MINISTERUL EDUCAȚIEI NAȚIONALE
UNIVERSITATEA "VALAHIA" DIN TÂRGOVIȘTE
IOSUD – ȘCOALA DOCTORALĂ DE ȘTIINȚE INGINEREȘTI
DOMENIUL FUNDAMENTAL *ȘTIINȚE INGINEREȘTI*
DOMENIUL *INGINERIA MATERIALELOR*

NANOMATERIALE PE BAZĂ DE EXTRACTE NATURALE CU APLICAȚII BIOMEDICALE

-REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT-

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
Prof. univ. dr. chim. Rodica Mariana ION

DOCTORAND:
Radu Lucian OLTEANU

TÂRGOVIȘTE
2019

CUPRINS

Teza de doctorat (***Rezumatul tezei de doctorat***)

STADIUL CUNOAȘTERII

PARTE EXPERMENTALĂ

CONTRIBUȚII PROPRII

În ***rezumatul tezei de doctorat***:

* ***figurile și tabelele selecţionate păstrează numerotarea din teza de doctorat***;
** ***bibliografia indicată este selectivă păstrând numerotarea din teza de doctorat.***

Cuvinte cheie: extracte naturale, *Salvia officinalis*, *Sapindus mukorossi*, nanoparticule de argint, hidrogeluri compozite cu nanoparticule de argint, sinteză *in-situ*, UV-VIS, XRD, FTIR, SEM-EDS, activitate antimicrobiană, *Staphiloccocus aureus*, *Escherichia coli*, examen microbiologic.

Mulțumiri

Doresc să mulțumesc conducătorului științific al prezentei teze de doctorat, doamnei profesor universitar doctor chimist Rodica Mariana Ion pentru îndrumarea atentă, de înalt profesionalism, și suportul continuu oferit pe parcursul întregii perioade de pregătire a tezei de doctorat.

Doamnei prof. univ. dr. ing. Cristiana Rădulescu, directorul Institutului de Cercetare Științifică și Tehnologică Multidisciplinară (ICSTM) din cadrul Universității Valahia din Târgoviște și colegilor mei din cadrul ICSTM pentru suportul tehnic de specialitate oferit în vederea realizării unor investigații din cadrul tezei de doctorat.

Domnului prof. univ. dr. Radu Setnescu și domnilor cercetători din Departamentul de Materiale Avansate din cadrul Institutului Național de Cercetare Dezvoltare pentru Inginerie Electrică (ICPE-CA) București: CS III dr. Marius Lungulescu și CS drd. Virgil Marinescu pentru suportul și sprijinul acordat în realizarea cercetării experimentale.

Doamnei dr. Gilda Constantinescu, coordonator al Laboratorului de Microbiologie din cadrul Direcției Sanitar Veterinare și Siguranța Alimentelor Târgoviște, pentru realizarea studiilor microbiologice aferente tezei de doctorat.

O mențiune specială este adresată colegilor mei, CS dr. ing. Cristina Mihaela Nicolescu și lector dr. Marius Bumbac, pentru sprijinul profesional, implicarea, înțelegerea și încrederea acordate pe parcursul întregii perioade doctorale. Le mulțumesc încă o dată pe această cale pentru întregul suport acordat în cercetarea experimentală și nu numai.

Nu în ultimul rând, mulțumesc familiei și prietenilor pentru suportul moral, răbdarea, încurajările și încrederea acordată în această perioadă.

Pentru Carmen, Cristina și Marius

Radu Lucian Olteanu

1. INTRODUCERE

Problematica abordată în cadrul tezei de doctorat, legată de o serie de aspecte fundamentale din domeniul nanomaterialelor pentru aplicații biomedicale, se înscrie între direcțiile principale de acțiune (Strategia națională de cercetare, dezvoltare și inovare 2014 – 2020) ale programelor de cercetare de excelență prin care se promovează cunoașterea științifică în domeniul nanomaterialelor în vederea dezvoltării și integrării agenților economici la nivel de consorții CEEX și al cerințelor Uniunii Europene și țărilor europene dezvoltate. Dezvoltarea de nanomateriale biocompatibile, cu funcționalitate ridicată și efecte secundare reduse în cazul aplicațiilor medicale, permițând terapii performante și tratamente de succes, reprezintă un domeniu important prin prisma potențialului lucrativ dar și a sănătații populației.

Eco-nanotehnologia (nanotehnologia verde), rezultată prin combinarea nanotehnologiei cu principiile și practicile chimiei verzi (chimia verde are la bază un set de principii sau mai degrabă o filozofie care încurajează devoltarea unor produse și procese care reduc sau elimină utilizarea și generarea unor substanțe potențial nocive), ar putea constitui un element important în dezvoltarea unei societăți durabile din punct de vedere ecologic în secolul 21. Procesele și procedeele aplicate curent în domeniul eco-nanotehnologiei implică utilizarea de surse naturale, solvenți nontoxici și procese eficiente energetic în obținerea nanomaterialelor [1]. Extractele din plante constituie una din cele mai studiate categorii în prezent fiind privite ca una din cele mai promițătoare surse de agenți reducători naturali. Un domeniu aparte de succes îl reprezintă sinteza nanoparticulelor metalice, cu aplicații medicale și în electronică, cu utilizarea extractelor de plante ca și agenți reducători [2].

În primele trei decenii ale secolului 21 societatea a fost pusă în fața unui număr mare de produse nano. Conform raportului NCPI (Nanotechnology Consumer Products Inventory), în anul 2016, 622 companii din 32 de țări produceau împreună 1814 nanoproduse. Există o serie de expresii asociate nanotehnologiei însă doi dintre cei mai utilizați termeni sunt „nanomaterial" și „nanoparticulă". Deși uneori ambii termeni sunt folosiți ca sinonime, American Society for Testing and Materials (ASTM) [4] precizează că „nanoparticula (NP) constituie o subclasificare a unei particule ultrafine bi- sau tridimensionale mai mari de 0.001 μm (1 nm) și mai mici de 0.1 μm (100 nm) ce poate sau nu prezenta o proprietate intensivă legată de dimensiune". Pe de altă parte Uniunea Europeană a definit nanomaterialul (NM) ca un „material natural, incidental sau fabricat conținând particule într-o stare nelegată sau sub formă agregată sau aglomerată, pentru care peste 50% din distribuția dimensională a particulelor, a uneia sau mai multor dimensiuni, se află în domeniul 1 – 100 nm" [5]. Conform unor publicații recente [3, 6, 7, 8] dezvoltarea sintezei verzi a nanomaterialelor dincolo de scara de laborator trebuie să aibă în vedere clarificarea aspectelor privitoare la: cuantificarea producției de nanomaterial / nanoparticule, stabilirea unei durate de producere pentru un anumit volum de nanoparticule, standardizarea condițiilor pentru obținerea de particule monodisperse specifice, stabilitatea nanoparticulelor obținute prin sinteză verde, identificarea materialelor derivate din plante cele mai adecvate pentru sinteza unor nanomateriale / nanoparticule specifice, clarificarea mecanismelor biochimice și moleculare implicate în formarea de nanoparticule specifice.

Studiile efectuate, care au stat la baza elaborării prezentei teze de doctorat, au intenționat să valorifice potențialul unor extracte din plante în vederea sintezei nanoparticulelor de argint și respectiv obținerea de nanomateriale tip hidrogeluri compozite cu nanoparticule de argint, printr-o metodă de sinteză „verde", cu potențiale aplicații biomedicale.

1.1. Scopul și obiectivele tezei de doctorat

Scopul tezei de doctorat îl reprezintă cercetarea posibilităților de a sintetiza un anume tip de nanomateriale, respectiv hidrogeluri compozite, cu matrice polimerică hibridă (pe baza a doi componenți, un polimer sintetic și unul natural), funcționalizate cu nanoparticule de argint (sintetizate prin intermediul extractelor vegetale de *Salvia officinalis* și *Sapindus mukorossi*). Pentru un studiu relevant într-o primă fază a fost experimentată sinteza nanoparticulelor de argint cu extractele vegetale menționate iar ulterior sinteza hidrogelurilor compozite cu nanoparticule de argint generate *in situ* prin intermediul acelorași extracte. Într-o fază finală a fost evaluată activitatea antimicrobiană a nanomaterialelor sintetizate prin teste *in vitro* și teste preliminare *in vivo* în vederea evaluarii potențialului acestora pentru aplicații biomedicale. Rezultatele obținute pe durata elaborării tezei pot constitui, în perspectivă, subiectul unor noi cercetări.

Obiectivul general al prezentei teze de doctorat îl constituie sinteza „verde" a unor nanomateriale tip hidrogeluri compozite cu nanoparticule de argint prin metoda de formare a nanoparticulelor reactive în cadrul unui gel preformat (generarea nanoparticulelor realizându-se in situ), reticulat fizic (congelare - decongelare) și respectiv prin iradiere.

Obiective specifice:

- Sinteza nanoparticulelor de argint cu extract de *Salvia officinalis* implicând un număr redus de reactivi și echipamente tehnice specifice, cu implicații minimale de ordin economic și logistic; studiul influenței raportului de combinare extract / precursor sare ionică, pH-ului și temperaturii asupra procesului de sinteză.
- Sinteza nanoparticulelor de argint cu extract de *Sapindus mukorossi* implicând un număr redus de reactivi și echipamente tehnice specifice, cu implicații minimale de ordin economic și logistic; studiul influenței raportului de combinare extract / precursor sare ionică, pH-ului și temperaturii asupra procesului de sinteză.
- Sinteza nanoparticulelor de argint cu amestec de extracte (*Salvia officinalis* și *Sapindus mukorossi*) pentru punerea în valoare a potențialului reducător al extractului de *Salvia officinalis* și respectiv a celui de agent de stabilizare pentru extractul de *Sapindus mukorossi*.
- Obținerea hidrogelurilor compozite cu nanoparticule de argint, generate *in situ* prin intermediul extractelor de *Salvia officinalis*, *Sapindus mukorossi* și amestecului de extracte, reticulate fizic (congelare - decongelare) și prin iradiere.
- Studiul proprietăților antibacteriene ale hidrogelurilor funcționalizate cu nanoparticule de argint, determinate calitativ și semicantitativ prin stabilirea concentrației minime bactericide și bacteriostatice relativ la două tulpini de bacterii patogene (*Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*) din seria celor implicate deseori în infecțiile intraspitalicești.

1.2. Descrierea capitolelor tezei de doctorat

Teza de doctorat este structurată în 7 capitole, primele trei capitole fiind dedicate studiului documentar referitor la stadiul actual al cunoașterii în domeniul complex al nanomaterialelor / nanoparticulelor metalice, iar următoarele patru capitole cercetărilor experimentale și contribuțiilor proprii.

Capitolul 1 al tezei este unul introductiv fiind prezentată o scurtă incursiune în problematica abordată și o serie de aspecte privitoare la stadiul sintezei verzi a nanomaterialelor precum și scopul și obiectivele generale și specifice ale tezei.

În **capitolul 2** al tezei este inclusă o descriere amănunțită a nanomaterialelor / nanoparticulelor metalice la modul general și cu precădere a celor cu nanoparticule de argint pornind de la modalități de sinteză, clasificare și aplicațiile lor biomedicale. În cadrul acestui capitol s-a pus accent în special pe sinteza verde a nanoparticulelor de argint prin intermediul extractelor de plante, a nanomaterialelor cu nanoparticule de argint cu matrice polimerică și respectiv a hidrogelurilor compozite cu nanoparticule de argint.

Capitolul 3 cuprinde o serie de informații legate activitatea antimicrobiană a nanoparticulelor de argint / nanomaterialelor cu nanoparticule de argint asupra microorganismelor patogene precum și unele aspecte referitoare la toxicologia acestora.

Partea experimentală a tezei de doctorat debutează cu **capitolul 4** dedicat unei prezentări succinte a tehnicilor de investigație aplicate în studiul nanoparticulelor / nanomaterialelor sintetizate și a extractelor vegetale utilizate.

În **capitolul 5** sunt prezentate aspecte referitoare la sinteza nanoparticulelor de argint cu extracte de *Salvia officinalis* și *Sapindus mukorossi* prin prisma raportului de combinare extract / precursor sare ionică, pH-ului și temperaturii de sinteză, precum și investigații realizate asupra nanoparticulelor sintetizate, fiind discutate rezultatele obținute.

Capitolul 6 include sinteza hidrogelurilor compozite (cu matrice polimerică alcool polivinilic – hidrolizat de colagen și respectiv poliacrilamidă – amidon) cu nanoparticule de argint generate *in situ* cu ajutorul extractelor de *Salvia officinalis* și *Sapindus mukorossi* precum și investigațiile realizate asupra acestor nanomateriale. În cadrul aceluiași capitol este prezentată și evaluarea activității antibacteriene a nanomaterialelor obținute.

Capitolul 7 al tezei de doctorat prezintă concluziile și contribuțiile proprii.

În finalul tezei de doctorat sunt incluse notele bibliografice consultate pe parcursul anilor de desfășurare a tezei, lista de lucrări publicate în domeniul tezei de doctorat precum și anexele structurate în 11 părți, care cuprind o serie din datele obținute în urma cercetărilor experimentale efectuate în cadrul tezei.

PARTE EXPERIMENTALĂ

4. TEHNICI DE INVESTIGAȚIE UTILIZATE ÎN STUDIU

Metodele de analiză fizico-structurală a materialelor constituie elementele de bază în determinarea relației dintre structură – proprietate – procesare pentru orice domeniu al științei materialelor. Ele furnizeaza date despre comportarea și proprietățile acestora legate de structura, natura forțelor de interacțiune, organizare structurală. Cum fiecare domeniu din știința materialelor are metode de investigare specifice, ele se pot subclasifica în metode structurale, fizice și analitice comune pentru orice tip de material.

4.1 Spectroscopia de absorbție în ultraviolet-vizibil

Spectroscopia de absorbție UV-VIS a permis: 1) identificarea prezenței nanoparticulelor de argint în soluție coloidală / nanomaterialul tip hidrogel (de regulă prezența nanoparticulelor de argint în proba analizată este evidențiată de existența unui maxim spectral în domeniul 400 – 480 nm); 2) aprecieri cu privire la: dimensiunea, distribuția granulometrică, aglomerarea / agregarea nanoparticulelor (deplasarea batocromă respectiv hipsocromă a maximului de absorbție asociată creșterii respectiv scăderii dimensiunii nanoparticulelor; efectul hipercrom coroborat cu îngustarea benzii de absorbție asociat reducerii distribuției dimensionale și unei dispersii avansate și respectiv efectul hipocrom coroborat cu lărgirea benzii de absorbție și deplasarea batocromă în cazul lărgirii distribuției dimensionale și agregării nanoparticulelor).

Înregistrarea spectrelor de absorbție în ultraviolet-vizibil s-a realizat cu ajutorul unui spectrofotometru de absorbție tip Thermo-Evolution-260Bio în domeniul 200-375 nm (utilizând cuve de cuarț ca suport pentru probe) și respectiv 375-700 nm (utilizând cuve de sticlă ca suport pentru probe) la interval de 2 nm. Prelevarea probelor de material s-a realizat în diferite stadii ale procesului de sinteză sau la intervale de timp după obținerea produsului final. Probele de hidrogel au fost diluate în prealabil pentru înregistrarea spectrului folosind ca solvent apă bidistilată; ca probă martor s-a folosit după caz apă bidistilată și extracte vegetale în același raport de diluție cu al probelor analizate.

4.2 Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)

Sistemul de spectroscopie FTIR pentru cercetare avansată, utilizat pentru analiză, a fost constituit dintr-un spectrometru FT-IR Vertex 80 în modul de operare ATR – reflexie total atenuată (attenuated total reflection). Probele analizate (soluții coloidale de nanoparticule, componenți ai matricilor polimerice, matrici polimerice și hidrogeluri compozite cu nanoparticule de argint) au fost evaporate la sec în prealabil (uscare la etuvă timp de 72 ore / 30°C) fără pastilare cu bromură de potasiu sau cu pastilare în unele cazuri. De regulă este preferată analiza probelor cu o manipulare cât mai redusă posibil pentru evitarea contaminării acestora [49], reactivii chimici utilizați pentru fixare, legare sau eluție putând duce la relocarea elementelor în urme și schimbarea compoziției chimice native și structurale a probelor [183]. Rezultatele obținute au fost intercomparate cu date din articole din literatura de specialitate referitoare la tipuri de extracte vegetale apoase și matrici polimerice similare; absorbția radiației IR s-a înregistrat în coordonate transmitanță (T) – număr de undă (ν, cm^{-1}) sau absorbanță (A) – număr de undă, în domeniul 4000 – 400 cm^{-1} la o rezoluție spectrală de 2 cm^{-1}.

Interpretarea spectrelor FTIR a avut în vedere identificarea maximelor de absorbție care suferă modificări în mediile analizate (extract vegetal brut, componenți ai matricii polimerice și hidrogeluri cu nanoparticule de argint). Modificările poziției maximelor spectrale pot fi asociate adsorbției [184, 185, 186, 187, 188] constituenților extractului vegetal pe suprafața nanoparticulelor de argint, legăturilor care pot apare în urma reticulării matricii polimerice și interacției dintre aceasta și / sau nanoparticulele de argint respectiv extractul vegetal.

4.3 Difracția de raze X (XRD)

Caracterizarea structurală a nanoparticulelor de argint sintetizate, matricilor polimerice și nanomaterialelor tip hidrogel, s-a realizat cu un difractometru model Rigaku Ultima IV. Fazele cristaline din structura pulberilor de nanoparticule au fost identificate prin compararea difractogramelor obținute cu liniile de difracție existente în bazele de date internaționale ICDD (International Centre for Diffraction Data) [189]. Fișele ICDD – PDF2 studiate pentru identificarea fazelor cristaline au fost: 00-031-1238 pentru clorura de argint, 00-030-1137 pentru fosfatul de argint și 00-004-0783 pentru argintul metalic.

Analiza XRD a avut în vedere evaluarea cristalinității nanomaterialelor investigate precum și confirmarea prezenței compușilor argintului fiind analizate nanomaterialele tip hidrogel obținute cu extracte de *Salvia officinalis*, *Sapindus mukorossi* și amestec de extracte, respectiv matricile polimerice corespunzătoare. Datele obținute din scanările XRD au fost importate în programul PDXL fiind efectuată analiza Rietveld pentru rafinarea cristalografică. Modelele cristaline au fost constituite pe baza cardurilor ICDD pentru argint (ICDD-PDF 04-003-7118), oxidul de argint (ICDD-PDF 04-007-1374) și respectiv azotatul de argint (ICDD-PDF 01-074-4790).

4.4 Microscopia electronică de baleiaj și spectroscopie de raze X cu dispersie după energie (SEM-EDS)

Dispozitivul utilizat la analiză a fost constituit dintr-un microscop electronic de baleiaj cu emisie de câmp (FESEM) model Carl Zeiss – Auriga, dedicat studiului structurilor microscopice și al suprafețelor diferitelor tipuri de materiale: probe organice și anorganice (polimeri, materiale policompozite, mase plastice) conductive sau neconductive magnetic. Pentru analiza nanoparticulelor (din soluțiile coloidale) sintetizate în prima fază a studiului experimental s-a utilizat un dispozitiv constituit dintr-un microscop electronic de baleiaj cu emisie de câmp model Hitachi SU-70 cuplat cu spectrometru cu dispersie după energie (EDS) și lungimea de undă (WDS); tensiune de accelerare variabilă 0.1÷30 kV, domeniul de mărire 30X÷800.000X și 1 nm rezoluția la tensiunea de accelerare de 15 kV.

Spectrometrul de raze X cu dispersie după energie (EDX sau EDS) este un instrument capabil să realizeze analiza compozițională a razelor X caracteristice, generate în urma interacțiunii dintre fascicolul electronic incident și suprafața probei. Printre caracteristicile / avantajele și dezavantajele metodei EDS comparativ cu metoda spectrometriei de dispersie după lungimea de undă (WDX sau WDS), pot fi menționate: analiza simultană a numeroase elemente într-un timp scurt, senzitivitate la detecție ridicată, limită de detecție redusă (0.3%) comparativ cu WDX, deteriorare minimă a probei analizate.

Ca și avantaj al tehnicii SEM poate fi menționată rezoluția înaltă în caracterizarea formei și dimensiunii nanoparticulelor însă trebuie avute în vedere o serie de limitări cauzate de efectele de încărcare (datorate acumulării câmpurilor electrice statice), incompatibilității cu probele lichide sau umede, operarea în condiții de vid precum și un grad de incertitudine de 10% în analiza cantitativă [9, 190, 191].

4.5 Tehnici microbiologice utilizate în studiu

Potențialul biocid, respectiv ***investigarea proprietăților antimicrobiene, ale nanomaterialelor tip hidrogel***, s-a realizat în laboratorul de microbiologie al Direcției Sanitar Veterinare și Siguranța Alimentelor Târgoviște, Dâmbovița. Laboratorul, echipat standard din punct de vedere al dotărilor tehnice (condiții de lucru sterile ce includ sterilizarea instumentarului, materialului de lucru și incintei), utilizează tehnica aseptică pentru evitarea oricărei contaminări încrucișate a culturilor de microorganisme, mediilor de cultură, materialului și instrumentarului, etc.

Proprietățile antimicrobiene ale nanomaterialelor tip hidrogel cu nanoparticule de argint au fost investigate printr-un studiu microbiologic pe două culturi pure de bacterii din categoria tulpinilor Gram-negative (*Escherichia coli*) și respectiv Gram-pozitive (*Staphylococcus aureus*); selectarea bacteriilor menționate având în vedere incidența acestora în cadrul infecțiilor nosocomiale (infecția nosocomială sau infecția intraspitalicească, este acea infecție care nu este prezentă sau care nu se află în perioada de incubație în momentul în care pacientul s-a internat în spital și care se supraadaugă afecțiunii pentru care pacientul s-a internat).

Tulpinile bacteriene au fost cultivate pe medii nutritive specifice și / sau selective, în prezența unor doze variabile de hidrogel cu nanoparticule de argint, incubate la temperaturi optime pe durate standard, iar ulterior s-a recurs la numărarea indirectă a unităților formatoare de colonii (UFC). Capacitatea antimicrobiană a tipului de hidrogel și doza minimă bactericidă se poate stabili prin corelarea numărul de colonii dezvoltate cu doza de hidrogel din probă. Stadiul de multiplicare al microorganismelor sau aprecierea gradului de infectare al probei se poate stabili prin numărarea microorganismelor sau a UFC. Pentru o numărătoare cât mai exactă se procedează de regulă la o diluare, într-o primă etapă înainte de însămânțare, a probei de analizat (hidrogelul cu potențial antimicrobian) sau inoculului de microorganisme utilizat întru-un mediu steril; uzual se aplică diluția decimală în apă peptonată sterilă (acest mediu este recomandat de ISO Committee prin specificația ISO 6579:1993), ser fiziologic - soluție 9% NaCl sau ser fiziologic peptonat) [192].

În cazul studiului efectuat pe probele de hidrogeluri s-a folosit metoda indirectă de numărare a microorganismelor, respectiv metoda culturală Koch (metoda culturală în placă) ce se bazează în principiu pe însămânțarea unui volum cunoscut de suspensie de celule microbiene pe mediu de cultură, în plăci Petri care conțin o anumită cantitate de probă de analizat – ca atare sau eluată; după o perioadă optimă de incubare se realizează numărarea coloniilor, considerând că fiecare colonie apare ca rezultat al multiplicării unei singure celule.

În paralel a fost realizată o ***testare a activității antifungice pe tulpină de Penicillium (Penicillium glaucum)***, deoarece numeroase specii ale acestui gen sunt agenți de putrezire, fiind frecvent întâlnite în microhota aerului; testarea activității s-a realizat la U.S.A.M.V. – Facultatea de Medicină Veterinară, laboratorul clinic din cadrul Colegiului Medicilor Veterinari. Tehnica de testare precum și protocolul de lucru aplicat în cazul probelor de hidrogeluri compozite cu nanoparticule de argint s-a realizat cu respectarea normelor în vigoare conform metodelor standardizate existente [200, 201, 202].

Pentru o primă ***evaluare a gradului de toxicitate acută***, nanomaterialele tip hidrogel sintetizate au fost supuse unei serii de teste farmacologice preliminare (testarea s-a realizat la U.S.A.M.V. București – Facultatea de Medicină Veterinară, laboratorul clinic din cadrul Colegiului Medicilor Veterinari). În experimentul de testare a toxicității acute au fost folosiți șoareci albi rasa Swiss (în greutate de 20±2 g) și șobolani albi rasa Wistar (în greutate de 140±20 g) cu repartiție uniformă pe sexe (20 animale, 10 masculi și 10 femele pe fiecare lot și doză), proveniți de la biobaza U.S.A.M.V. - București. În cursul experimentelor *in vivo*, în manipularea animalelor s-a ținut seama de aprobarea Comisiei de Etică a U.S.A.M.V. - București, în strictă concordanță cu reglementările etice internaționale.

4.6 Metode de caracterizare a extractelor vegetale utilizate în studiu

Extractele vegetale obținute au fost caracterizate prin măsurarea pH-ului (valoarea înregistrată fiind de 6.8 pentru *Salvia officinalis* și respectiv 4.2 pentru *Sapindus mukorossi*) și evaluarea spectrofotometrică a speciilor fitochimice implicate în procesul de sinteză.

Activitatea antioxidantă (AA, %) a fost evaluată utilizând 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) și înregistrarea absorbanței la 517 nm pe baza metodei descrise în literatură [207]. Conținutul total de flavonoide a fost determinat pe baza testului cu clorură de aluminiu la 510 nm [208] rezultatele fiind exprimate în mg catehină / ml. Testul cu vanilină [209, 210] la 500 nm a fost aplicat pentru a determina conținutul total de taninuri; rezultatele au fost exprimate în mg catehină / ml. Pentru conținutul total de terpenoide s-a aplicat metoda descrisă în literatură [211] la 608 nm, rezultatele fiind exprimate în mg linalol / ml. Extractele vegetale au fost caracterizate de asemenea în vederea determinării conținutului total de fenoli prin aplicarea metodei Folin-Ciocâlteu, în acord cu standardul internațional ISO 14502-1:2005(E) [212], adaptată condițiilor de lucru; pentru trasarea dreptei de etalonare s-au utilizat soluții de concentrații diferite de acid galic, standardele și probele fiind măsurate la 765 nm iar conținutul total de fenoli fiind exprimat în mg acid galic / ml extract.

Metodele spectrofotometrice uzuale pentru determinarea ***concentrației critice micelare*** (CMC) apelează la aditivi a căror modificare a absorbanței în UV-VIS sau a emisiei de fluorescență, indică formarea miceliilor.

