în primul rând peretele celular, ce acoperă membrana celulară, protejând-o. Acesta este format în principal din peptidoglicani (poli-*N*-acetilglucozamină și acid *N*-acetilmuramic), iar ionii de argint încărcăți pozitiv, pot forma complecși moleculari cu unele grupări donoare de electroni (cu sarcină parțial negativă, datorită oxigenului sau azotului) din moleculele de peptidoglicani, influențând proprietățile de permeabilitate ale învelișului celular, astfel că pot ajunge și la membrana celulară. Prin interacțiuni de acest fel, ionii de Ag^+ pot penetra și membrana celulară ajungând să interacționeze cu organele celulare și să influențeze procesele metabolice din citoplasmă (*Duran și colab., 2016*).

Dintre aceste interacțiuni intracelulare, un rol important se atribuie generării de specii reactive de oxigen (ROS- Reactive Oxygen Species) și interacțiunii cu proteinele și moleculele de ADN. Asupra lui *E. coli* efectul a fost, dimpotrivă, cel mai mare, demonstrat prin la aplicarea metodei difuzimetrice (Fig. IV.15) dar și cu un timp de omorâre relativ mai mare (Fig. IV.18).

Toxicitatea indusă de producerea unui nivel ridicat de specii reactive de oxigen (ROS) – cum sunt radicalii hidroxil ($\text{OH}^\cdot$), oxigenul molecular ionizat ($\text{O}_2^\cdot$), peroxidul de hidrogen (H_2O_2) etc se datorează efectului lor oxidant ce afectează mai ales lipidele din structurile membranare ale plasmalemei (membrana celulară) și din membranele organelor celulare, de exemplu mitocondriile – sediul proceselor vitale de respirație celulară. Astfel, membranele cu lipide peroxidate se destabilizează și își pierd funcțiile de permeabilitate, iar schimburile de ioni (de sodiu, potasiu, calciu etc) cu mediul sunt compromise – la fel și comunicarea cu mediul, care se

realizează prin intermediul curenților transmembranari de sodiu, calciu, potasiu etc. În consecință, celulele suferă alterări ireparabile ale unor procese vitale și mor.

IV.7. Concluzii

Nanoparticulele de argint sintetizate cu reducători din extracte vegetale au caracteristici fizico-chimice comparabile cu cele raportate în literatură, dovedindu-se adecvate pentru aplicații biomedicale. Banda de absorbție caracteristică particulelor a fost evidențiată între 425 nm și 460 nm pentru toate probele, în bună concordanță cu rezultatele altor autori.

Stabilitatea suspensiilor de AgNP, din punct de vedere al granularității, este datorată dimensiunii particulelor metalice, de ordinul zecilor de nanometri, așa cum s-a constatat prin vizualizarea lor în microscopia optică cu câmp întunecat, dar și diametrului hidrodinamic (între 60 nm și 120 nm), cu indicele de polidispersie dimensională sub 0,3, indicând o bună monodimensionalitate la toate probele.

Stabilitatea suspensiilor, din punct de vedere al forțelor de interacțiune dintre particule, s-a dovedit a fi asigurată de repulsia predominant sterică în cazul probelor de AgNP-lămâie și AgNP-ceai verde, cu înveliș molecular mai bogat în molecule neutre decât în ioni, și cu valori mai mici (în valoare absolută) ale potențialului Zeta, în timp ce pentru suspensiile de AgNP sintetizate cu fructe de pădure, învelișul molecular mai bogat în ioni negativi asigură și o componentă de respingere electrostatică, evidențiată de valorile negative ale potențialului Zeta – rezultând așadar, atât forțe de repulsie electrostatice, cât și sterice.

Aplicarea metodei difuzimetrice a scos în evidență că eficiența cea mai mare contra lui *S. aureus* este datorată particulelor de AgNP-ceai verde, corespunzător zonelor de inhibiție a creșterii microbiene cu diametre de circa 16,5 mm, în timp ce particulele de AgNP-lămâie și AgNP-mure au acționat cel mai eficient asupra lui *E. coli*, ducând la zone de

inhibiție a creșterii microbiene de circa 18,5 mm – în concordanță cu *Khane și colab. (2022)*.

Aplicarea tehnicii timpului de omorâre a permis evidențierea intervalelor de timp de anihilare totală a germenilor testați, pentru *S. aureus* și *E. coli*. Pentru *S. aureus* se poate considera că probele AgNP-ceai verde și AgNP-lămâie au condus la cele mai bune rezultate deoarece, încă de la 6 ore de interacțiune, densitățile celulelor microbiene viabile au fost relativ mici, cu două ordine de mărime sub cele corespunzătoare probelor de AgNP sintetizate cu fructe de pădure – în toate cazurile, distrugerea totală a viabilității celulare survenind la 24 de ore.

În cazul lui *E. coli*, particulele de AgNP-ceai verde sunt cele mai eficiente, anulând creșterea microbiană după 12 ore, fiind urmate de particulele de AgNP-mure, pentru care timpul de omorâre a fost de 24 de ore și de cele de AgNP-afine și AgNP-lămâie, cu timpul de omorâre de 48 de ore.