Metoda micelizării unui colorant, propusă de Patist și colaboratorii [58], a fost adaptată condițiilor de lucru pentru determinarea CMC a extractului prin utilizarea unei soluții apoase de albastru de metilen ($C_{16}H_{18}ClN_3S$) de concentrație 10^{-4}M. Spectrele de absorbție în vizibil au fost înregistrate în domeniul 500 – 800 nm, pe interval de scanare de 1 nm, înregistrându-se lungimea de undă corespunzătoare maximului de absorbție (λ_{max}). Din reprezentarea grafică a λ_{max} în funcție de concentrația extractului în soluție, CMC a fost determinată corespunzătoar punctului de intersecție al celor două aproximări / tendințe liniare ale segmentelor corespunzătoare curbei obținute.

Metoda bazată pe corelarea semnalului datorat rezonanței plasmonice de suprafață a nanoparticulelor de argint cu concentrația surfactantului. Pentru determinarea CMC pe baza răspunsului plasmonic al nanoparticulelor, s-a apelat la amestecuri de extract vegetal și soluție stabilă de nanoparticule de argint, testele fiind realizate la temperatura camerei prin înregistrarea absorbanței probelor la o lungime de undă fixă (418 nm), corespunzătoare maximului de absorbție înregistrat pentru soluția stabilă de nanoparticule de argint. Valorile absorbanței au fost reprezentate în funcție de concentrația calculată de extract la fiecare măsurare, CMC fiind determinată ca valoarea corespunzătoare punctului de inflexiune identificat din reprezentarea variației maximului absorbanței (A_{max}) în funcție de conținutul de extract vegetal din soluția test.

Ca și variantă a metodei aplicate anterior s-a realizat și ***determinarea CMC pe baza variației lungimii de undă asociate maximului de absorbție (λ_{max}) cu conținutul de extract aditivat soluției de nanoparticule de argint***, valoarea CMC obținută (2.53 ± 0.19 %, v/v) fiind apropiată de valorile înregistrate prin aplicarea celor două metode descrise mai sus. Variația lungimii de undă asociată maximului de absorbție în spectrul UV-VIS a avut în vedere faptul că nu există o singură valoare a maximului absorbanței, maximul de absorbție fiind aplatizat; ținând cont de acest aspect a fost selectată valoarea lungimii de undă la care s-a înregistrat prima valoare a absorbanței maxime în domeniul 650 - 300 nm).

CONTRIBUȚII PROPRII

5. SINTEZA NANOPARTICULELOR DE ARGINT UTILIZÂND EXTRACTE DE *SALVIA OFFICINALIS* ȘI *SAPINDUS MUKOROSSI*

5.1 Obținerea extractelor vegetale de *Salvia officinalis* și *Sapindus mukorossi*

Ca și procedură de extracție s-a optat pentru extracția cu solvent în vederea obținerii extractelor din plante datorită rapidității, facilității și eficienței costurilor. Extractele au fost obținute prin extracție statică la temperatura camerei în recipient acoperit, raportul de extracție (material vegetal uscat / volum de solvent, g / ml) fiind menținut în toate procedurile de extracție. După terminarea extracției amestecul a fost filtrat și centrifugat pentru obținerea unui extract limpede iar supernatantul a fost stocat la 4°C pentru utilizarea ulterioară în determinările experimentale. Aceeași soluție stoc din fiecare extract a fost utilizată în toate determinările aferente [218, 219].

5.2 Caracterizarea extractelor vegetale de *Salvia officinalis* și *Sapindus mukorossi*

Testele pentru identificarea unor componenți activi în extractele apoase de *Salvia officinalis* și *Sapindus* mukorossi au fost realizate pe baza unor proceduri standard [231, 232, 233] permițând identificarea prezenței saponinelor, terpenoidelor, steroidelor, taninurilor și flavonoidelor.

Tabelul 5.1 Indicatori ai conținutului fitochimic al extractelor apoase de *Salvia officinalis* și *Sapindus mukorossi* [218, 219]

Indicator / Tip extract	***Activitate antioxidantă (%)***	***Flavonoide (mg/ml)***	***Taninuri (mg/ml)***	***Terpenoide (mg/ml)***	***Polifenoli (mg/ml)***
Salvia officinalis	28.92±0.88	304.60±3.40	188.00±2.35	95.61±0.89	170.92±2.44
Sapindus mukorossi	27.01±0.92	182.54±1.66	83.31±1.12	251.00±2.21	168.88±2.78
*fiecare valoare constituie media valorilor obținute pentru trei analize (probe în triplicat) ± deviație standard					

În cadrul demersului experimental ce a vizat influența capacității reducătoare fitochimice asupra sintezei nanoparticulelor de argint cu extracte vegetale, ale căror rezultate au fost publicate [218], ce au inclus și extractul de *Salvia officinalis*, a fost realizată și o corelare între indicatorii conținutului fitochimic al extractelor vegetale și capacitatea reducătoare a acestora.

Așa cum a fost precizat anterior extractul de *Sapindus mukorossi* a fost remarcat îndeosebi pentru pentru calitățile sale de surfactant natural datorită conținutului ridicat în saponine. O proprietate aparte a acestora este modul de aranjare al moleculelor în agregate moleculare organizate, micelii, atunci când concentrația surfactantului atinge o anumită valoare numită ***concentrație critică micelară*** (CMC – critical micelle concentration) [245]. Este general acceptat faptul că CMC nu este definită de o valoare bine definită ci de un domeniu de concentrație asociat formării miceliilor [248, 249].

Metoda micelizării unui colorant, propusă de Patist și colaboratorii [58], a fost adaptată condițiilor de lucru pentru determinarea CMC a extractului prin utilizarea unei soluții apoase de albastru de metilen ($C_{16}H_{18}ClN_3S$) de concentrație 10^{-4}M.

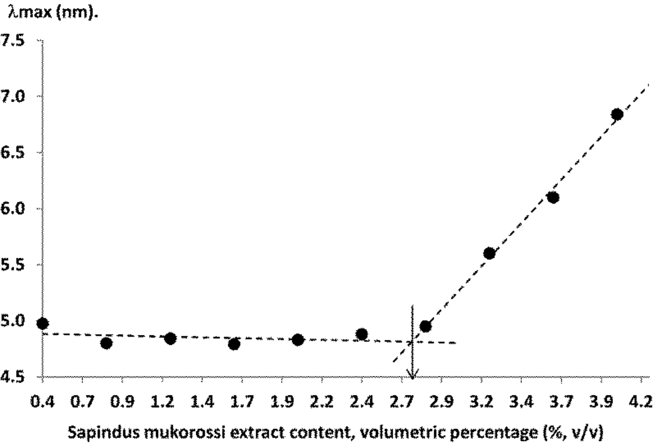


Figura 5.4 Determinarea concentrației critice micelare (CMC = 2.71 ± 0.11 %, v/v) pentru extractul apos de *Sapindus mukorossi* prin metoda micelizării unui colorant (albastru de metilen 10^{-4} M) [213].

Metoda bazată pe corelarea semnalului datorat rezonanței plasmonice de suprafață a nanoparticulelor de argint cu concentrația surfactantului a fost studiată printre alții de Salem și colaboratorii [61] care au publicat o serie de studii referitoare la utilizarea deplasării spectrale a benzilor de rezonanță plasmonică pentru o serie de surfactanți de sinteză la determinarea concentrației critice micelare.

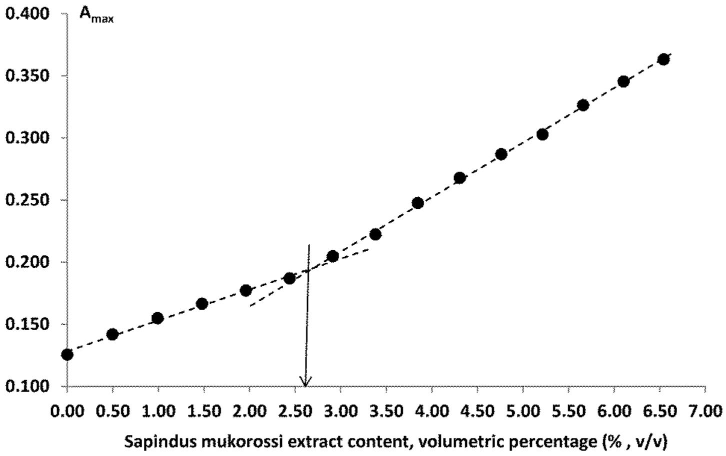


Figura 5.5 Determinarea concentrației critice micelare (CMC = 2.68 ± 0.13 %, v/v) pentru extractul apos de *Sapindus mukorossi* pe baza senzitivității benzii asociate rezonanței plasmonice de suprafață a nanoparticulelor de argint (418 nm) [213].

Ca și variantă a metodei aplicate s-a realizat și ***determinarea CMC pe baza variației lungimii de undă asociate maximului de absorbție (λ_{max}) cu conținutul de extract aditivat***

soluției de nanoparticule de argint, valoarea CMC obținută (2.53 ± 0.19 %, v/v) fiind apropiată de valorile înregistrate prin aplicarea celor două metode descrise mai sus.

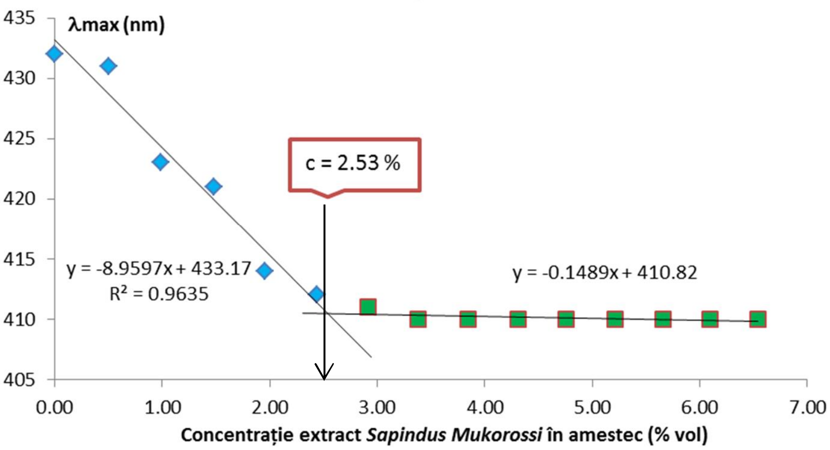


Figura 5.6 Determinarea concentrației critice micelare (CMC = 2.53 ± 0.19 %, v/v) pe baza variației lungimii de undă asociată maximului de absorbție pentru soluția coloidală de nanoparticule de argint cu adaos de extract de *Sapindus mukorossi*.

Metodele spectroscopice aplicate au condus la obținerea unei corelații bune între valorile determinate pentru concentrația critică micelară (2.71 ± 0.11 %, v/v și respectiv 2.68 ± 0.13 %, v/v).

5.3 Sinteza nanoparticulelor de argint cu extract de *Salvia officinalis*

5.3.1 Dinamica procesului de creștere a nanoparticulelor de argint. Influența raportului de combinare precursor sare ionică : extract

Dinamica formării și creșterii nanoparticulelor coloidale metalice a fost descrisă de diferite teorii care stabilesc modele pentru nucleația și creșterea nanoparticulelor. O abordare diferită față de aceste teorii este făcută de Jorg Polte [215] care prezintă modele de creștere a nanoparticulelor folosind ca fundament stabilitatea coloidală a acestora. Modelul de formare al nanoparticulelor propus de Polte cuprinde patru etape în care reducerea și coalescența se desfășoară simultan dar cu viteze diferite.

Sinteza nanoparticulelor de argint utilizând extract de *Salvia officinalis* se poate încadra în modelul propus de Polte în categoria a doua de sinteză (cuprinde procesele în care reducerea și coalescența au loc în același timp și se desfășoară concomitent pe toată durata până la obținerea nanoparticulelor coloidale stabile) judecând dupa compoziția amestecului de extracție așa cum este prezentat în literatură, care include specii slab reducătoare. Cu toate acestea modificarile condițiilor de lucru ar putea conduce la diferite dinamici ale procesului de creștere a nanoparticulelor.

Prin corelarea modificărilor spectrale în UV-VIS, ca indicator al schimbărilor morfologice ale nanoparticulelor de argint, cu parametrii experimentali (pH, raportul de amestecare inițial azotat de argint / extract *Salvia officinalis*) se pot trage concluzii referitoare la creșterea nanoparticulelor și parametrii de lucru optimi în vederea sintezei nanoparticulelor de argint utilizând extracte din plante [92, 258, 259].

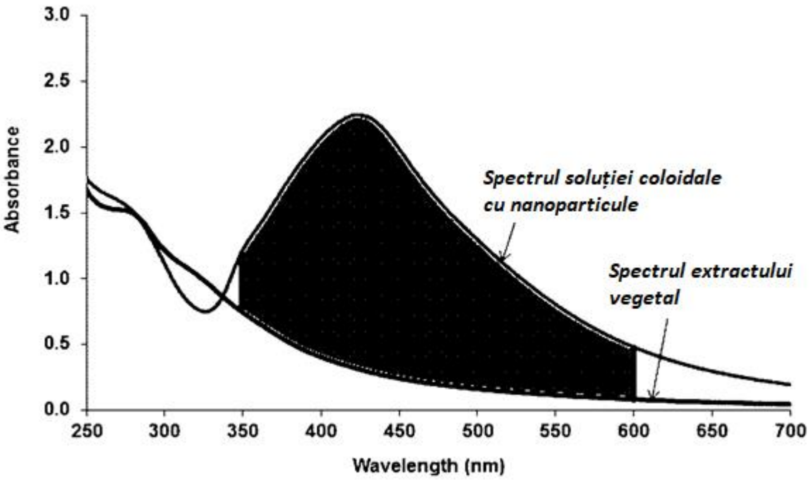


Figura 5.9 Aria relativă asociată răspunsului plasmonic al nanoparticulelor de argint calculată din spectrele UV-VIS înregistrate pentru extractul vegetal şi respectiv soluţia coloidală de nanoparticule.

Reprezentarea grafică a ariei relative în funcţie de timp a fost preferată reprezentării valorilor asociate maximului de absorbţie în timp datorită faptului că benzile de absorbţie prezintă caracteristici diferite (intensitate maximă, lărgime de bandă, formă) în funcţie de rapoartele de amestecare azotat de argint / extract de salvie. Domeniul lungimii de undă selectat a avut în vedere faptul că în această zonă apar principalele modificări plasmonice ale nanoparticulelor de argint în spectrele UV-VIS [261]. Motivul selectării ariei relative în locul maximului de absorbţie a fost şi acela că răspunsul plasmonic al nanoparticulelor metalice este influenţat de mediul de reacţie.. În etapa de creştere procesul este dinamic, însoţit de rupere şi formare de legături, cu efect asupra dimensiunii şi formei nanoparticulelor şi interfeţei metalice.

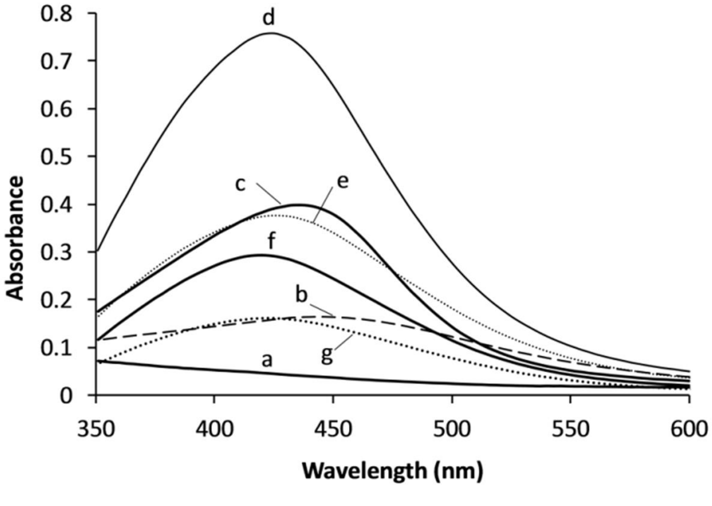


Figura 5.10 Spectrele de absorbţie UV-VIS la 3 ore pentru diferite rapoarte volumetrice de amestecare azotat de argint 10 mM : extract *Salvia officinalis*: (a) 1:5, (b) 1:3, (c) 1:2, (d) 1:1, (e) 2:1, (f) 3:1 şi (g) 5:1.

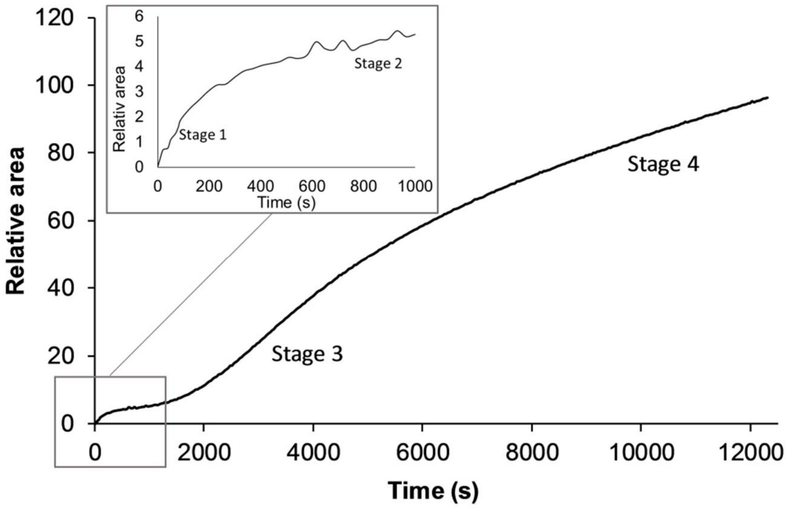


Figura 5.11 Evoluția ariei relative în timp pentru amestecul de sinteză la un raport de amestecare volumetric azotat de argint 10 mM : extract *Salvia officinalis* egal cu 1:1 [219].

Evoluția spectrului UV-VIS în timp indică o creștere rapidă a nanoparticulelor de argint în primele trei ore de la momentul amestestecării componenților. Totuși apar diferențe între viteza de creștere a intensității absorbanței și poziția maximului de absorbție. Luând în considerare alura spectrului (figura 5.10) în domeniul 350-600 nm, se poate aprecia că cel mai mare conținut de nanoparticule a fost obținut atunci când amestecul inițial a conținut volume egale de azotat de argint 10 mM și extract de salvie.

Alura curbelor variației ariei relative în funcție de timp variază cu raportul de amestecare inițial dintre extractul de salvie și azotat de argint. În cazul tuturor sintezelor efectuate experimental a fost calculată viteza relativă de creștere a ariei ca panta porțiunii lineare a graficului trasat în figura 5.11. Pentru fiecare viteză relativă aferentă celor patru etape ale procesului de creștere a nanoparticulelor de argint, menționate anterior și evidențiate în figura 5.11, au fost atribuite notațiile v_1, v_2, v_3 și respectiv v_4, valorile respective fiind prezentate în tabelul 5.3.

Tabelul 5.3 Valorile vitezei relative de creștere a ariei, din spectrele UV-VIS, asociată nanoparticulelor de argint pentru cele patru etape ale procesului de creștere a nanoparticulelor

Raport de amestecare volumetric azotat de argint : extract vegetal în amestecul de sinteză	***Viteza relativă de creștere a ariei relative (unități arbitrare / secundă)***			
	v_1	***v_2***	***v_3***	***v_4***
1:5	0.0450	0.0004	-	-
1:3	0.0422	0.0006	0.0038	0.0012
1:2	0.0251	0.0018	0.0050	0.0035
1:1	0.0176	0.0021	0.0138	0.0052
2:1	0.0136	0.0010	0.0066	0.0035
3:1	0.0028	0.0006	0.0044	0.0027
5:1	0.0026	0.0005	0.0016	0.0009

Un prim aspect care poate fi observat este acela că viteza relativă de creștere în prima etapă, ce implică un proces de reducere ce are loc cu viteză superioară creșterii particulelor, este influențată de conținutul de extract în soluție. Ca urmare utilizarea soluțiilor în care raportul de amestecare este favorabil extractului conduce la viteze de creştere superioare aferente ariilor relative. Se poate concluziona că viteza de creştere a ariei relative (implicit a răspunsului plasmonic) în prima etapă a formării şi creşterii nanoparticulelor este proporţională cu conţinutul în extract vegetal sau speciilor reducătoare prezente în acesta, existente în amestecul de sinteză. În a doua etapă a procesului de creştere a nanoparticulelor, principalele procese care concură la apariţia unor nanoparticule stabile coloidal sunt reducerea şi difuzia iar probele cu un raport volumetric de amestecare sare ionică : extract vegetal egal cu 1:1 oferă condiţii optime pentru creşterea nanoparticulelor.

Formarea nanoparticulelor în etapa de accelerare autocatalitică a creşterii acestora este atribuită unui proces autocatalitic, ionii metalici adsorbiţi la interfaţa metal-soluţie fiind iniţial reduşi şi apoi încorporaţi în particula aflată în creştere; amestecurile cu un raport de amestecare volumetric azotat de argint 10 mM : extract de salvie egal cu 1:1 au înregistrat cele mai mari valori ale vitezei de creştere a semnalului plasmonic (tabelul 5.3). În etapa a patra se menţine aceeaşi ordine a evoluţiei vitezelor relative sugerînd ca fiind optim în obţinerea unui răspuns plasmonic intens, raportul volumetric de amestecare sare ionică : extract vegetal de 1:1.

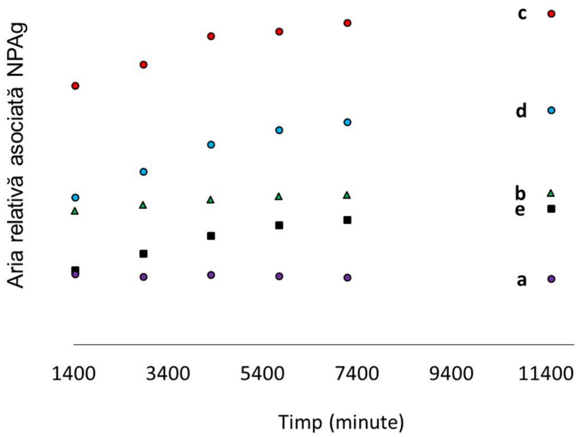
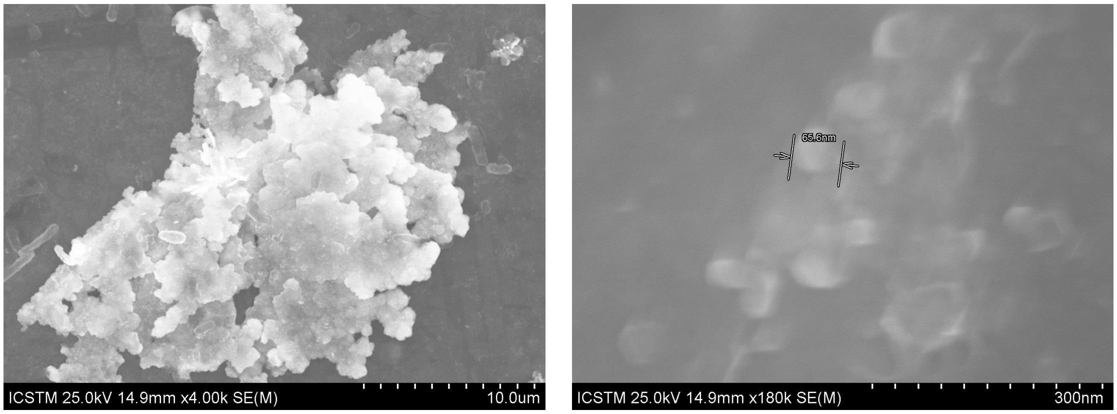
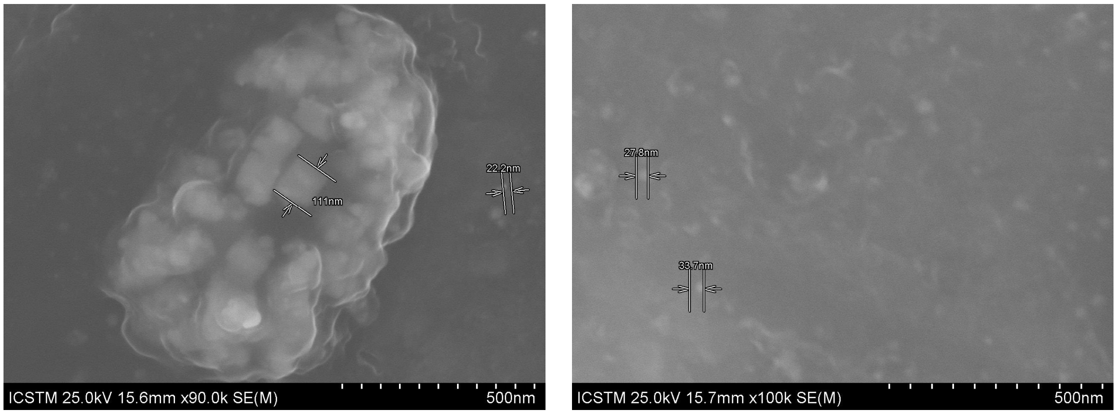


Figura 5.12 Variaţia ariei relative în timp pentru rapoarte volumetrice de amestecare azotat de argint 10 mM : extract de salvie egale cu: (a) 1:5, (b) 1:2, (c) 1:1, (d) 2:1 şi (e) 5:1 [219].



(a) (b)

Figura 5.13 Imagini SEM pentru probe cu raport volumetric de amestecare $AgNO_3$ 10 mM : extract de *Salvia officinalis* egal cu 5:1, (a) conglomerate cu model fractal de cristalizare, (b) particule cu dimensiuni nanometrice.



(a) (b)

Figura 5.20 Imagini SEM ale nanoparticulelor puse în evidenţă pentru probe cu raport volumetric de amestecare $AgNO_3$ 10 mM : extract de *Salvia officinalis* egal cu 1:4 - (a) şi respectiv 1:5 - (b).

În vederea obţinerii de informaţii privind stoechiometria mediului de reacţie al întregului proces de echilibru, într-o primă etapă amestecul a fost testat la temperatura camerei prin înregistrarea spectrului UV-VIS iar conţinutul de azotat de argint a fost variat sistematic (0 – 100%); spectrele UV-VIS au fost înregistrate pentru obţinerea de informaţii asupra produşilor de reacţie. Etapele demersului experimental au fost realizate pentru obţinerea de informaţii legate de raportul volumetric optim azotat de argint : extract vegetal necesar sintezei nanoparticulelor de argint stabile.

Rezultatele experimentale au indicat un raport optim de amestecare a precursorilor egal cu 1:1 (soluţie azotat de argint 10 mM : extract de salvie) în cazul biosintezei nanoparticulelor de argint cu extract de *Salvia officinalis* la temperatura ambiantă.

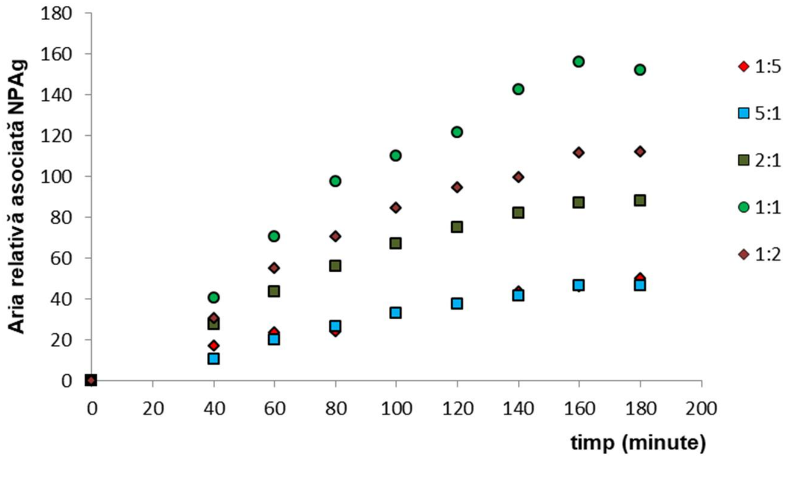


Figura 5.22 Evoluţia în timp a ariei relative, calculate din spectrul UV-VIS, asociată nanoparticulelor de argint, într-un interval de 3 ore de la debutul sintezei (25°C) pentru diferite rapoarte volumetrice de amestecare ale precursorilor (extract *Salvia officinalis* : azotat de argint 10 mM).

Prin reprezentarea ariei relative în funcţie de conţinutul volumetric de azotat de argint din amestec (%, v/v) la intervale de timp de la debutul sintezei (25°C) se remarcă valori mici ale acesteia pentru un conţinut redus de sare ionică, comportare corelată cu existenţa unui număr redus de nanoparticule de argint în soluție (figura 5.24). O amplificare a răspunsului plasmonic se observă în cazul unui exces de sare ionică relativ la conținutul de extract vegetal (conținut de azotat de argint peste 50%, v/v), fiind înregistrate valori mai mari ale ariei relative. Rezultă astfel că raportul volumetric inițial de amestecare al precursorilor egal cu 1:1 poate fi considerat ca fiind optim pentru biosinteza nanoparticulelor de argint cu extract de *Salvia officinalis* la 25°C.

5.3.2 Influența pH-ului

pH-ul constituie un parametru experimental important în dinamica creșterii nanoparticulelor de argint pentru că valoarea sa poate influența majoritatea echilibrelor implicate în proces. Probele testate, obținute prin amestecarea în proporții diferite a extractului de salvie cu soluție tampon de pH, au prezentat valori stabile ale pH-ului.

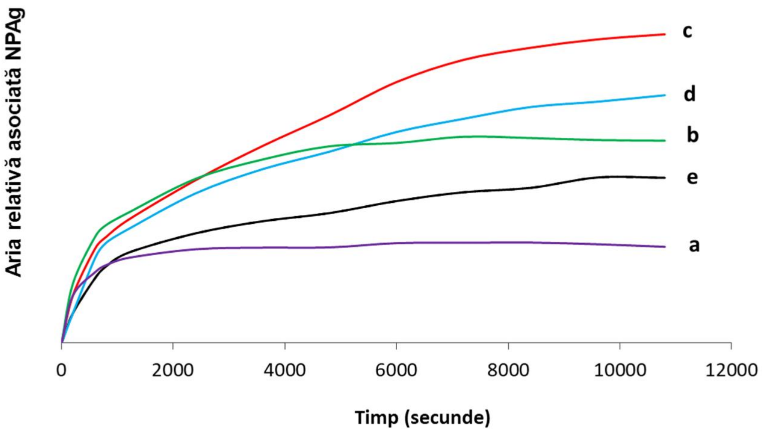


Figura 5.25 Variația ariei relative în timp în mediu bazic (pH = 11.5) pentru diferite rapoarte de amestecare (v/v) azotat de argint : extract de salvie: (a) 1:5, (b) 1:2, (c) 1:1, (d) 2:1 și (e) 5:1 [219].

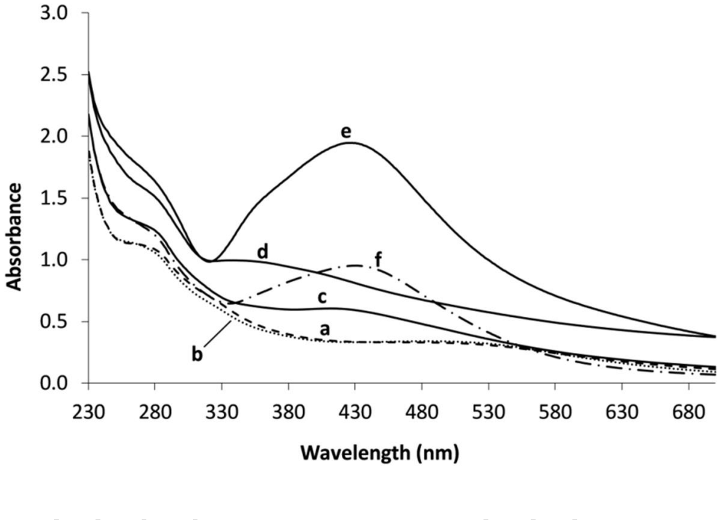


Figura 5.26 Spectrele de absorbție UV-VIS pentru soluțiile de nanoparticule de argint, la raport volumetric de amestecare azotat de argint : extract de salvie egal cu 1:1, la diferite valori de pH: (a) pH = 2.3, (b) pH = 2.8, (c) pH = 6.3, (d) pH = 10.5, (e) pH = 11.8, (f) pH = 6.8 (fără soluție tampon de pH) [219].

Evoluția vitezei relative de creștere (calculată ca panta dreptei pe porțiunea liniară a variației ariei relative în timp), la diferite valori de pH, pentru raportul de amestecare volumetric azotat de argint : extract de *Salvia officinalis* egal cu 1:1, este prezentată în tabelul 5.4. Valorile v_1, v_2, v_3 și respectiv v_4 corespund celor patru etape ale procesului de creștere a nanoparticulelor corespunzătoare modelului propus în studiul prezentat. Ariile relative sunt atribuite răspunsului plasmonic al nanoparticulelor de argint iar modul de calcul a fost detaliat anterior.

Tabelul 5.4 Valorile vitezei relative de creștere a ariei relative asociată nanoparticulelor de argint la diferite valori de pH pentru raportul de amestecare (v/v) azotat de argint : extract de *Salvia officinalis* egal cu 1:1

pH-ul amestecului de sinteză	***Viteza relativă de creștere a ariei relative (unități arbitrare / secundă)***			
	v_1	v_2	v_3	v_4
6.8 (fără soluție tampon de pH)	0.0176	0.0021	0.0138	0.0052
11.8	0.4439	0.0025	-	-
10.5	0.0255	0.0031	0.0081	0.0049
6.3	0.0106	0.0023	0.0092	0.0072
2.8	0.0098	0.0023	0.0072	0.0030
2.3	0.0028	0.0002	0.0061	0.0009

Viteza asociată primei etape a procesului de creștere (v_1) prezintă valori ridicate în cazul amestecurilor cu pH alcalin comportare care poate fi atribuită formării oxidului de argint. Ca urmare, în soluție alcalină, în faza inițială, oxidarea argintului la oxid de argint joacă un rol important în mecanismul global al formării nanoparticulelor de argint.

Analiza de spectroscopie în infraroșu a urmărit identificarea modificărilor structurale care ar sugera natura interacțiilor dintre nanoparticulele de argint și componenții extractului vegetal, la diferite valori ale pH-ului, și, de asemenea, de a observa potențiale corelații cu metodele de caracterizare ale extractului vegetal. Spectrele înregistrate au fost obținute cu scopul obținerii de informații privind caracteristicile structurale și modificarile care ar rezulta ca urmare a modificării pH-ului soluției apoase în care s-au sintetizat nanoparticulele de argint [272]. Modificările observate în spectrele IR ale extractului în mediu acid și alcalin pot fi atribuite schimbările structurale datorate hidrolizei grupelor amidice; acest lucru ar putea explica și modificările apărute în spectrele IR ale extractului de salvie după adăugarea azotatului de argint și răspunsul plasmonic slab al amestecului azotat de argint : extract vegetal în soluție acidă.

Analiza FTIR (realizată pentru extractul vegetal, în soluție neutră, acidă și bazică, și respectiv pentru amestecurile de sinteză) a pus în evidență în spectrele IR pentru extractul vegetal a unei benzi largi de absorbție cu un maxim centrat la 3400 cm^{-1} ce poate fi corelat cu conținutul de compuși fenolici pus în evidență prin determinările efectuate pentru conținutul de fenoli total, flavonoide și taninuri. Pe de altă parte au fost identificate modificări structurale, în cazul extractului vegetal în soluție acidă și alcalină, constând în deplasarea unor picuri și apariția unora noi, ce au fost asociate acțiunii hidroxidului sau acidului introdus în soluție. Modificările semnificative au fost observate în domeniul 1600-1800 cm^{-1}, datorate vibrațiilor de întindere a legăturilor C-O specifice compușilor cu grupări carbonilice. În urma adăugării azotatului de argint la extractul vegetal, s-au constat deplasări ale unor picuri după formarea nanoparticulelor metalice; aceste deplasări putând fi asociate interacțiilor dintre unele grupe funcționale ale speciilor organice cu nanoparticulele metalice la interfața metal – soluție.

5.3.3 Influența temperaturii

În această secţiune sunt prezentate o serie de aspecte legate de influenţa temperaturii asupra procesului de biosinteză a nanoparticulelor de argint cu utilizarea extractului de *Salvia officinalis*. Este cunoscut faptul că temperatura de reacţie joacă un rol important în distribuţia spaţială şi dimensională a particulelor, în special în cazul nanoparticulelor de argint [92]. Determinările experimentale pe baza procedurii abordate sunt destinate a optimiza parametrii experimentali ai procesului de biosinteză studiat luând în considerare modificările din spectrul UV-VIS.

În figura 5.31 este prezentată variaţia în timp a ariei relative asociată nanoparticulelor de argint în primele trei ore de la debutul sintezei la diferite temperaturi de lucru şi rapoarte de amestecare ale precursorilor.

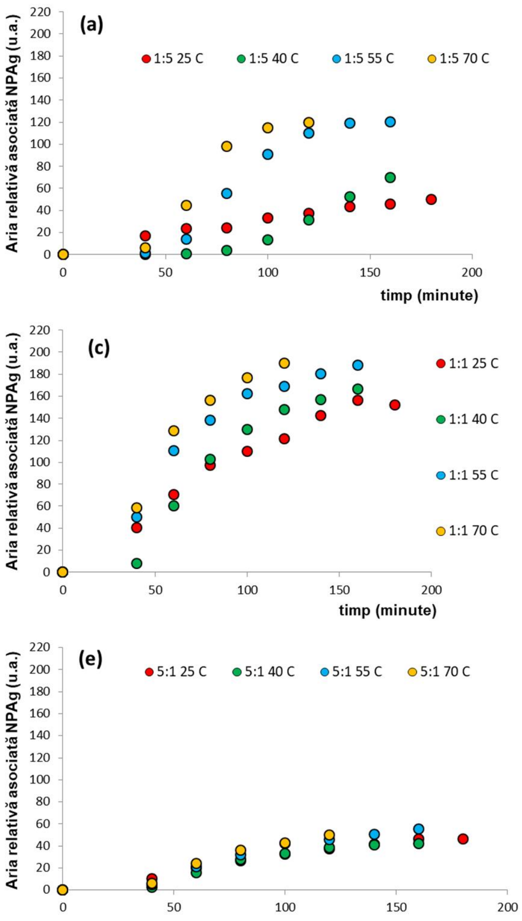


Figura 5.31 Evoluţia în timp a ariei relative, calculate din spectrul UV-VIS, asociată nanoparticulelor de argint, într-un interval de 3 ore de la debutul sintezei la 25, 40, 55 şi respectiv 70°C, pentru rapoarte volumetrice de amestecare extract *Salvia officinalis* : azotat de argint 10 mM egale cu: a) 1:5, b) 1:2, c) 1:1, d) 2:1 şi e) 5:1.

Înregistrarea spectrelor UV-VIS pentru amestecurile studiate (figurile 5.1-5.3 în Anexa 5) a permis calculul ariei relative asociate nanoparticulelor de argint prezente în soluţie (figura 5.31) putând fi puse în evidenţă totodată o serie modificări în alura spectrelor: atunci când sarea ionică se află în exces (rapoarte volumetrice azotat de argint : extract mai mari ca 1:1) deplasarea λ_{max} spre valori mai mari poate fi corelată cu formarea unor nanoparticule de dimensiuni mai mari şi cu un înveliş mai subţire.

Rezultatele obţinute sugerează că formarea nanoparticulelor de argint în urma procesului de biosinteză cu extract de *Salvia officinalis* are la bază un echilibru capabil să determine o modificare continuă a formei şi dimensiunii nanoparticulelor dependent de raportul Ag^+ / specii reducătoare şi specii cu rol stabilizator.

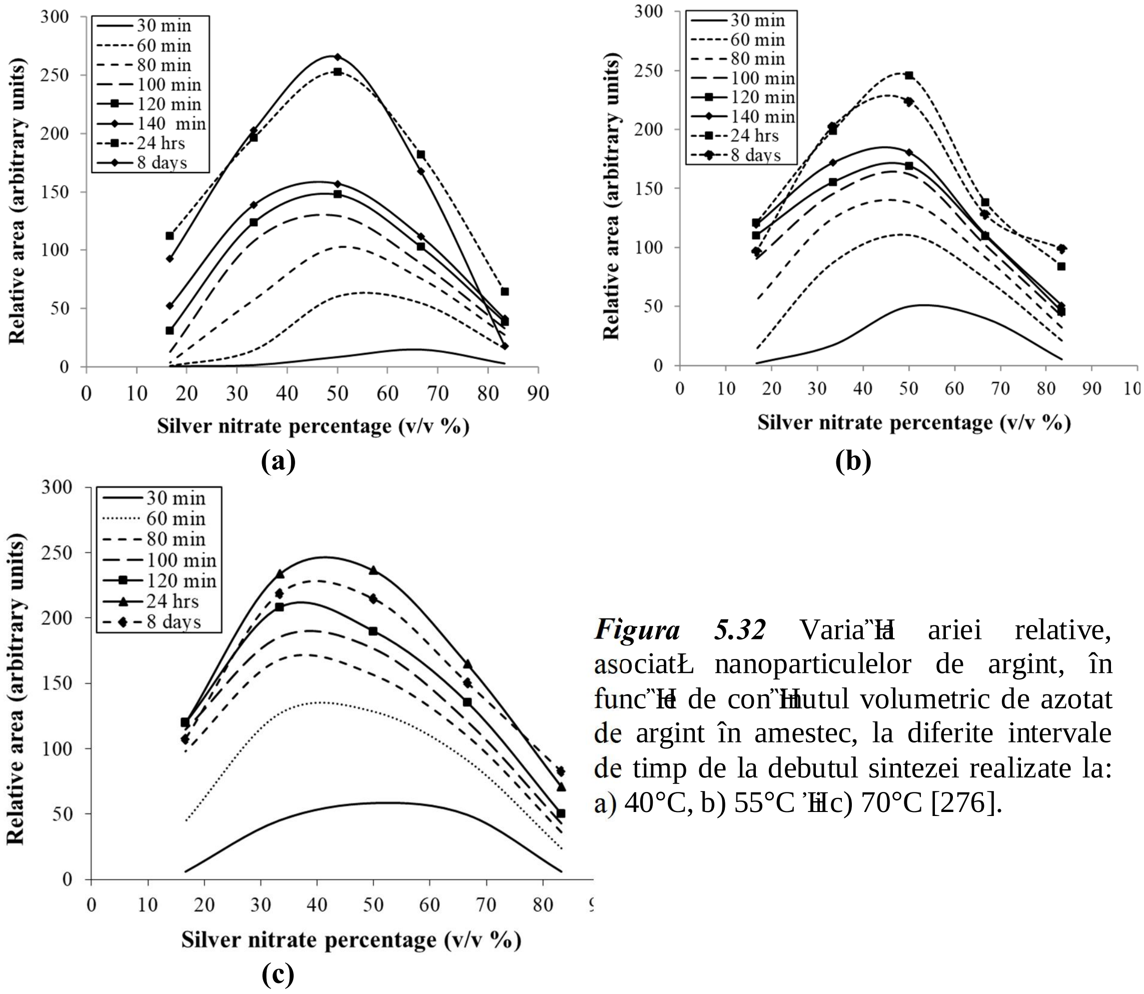


Figura 5.32 Variaţia ariei relative, asociată nanoparticulelor de argint, în funcţie de conţinutul volumetric de azotat de argint în amestec, la diferite intervale de timp de la debutul sintezei realizate la: a) 40°C, b) 55°C şi c) 70°C [276].

Din figura 5.32 se evidenţiază, în primele trei ore de la debutul sintezei, un raport volumetric optim iniţial de amestecare azotat de argint : extract salvie egal cu 1:1 la temperatura de 40 şi respectiv 55°C, fiind obţinute valori maxime ale ariei relative pentru acest raport. Când temperatura creşte la 70°C maximul ariei relative se deplasează spre valori mai mici ale conţinutului de azotat de argint în soluţie, această comportare putând constitui un indiciu asupra agregării nanoparticulelor sintetizate [265, 277].

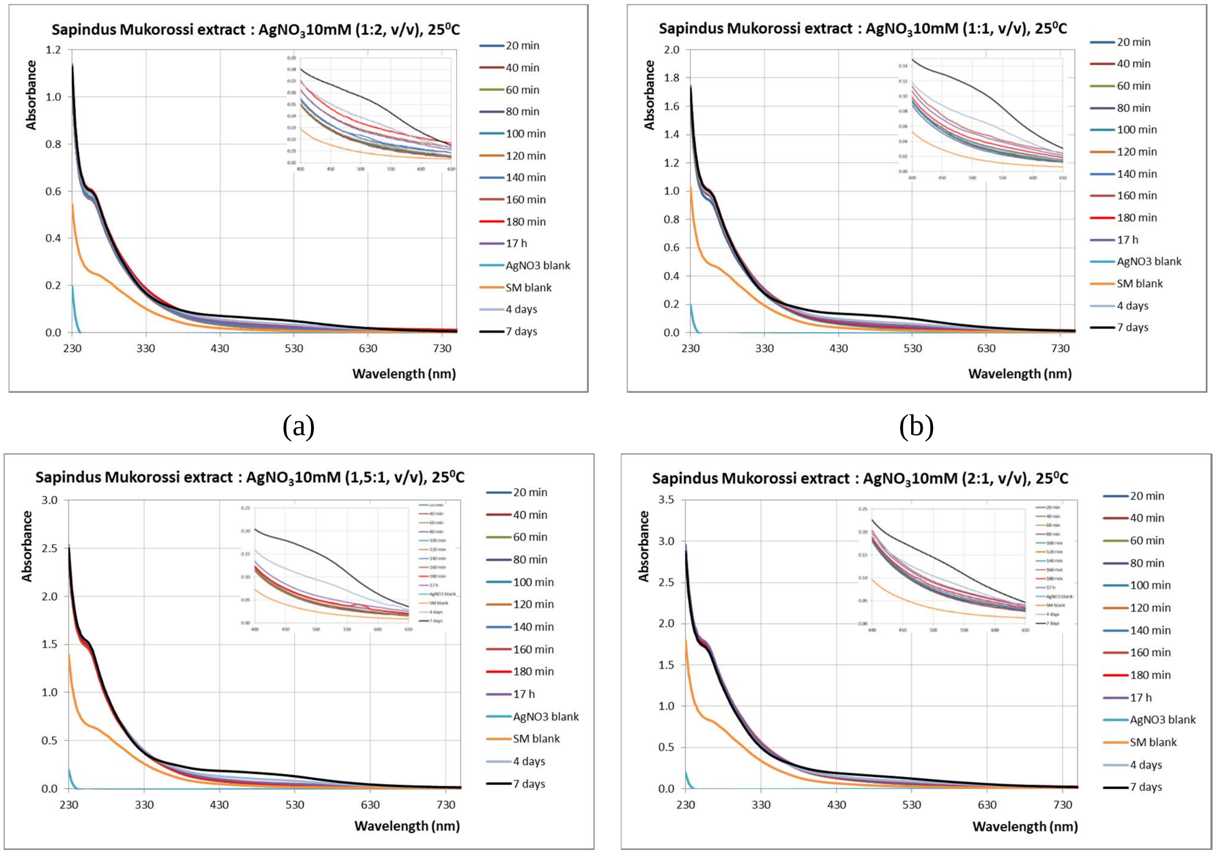
5.4 Sinteza nanoparticulelor de argint cu extract de *Sapindus mukorossi*

Studiul experimental a urmărit într-o primă fază comportarea extractului de *Sapindus mukorossi* în calitate de reducător şi agent de stabilizare la sinteza nanoparticulelor de argint utilizând ca precursor soluţie de azotat de argint 10 mM. Au fost efectuate teste cu probe având proporţii (rapoarte volumetrice) variabile de extract menţinând constant conţinutul de sare ionică, la un pH al amestecului de sinteză datorat extractului vegetal (tabelul 5.6).

Tabelul 5.6. Amestecuri de sinteză utilizate la studiul generării nanoparticulelor de argint (3 ore / 25^{0}C) cu extract de *Sapindus mukorossi* / soluție $AgNO_3$ 10 mM

Nr. crt.	***Cod probă***	***Raport volumetric extract : soluție ionică***	***Modul de preparare al amestecurilor de sinteză***			***pH***
			Apă bidistilată (diluție) (ml)	Extract *Sapindus mukorossi* (ml)	Soluție $AgNO_3$ 10mM (ml)	
1	SM0.5-1Ag10	1 : 2	48.50	0.50	1.00	4.51
2	SM1-1Ag10	1 : 1	48.00	1.00	1.00	4.33
3	SM1.5-1Ag10	1.5 : 1	47.50	1.50	1.00	4.34
4	SM2-1Ag10	2 : 1	47.00	2.00	1.00	4.28

Pentru analiza UV-VIS au fost utilizate probe martor având aceleași rapoarte volumetrice de extract, la diluții identice cu probele de soluții coloidale de nanoparticule de argint obținute.



(a) (b)

(c) (d)

Figura 5.35 Spectrele UV-VIS înregistrate pentru amestecurile de extract de *Sapindus mukorossi* și azotat de argint 10 mM (contactare statică / 25^{0}C / pH acid al mediului de reacție datorat extractului vegetal) la diferite rapoarte de volum: a) 1:2, b) 1:1, c) 1.5:1 și d) 2:1 (inserție: domeniul spectral 400 – 650 nm).

Datele obținute în urma analizei UV-VIS pun în evidență o reducere extrem de lentă a ionilor de argint de către compușii prezenți în extractul vegetal în condițiile de sinteză stabilite (contactare statică / 25^{0}C / pH acid al mediului de reacție datorat extractului vegetal). Cu toate acestea poate fi observată (figura 5.35 – b, c) formarea nanoparticulelor în special la rapoartele volumetrice 1:1 și 1.5:1 (corespunzătoare unor concentrații volumetrice de extract în amestec de 2% și respectiv 3%). În acest interval de concentrații a fost determinată de altfel și valoarea concentrației critice micelare a extractului – 2.7% valoare medie (capitolul 5.2 – Caracterizarea extractelor vegetale de *Salvia officinalis* și *Sapindus mukorossi*); această comportare sugerează implicarea favorabilă a miceliilor formate în soluție în procesul de reducere și stabilizare a nanoparticulelor de argint.

5.4.1 Influența pH-ului și raportului de combinare precursor sare ionică : extract

În următoarea etapă a studiului experimental sinteza nanoparticulelor de argint a fost realizată pentru cinci valori de concentrație ale extractului în amestec (în jurul valorii concentrației critice micelare medii determinate – 2.7%) la 25ºC; amestecul a fost monitorizat prin analiză UV-VIS în domeniul 230-750 nm (ca probe martor au fost utilizate probe de extract – diluție cu apă bidistilată – la concentrații similare cu amestecurile testate).

După un interval de trei ore de la contactarea componenților nu s-a constat nici o modificare sensibilă a culorii soluției care ar putea constitui un prim indiciu al prezenței nanoparticulelor de argint. Probele de amestec au fost menținute în continuare la temperatura ambiantă și analizate prin spectrofotometrie UV-VIS la 24 ore de la debutul sintezei. La 24 ore de la amestecare culoarea amestecurilor s-a modificat vizibil indicând prezența nanoparticulelor de argint în soluția coloidală.

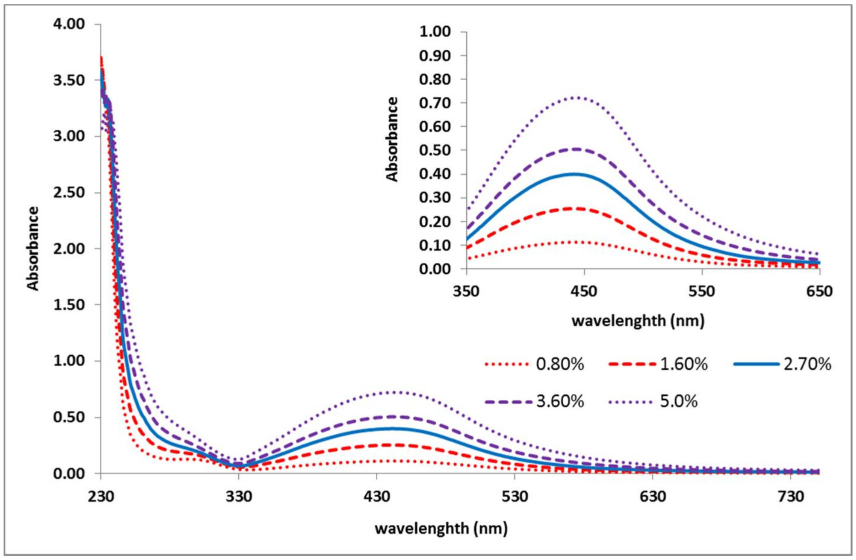
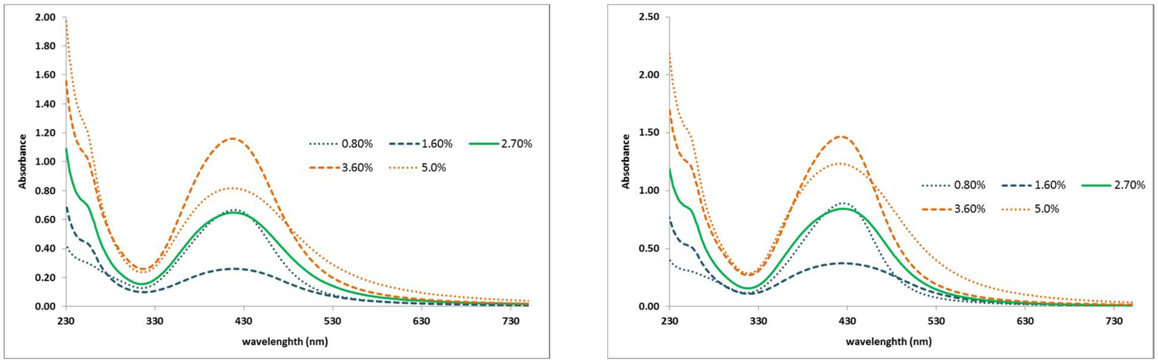


Figura 5.37 Spectrele UV-VIS înregistrate pentru soluția coloidală de nanoparticule de argint la sinteza cu extract de *Sapindus mukorossi* / azotat de argint 10 mM (contactare statică / 25^{0}C / 24 ore) în funcție de concentrația extractului în amestec (% vol).