Astfel, proba de AgNP-ceai verde s-a dovedit cea mai eficientă, atât pentru microorganismele Gram-pozitive, cât și pentru cele Gram-negative – prin ambele tehnici aplicate. Amintim că pentru această probă intensitatea benzii de absorbție caracteristice a fost cea mai mare corespunzând concentrației celei mai mari de nanoparticule de argint, aceasta rezultând din faptul că pentru ceaiul verde s-au găsit cel mai mare conținut de polifenoli, cel mai mare conținut de flavone și cea mai mare capacitate antioxidantă totală.

Bibliografie selectivă

Alaallah, N.J., Abd Alkareem, E., Ghaidan, A., et al. (2023). *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*, 10(1), 205-216.

Alamier, W.M., Oteef, M., Bakry, A.M., et al. (2023). *ACS Omega*, 8(21), 18901-18914.

Demirbas, A., Yilmaz, V., Ildiz, N., et al. (2017). *Journal of Molecular Liquids*, 248, 1044-1049.

Dewanto, V., Wu, X., Adom, K.K., et al. (2002). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 3010-3014.

- Dhulappanavar, G., Hungund, B., Ayachit, N., et al. (2011). In *International Conference on Nanoscience, Engineering and Technology (ICONSET 2011)* (pp. 258-262). IEEE
- Durán, N., Durán, M., De Jesus, M.B., et al. (2016). *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12(3), 789-799.
- Ershov, V.A., & Ershov, B.G. (2024). *Toxics*, 12(11), 801.
- Gauri, B., Vidya, K., Sharada, D., et al. (2016). *Research Journal of Chemistry and Environment*, 20(10), 1-5.
- Gorinstein, S., Martín-Belloso, O., Park, Y. S., et al. (2001). *Food chemistry*, 74(3), 309-315.
- Hasan, W. L., Sari, R., & Hendradi, E. (2024). *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 11(1), 25-31.
- Khane, Y., Benouis, K., Albukhaty, S., et al. (2022). *Nanomaterials*, 12(12), 2013.
- Kimling, J., Maier, M., Okenve, B., et al. (2006). *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(32), 15700-15707.
- Kumar, B., Smita, K., Cumbal, L., et al. (2017). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(1), 45-50.
- Li, K., Ma, C., Jian, T., et al. (2017). *Journal of Food Science and Technology*, 54, 3569-3576.
- Liaqat, N., Jahan, N., Anwar, T., et al. (2022). *Frontiers in Chemistry*, 10, 952006.
- Loo, Y.Y., Rukayadi, Y., Nor-Khaizura, M.A.R., et al. (2018). *Frontiers in Microbiology*, 9, 1555.
- Molyneux, P. (2004). *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219.
- Nakhjavani, M., Nikkhah, V., Sarafraz, M.M., et al. (2017). *Heat and Mass Transfer*, 53, 3201-3209
- Oprica, L., Andries, M., Sacarescu, L., et al. (2020). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(12), 3365-3375.
- Paramelle, D., Sadovoy, A., Gorelik, S., Free, P., Hobley, J., & Fernig, D. G. (2014). *Analyst*, 139(19), 4855-4861.
- Plesnicute, R.M., Vacariu, A., Motrescu, I., et al. (2023). In *International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering* (pp. 123-133). Cham: Springer Nature Switzerland.
- Xia, H., Xiahou, Y., Zhang, P., et al. (2016). *Langmuir*, 32(23), 5870-5880
- Zahoor, M., Nazir, N., Iftikhar, M., et al. (2021). *Water*, 13(16), 2216.
- Zuorro, A., Iannone, A., Natali, S., et al. (2019). *Processes*, 7(4), 193.

CONCLUZII GENERALE

- Studiul comparativ al particulelor de AgNP obținute prin reducere chimică și respectiv prin reducere biologică cu extract de ceai verde a scos în evidență *potențialul reducător mai mare a extractului de ceai verde față de citratul trisodic, după cum au arătat benzile de absorbție caracteristice argintului nanodimensionat, intensitatea în maximul corespunzător probei de AgNP sintetizată cu ceai verde fiind de circa opt ori mai mare decât cel corespunzător probei de AgNP sintetizată cu citrat trisodic, în concordanță cu conținutul mai mare de argint evidențiat de analiza elementală.*
- Studiul sintezei de particule de AgNP sintetizată cu extract de lămâie a arătat că se poate obține o concentrație de circa două ori mai mare decât în proba de AgNP sintetizată cu citrat trisodic (intensitatea benzii de absorbție caracteristice fiind de două ori mai mare) prin aplicarea unei proceduri în două etape, după sinteza prin reducere termică aplicându-se o *iradiere de 30 de min cu radiații UV-C.*
- *Un element de originalitate* al abordării experimentale din această teză constă în monitorizarea influenței radiațiilor UV-C prin măsurători dimensionale pe imaginile furnizate de *microscopia optică în câmp întunecat* asupra emisiilor de rezonanță plasmonică localizată de suprafață asociate particulelor de *AgNP sintetizate prin reducere biologică.*
- Utilizarea extractelor de fructe de pădure a condus la sinteze reușite, cu intensități relativ mari ale benzilor de absorbție caracteristice, în cazul AgNP sintetizate cu *extract de mure* intensitatea în maximul benzii fiind similară cu cea a probei de AgNP sintetizată cu extract de lămâie, iar în cazul probei de AgNP sintetizată cu *extract de afine*, intensitatea benzii de

absorbție caracteristice fiind comparabilă cu cea a probei de AgNP sintetizată cu ceai verde. Față de sintezele prezentate anterior, apare dezavantajul finalizării după intervale de timp mai îndelungate (de peste două săptămâni), dar avantajele sunt date de activitatea antimicrobiană ridicată asupra germenilor *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli*.