Din figura 5.37 se observă amplificarea maximului de absorbție odată cu creșterea concentrației extractului în amestec, îndeosebi la valori superioare concentrației critice micelare (2.7%). Maximele de aborbție păstrează în general aceeași formă – bandă de absorbție centrată la aproximativ 440 nm. În condițiile de sinteză testate se constată existența unui proces global de sinteză foarte lent.

Rezultatele obținute în acest stadiu sugerează o influență importantă în procesul de reducere și stabilizare a pH-ului mediului de reacție. Ca urmare într-o a doua fază a studiului experimental a fost investigată comportarea amestecurilor de sinteză la valori de pH bazic (ajustarea pH-ului s-a realizat cu soluţie de hidroxid de potasiu 1M) menţinând constant raportul volumetric de amestecare al componenţilor extract : sare ionică egal cu 1:1.

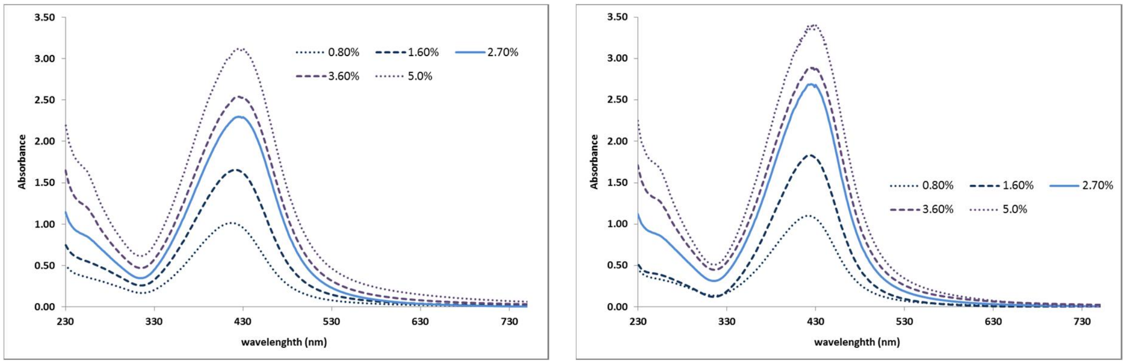


(a) (b)

Figura 5.41 Spectrele UV-VIS înregistrate pentru soluţia coloidală de nanoparticule de argint la sinteza cu extract de *Sapindus mukorossi* / azotat de argint 10 mM (contactare statică / 25^{0}C / pH bazic) în funcţie de concentraţia extractului în amestec (% vol): a) 3 ore; b) 3 zile.

Atât în cazul pH-ului acid cât şi pentru valori de pH bazic, formarea nanoparticulelor este influenţată de concentraţia extractului în amestecul de sinteză fiind notabilă la valori superioare concentraţiei critice micelare.

În a treia fază a studiului experimental sinteza a fost realizată la valori bazice de pH (ajustare pH cu soluţie KOH 1M) menţinând constat (1:1) raportul de amestecare între componenţii amestecului (extract : soluţie ionică) şi respectiv la valori ale pH-ului amestecului datorate extractului vegetal (pH acid) modificând raportul de amestecare între componenţi (1:4, 1:2, 1:1, 2:1 şi 4:1); sinteza a fost realizată pentru cinci valori de concentraţie (în jurul valorii concentraţiei critice micelare medii determinate - 2.7%) la 25ºC (baie de apă termostatată) cu soluţie $AgNO_3$ 10 mM, prin contactare statică. Amestecul a fost monitorizat prin analiză UV-VIS (domeniu 230-750 nm, ca martori fiind utilizate probe de extract – diluţie cu apă bidistilată – la concentraţii în extract similare cu amestecurile testate).



(a) (b)

Figura 5.43 Spectrele UV-VIS înregistrate pentru soluţia coloidală de nanoparticule de argint la sinteza cu extract de *Sapindus mukorossi* / azotat de argint 10 mM (contactare statică / 25^{0}C / pH bazic) în funcţie de concentraţia extractului în amestec (% vol): a) 3 ore; b) 3 zile.

Tendinţele observate nu pot fi interpretate doar având în vedere în principal rolul stabilizator al extractului, fiind de aşteptat ca o creştere a concentraţiei acestuia să ducă la dimensiuni mai reduse ale nanoparticulelor, rolul extractului nefiind limitat doar la acela de agent de reducere / stabilizare. Rezultatele sugerează că distribuţia dimensională a nanoparticulelor de argint este determinată de un echilibru existent între reactivitatea precursorilor şi coalescenţă în perioada iniţială, care ar putea fi influenţată prin controlul pH-ului iniţial al reactanţilor respectiv al amestecului de reacţie.

5.4.2 Influența concentrației critice micelare

Influenţa concentraţiei critice micelare (CMC) a putut fi sesizată încă de la debutul studiului sintezei nanoparticulelor de argint cu extract de *Sapindus mukorossi*. Ca urmare în subcapitolul de faţă a fost realizat un studiu mai detaliat cu accent pe această caracteristică a extractului.

Sinteza nanoparticulelor de argint s-a realizat prin amestecarea extractului cu soluţie de azotat de argint 10 mM în diferite proporţii în mediu acid şi bazic; pentru experimentele efectuate în mediu acid, aciditatea mediului (pH = 4.4) a fost asigurată de extract în urma amestecării precursorilor. Mediul bazic a fost ajustat cu soluţie de hidroxid de sodiu 1 M la o valoare de pH egală cu 8.2.

În figura 5.46 sunt prezentate spectrele de absorbţie UV-VIS pentru soluţiile cu nanoparticule de argint obţinute prin amestecarea precursorilor (extract : soluţie ionică) în raport volumetric de 1:1. În inserţia diagramei este ilustrată variaţia ariei relative asociată nanoparticulelor în funcţie de conţinutul în extract al amestecului de sinteză.

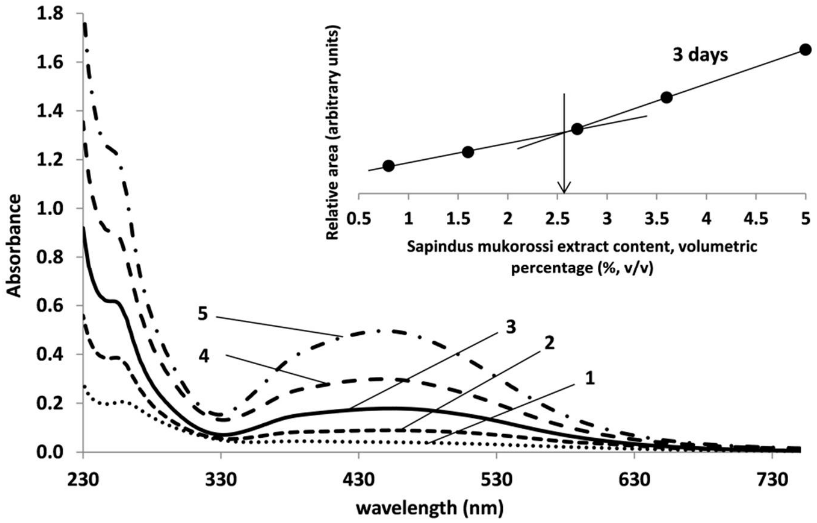


Figura 5.46 Spectrele de absorbţie UV-VIS (72 ore / mediu acid, pH = 4.4, raport volumetric de sinteză 1:1, extract *Sapindus mukorossi* : azotat de argint) pentru soluţiile de nanoparticule la diferite valori ale concentraţiei extractului în amestec (%, v/v): 1) 0.8%, 2) 1.6%, 3) 2.7%, 4) 3.6% şi 5) 5% [213].

Atât probele martor (soluţiile de extract la diluţiile corespunzătoare) cât şi amestecurile de sinteză au înregistrat un pH în jurul valorii de 4.4 indicând proprietatea de tamponare a extractului vegetal. Valoarea pH-ului se corelează cu structura saponinelor, ca şi specii cu caracter slab acid, prezente în extractul apos de *Sapindus mukorossi* [239]. În condiţiile de sinteză aplicate formarea nanoparticulelor este un proces foarte lent, modificări notabile atât în ceea ce priveşte culoarea soluţiilor (incolor la roz pal şi roşiatic) cât şi în spectrele UV-VIS fiind observate la 72 ore din momentul contactării precursorilor.

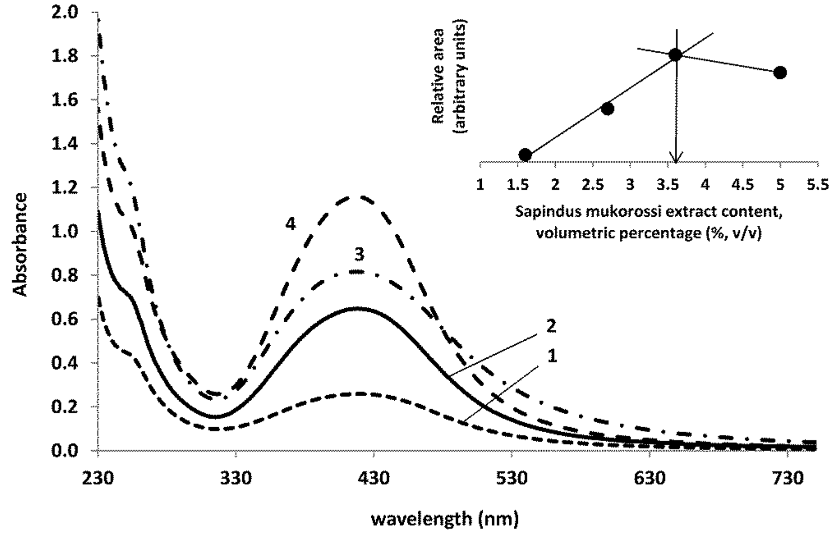


Figura 5.47 Spectrele de absorbție UV-VIS (3 ore / mediu bazic, pH = 8.2, raport volumetric de sinteză 1:1, extract *Sapindus mukorossi* : azotat de argint) pentru soluțiile de nanoparticule la diferite valori ale concentrației extractului în amestec (%, v/v): 1) 1.6%, 2) 2.7%, 3) 3.6% și 4) 5% [213].

Valorile CMC determinate din variația ariilor relative în mediu bazic, corespunzătoare punctului de inflexiune, au prezentat valori similare în ambele cazuri: 3.65±0.19 % la 3 ore și respectiv 3.68±0.12% la 72 ore. Creșterea valorii CMC în mediul bazic comparativ cu mediul acid poate fi asociată existenței speciilor chimice din extract cu caracter slab acid, odată cu adăugarea soluției alcaline (hidroxid de potasiu) grupările funcționale acide suferind o deprotonare formându-se un amestec de compuși cu un caracter slab hidrofob. Scăderea caracterului hidrofobic al soluțiilor poate conduce la valori mai ridicate ale CMC.

Profilul FTIR al extractului vegetal și nanoparticulelor de argint sintetizate evidențiază existența biomoleculelor, cu grupe funcționale specifice flavonoidelor și saponinelor, ce pot acționa ca stabilizatori ai nanoparticulelor [282]. Aceste observații sugerează stabilizarea nanoparticulelor de argint prin intermediul grupelor funcționale asociate biomoleculelor precum flavonoidele și saponinele, prezente în extract; aceste interacții decurg prin intermediul grupelor carboxilice de la nivelul saponinelor ca și al grupelor carbonil din structura flavonoidelor [52, 282].

Difractogramele XRD în cazul probelor martor (extract) prezintă un maxim larg bine definit în domeniul 2Θ de 10-25° fiind absente maxime înguste, sugerând astfel caracterul amorf al extractului apos uscat. Pentru amestecurile de sinteză intensitatea maximului asociat caracterului amorf scade pe măsura creșterii conținutului de extract în amestec concomitent cu apariția unor maxime înguste sugerând formarea unor compuși cristalini în timpul sintezei. Prezența concomitentă a fazei amorfe și cristaline după sinteză sugerează atașarea unor compuși din extract la nanoparticulele formate, comportare ce ar confirma și rezultatele obținute prin spectroscopia în ultraviolet-vizibil și infraroșu. Analiza XRD a confirmat prezența argintului cristalin în probele studiate în special în cazul raportului volumetric de sinteză egal cu 1: 1 și inferior acestuia, fiind de asemenea pusă în evidență și prezența azotatului de argint nereacționat. Prin raportare și la o serie de date de literatură [283, 284] difracția de raze X a permis obținerea de informații referitoare la identificarea nanoparticulelor și evoluția cristalinității probelor investigate.

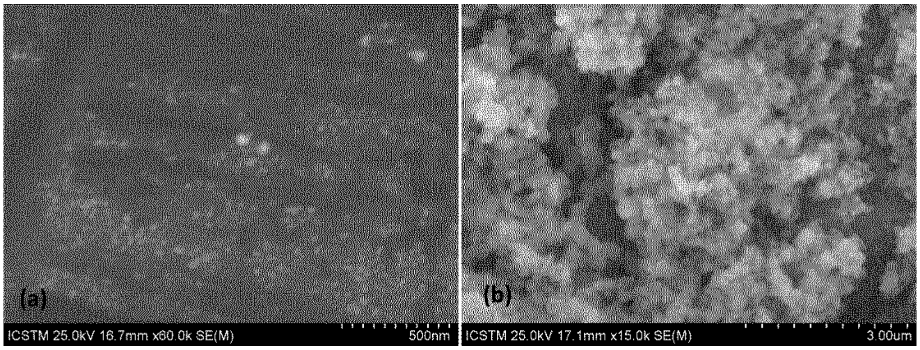


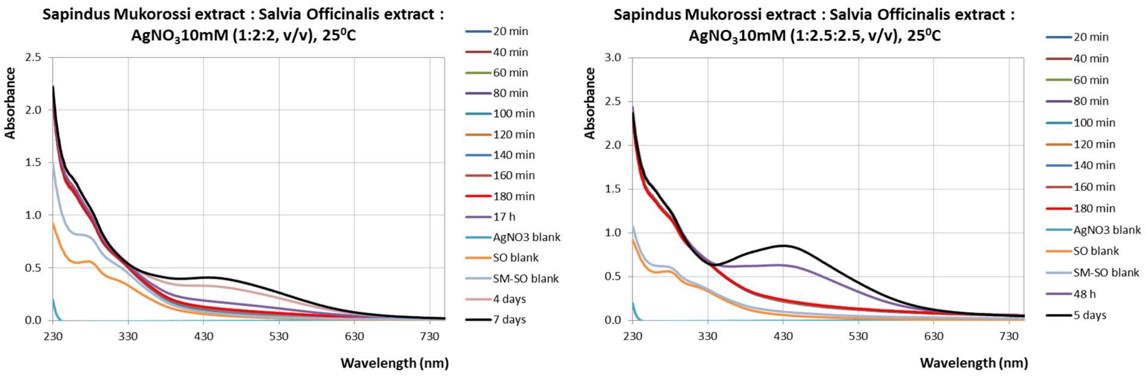
Figura 5.51 Imagini SEM al amestecului de sinteză extract *Sapindus mukorossi* : azotat de argint 10 mM egal cu 1:1 pentru valori ale conținutului de extract în amestec (% vol) de a) 0.8% și b) 2.7%.

5.5 Sinteza nanoparticulelor de argint cu amestec de extracte de *Salvia officinalis* și *Sapindus mukorossi*

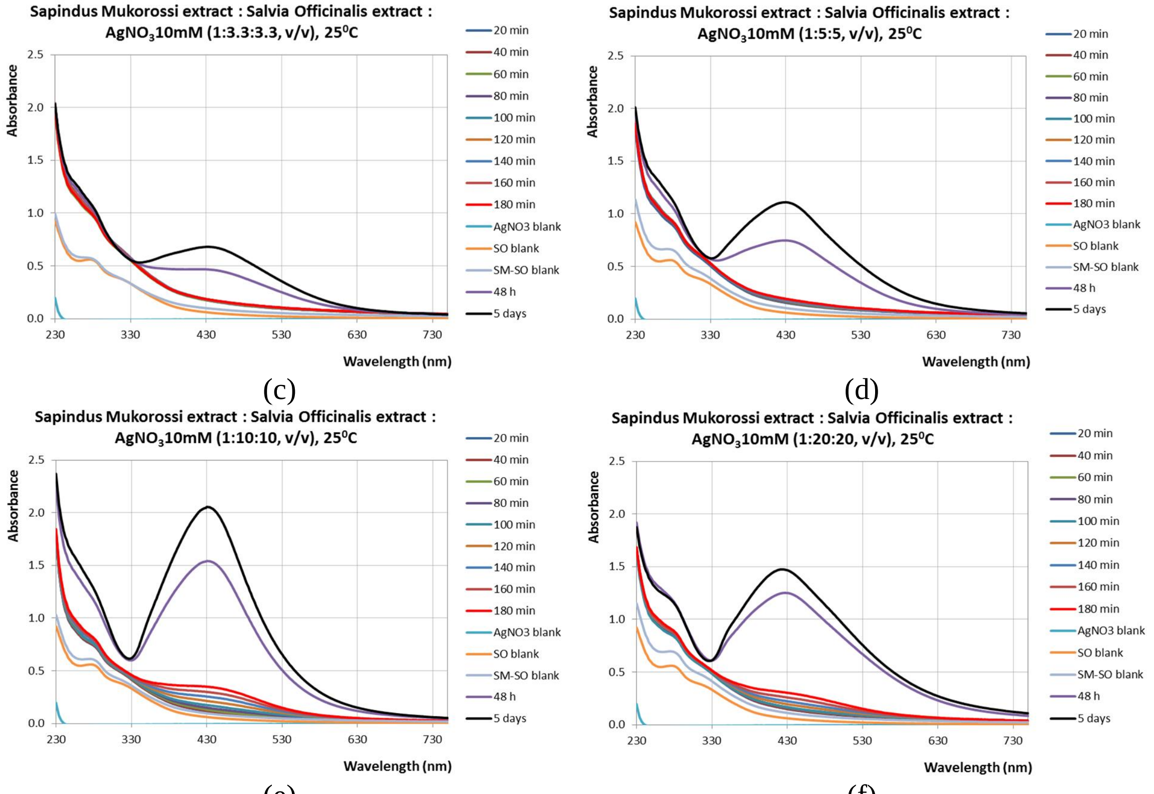
5.5.1 Influența raportului de amestecare între extractele de *Salvia officinalis* și *Sapindus mukorossi*

Studiul experimental a urmărit comportarea amestecului de extracte apoase (*Salvia officinalis* și *Sapindus mukorossi*) în calitate de agent reducător și agent de stabilizare la sinteza nanoparticulelor de argint utilizând ca precursor soluție de azotat de argint 10 mM. Au fost efectuate teste cu probe având proporții (rapoarte volumetrice) variabile din cele două extracte, menținând constant conținutul de sare ionică, la un pH al amestecului de sinteză datorat celor două extracte.

Probele au fost analizate prin spectrometrie UV-VIS în intervalul 230-750 nm (acuratețe lungime de undă: ± 0.8 nm, repetabilitate: ≤0.1 nm, domeniu fotometric: >3.5 A) prin monitorizare continuă timp de 3 ore (25^0C) la interval de 20 minute; ulterior s-a realizat monitorizarea la intervale mai mari de timp pentru a observa modificările care apar în spectrul UV-VIS. Pentru analiza s-au folosit cu probe martor având aceleași rapoarte volumetrice de extracte, la diluții identice cu probele de soluții coloidale de nanoparticule de argint.



(a) (b)



(c) (d)

(e) (f)

Figura 5.54 Spectrele UV-VIS înregistrate pentru amestecul de sinteză extract *Sapindus mukorossi* : extract *Salvia officinalis* : AgNO$_3$ 10 mM (25^{0}C) la rapoarte volumetrice de: a) 1:2:2 (pH = 6.24), b) 1:2.5:2.5 (pH = 6.32), c) 1:3.3:3.3 (pH = 5.87), d) 1:5:5 (pH = 6.15), e) 1:10:10 (pH = 6.62) şi f) 1:20:20 (pH = 6.90).

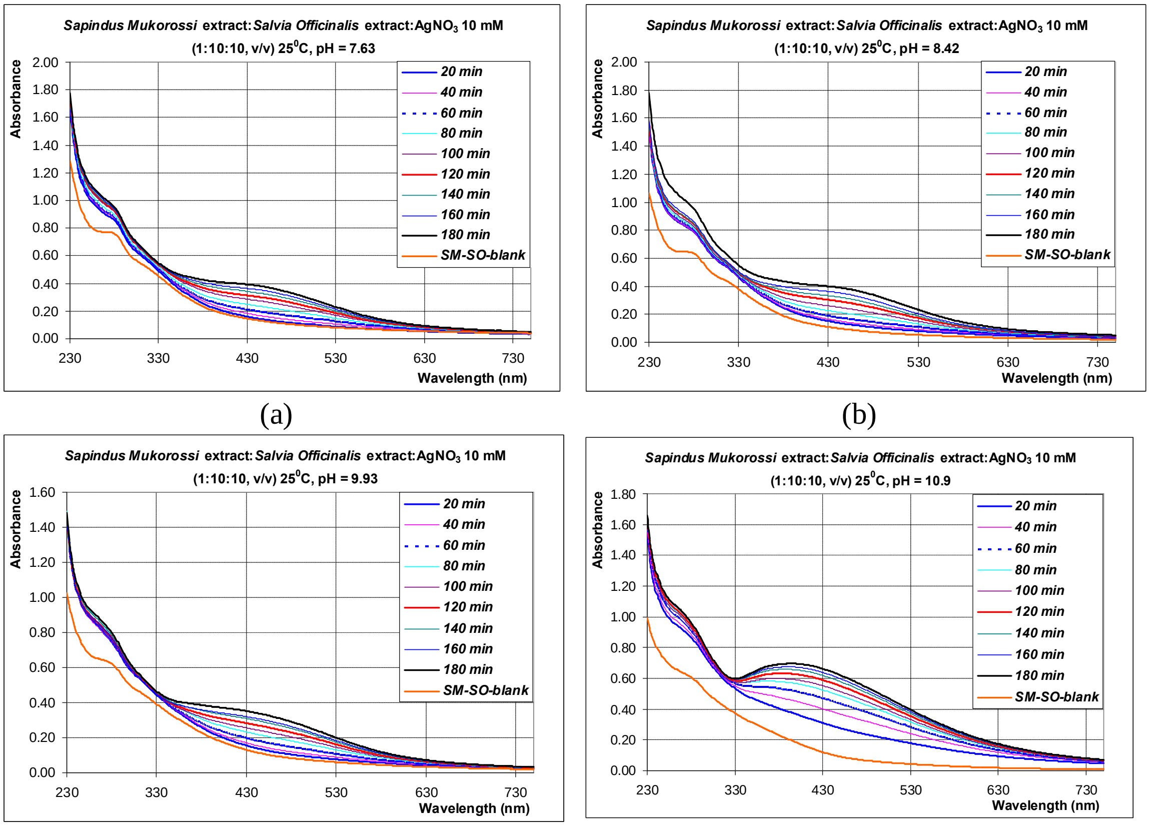
Pentru rapoartele de amestecare între componenţi la care extractul de *Salvia officinalis* şi azotat de argint se află în exces faţă de extractul de *Sapindus mukorossi* (1:2:2 → 1:20:20, figura 5.54) pe durata monitorizării iniţiale (3 ore la intervale de 20 minute) au putut fi observate modificări ale spectrului semnificative îndeosebi la rapoartele de amestecare 1:10:10 şi respectiv 1:20:20 (figura 5.54 - e, f).

Analiza prin microscopie cu scanare electronică (SEM) a fost utilizată pentru a caracteriza dimensiunea, forma şi morfologia nanoparticulelor de argint sintetizate. Din imaginile SEM s-au putut observa formarea şi a unor conglomerate a căror dimensiune se reduce pe măsura scăderii conţinutului de extract de *Sapindus mukorossi* în amestecul de sinteză; aceeaşi tendinţă apare şi în ceea ce priveşte dimensiunea nanoparticulelor de argint aproximativ sferice şi numărul acestora (reducerea dimensiunii şi creşterea numărului de nanoparticule pentru raportul de amestecare 1:10:10 comparativ cu raportul de amestecare 1:2:2).

O diferenţă notabilă în cazul amestecului de extracte comparativ cu extractul de *Sapindus mukorossi* ca atare se observă în cazul raportului volumetric egal cu 1:1:1 respectiv unei concentraţii de 2% (% vol.) de extract. Implicarea speciilor chimice din extractul de *Sapindus mukorossi* în procesul de reducere rezultă, în special în cazul concentraţiilor apropiate sau superioare (2%, 3% şi 4%) concentraţiei critice micelare, din variaţia ariei relative în primele 80 minute de contactarea precursorilor pentru amestecul de extracte comparativ cu extractul de salvie; nu trebuie exclusă nici posibilitatea modificării valorii concentrației critice micelare a extractului de *Sapindus mukorossi* aflat în amestec cu cel de salvie comparativ cu extractul ca atare.

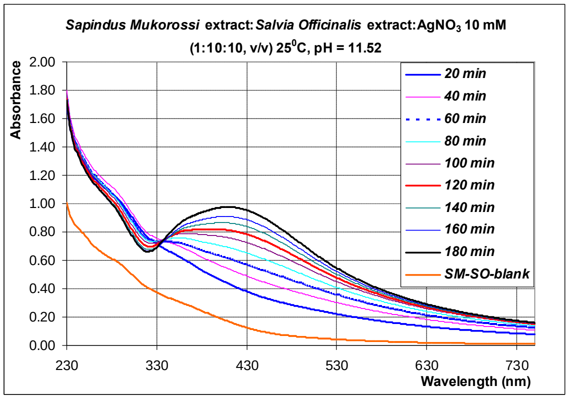
5.5.2 Influența pH-ului la sinteza nanoparticulelor de argint cu amestec de extracte de *Salvia officinalis* și *Sapindus mukorossi*

Într-o primă fază, ținând cont de rezultatele anterioare (studierea comportării amestecului de extracte la proporții variabile de extract de *Sapindus mukorossi* la un pH datorat compușilor prezenți în extracte) s-a realizat testarea la valori diferite (crescătoare) de pH prin aditivare de hidroxid de potasiu 0.1M. Au fost efectuate teste cu probe la un raport volumetric constant de extracte de *Sapindus mukorossi* și *Salvia officinalis* și respectiv de soluție $AgNO_3$, variindu-se pH-ul prin adaos de KOH.