- Toate probele sintetizate cu extracte din plante, cu pornire de la aceeași cantitate de ioni de argint, au prezentat activitate antimicrobiană relativ mare, după cum s-a dovedit prin măsurători asupra zonelor de inhibiție a creșterilor microbiene tratate cu suspensii de AgNP difuzate în mediile de cultură ale celor două microorganisme etalon.
- *Un element de originalitate* al studiilor efectuate în această teză constă în aplicarea suplimentară a metodei de determinare a timpului de omorâre la nanoparticule de argint sintetizate prin metode prietenoase cu mediul – metodă care a evidențiat timpi de distrugere totală a germenilor patogeni de 24 de ore.
- Din investigațiile realizate asupra proprietăților fizico-chimice și a activității antimicrobiene a reieșit *eficiența cea mai mare* a nanoparticulelor de argint sintetizate cu antioxidanții naturali din *extractul de ceai verde* – reducători ai căror parametri biochimici (*conținut total de polifenoli, conținut total de flavone și capacitate de inhibare a activității radicalilor liberi de DPPH*) au avut cele mai mari valori.
- Aceste studii pot fi continuate urmărind optimizarea protocoalelor de sinteză cu fructe de pădure, pentru care se pune problema scurtării timpului de sinteză, ceea ce s-ar putea obține prin expunerea la radiații ultraviolete. De asemenea, se poate studia sinteza cu extracte din frunze de afin, mur etc, care sunt mai

puțin costisitoare decât fructele, și pentru care se găsesc unele repere în literatura de specialitate.

Prin colaborări cu laboratoare specializate de microbiologie se poate studia sinteza de AgNP prin intermediul unor microorganisme alese adecvat – bacterii, drojdii, actinomicete.

LISTA COMUNICĂRILOR ȘTIINȚIFICE ȘI A ARTICOLELOR PUBLICATE

Articole publicate în reviste științifice cu cotație ISI

Plesnicute, R. M., Vacariu, A., Motrescu, I., & Creanga, D. (2023). Preliminary Study on Silver Nanoparticle Synthesis Through Chemical and Biological Methods. In *International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering* (pp. 123-133). Cham: Springer Nature Switzerland. (ISI fără impact factor – conference series)

Plesnicute, R., Eluta, M., Les-Agavriiloaei, A., Motrescu, I., Oprica, L., & Creanga, D. (2024). Study of plasmonic silver nanoparticles synthesized by conventional and eco-friendly methods with ultraviolet irradiation. *Romanian Journal of Physics*, 69, 618. (ISI – 1,2, AIS-0,162)

R. Plesnicute, C. Rimbu, L. Oprica, D. Herea, D.Creanga, M.N. Grigore, Eco-friendly synthesis of silver nanoparticles with significant antimicrobial activity (2025) *Sustainability*, 17 (12) 5321 (ISI -3,3, AIS-0,533)

Comunicări științifice la conferințe internaționale

R. Plesnicute, A.Les, D. Creanga, Study on the UV radiation role in the synthesis of silver nanoparticles by conventional and eco-friendly methods, **IBWAP-2024** (Int. Balkan Workshop on Applied Physics), Constanta, Romania – comunicare orală

R. Plesnicute, A. Les, I. Motrescu, D. Creanga, Study on the photochemical synthesis of silver nanoparticles using chemical and biological reducers – preliminary results, International Conference of the Doctoral Schools, Iași, 2024 - comunicare orală

R. Plesnicute, L. Oprica, C. Rimbu, D. Herea, I. Motrescu, D. Luca, D. Creanga, M.N. Grigore. Silver nanoparticles synthesized with vegetal antioxidants and their antimicrobial properties, IC-ANMBES (International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences), Brașov, 2024 – comunicare orală

Comunicări științifice la conferințe naționale

R. Plesnicute, D. Herea, D. Creanga, Plant-mediated synthesis of plasmonic silver nanoparticles for biomedical applications, Conferința Națională de Biofizică, Iași, 2024 – comunicare poster

M. Eluta, **R. Plesnicute**, A. Les, D. Creanga. Preliminary data on the influence of UV radiation on the silver nanoparticle synthesis by various methods, FTEM (Fizica și Tehnologiile Educaționale Moderne) – 2023, Iași – comunicare poster

R. Plesnicute, A. Leș, Studiul spectral al unor nanoparticule de argint obținute prin sintetiză mediată de extracte vegetale, FarPhys, Iași, 2022 – comunicare orală.