(a) (b)

(c) (d)



(e)

Figura 5.68 Spectrele UV-VIS înregistrate pentru amestecul de extract de *Sapindus mukorossi* și *Salvia officinalis* / azotat de argint 10 mM la pH alcalin al mediului de reacție: a) pH = 7.63; b) pH = 8.42; c) pH = 9.93; d) pH = 10.9; e) pH = 11.56.

6. SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA HIDROGELURILOR COMPOZITE CU NANOPARTICULE DE ARGINT OBȚINUTE CU EXTRACTE DE *SALVIA OFFICINALIS* ȘI *SAPINDUS MUKOROSSI*

Sinteza nanomaterialelor tip hidrogel pe bază de matrice polimerică hibridă (matricea polimerică a avut la bază două componente, un polimer sintetic – poliacrilamidă sau alcool polivinilic – şi respectiv un polimer natural sau un derivat al acestuia – amidon sau hidrolizat de colagen) a avut ca scop obţinerea unor materiale - biocompatibile, netoxice, cu potenţial antimicrobian – cu nanoparticule de argint pentru aplicaţii biomedicale, etapele de sinteză implicând evitarea utilizării unor reactivi chimici cu potenţial toxic şi totodată aplicarea unui proces de „sinteză verde”. Încorporarea nanoparticulelor de argint în matricea polimerică s-a realizat prin metoda *in situ* prin intermediul unui extract natural cu rol de agent reducător şi de stabilizare.

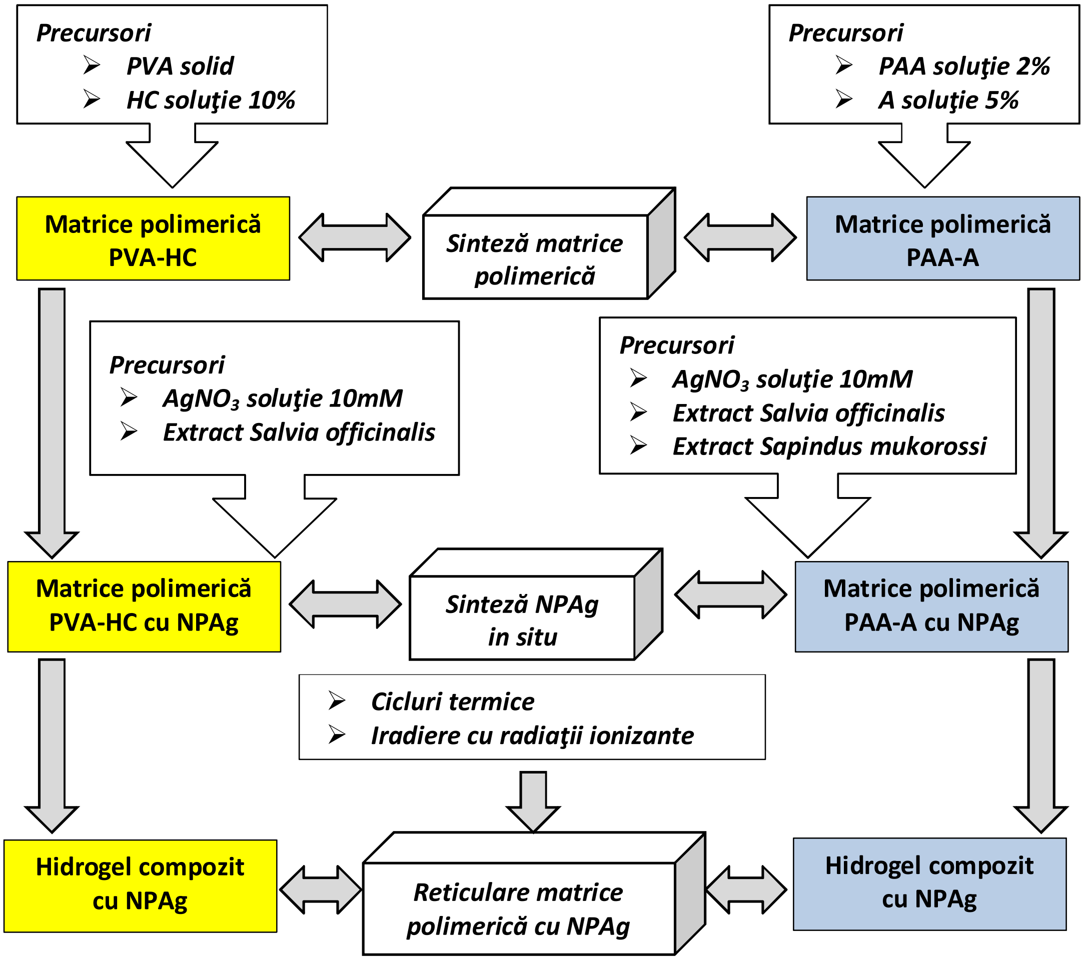


Figura 6.1 Schema de sinteză a hidrogelurilor compozite cu matrice polimerică pe bază de alcool polivinilic (PVA) – hidrolizat de colagen (HC) şi poliacrilamidă (PAA) – amidon (A) şi nanoparticule de argint (NPAg).

Demersul experimental de obţinere a nanomaterialelor tip hidrogel a avut în vedere aplicarea unor condiţii de sinteză ce presupun reducerea implicării unor agenţi chimici potenţial toxici şi aplicarea unor procese care să afecteze într-un grad redus precursorii naturali (extractele vegetale). Schema generală de sinteză a hidrogelurilor compozite cu matrice polimerică pe bază de alcool polivinilic (PVA) – hidrolizat de colagen (HC) şi respectiv poliacrilamidă (PAA) – amidon (A) este prezentată în figura 6.1.

Reticularea matricii polimerice s-a realizat fie prin ***cicluri termice de congelare – decongelare*** (probele de material au fost supuse la 3 cicluri termice fiecare ciclu constând în menţinere 23 ore la -20ºC urmată de menţinere o oră la temperatura ambiantă de 25ºC) fie prin ***iradiere cu radiaţii ionizante*** (la doze de iradiere de 20 kGy şi respectiv 50 kGy). După reticularea probelor de material acestea au fost stocate la întuneric (9ºC) pe toată durata testelor / analizelor efectuate. Modalitatea de reticulare a matricii polimerice avut în vedere o serie de aspecte dintre care pot fi menţionate: evitarea utilizării unor reactivi chimici cu potenţial toxic şi care ar putea interacţiona cu compuşii prezenţi în extractele vegetale, natura componentelor matricii polimerice şi consecutiv posibilele modificări induse de metoda de reticulare aplicată, modificările induse asupra compuşilor din compoziţia extractelor vegetale.

6.1 Caracterizarea prin spectroscopie de absorbție în ultraviolet-vizibil a hidrogelurilor compozite cu nanoparticule de argint, cu matrice polimerică alcool polivinilic – hidrolizat de colagen și poliacrilamidă - amidon

6.1.1 Hidrogel compozit cu matrice polimerică PVA-HC cu reticulare prin cicluri de temperatură

Probele de hidrogel au fost diluate în prealabil şi omogenizate prin agitare magnetică timp de o oră la 25°C. Au fost utilizate în calitate de probe martor pentru comparare probe de matrice polimerică ca atare, matrice polimerică cu extract de *Salvia officinalis* şi respectiv matrice polimerică cu azotat de argint.

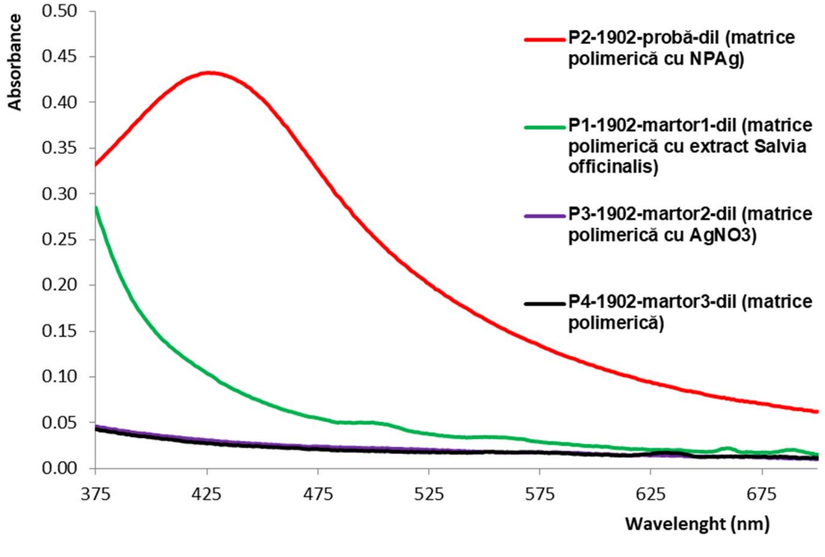


Figura 6.5 Spectrele de absorbţie UV-VIS pentru hidrogelul compozit cu matrice polimerică PVA-HC cu reticulare prin cicluri de temperatură – probe diluate (după terminarea etapei de reticulare).

Prezența nanoparticulelor de argint poate fi evidențiată în spectrul de absorbție UV-VIS (figura 6.5) prin existența unui maxim de absorbție bine definit (localizat la 425.68 nm / 0.433 - absorbanță) prezent numai în spectrul probei de hidrogel cu nanoparticule de argint. Alura benzii de absorbție sugerează existența unor nanoparticule în soluție cu un spectru granulometric relativ îngust cu precizarea că prelevarea probei în vederea analizei s-a efectuat din supernatant existând prin urmare posibilitatea existenței unor nanoparticule și în matricea hidrogelului care nu au migrat în soluție apoasă.

6.1.2 Hidrogel compozit cu matrice polimerică PVA-HC cu reticulare prin iradiere

Tabel 6.2 Modul de preparare a hidrogelului compozit cu matrice PVA-HC cu reticulare prin iradiere în vederea analizei UV-VIS

Cod probă	***Diluție probă pentru analiza UV-VIS***	***Observații***
P1-0412-ir-20-dil	2 ml probă (2.05 g) / 38 ml apă bidistilată	Probă martor matrice polimerică cu extract de *Salvia officinalis* (iradiere la 20 kGy) Scanarea s-a realizat la un interval de 5 zile de la terminarea etapei de reticulare. Aspect translucid, incolor. Spectrul nu prezintă maxime de absorbție.
P1-0412-ir-50-dil	2 ml probă (2.04 g) / 38 ml apă bidistilată	Probă martor matrice polimerică cu extract de *Salvia officinalis* (iradiere la 50 kGy) Scanarea s-a realizat la un interval de 5 zile de la terminarea etapei de reticulare. Aspect translucid, incolor. Spectrul nu prezintă maxime de absorbție.
P2-0412-ir-20-dil	2 ml probă (2.06 g) / 38 ml apă bidistilată	Probă matrice polimerică cu NPAg (iradiere la 20 kGy) Scanarea s-a realizat la un interval de 5 zile de la terminarea etapei de reticulare. Colorație galben-brun deschis. Spectrul prezintă o bandă de absorbție cu un maxim centrat la 404.82 nm / 0.292 A.
P2-0412-ir-50-dil	2 ml probă (2.04 g) / 38 ml apă bidistilată	Probă matrice polimerică cu NPAg (iradiere la 50 kGy) Scanarea s-a realizat la un interval de 5 zile de la terminarea etapei de reticulare. Colorație galben-brun deschis. Spectrul prezintă o bandă de absorbție cu un maxim centrat la 407.34 nm / 0.323 A.
P3-0412-ir-20-dil	2 ml probă (2.05 g) / 38 ml apă bidistilată	Probă martor matrice polimerică cu $AgNO_3$ (iradiere la 20 kGy) Scanarea s-a realizat la un interval de 5 zile de la terminarea etapei de reticulare. Colorație galben-brun deschis. Spectrul prezintă o bandă de absorbție cu un maxim centrat la 420.69 nm / 0.175 A.
P3-0412-ir-50-dil	2 ml probă (2.06 g) / 38 ml apă bidistilată	Probă martor matrice polimerică cu $AgNO_3$ (iradiere la 50 kGy) Scanarea s-a realizat la un interval de 5 zile de la terminarea etapei de reticulare. Colorație galben-brun deschis. Spectrul prezintă o bandă de absorbție cu un maxim centrat la 417.99 nm / 0.245 A.
P4-0412-ir-20-dil	2 ml probă (2.04 g) / 38 ml apă bidistilată	Probă martor matrice polimerică (iradiere la 20 kGy) Scanarea s-a realizat la un interval de 5 zile de la terminarea etapei de reticulare. Aspect translucid, incolor. Spectrul nu prezintă maxime de absorbție.
P4-0412-ir-50-dil	2 ml probă (2.03 g) / 38 ml apă bidistilată	Probă martor matrice polimerică (iradiere la 50 kGy) Scanarea s-a realizat la un interval de 5 zile de la terminarea etapei de reticulare. Aspect translucid, incolor. Spectrul nu prezintă maxime de absorbție.

Existenţa nanoparticulelor de argint este evidenţiată în spectrul de absorbţie UV-VIS al probelor de hidrogel (matrice polimerică PVA-HC cu reticulare prin iradiere) prin maxime de absorbţie în domeniul 400 – 430 nm respectiv: 401.18 nm / 0.294(A) – P2-0412-ir-20-dil, 421.44 nm / 0.173(A) – P3-0412-ir-20-dil, 407.61 nm / 0.325(A) – P2-0412-ir-50-dil şi 418.0 nm / 0.245(A) – P3-0412-ir-50-dil. În cazul absenţei extractului vegetal din amestecul de sinteză (probele P3-0412-ir-20-dil şi P3-0412-ir-50-dil) maximele de absorbţie sunt deplasate către lungimi de undă mai mari, sugerând existenţa unor nanoparticule de mai mari dimensiuni, în timp ce prezenţa extractului vegetal determină deplasarea acestor maxime către lungimi de undă mai mici; această deplasare ar putea fi datorată efectului de stabilizare al compuşilor din extractul vegetal care determină o stabilizare dimensională a nanoparticulelor.

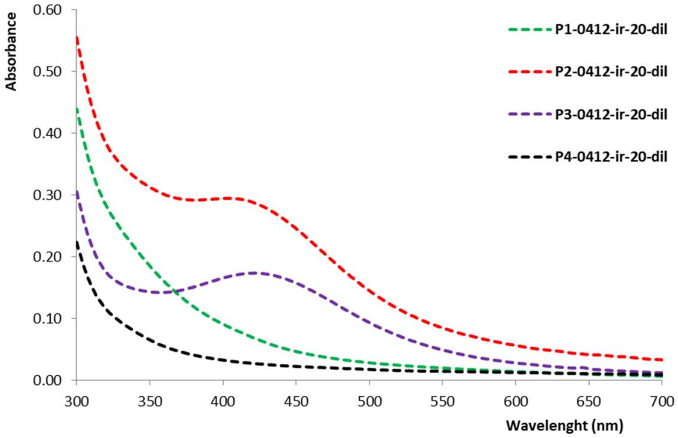


Figura 6.8 Spectrul de absorbţie UV-VIS pentru hidrogelul compozit cu matrice polimerică PVA-HC cu reticulare prin iradiere (20 kGy) – 5 zile de la iradiere.

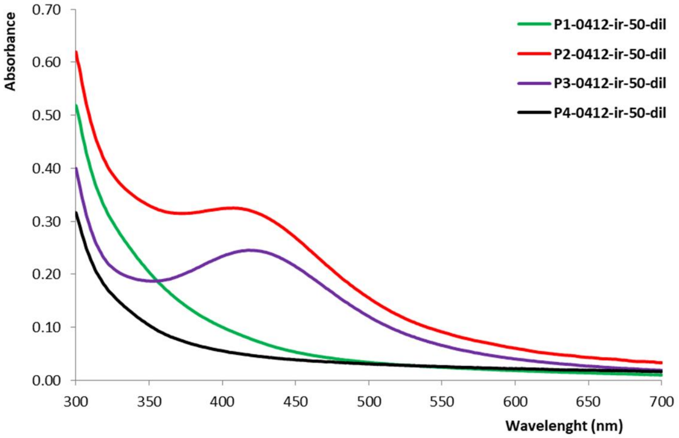


Figura 6.9 Spectrul de absorbţie UV-VIS pentru hidrogelul compozit cu matrice polimerică PVA-HC cu reticulare prin iradiere (50 kGy) – 5 zile de la iradiere.

Rolul extractului vegetal ca agent reducător poate fi sugerat şi de amplitudinea maximelor de absorbţie superioară comparativ cu amestecurile fără extract vegetal, indiferent de doza de iradiere. La o doză superioară de iradiere se remarcă o intensificare a maximului de absorbţie (îndeosebi în cazul absenţei extractului vegetal din amestec) concomitent cu o relativă îngustare a benzii de absorbţie.

Datele obținute ar putea sugera o primă direcție de optimizare a procedeului de sinteză în sensul găsirii unui raport optim între doza de iradiere și conținutul de extract din amestecul de sinteză.

6.1.3 Hidrogeluri compozite cu matrice polimerică PAA-A cu reticulare prin cicluri de temperatură

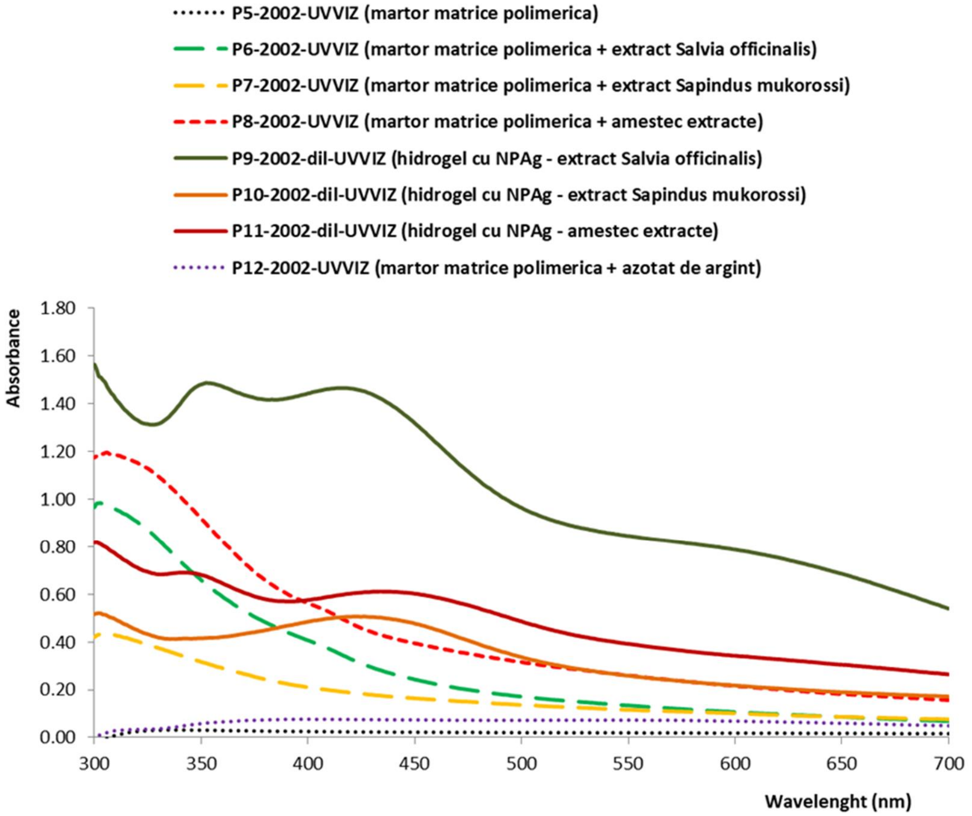
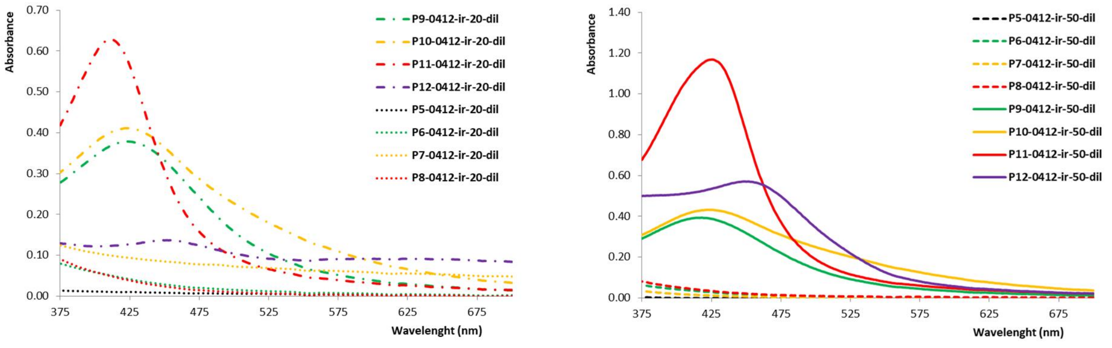


Figura 6.12 Spectrele de absorbție UV-VIS pentru hidrogelurile compozite cu matrice polimerică PAA-A cu reticulare prin cicluri de temperatură comparativ cu spectrele înregistrate pentru martori cu matrice polimerică (după etapa de reticulare – 14 zile / blank apă bidistilată)

Rezultatele obținute sugerează posibilitatea implicării compușilor din extractul de *Sapindus mukorossi* nu numai în reducerea, formarea și stabilizarea nanoparticulelor de argint dar și în reticularea scheletului polimeric de bază.

Pentru probele de hidrogel cu NPAg, maximele tip bandă înregistrate sugerează existența unui număr relativ mare de nanoparticule cu o distribuție granulometrică largă. Comparativ cu spectrul extractelor vegetale poate fi remarcată o diminuare semnificativă a maximelor prezente în extractele vegetale îndeosebi pentru probele în care este prezent extractul de *Salvia officinalis*. Această modificare ar putea confirma implicarea anumitor compuși din extractul de *Salvia officinalis* în procesul de reducere și stabilizare a nanoparticulelor, aceștia influențând procesul menționat într-un grad mai ridicat comparativ cu compușii din extractul de *Sapindus mukorossi*.

6.1.4 Hidrogeluri compozite cu matrice polimerică PAA-A cu reticulare prin iradiere



(a) (b)

Figura 6.15 Spectrele de absorbţie UV-VIS pentru hidrogelurile compozite cu matrice polimerică PAA-A cu reticulare prin iradiere comparativ cu spectrele probelor martor (după etapa de reticulare / blank apă bidistilată) – 60 zile de la sinteză: a) 20 kGy şi b) 50 kGy

Stabilitatea nanoparticulelor de argint în toate sistemele testate se dovedeşte a fi deosebită pentru toate sistemele analizate la ambele doze de iradiere. Această comportare indică alături de rolul stabilizant al compuşilor din extractele vegetale şi implicarea matricii polimerice / componenţilor acesteia în procesul de stabilizare a nanoparticulelor.

6.2 Caracterizarea prin spectroscopie în infraroșu (FTIR) a hidrogelurilor compozite cu matrice polimerică alcool polivinilic – hidrolizat de colagen și poliacrilamidă - amidon

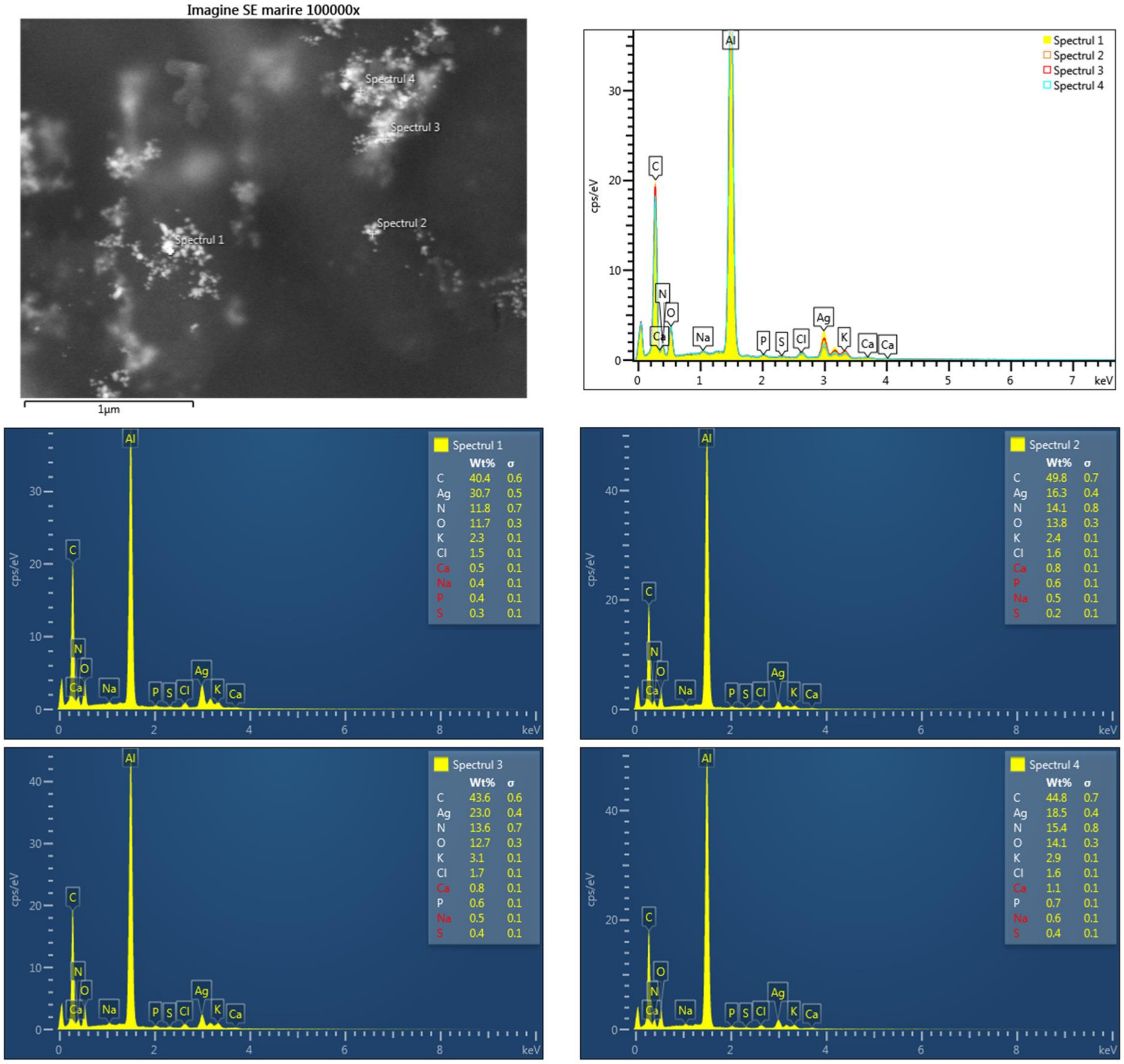
Analiza FTIR a fost realizată utilizând un sistem de spectroscopie FTIR pentru cercetare avansată compus din spectrometru FT-IR Vertex 80 (ATR – attenuated total reflection; cap de diamant). Rezultatele obţinute au fost intercomparate cu date din articole din literatura de specialitate referitoare la tipuri de extracte vegetale apoase şi matrici polimerice similare. Interpretarea spectrelor FTIR a avut în vedere identificarea maximelor de absorbţie care suferă modificări în mediile analizate (extract vegetal brut, componenţii matricii polimerice şi hidrogeluri cu nanoparticule de argint). Modificările poziţiei maximelor spectrale pot fi asociate adsorbţiei [184, 185, 186, 187, 188] constituenţilor extractului vegetal pe suprafaţa nanoparticulelor de argint, legăturilor care pot apare în urma reticulării matricii polimerice şi interacţiei dintre aceasta şi / sau nanoparticulele de argint respectiv extractul vegetal.

Similitudinea între spectrele IR în cazul probelor de hidrogeluri cu matrice hibridă PVA-HC (respectiv cu extract de *Salvia officinalis*, nanoparticule de argint, azotat de argint şi matrice polimerică ca atare - Anexa 7: figurile 7.1-7.2), sugerează o înglobare avansată a componenţilor nanomaterialului obţinut în matricea polimerică. Principalele modificări observate în spectrul IR apar îndeosebi între componenţii matricii polimerice şi matricea polimerică obţinută pe baza acestora. Analiza FTIR a hidrogelurilor compozite cu matrice polimerică PAA-A şi reticulare prin iradiere (50kGy) a dus la înregistrarea unor modificări spectrale îndeosebi în cazul hidrogelurilor cu NPAg / extract *Sapindus mukorossi* şi respectiv amestec de extracte, comparativ cu matricea polimerică şi hidrogelurile cu NPAg / extract *Salvia officinalis* şi azotat de argint.

6.3 Caracterizarea prin microscopie electronică (SEM-EDS) a hidrogelurilor compozite cu matrice polimerică alcool polivinilic – hidrolizat de colagen și poliacrilamidă – amidon

Dispozitivul utilizat la analiză a fost constituit dintr-un microscop electronic de baleiaj cu emisie de câmp (FESEM) model Carl Zeiss – Auriga, dedicat studiului structurilor microscopice și al suprafețelor diferitelor tipuri de materiale: probe organice și anorganice (polimeri, materiale policompozite, mase plastice) conductive sau neconductive magnetic; parametrii funcționali ai dispozitivului sunt menționați în subcapitolul 4.4 – figura 4.6.

6.3.1 Caracterizarea prin microscopie electronică (SEM-EDS) a hidrogelurilor compozite cu matrice polimerică alcool polivinilic – hidrolizat de colagen



Spectrul 1

	Wt%	σ
C	40.4	0.6
Ag	30.7	0.5
N	11.8	0.7
O	11.7	0.3
K	2.3	0.1
Cl	1.5	0.1
Ca	0.5	0.1
Na	0.4	0.1
P	0.4	0.1
S	0.3	0.1

Spectrul 2

	Wt%	σ
C	49.8	0.7
Ag	16.3	0.4
N	14.1	0.8
O	13.8	0.3
K	2.4	0.1
Cl	1.6	0.1
Ca	0.8	0.1
P	0.6	0.1
Na	0.5	0.1
S	0.2	0.1

Spectrul 3

	Wt%	σ
C	43.6	0.6
Ag	23.0	0.4
N	13.6	0.7
O	12.7	0.3
K	3.1	0.1
Cl	1.7	0.1
Ca	0.8	0.1
P	0.6	0.1
Na	0.5	0.1
S	0.4	0.1

Spectrul 4

	Wt%	σ
C	44.8	0.7
Ag	18.5	0.4
N	15.4	0.8
O	14.1	0.3
K	2.9	0.1
Cl	1.6	0.1
Ca	1.1	0.1
P	0.7	0.1
Na	0.6	0.1
S	0.4	0.1

Figura 6.37 Analiza SEM-EDS pentru hidrogelul compozit cu matrice polimerică PVA-HC cu reticulare prin cicluri de temperatură (ordin de mărire: 100.000X, scala 1 µm) / mapare elemente chimice în microzona de interes

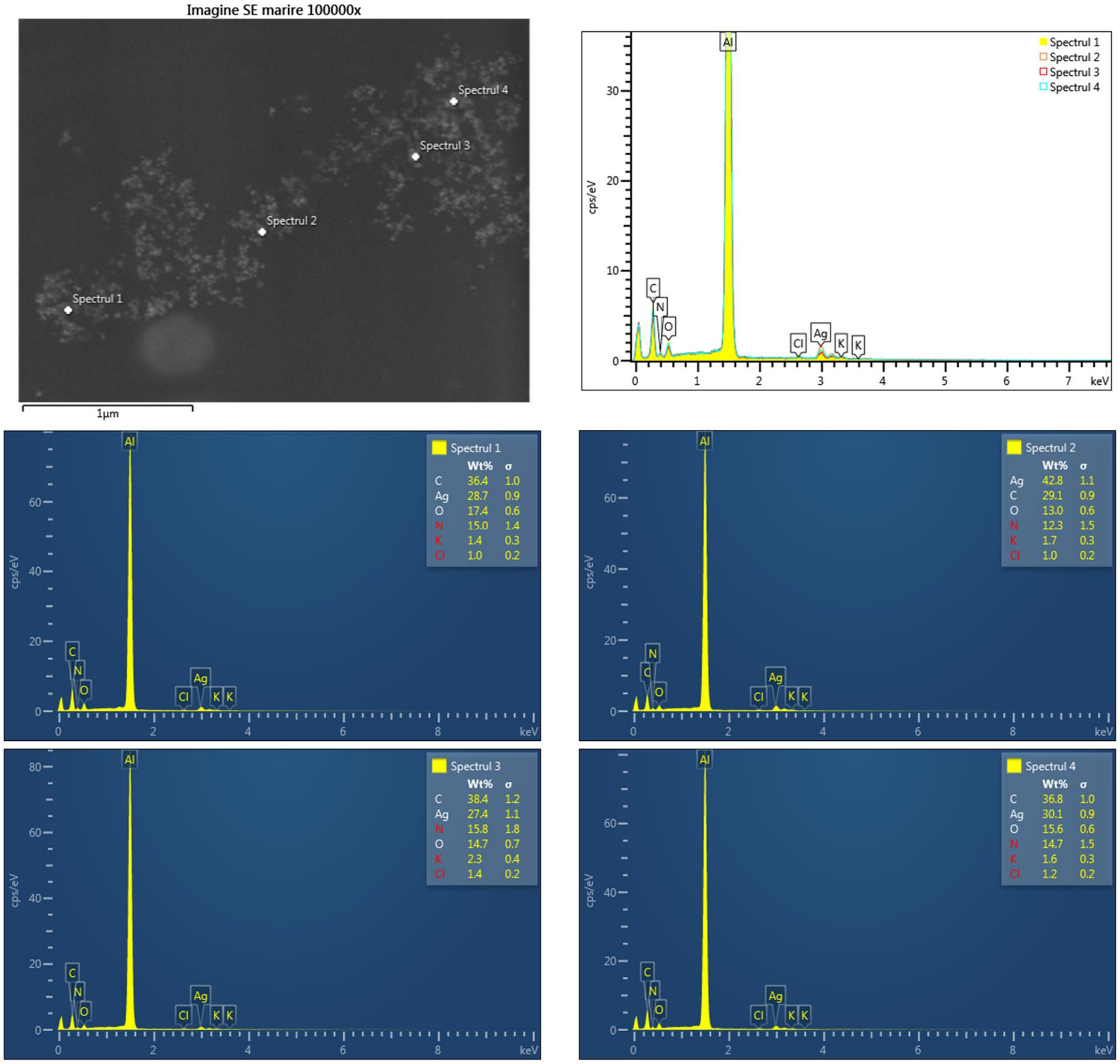
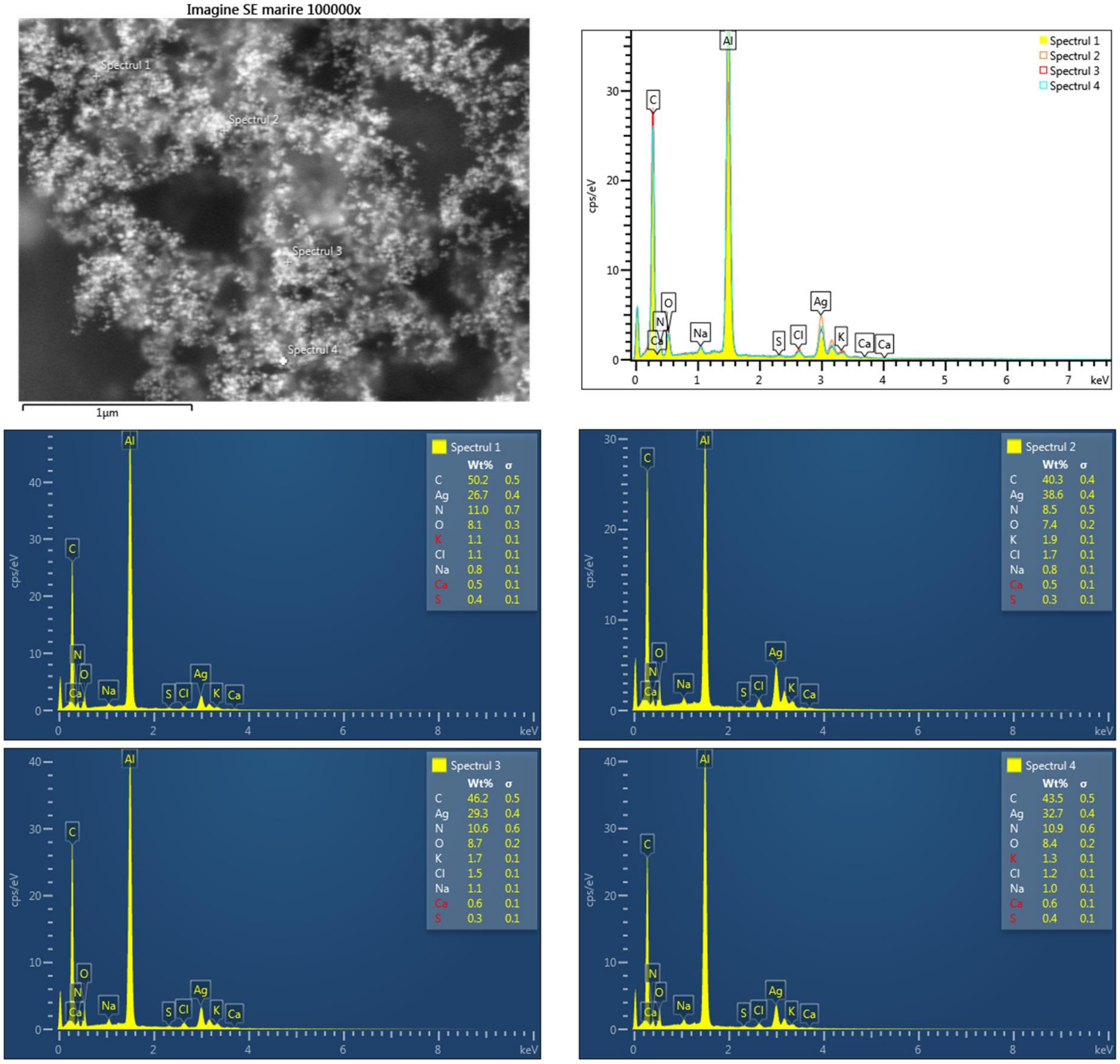


Figura 6.39 Analiza SEM-EDS pentru hidrogelul compozit cu matrice polimerică PVA-HC cu reticulare prin iradiere – 20 kGy (ordin de mărire: 100.000X, scala 1 µm) / mapare elemente chimice în microzona de interes

Morfologia / forma nanoparticulelor de argint (figurile 6.36.-6.41, Anexa 9 – figura 9.1) este relativ complexă, unele dintre acestea prezentând forme polignale asociate în general ca sferice. Au fost puse în evidenţă particule relativ de formă sferică şi polidisperse, fiind prezente şi aglomerări, cu dimensiuni în intervalul 21÷37 nm. Detaliile neclare apar ca rezultat al încărcării probei ce evidenţiază o conductibilitate electrică scăzută a mediului ce poate fi asociată existenţei stratului stabilizator din jurul nanoparticulelor constituit din matricea polimerică / compuşii fitochimici din extractul vegetal.

Spectrele EDS au pus în evidenţă alături de spoturile asociate argintului şi cele asociate carbonului, oxigenului şi azotului ce confirmă prezenţa stabilizatorilor constituiţi din catene alchilice în probele examinate [342, 343]. În zona centrală a spectrului poate fi observat clar picul asociat argintului localizat la 2.5 keV, acest maxim fiind asociat liniilor K, L caracteristice argintului [344, 345, 346]. Intensităţile liniilor spectrale sunt proporţionale cu abundenţa elementului însă având în vedere că metoda EDS nu poate distinge între argintul elemental ’Ĥl atomii de argint prezen˝Ĥîn al˝Ĥcompu’Ĥl [342, 345, 346], rezultatul eviden˝ĤązŁ valori ale concentra˝Ĥlor relative în probele investigate



Spectrul 1	Wt%	σ
C	50.2	0.5
Ag	26.7	0.4
N	11.0	0.7
O	8.1	0.3
K	1.1	0.1
Cl	1.1	0.1
Na	0.8	0.1
Ca	0.5	0.1
S	0.4	0.1

Spectrul 2	Wt%	σ
C	40.3	0.4
Ag	38.6	0.4
N	8.5	0.5
O	7.4	0.2
K	1.9	0.1
Cl	1.7	0.1
Na	0.8	0.1
Ca	0.5	0.1
S	0.3	0.1

Spectrul 3	Wt%	σ
C	46.2	0.5
Ag	29.3	0.4
N	10.6	0.6
O	8.7	0.2
K	1.7	0.1
Cl	1.5	0.1
Na	1.1	0.1
Ca	0.6	0.1
S	0.3	0.1

Spectrul 4	Wt%	σ
C	43.5	0.5
Ag	32.7	0.4
N	10.9	0.6
O	8.4	0.2
K	1.3	0.1
Cl	1.2	0.1
Na	1.0	0.1
Ca	0.6	0.1
S	0.4	0.1

Figura 6.41 Analiza SEM-EDS pentru hidrogelul compozit cu matrice polimericŁ PVA-HC cu reticulare prin iradiere ï 50 kGy (ordin de mŁrire: 100.000X, scala 1 µm) / mapare elemente chimice în microzona de interes

6.3.2 Caracterizarea prin microscopie electronică (SEM-EDS) a hidrogelurilor compozite cu matrice polimerică poliacrilamidă – amidon

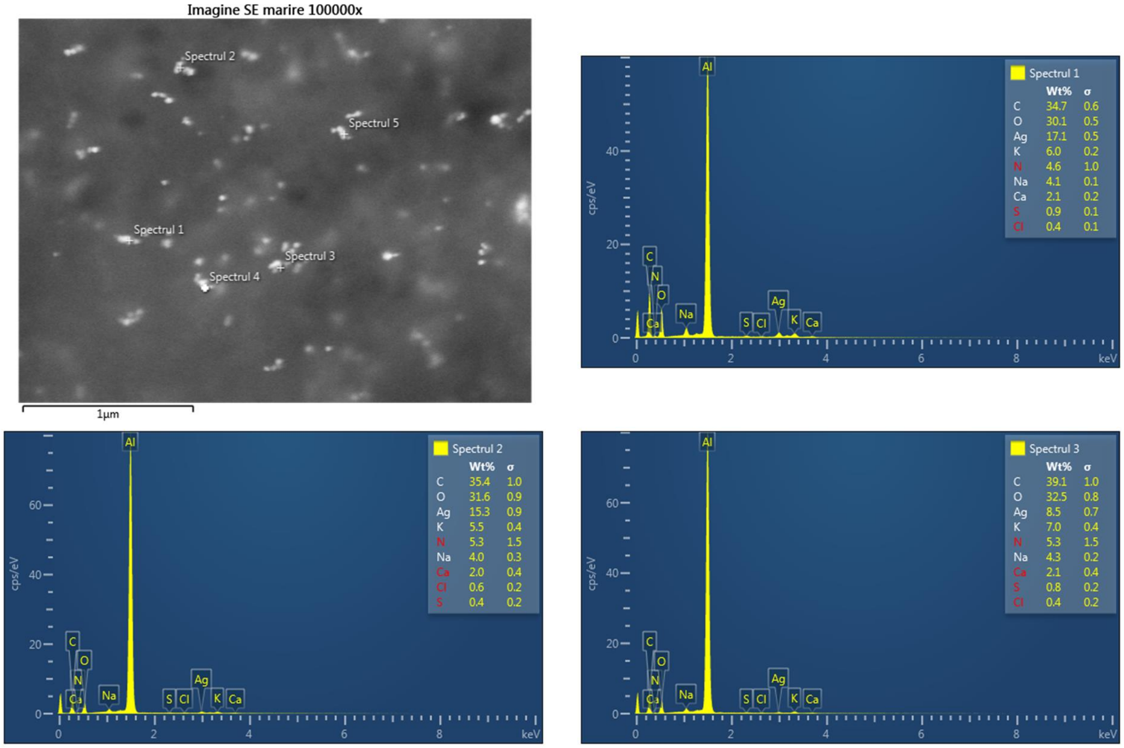


Figura 6.43 Analiza SEM-EDS pentru hidrogelul compozit cu matrice polimericŁ PAA-A / extract *Salvia officinalis* cu reticulare prin cicluri de temperaturŁ (ordin de mŁrire: 100.000X, scala 1 µm) / mapare elemente chimice în microzona de interes

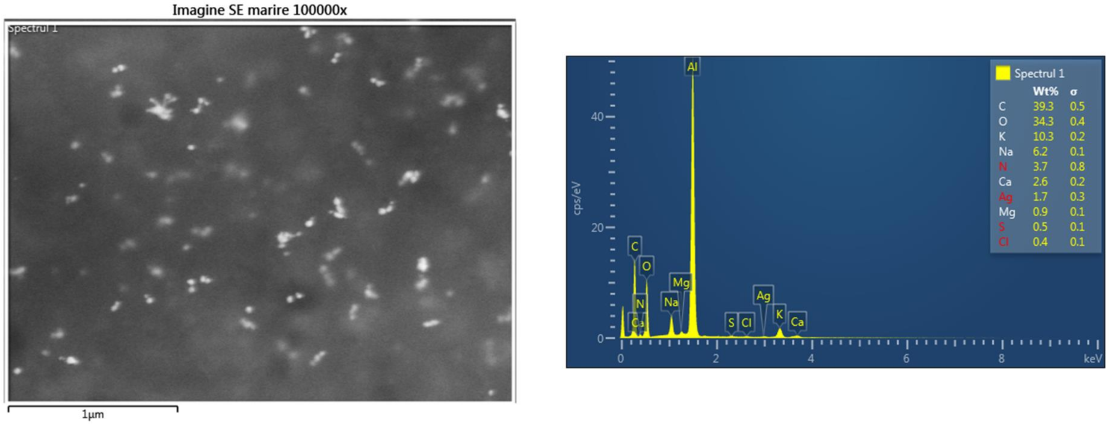
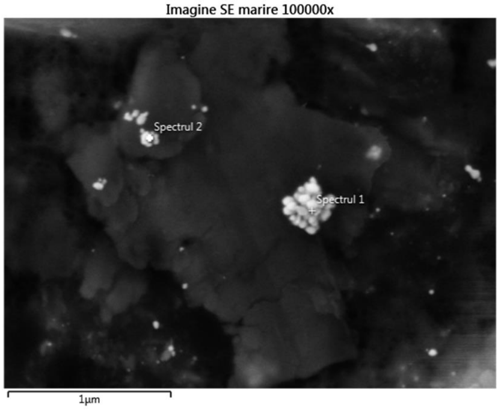


Figura 6.45 Analiza SEM-EDS pentru hidrogelul compozit cu matrice polimericŁ PAA-A / extract *Sapindus mukorossi* cu reticulare prin cicluri de temperaturŁ (ordin de mŁrire: 100.000X, scala 1 µm) / mapare elemente chimice în microzona de interes



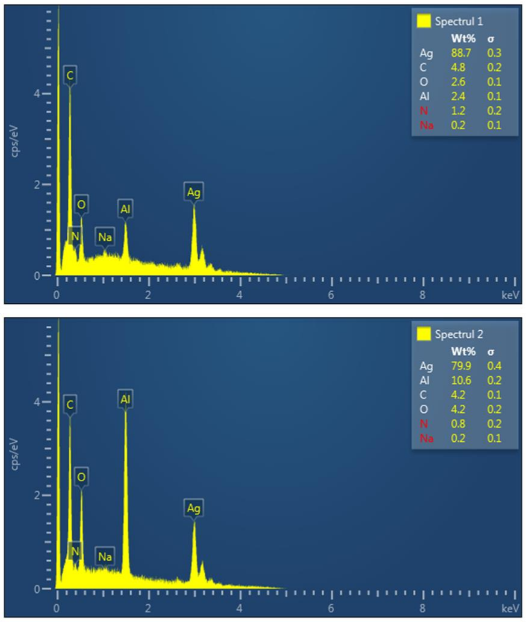


Figura 6.47 Analiza SEM-EDS pentru hidrogelul compozit cu matrice polimericŁ PAA-A / amestec extracte cu reticulare prin cicluri de temperaturŁ (ordin de mŁrire: 100.000X, scala 1 µm) / mapare elemente chimice în microzona de interes

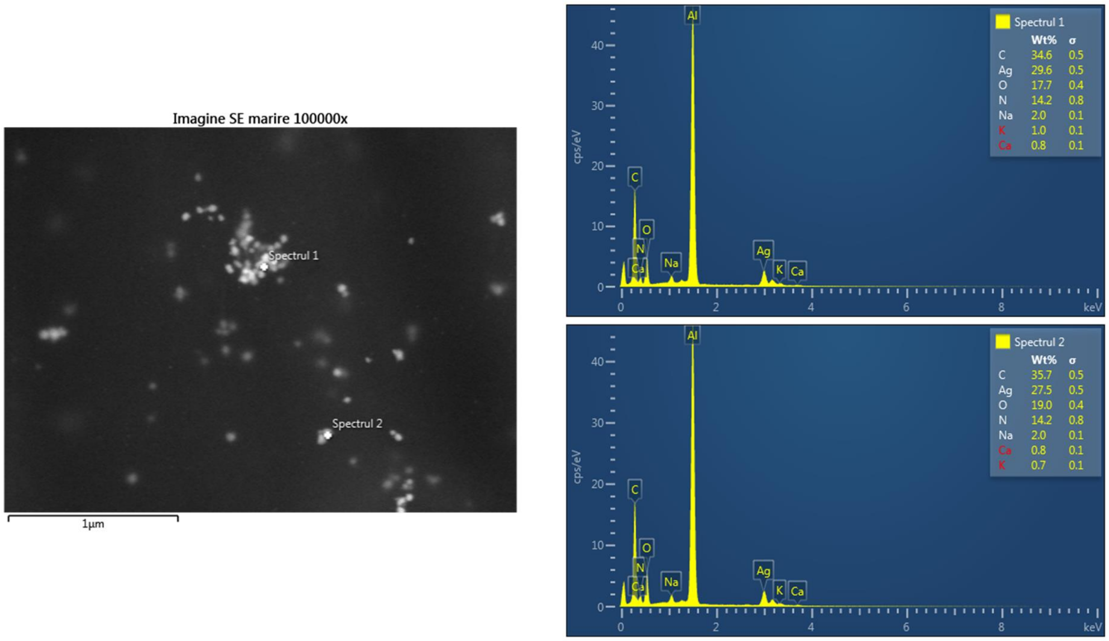
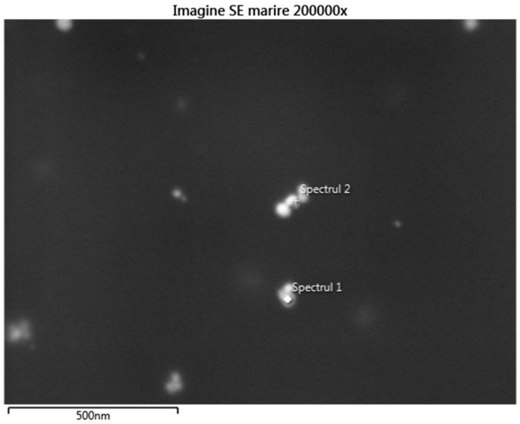


Figura 6.49 Analiza SEM-EDS pentru hidrogelul compozit cu matrice polimericŁ PAA-A / extract *Salvia officinalis* cu reticulare prin iradiere ï 20 kGy (ordin de mŁrire: 100.000X, scala 1 µm) / mapare elemente chimice în microzona de interes



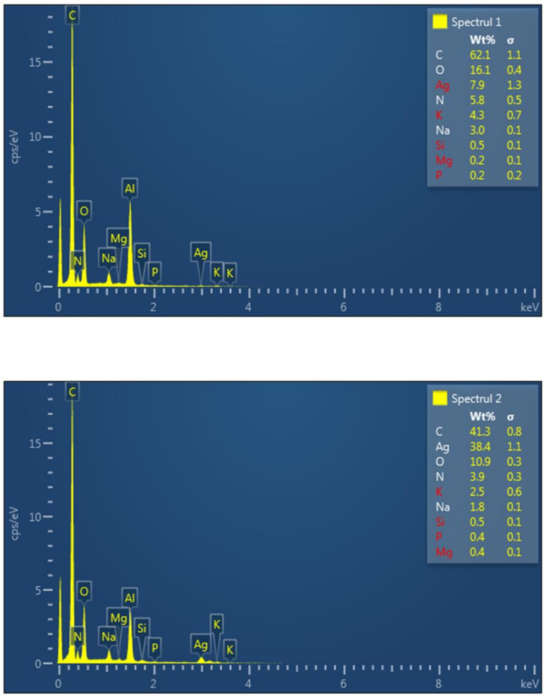


Figura 6.51 Analiza SEM-EDS pentru hidrogelul compozit cu matrice polimerică PAA-A / extract *Sapindus mukorossi* cu reticulare prin iradiere – 20 kGy (ordin de mărire: 100.000X, scala 1 µm) / mapare elemente chimice în microzona de interes

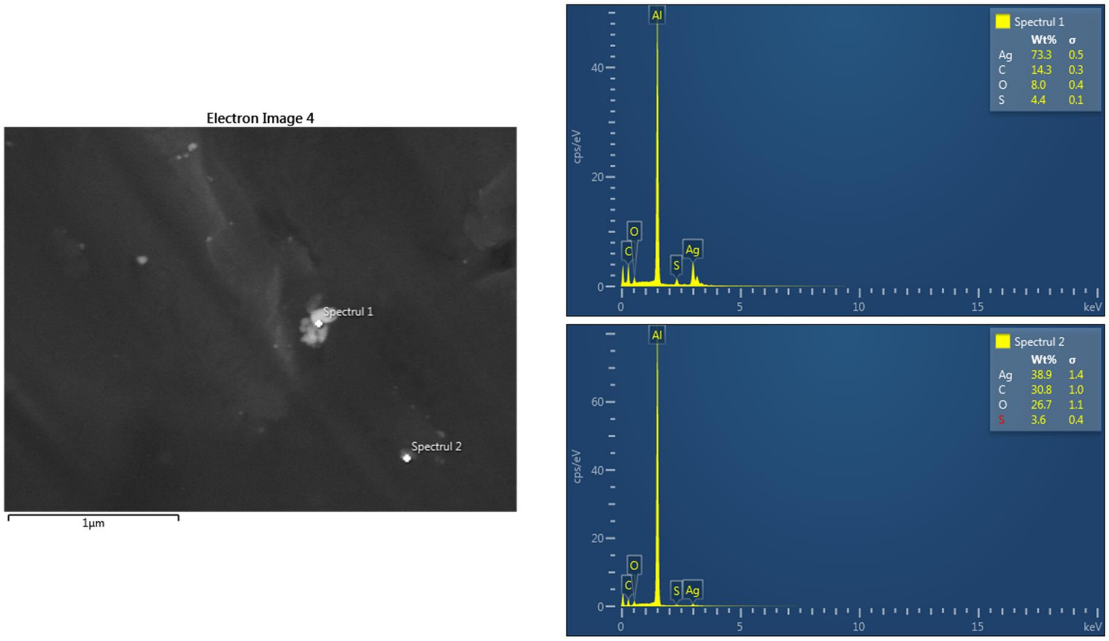


Figura 6.53 Analiza SEM-EDS pentru hidrogelul compozit cu matrice polimerică PAA-A / amestec extracte cu reticulare prin iradiere – 20 kGy (ordin de mărire: 100.000X, scala 1 µm) / mapare elemente chimice în microzona de interes

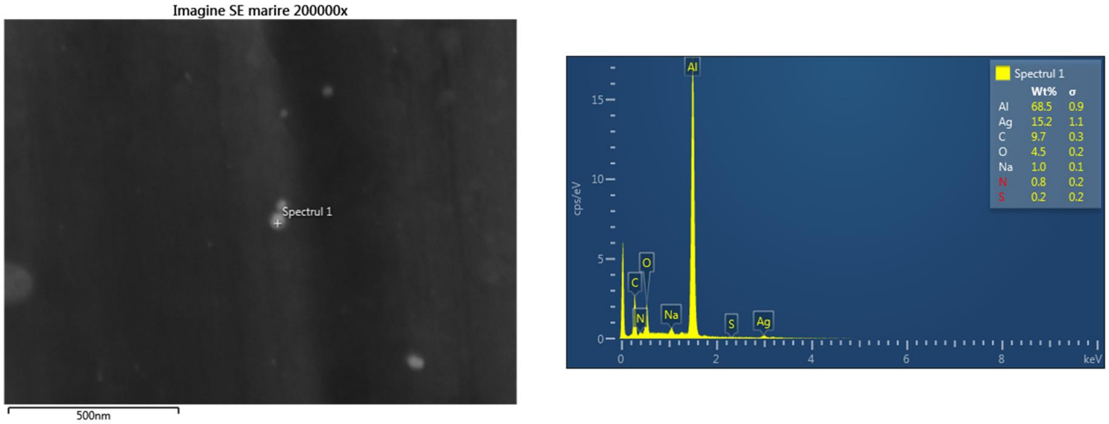


Figura 6.55 Analiza SEM-EDS pentru hidrogelul compozit cu matrice polimericŁ PAA-A / extract *Salvia officinalis* cu reticulare prin iradiere ï 50 kGy (ordin de mŁrire: 200.000X, scala 500 nm) / mapare elemente chimice în microzona de interes

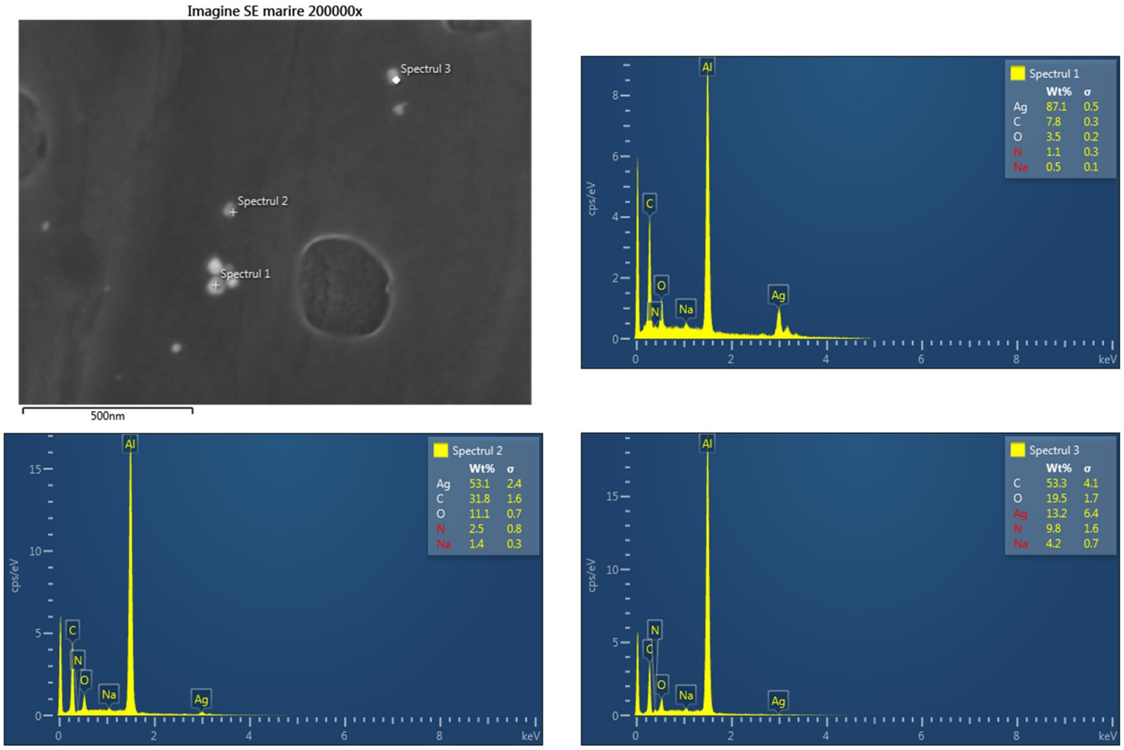


Figura 6.57 Analiza SEM-EDS pentru hidrogelul compozit cu matrice polimericŁ PAA-A / extract *Sapindus mukorossi* cu reticulare prin iradiere ï 50 kGy (ordin de mŁrire: 100.000X, scala 1 µm) / mapare elemente chimice în microzona de interes

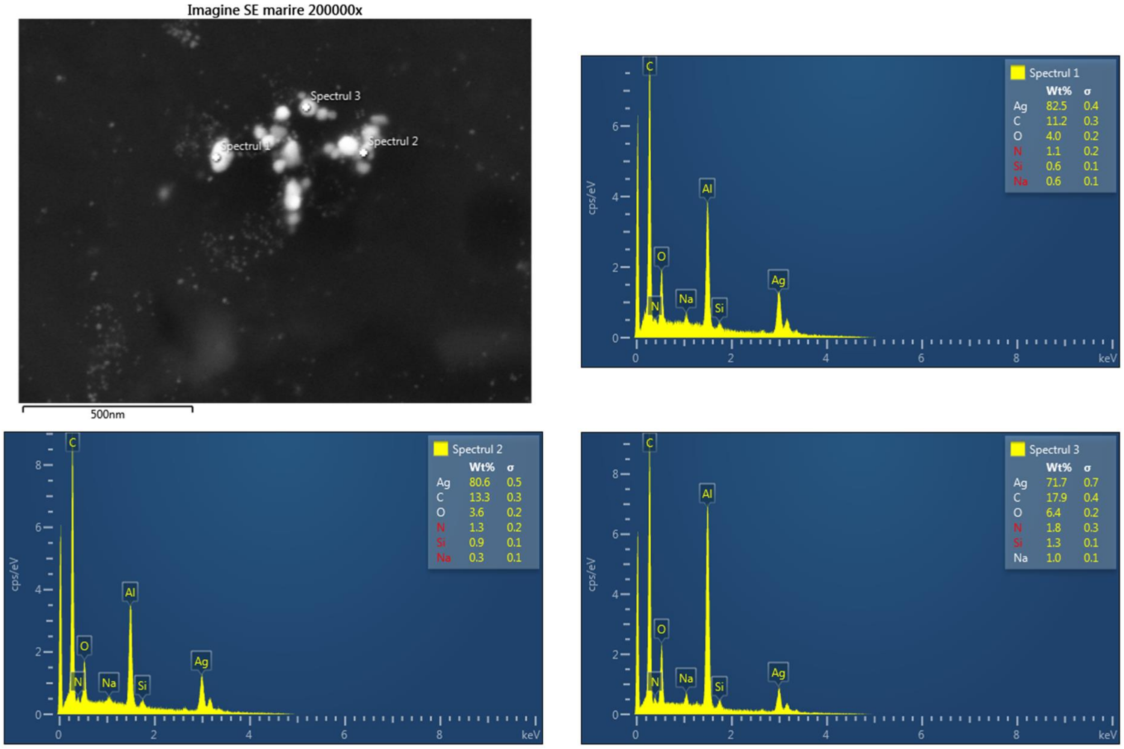


Figura 6.59 Analiza SEM-EDS pentru hidrogelul compozit cu matrice polimerică PAA-A / amestec extracte cu reticulare prin iradiere – 50 kGy (ordin de mărire: 200.000X, scala 500 nm) / mapare elemente chimice în microzona de interes

Analiza SEM pentru hidrogelurile compozite (matrice polimerică PAA-A) cu NPAg utilizînd extract de *Salvia officinalis* a pus în evidenţă existenţa nanoparticulelor de formă aproximativ sferică, dispersate, cu dimensiuni în intervalul 20 – 60 nm. Concentraţia medie relativă a argintului în probele investigate a variat între 13.6% (reticulare prin cicluri de temperatură), 28.5% (iradiere – 20 kGy) şi respectiv 15.2% (iradiere – 50 kGy); valorile ridicate ale concentraţiei medii relative a carbonului şi oxigenului indică existenţa stratului stabilizator indus de matricea polimerică şi compuşii fitochimici din extract asupra nanoparticulelor de argint. Pentru hidrogelurile compozite (matrice polimerică PAA-A) cu NPAg utilizînd extract de *Sapindus mukorossi* au fost observate nanoparticule de formă aproximativ sferică, dispersate, cu dimensiuni în intervalul 30 – 60 nm. Un aspect aparte referitor la aceste probe investigate îl constituie prezenţa peliculei de gel observabilă chair după procesarea probei în vederea analizei SEM-EDS. Valorile superioare în cazul concentraţiei medii relative a carbonului şi oxigenului, pentru fiecare variantă de reticulare, comparativ cu cele ale extractului de salvie sugerează aderarea stratului stabilizator (matrice polimerică / compuşi fitochimici din extract) într-o măsură mai mare.

În cazul utilizării amestecului de extracte la obţinerea hidrogelurilor compozite (matrice polimerică PAA-A) cu NPAg, analiza SEM-EDS a evidenţiat existenţa nanoparticulelor de formă sferică, disperse (în unele cazuri pot fi observate şi aglomerări de particule) cu dimensiuni cuprinse între 10 – 60 nm. O primă remarcă referitoare la rezultatele obţinute este legată de obţinerea unor valori superioare ale C_{mAg} comparativ cu extractele utilizate ca atare în condiţii similare de sinteză / analiză ceea ce sugerează un efect sinergetic al compuşilor fitochimici prezenţi în cele două extracte relativ la reducerea / stabilizarea nanoparticulelor de argint în cadrul matricii polimerice.

6.4 Caracterizarea prin difracție de raze X (XRD) a hidrogelurilor compozite cu matrice polimerică alcool polivinilic – hidrolizat de colagen și poliacrilamidă – amidon

Caracterizarea structurală a matricilor polimerice şi hidrogelurilor compozite, s-a realizat pe probe de material uscate (30 ± 2°C) la etuvă timp de 24 de ore, mojarate şi separate în două fracţiuni granulometrice pe sită cu ochiuri de 1 mm; analiza a fost efectuată asupra fracţiunii fine depuse pe suporturile standard de cuarţ aferente difractometrului.

Datele obţinute din scanările XRD au fost importate în programul PDXL fiind efectuată analiza Rietveld pentru rafinarea cristalografică. Detaliile referitoare la modelele cristalografice utilizate sunt prezentate în tabelul 6.13.

Tabelul 6.13 Parametrii structurii cristaline pentru o serie din compuşii argintului

Fază	*Formula chimică*	*Sistem cristalin*	*Grup spațial*	*Densitate (g/cm^3)*	*Nr. Card ICDD-PDF*
Argint	Ag	Cubic	Fm-3m (225)	10.396	04-003-7118
Oxid de argint	AgO	Monoclinic	P21/c (14)	7.684	04-007-1374
Azotat de argint	$AgNO_3$	Orthorombic	P212121 (19)	4.346	01-074-4790
Ag-PVA	$Ag(C_2H_4O)_{48}$	Tetragonal	-	9.610	00-058-1070
Ag-PVA	$Ag(C_2H_4O)_{121}$	Tetragonal	-	9.610	00-058-1069
Ag-PVA	$Ag(C_2H_4O)_{243}$	Tetragonal	-	9.610	00-058-1068

Tabelul 6.14 Gradul de cristalinitate relativ pentru hidrogelurile compozite cu matrice polimerică poliacrilamidă – amidon.

Cod probă	*Varianta de reticulare*	*Intensitate pic (cps)*		*Cristalinitate (%)*
		$I_{2\theta = 17°}$	$I_{2\theta = 38°}$	
Matrice polimerică PAA-A				
P5-1902	CT – cicluri termice	3469	-	-
P5-0412-ir20	ir20 – iradiere 20 kGy	3195	-	-
P5-0412-ir50	ir50 – iradiere 50 kGy	2747	-	-
Hidrogeluri compozite cu NPAg / extract Salvia officinalis				
P9-1902	CT – cicluri termice	1558	3072	66.35
P9-0412-ir20	ir20 – iradiere 20 kGy	1769	1899	51.77
P9-0412-ir50	ir50 – iradiere 50 kGy	1375	1849	57.35
Hidrogeluri compozite cu NPAg / extract Sapindus mukorossi				
P10-1902	CT – cicluri termice	2438	2162	47.00
P10-0412-ir20	ir20 – iradiere 20 kGy	2966	1680	36.16
P10-0412-ir50	ir50 – iradiere 50 kGy	2659	1573	37.17
Hidrogeluri compozite cu NPAg / amestec extracte				
P11-1902	CT – cicluri termice	2609	2818	51.93
P11-0412-ir20	ir20 – iradiere 20 kGy	1645	1347	45.02
P11-0412-ir50	ir50 – iradiere 50 kGy	2697	2127	44.09

Datele prezentate în tabelul 6.14 indică o creştere a gradului de cristalinitate în ordinea P10, P9 şi respectiv P11, rezultatele indicând caracterul mixt, cristalin şi amorf, al materialelor sintetizate precum şi că tipul de extract utilizat ca agent reducător şi varianta de reticulare aplicată, influenţează cristalinitatea produsului final. În cazul reticulării prin cicluri termice nanomaterialele la care a fost utilizat extract de *Salvia officinalis* ca atare (66.35%)

sau în amestec (51.93%) prezintă un grad de cristalinitate relativ superior comparativ cu nanomaterialul obținut cu extract de *Sapindus mukorossi* (47 %); o variație similară se constată și în cazul reticulării prin iradiere la ambele doze de iradiere aplicate.

Varianta de reticulare aplicată (cicluri termice și respectiv iradiere cu radiații gamma) influențează de asemenea gradul de cristalinitate relativ, acesta având valori superioare în cazul reticulării prin cicluri termice comparativ cu varianta prin iradiere. Pentru toate cele trei categorii de hidrogeluri (funcție de tipul de extract) se constată diferențe relativ mici ale valorilor gradului de cristalinitate în funcție de doza de iradiere.

6.5 Evaluarea activității antimicrobiene a hidrogelurilor compozite cu matrice polimerică alcool polivinilic – hidrolizat de colagen și poliacrilamidă – amidon

Testarea efectului antifungic al materialelor sintetizate pune în primul rând în evidență rolul extractelor vegetale. Așa cum se menționează și în studiile de specialitate, chiar în cazul extractelor (*Salvia officinalis, Sapindus mukorossi*) a căror compoziție chimică nu a fost identică, rezultatele au indicat o activitate antifungică similară; efectul antifungic nu este asociat unuia dintre compușii majori prezenți în extract ci sinergiei altor compuși care se află în proporții reduse [354, 355, 356]. Evaluarea comparativă a rezultatelor obținute (tabelul 6.15) pentru probele martor (cu extract) și hidrogelurilor cu nanoparticule de argint indică rolul determinat al compușilor din extract / extracte în efectul antifungic manifestat.

În experimentul de ***testare a toxicității acute*** au fost folosiți șoareci albi rasa Swiss (în greutate de 20±2 g) și șobolani albi rasa Wistar (în greutate de 140±20 g) cu repartiție uniformă pe sexe (20 animale, 10 masculi și 10 femele pe fiecare lot și doză), proveniți de la biobaza U.S.A.M.V. - București.

Tabelul 6.17 Rezultatele testelor biochimice la sfîrșitul perioadei de observație după administrarea probei P11-1902 (probă hidrogel cu matrice poliacrilamidă-amidon și nanoparticule de argint obținute cu amestec de extracte) pe șobolan Wistar

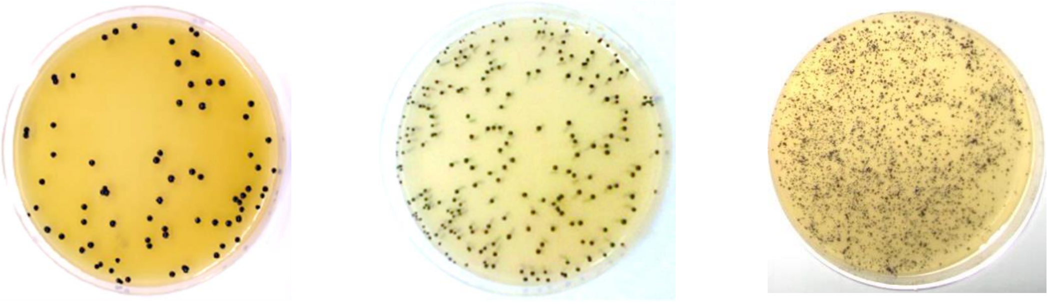
Nr. crt.	***Parametru / indicator biochimic***	***Valoare înregistrată***	***Domeniu valori de referință*** [357, 358]
1	Hb - hemoglobină	11 g / 100 ml	8 – 15 g / 100 ml
2	RBC (Red Blood Cells) - eritrocite	7.0 mil. / mm^3 sânge	5.5 – 10 mil / mm^3
3	WBC (White Blood Cells) - leucocite	12000 / mm^3 sânge	10000 – 15000 / mm^3
4	MONO (Monocytes) - monocite	3 %	max. 5 %
5	BASO (Basophils) - bazofile	< 1 %	0.0 – 0.7 %
6	EOS (Eosinophils) - eozinofile	2.1 %	2 – 4 %
7	NEU (Neutrophils) - neutrofile	54 %	50 – 55 %
8	LYM (Lymphocytes) - limfocite	28 %	25 – 35 %
9	CHOL (Cholesterol) - colesterol	126 mg / 100 ml	135 mg / 100 ml, medie
10	CREA (Creatinine Kinase) - creatinină	0.3 mg / 100 ml sânge	0.3 – 0.5 mg / 100 ml
11	ALB (Albumin) - albumină	2.3 mg / 100 ml sânge	2.1 – 4.0 mg / 100 ml
12	AMYL (Amylase) - amilază	740 mg / 100 ml sânge	300 – 1500 mg / 100 ml
13	GLU (Glucose) - glucoză	44 mg / 100 ml sânge	40 mg / 100 ml, medie
14	ALKP (Alkaline phosphatase) - fosfatază alcalină	29 mg / 100 ml sânge	8 – 80 mg / 100 ml

Animalele de experiență au fost supuse observațiilor în ceea ce privește comportamentul, semnele vitale, notându-se apariția eventualelor modificări sugestive unei stări toxice, la 24 ore, 48 ore, 72 ore și 14 zile, după administrarea dozelor [359].

Studiul microbiologic efectuat asupra hidrogelurile compozite cu nanoparticule de argint s-a realizat în scopul evidențierii caracterului lor antimicrobian și determinării dozei minime bactericide asupra tulpinilor de bacterii testate. Au fost selectate două tulpini de bacterii (sub formă de culturi pure liofilizate) frecvent implicate în infecţiile intraspitaliceşti: *Escherichia coli* ATCC reg. 25922 - bacterie Gram negativă (condiţionat patogenă, extrem de rezistentă la tratamentul cu antibiotice) şi *Staphylococcus aureus* ATCC reg 25923 - bacterie Gram pozitivă, patogenă, din clasa stafilococilor coagulazo-pozitivi, cu ridicat risc de infecţie postoperatorie.

Activitatea antimicrobiană pentru hidrogelurile compozite cu nanoparticule de argint a fost determinată la concentraţii obţinute prin diluţii decimale, conform protocolului de lucru (prezentat în subcapitolul 4.5). Volumul mediului de cultură folosit în cazul fiecărei tulpini de bacterii a fost menţinut constant (15 ml) fiind variată concentraţia hidrogelurilor testate. Plăcile cu medii nutritive, hidrogel şi inocul de bacterii au fost incubate aerob, pe durate variabile funcţie de genul bacteriei, în paralel fiind efectuate teste microbiologice şi pentru matricea polimerică corespunzătoare fiecărui tip de hidrogel (PVA-HC şi respectiv PAA-A), considerată probă martor. Pentru testarea hidrogelurilor compozite cu nanoparticule de argint a fost adoptată aceeaşi procedură indiferent de modul de sinteză al acestora. Într-o primă fază s-au realizat o serie de teste preliminare asupra fiecărui tip de hidrogel sintetizat şi probelor martor (matricii polimerice) corespunzătoare. Pentru confirmarea rezultatelor, testele preliminare au fost efectuate în duplicat pentru toate probele de hidrogeluri şi ambele tulpini bacteriene.

Eficienţa hidrogelurilor compozite cu nanoparticule de argint a fost evaluată prin intermediul concentraţiei minime bactericide (CMB). Astfel într-o fază preliminară au fost repetate testele cu proporţii mai reduse de hidrogeluri (0.8 ml şi 0.5 ml / placă test) rezultatele indicînd şi aceste cazuri lipsa coloniilor tipice de bacterii ceea ce indică un efect bactericid asupra ambelor tulpini bacteriene. Ca urmare a acestor teste s-a stabilit o sensibilitate diferenţiată a tulpinilor bacteriene la acţiunea nanomaterialelor testate, tulpina de *Escherichia coli* fiind mai sensibilă decât cea de *Staphylococcus aureus*. Din acest motiv în testele ulterioare, testarea pe tulpină de *Escherichia coli* s-a efectuat plecând de la diluţia de bază d_0 cu 0.5 ml hidrogel respectiv 0.8 ml hidrogel pentru testarea pe tulpină de *Staphylococcus aureus*. Pentru valori inferioare d_0 în plăci apar dezvoltate colonii tipice de bacterii hidrogelurile manifestând doar efect bacteriostatic. Termenul de diluţie de bază d_0 (10^0) va fi utilizat în cele ce urmează pentru probele în care hidrogelurile se folosesc ca atare, neeluate în ser fiziologic. Datorită volumului redus de hidrogel luat în probă pentru testare este dificil de realizat o repartizarea uniformă a acestuia pe placa Petri; din acest motiv, pentru stabilirea CMB în cazul celor două tulpini bacteriene, testele au fost realizate cu efectuarea de diluţii decimale succesive (conform tehnicii descrise în subcapitolul 4.5) pentru toate probele de hidrogeluri:



(a) **(b)** **(c)**

Figura 6.69 Hidrogel P2-0412 – plăci Petri după testare la tulpină de *Staphylococcus aureus* la diluţii diferite: a) $d_1(10^{-1})$, b) $d_2(10^{-2})$ şi c) $d_3(10^{-3})$.

Întrucât imaginile plăcilor de testare Petri sugerează acelaşi tip de comportament bacteriostatic au fost prezentate numai o serie de imagini sugestive pentru fiecare tip de hidrogel cu nanoparticule de argint şi pentru fiecare tip de tulpină bacteriană, comportamentul bacteriostatic fiind detaliat sub formă tabelară (tabelele 6.19-6.23).

Tabelul 6.23 Concentraţia minimă bactericidă (CMB) pentru tulpinile bacteriene *Escherichia coli* şi *Staphylococcus aureus*

Nr.crt.	*Cod probă*	*CMB (ml / ml inocul / 24 ore)*		*Tip hidrogel / matrice polimerică*
		Escherichia coli	*Staphylococcus aureus*	
1	**P2-0412**	$0.5\cdot10^{-2}$	$0.8\cdot10^{-2}$	***Hidrogeluri cu extract de Salvia officinalis / PVA-HC***
2	**P2-0412-ir20**	**$0.5\cdot10^{-3}$**	**$0.8\cdot10^{-3}$**	
3	**P2-0412-ir50**	**$0.5\cdot10^{-3}$**	**$0.8\cdot10^{-3}$**	
4	**P3-0412-ir20**	$0.5\cdot10^{-2}$	$0.8\cdot10^{-2}$	***Hidrogeluri cu $AgNO_3$ – iradiere / PVA-HC***
5	**P3-0412-ir50**	$0.5\cdot10^{-2}$	$0.8\cdot10^{-2}$	
6	**P9-2002**	**$0.5\cdot10^{-3}$**	**$0.8\cdot10^{-3}$**	***Hidrogeluri cu extract de Salvia officinalis / PAA-A***
7	**P9-0412-ir20**	$0.5\cdot10^{-2}$	$0.8\cdot10^{-2}$	
8	**P9-0412-ir50**	$0.5\cdot10^{-2}$	$0.8\cdot10^{-2}$	
9	**P10-2002**	$0.5\cdot10^{-2}$	$0.8\cdot10^{-2}$	***Hidrogeluri cu extract de Sapindus mukorossi / PAA-A***
10	**P10-0412-ir20**	$0.5\cdot10^{-2}$	$0.8\cdot10^{-2}$	
11	**P10-0412-ir50**	$0.5\cdot10^{-2}$	$0.8\cdot10^{-2}$	
12	**P11-2002**	$0.5\cdot10^{-2}$	$0.8\cdot10^{-2}$	***Hidrogeluri cu amestec de extracte / PAA-A***
13	**P11-0412-ir20**	$0.5\cdot10^{-2}$	**$0.8\cdot10^{-3}$**	
14	**P11-0412-ir50**	**$0.5\cdot10^{-3}$**	**$0.8\cdot10^{-3}$**	
15	**P12-0412-ir20**	$0.5\cdot10^{-1}$	$0.8\cdot10^{-1}$	***Hidrogeluri cu $AgNO_3$ – iradiere / PAA-A***
16	**P12-0412-ir50**	$0.5\cdot10^{-1}$	$0.8\cdot10^{-1}$	

7. CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PROPRII

7.1 Concluzii

Activitatea de cercetare aferentă tezei de doctorat a avut ca obiectiv general sinteza „verde” a unor hidrogeluri compozite, funcționalizate cu nanoparticule de argint, caracterizarea acestor materiale precum și evaluarea potențialului acestora pentru aplicații biomedicale. Cercetările efectuate în cadrul tezei s-au direcționat către posibilitățile de a sintetiza un anume tip de nanomateriale, respectiv hidrogeluri, cu matrice polimerică hibridă (pe baza a doi componenți, un polimer sintetic și unul natural) și funcționalizate cu nanoparticule de argint (sintetizate prin intermediul extractelor vegetale de *Salvia officinalis* și *Sapindus mukorossi*). Pentru un studiu relevant într-o primă fază a fost experimentată sinteza nanoparticulelor de argint cu extractele vegetale menționate iar ulterior sinteza hidrogelurilor compozite cu nanoparticule de argint generate *in situ* prin intermediul acelorași extracte. Într-o fază finală a fost evaluată activitatea antimicrobiană a nanomaterialelor sintetizate prin teste *in vitro* și teste preliminare *in vivo*.

Obiectivele specifice tezei de doctorat au fost atinse finalizându-se prin obținerea nanomaterialelor tip hidrogel prin tehnicile de sinteză propuse în cadrul obiectivului general al tezei, nanomateriale care au fost caracterizate ulterior prin metode specifice de analiză.

Metodele de sinteză aplicate (atât la obținerea extractelor naturale, sinteza nanoparticulelor de argint și a hidrogelurilor compozite) au avut în vedere următoarele aspecte: utilizarea de surse naturale, solvenți nontoxici, parametrii de proces care să permită reproductibilitatea metodelor, apelarea la echipamente și o logistică avantajoase din punct de vedere economic precum și aspecte legate de protecția mediului înconjurător.

Nanoparticulele de argint reprezintă una din clasele de nanoparticule cel mai des utilizate ca agent de funcționalizare a polimerilor datorită în special proprietăților electrice, optice, catalitice și în particular proprietăților antimicrobiene bine stabilite și investigate în special în sistemele coloidale. Cu toate acestea numeroase aplicații practice ale nanoparticulelor de argint implică includerea acestora în diverse substraturi și matrici. Din acest punct de vedere polimerii constituie o clasă de materiale preferată datorită morfologiei specifice, naturii chimice și structurii cu catene polimerice lungi ce permit încorporarea și dispersia avansată a nanoparticulelor. În plus o serie de grupe funcționale ale polimerilor pot fi folosite ca centrii activi pentru sinteza controlată a nanoparticulelor.

Procedeul frecvent aplicat pentru dispersarea nanoparticulelor de argint în matricea polimerică implică captarea cationilor de argint de către catenele polimerice urmată de reducerea cu agenți reducători. Acest procedeu, comparativ cu amestecarea a doi componenți și polimerizarea în prezența nanoparticulelor de argint presintetizate, prezintă două avantaje: în primul rând existența catenelor macromoleculare îmbunătățește dispersia nanoparticulelor în matricea polimerică și previne parțial formarea de agregate și în al doilea rând, substratul asigurat de catenele polimerice conduce la o o dimensiune redusă a nanoparticulelor, o distribuție granulometrică îngustă și forme relativ bine definite.

Varianta de sinteză aplicată, formarea nanoparticulelor reactive în cadrul unui hidrogel preformat, implică obținerea într-o primă fază a hidrogelul preformat ce acționează ca un microreactor în care nanoparticulele se formează din precursori după o serie de tratamente necesare. Acest proces a dobândit popularitate îndeosebi datorită avantajelor tehnologice, comparativ cu metoda *ex situ*, dimensiunea și morfologia nanoparticulelor putând fi controlată relativ mai ușor. Ionii metalici pot fi absorbiți de grupele funcționale ale hidrogelului prin interacții electrostatice sau ion-dipol, iar apoi reduși la nanoparticule metalice prin intermediul unor agenți reducători proveniți din extractele naturale. Reticularea prin iradiere este o tehnică care nu implică utilizarea unor reactivi chimici păstrându-se ca urmare biocompatibiliatea polimerului şi asigurându-se în acelaşi timp modificarea polimerului şi o sterilizare a acestuia. Hidrogelurile preparate prin tehnica de îngheţare-dezgheţare au demonstrat a avea un potenţial important în numeroase aplicaţii datorită anumitor proprietăţi, preferabile gelurilor obţinute prin tehnici de reticulare tradiţionale, referitoare la lipsa toxicităţii şi rezistenţa mecanică superioară; expunerea la cicluri repetate de îngheţare şi decongelare la temperatura camerei are ca rezultat formarea de cristalite ce acţionează ca reticulări fizice în cadrul matricii polimerice. Compuşii fitochimici prezenţi în extractele vegetale ar putea contribui de asemenea la stabilizarea matricii polimerice, contribuind în plus cu activitate antioxidantă, farmacologică şi potenţial terapeutic la nanobiomaterial.

Un mediu hidrofilic este deosebit de important în aplicaţiile antimicrobiene pentru ca apa să faciliteze eliberarea ionilor de argint din nanoparticulele încapsulate în matricea polimerică; totodată materialul va menţine un mediu umed în jurul plăgii asigurând astfel o hidratare pentru o vindecare optimă. Biopolimerii constituie un grup important în principal datorită disponibilităţii, costului redus şi biocompatibilităţii. Considerând şi faptul că numeroase aplicaţii ale nanocompozitelor cu argint sunt îndreptate către tratamentul biomedical, hidrogelurile constituie repere importante în acest domeniu.

Din categoria materialelor sintetizate, hidrogelurile simple / multicomponent au luat amploare în domeniul eliberării controlate de principii medicamentoase dar şi în domenii precum ingineria tisulară unde biomaterialele polimerice îndeplinesc numeroase funcţii, captând tot mai mult interesul cercetătorilor în ultimul deceniu datorită proprietăţilor intrinseci pretabile aplicaţiilor medicale; biocompatibilitatea, capacitatea de a elibera din reţeaua polimerică compuşi hidrosolubili şi versatilitatea acestora în modelarea proprietăţilor fizicochimice permit generarea de noi biomateriale.

Concluzii rezultate în urma studiului sintezei nanoparticulelor de argint / hidrogelurilor compozite prin analiza de spectroscopie de absorbție în ultraviolet-vizibil (UV-VIS)

Prin corelarea modificărilor spectrale în UV-VIS, ca indicator al schimbărilor morfologice ale nanoparticulelor de argint, cu parametrii experimentali (pH, raportul de amestecare iniţial azotat de argint / extract *Salvia officinalis*) se pot trage concluzii referitoare la creşterea nanoparticulelor şi parametrii de lucru optimi în vederea sintezei nanoparticulelor de argint utilizând extracte din plante.

În demersul experimental efectuat spectroscopia de absorbţie în ultraviolet-vizibil a fost utilizată ca tehnică analitică pentru a caracteriza extractul vegetal şi a monitoriza procesul de sinteză al nanoparticulelor de argint. Parametrii de proces precum pH-ul, temperatura, conţinutul extractului de salvie (corespunzător unei anumite metode extracţie), concentraţia soluţiei ionice, timpul de reacţie, etc. influenţează reacţia de reducere a ionului metalic, creşterea nanoparticulelor şi faza de stabilizare. Prin urmare distribuţia dimensională şi morfologică a nanoparticulelor de argint este rezultatul cineticii diferite ale tuturor etapelor implicate în procesul formării nanoparticulelor. Această influenţă se reflectă în alura benzii de absorbţie care apare în domeniul 350-600 nm ce cumulează proprietăţile plasmonice ale tuturor nanoparticulelor de argint prezente în soluţie. Dinamica creşterii nanoparticulelor poate fi monitorizată prin controlul cinetic al procesului, varianta uzuală constând în variaţia concentraţiei tipului speciilor reducătoare şi cu caracter stabilizator. Astfel pentru a obţine informaţii referitoare la etapele procesului de creştere a nanoparticulelor au fost amestecate soluţii de extract de salvie şi azotat de argint în diferite rapoarte.

A fost calculată aria relativă în funcţie de timp în domeniul 350-600 nm, aria relativă reprezentând suprafaţa delimitată de spectrul de absorbţie în cazul probelor de extract aditivate cu azotat de argint. S-a considerat că valoarea acestei arii pot fi corelată cu existenţa și conținutul de nanoparticule care dau un răspuns plasmonic. Reprezentarea grafică a ariei relative în funcție de timp a fost preferată reprezentării valorilor asociate maximului de absorbție în timp datorită faptului că benzile de absorbție prezintă caracteristici diferite (intensitate maximă, lărgime de bandă, formă) în funcție de rapoartele de amestecare azotat de argint / extract de salvie. Domeniul lungimii de undă selectat a avut în vedere faptul că în această zonă apar principalele modificări plasmonice ale nanoparticulelor de argint în spectrele UV-VIS. Motivul selectării ariei relative în locul maximului de absorbție a fost și acela că răspunsul plasmonic al nanoparticulelor metalice este influențat de mediul de reacție.. În etapa de creștere procesul este dinamic, însoțit de rupere și formare de legături, cu efect asupra dimensiunii și formei nanoparticulelor și interfeței metalice.

Evoluția spectrului UV-VIS în timp indică o creștere rapidă a nanoparticulelor de argint în primele trei ore de la momentul amestestecării componenților. Totuși apar diferențe între viteza de creștere a intensității absorbanței și poziția maximului de absorbție. Luând în considerare alura spectrului în domeniul 350-600 nm, se poate aprecia că cel mai mare conținut de nanoparticule a fost obținut atunci când amestecul inițial a conținut volume egale de azotat de argint 10 mM și extract de salvie. În cazul reprezentării ariei relative în funcție de timp pentru amestecurile de sinteză studiate pot fi identificate cele patru etape cu cinetici diferite ale procesului de creștere a nanoparticulelor. Dinamica procesului este similară cu mecanismul propus de Polte [215] pentru formarea nanoparticulelor de aur obținute prin metoda Turkevich [214].

În modelul creșterii descris în studiul prezentat procesele implicate sunt: reducerea ionilor metalici, difuzia ionilor metalici și particulelor metalice în soluție, adsorbția și reducerea ionilor metalici la interfață, coalescența nanoparticulelor instabile coloidal. Având în vedere evoluția procesului de creștere a nanoparticulelor, la un anumit moment unul din procesele individuale poate avea o pondere mai însemnată în dinamica procesului global de creștere. O altă observație experimentală este aceea că alura curbelor variației ariei relative în funcție de timp variază cu raportul de amestecare inițial dintre extractul de salvie și azotat de argint. În cazul tuturor sintezelor efectuate experimental a fost calculată viteza relativă de creștere a ariei ca panta porțiunii lineare a evouției ariei relative în funcție de timp.

Monitorizarea formării nanoparticulelor pe durata a opt zile a pus în evidență o creștere lentă și continuă a ariei relative pentru amestecurile în care volumul de azotat de argint 10 mM se află în exces față de cel de extract. În același timp a putut fi observată și o deplasare ușoară a maximului de absorbție în spectrul UV-VIS spre lungimi de undă mai mari, comportare ce poate fi corelată cu formarea unor nanoparticule de dimensiuni mari.

În vederea obținerii de informații privind stoechiometria mediului de reacție al întregului proces de echilibru s-a aplicat de asemenea o procedură similară metodei variației continue. Într-o primă etapă amestecul a fost testat la temperatura camerei prin înregistrarea spectrului UV-VIS iar conținutul de azotat de argint a fost variat sistematic (0 – 100%); spectrele UV-VIS au fost înregistrate pentru obținerea de informații asupra produșilor de reacție. Etapele demersului experimental au fost realizate pentru obținerea de informații legate de raportul volumetric optim azotat de argint : extract vegetal necesar sintezei nanoparticulelor de argint stabile.

Când amestecul inițial de reacție conține volume egale de azotat de argint și extract de *Salvia officinalis* (raport volumetric de amestecare egal cu 1:1), spectrul UV-VIS a pus în evidență cea mai ridicată valoare a absorbanței la aproximativ 425 nm. În cazul rapoartelor de amestecare în care sarea ionică se află în exces s-a observat o deplasare batocromică a maximului de absorbție; această deplasare putând fi corelată cu formarea nanoparticulelor de dimensiuni mai mari. Dacă extractul vegetal se află în exces față de volumul de azotat de argint, spectrul UV-VIS prezintă maxime de absorbție mai atenuate, corelate cu un conținut mai mic de nanoparticule în amestec. Valoarea lungimii de undă corespunzătoare maximului de absorbţie (λ_{max}) este deplasată către lungimi de undă mai mici comparativ cu amestecul la raport de amestecare 1:1 indicând prezenţa unor particule de dimensiuni mai reduse; această comportare ar putea fi datorată soluţiei ionice în calitate de reactant limitativ în acest caz.

Rezultatele experimentale au indicat un raport optim de amestecare a precursorilor egal cu 1:1 (soluţie azotat de argint 10 mM : extract de salvie) în cazul biosintezei nanoparticulelor de argint cu extract de *Salvia officinalis* la temperatura ambiantă.

pH-ul constituie un parametru experimental important în dinamica creşterii nanoparticulelor de argint pentru că valoarea sa poate influenţa majoritatea echilibrelor implicate în proces. Probele testate, obţinute prin amestecarea în proporţii diferite a extractului de *Salvia officinalis* cu soluţie tampon de pH, au prezentat valori stabile ale pH-ului; ulterior, după adăugarea azotatului de argint, în rapoarte corespunzătoare extractului vegetal, s-a doar constatat o uşoară modificare (± 0.5 unităţi de pH) a valorii pH-ului amestecului de sinteză final. Diferenţele observate în spectrele înregistrate derivă îndeosebi din amplitudinea acestora, intensităţile maximului de absorbţie reducându-se şi devenind mai apropiate pe măsura scăderii pH-ului. Introducerea ionului fosfat în sistem (odată cu soluţia tampon de pH) influenţează răspunsul plasmonic al nanoparticulelor de argint formate diferenţa putând fi observată în cazul amestecului cu pH egal cu 6.3 (conţinând soluţie tampon) comparativ cu amestecul cu pH egal cu 6.8 (fără soluţie tampon); diferenţa dintre cele două spectre se datorează ionilor fosfat prezenţi în soluţie şi consecutiv la interfaţa particulă coloidală metalică – soluţie. În urma adăugării în amestecul de sinteză de acid fosforic, variaţia aria relative în timp este similară unor reacţii autocatalitice.

Evoluţia vitezei relative de creştere (calculată ca panta dreptei pe porţiunea liniară a variaţiei ariei relative în timp), la diferite valori de pH, pentru raportul de amestecare volumetric azotat de argint : extract de *Salvia officinalis* egal cu 1:1, a fost determinată pe baza valorilor v_1, v_2, v_3 şi respectiv v_4 ce corespund celor patru etape ale procesului de creştere a nanoparticulelor corespunzătoare modelului propus în studiul prezentat. Probele cu valori ale pH-ului de 10.5, 6.3, 2.8 şi 2.3, măsurat după adăugarea soluţiei tampon, prezintă valori relativ apropiate ale vitezei în a treia etapă (v_3), etapă în care procesul de creştere al nanoparticulelor este accelerat datorită reducerii autocatalitice la interfaţa metal – soluţie. Diferenţa dintre aceste valori este dată de durata de timp asociată acestei etape în curbele de variaţie ale ariei relative în funcţie de timp. Prin urmare odată cu scăderea valorii pH-ului în amestecul de sinteză, se reduce şi durata de timp corespunzătoare etapei a treia. Viteza asociată primei etape a procesului de creştere (v_1) prezintă valori ridicate în cazul amestecurilor cu pH alcalin comportare care poate fi atribuită formării oxidului de argint. Ca urmare, în soluţie alcalină, în faza iniţială, oxidarea argintului la oxid de argint joacă un rol important în mecanismul global al formării nanoparticulelor de argint.

Este cunoscut faptul că temperatura de reacţie joacă un rol important în distribuţia spaţială şi dimensională a particulelor, în special în cazul nanoparticulelor de argint. Determinările experimentale pe baza procedurii abordate au fost destinate optimizării parametrilor experimentali ai procesului de biosinteză studiat luând în considerare modificările din spectrul UV-VIS.

Înregistrarea spectrelor UV-VIS pentru amestecurile studiate a permis calculul ariei relative asociate nanoparticulelor de argint prezente în soluţie, putând fi puse în evidenţă totodată o serie modificări în alura spectrelor: atunci când sarea ionică se află în exces (rapoarte volumetrice azotat de argint : extract mai mari ca 1:1) deplasarea λ_{max} spre valori mai mari putând fi corelată cu formarea unor nanoparticule de dimensiuni mai mari şi cu un înveliş mai subţire. Rezultatele obţinute sugerează că formarea nanoparticulelor de argint în urma procesului de biosinteză cu extract de *Salvia officinalis* are la bază un echilibru capabil să determine o modificare continuă a formei şi dimensiunii nanoparticulelor dependent de raportul Ag^+ / specii reducătoare şi specii cu rol stabilizator. Procesul decurge continuu, în corelaţie cu condiţiile specifice ale mediului de reacţie până la atingerea unui anumit echilibru legat de distribuţia dimensională şi spaţială a nanoparticulelor. Deşi ariile relative calculate pe baza spectrelor UV-VIS prezintă valori ridicate pentru amestecurile ce au fost încălzite iniţial, valoarea absorbanţei asociată maximului este scăzută ca valoare benzile de absorbţie fiind totodată largi comparativ cu valorile amestecului la temperatura ambiantă. Această comportare sugerează că nanoparticulele de argint se află în proporţie ridicată atunci când amestecul este încălzit iniţial însă în acelaşi timp, distribuţia spaţială şi dimensională este mai largă comparativ cu probele fără încălzire.

Studiul experimental realizat cu utilizarea extractului de *Sapindus mukorossi* a urmărit într-o primă fază comportarea în calitate de reducător şi agent de stabilizare a acestuia, la sinteza nanoparticulelor de argint utilizând ca precursor soluţie de azotat de argint 10 mM. Au fost efectuate teste cu probe având proporţii (rapoarte volumetrice) variabile de extract menţinând constant conţinutul de sare ionică, la un pH al amestecului de sinteză datorat extractului vegetal. Pentru analiza UV-VIS au fost utilizate probe martor având aceleaşi rapoarte volumetrice de extract, la diluţii identice cu probele de soluţii coloidale de nanoparticule de argint obţinute.

Datele obţinute în urma analizei UV-VIS pun în evidenţă o reducere extrem de lentă a ionilor de argint de către compuşii prezenţi în extractul vegetal în condiţiile de sinteză stabilite (contactare statică / 25^{0}C / pH acid al mediului de reacţie datorat extractului vegetal). Cu toate acestea poate fi observată formarea nanoparticulelor în special la rapoartele volumetrice 1:1 şi 1.5:1 (corespunzătoare unor concentraţii volumetrice de extract în amestec de 2% şi respectiv 3%). În acest interval de concentraţie a fost determinată de altfel şi valoarea concentraţiei critice micelare a extractului – 2.7% valoare medie; această comportare sugerează implicarea favorabilă a miceliilor formate în soluţie în procesul de reducere şi stabilizare a nanoparticulelor de argint.

În următoarea etapă a studiului experimental sinteza nanoparticulelor de argint cu extract de *Sapindus mukorossi* a fost realizată pentru cinci valori de concentraţie ale extractului în amestec (în jurul valorii concentraţiei critice micelare medii determinate – 2.7%) la 25ºC (baie de apă termostatată) în exces de soluţie $AgNO_3$ 10 mM, fără diluţie, prin contactare statică; amestecul a fost monitorizat prin analiză UV-VIS în domeniul 230-750 nm (ca probe martor au fost utilizate probe de extract – diluţie cu apă bidistilată – la concentraţii similare cu amestecurile testate). Din spectrele UV-VIS se observă o deplasare uşoară a maximului de absorbţie către lungime de undă mai mare care ar putea fi corelată cu existenţa în soluţie a agregatelor / nanoparticulelor de dimensiuni mai mari (existenţa depunerilor ar confirma acest lucru, o parte din agregatele de mari dimensiuni precipitând). Concomitent se observă o stabilizare a maximului de absorbţie pentru concentraţiile de 1.6%, 2.7%, 3.6% şi 5% aproximativ în jurul valorii absorbanţei de 0.28; comportarea în spectrul UV-VIS are putea fi pusă în legătură şi cu formarea agregatelor micelare care influenţează răspunsul plasmonic, în domeniul de concentraţie menţionat anterior formându-se micelii de dimensiuni comparabile. Valorile pH-ului se menţin aproximativ în acelaşi domeniu pentru toate amestecurile de sinteză (pH: 4.14 – 4.63) după 4 zile de la sinteză, variind foarte puţin, scăderea fiind datorată posibil eliberării ionilor de hidrogen de către compuşii polifenolici în urma reducerii ionilor de argint din soluţie.

Rezultatele obţinute în acest stadiu al demersului experimental sugerează o influenţă importantă în procesul de reducere şi stabilizare a pH-ului mediului de reacţie. Ca urmare a fost investigată comportarea amestecurilor de sinteză la valori de pH bazic (ajustarea pH-ului s-a realizat cu soluţie de hidroxid de potasiu 1M) menţinând constant raportul volumetric de amestecare al componenţilor extract : sare ionică egal cu 1:1. Analiza spectrală UV-VIS a confirmat importanţa pH-ului ca unul din factorii decisivi în cazul sintezei. La valori bazice de pH procesul de formare a nanoparticulelor de argint decurge cu o viteză globală crescută din alura maximelor de absorbție rezultând formarea unui număr crescut de nanoparticule cu dimensiuni mai mici (valoarea lungimii de undă asociată maximului se deplasează către valori mai mici comparative cu amestecurile la pH acid) și o distribuție granulometrică mai restrânsă (maxime de absorbție bine definite în cazul pH-ului bazic comparativ cu benzi de absorbție pentru valori de pH acid). Atât în cazul pH-ului acid cât și pentru valori de pH bazic, formarea nanoparticulelor este influențată de concentrația extractului în amestecul de sinteză fiind notabilă la valori superioare concentrației critice micelare.

În condiții de pH acid al mediului de reacție sinteza nanoparticulelor de argint decurge extrem de lent în condițiile date (25^0C / pH acid datorat extractului vegetal / azotat de argint 10 mM / contactare statică); o modificare notabilă în spectrele UV-VIS apare la 3 zile de la debutul sintezei observându-se existența unor benzi de absorbție largi a căror intensitate se diminuează odată cu creșterea conținutului de extract vegetal în amestec. Această comportare sugerează un echilibru competitiv existent în amestecul de sinteză între ionii de argint și hidrogen, fixați și respectiv eliberați la nivelul grupelor hidroxil saponinice. Deplasarea batocromă a maximele benzilor de absorbție comparativ cu amestecurile la pH bazic sugerează existența în soluție a nanoparticulelor de argint de dimensiuni mai mari și un spectru granulometric relativ larg. Răspunsul plasmonic al nanoparticulelor de argint ar putea fi totodată atenuat de existența miceliilor formate în jurul nanoparticulelor. Pentru toate rapoartele de amestecare testate (1:4, 1:2, 1:1, 2:1 și 4:1) se constată totodată o stabilizare a pH-ului soluției în jurul valorii de 4.3 după trei zile de la contactare ce ar sugera totodată comportarea extractului vegetal ca un tampon de pH acid. Date de literatură [278] sugerează de asemenea că în condiții de pH acid are loc o dizolvare parțială a nanoparticulelor formate invers proporțională cu dimensiunea acestora și totodată o creștere dimensională după dizolvare; spectrele UV-VIS înregistrate ar confirma o astfel de comportare.

Influența concentrației critice micelare (CMC) a putut fi sesizată încă de la debutul studiului sintezei nanoparticulelor de argint cu extract de *Sapindus mukorossi*. Atât probele martor (soluțiile de extract la diluțiile corespunzătoare) cât și amestecurile de sinteză au înregistrat un pH în jurul valorii de 4.4 indicând proprietatea de tamponare a extractului vegetal; valoarea pH-ului se corelează cu structura saponinelor, ca și specii cu caracter slab acid, prezente în extractul apos de *Sapindus mukorossi*. În condițiile de sinteză aplicate formarea nanoparticulelor este un proces foarte lent, modificări notabile atât în ceea ce privește culoarea soluțiilor cât și spectrele UV-VIS au fost observate la 72 ore din momentul contactării precursorilor. Spectrele înregistrate prezintă benzi de absorbție largi centrate la circa 450 nm pentru toate probele investigate, putându-se observa că o creștere accentuată a absorbanței odată cu atingerea și depășirea valorii de 2.6±0.10% extract în amestecul de sinteză. Variația liniară a ariei relative, calculate pe baza spectrelor UV-VIS în domeniul 350-600 nm, pentru soluțiile de nanoparticule, prezintă un punct de inflexiune corespunzător unui conținut de extract de 2.6% ce confirmă ipoteza că miceliile ar putea constituie structuri ce contribuie formarea nanoparticulelor.

Creșterea valorii CMC în mediul bazic comparativ cu mediul acid poate fi asociată existenței speciilor chimice din extract cu caracter slab acid, odată cu adăugarea soluției alcaline (hidroxid de potasiu) grupările funcționale acide suferind o deprotonare formându-se un amestec de compuși cu un caracter slab hidrofob. Scăderea caracterului hidrofobic al soluțiilor poate conduce la valori mai ridicate ale CMC; diagramele înregistrate în mediu acid și respectiv bazic indică o influență semnificativă a CMC în formarea nanoparticulelor de argint în condițiile de sinteză aplicate.

Sinteza nanoparticulelor de argint cu amestec de extracte a evidențiat faptul că pentru rapoartele de amestecare între componenți la care extractul de *Salvia officinalis* și azotat de argint se află în exces față de extractul de *Sapindus mukorossi* (1:2:2 → 1:20:20) pe durata monitorizării inițiale (3 ore la intervale de 20 minute) au putut fi observate modificări spectrale semnificative îndeosebi la rapoartele de amestecare 1:10:10 şi respectiv 1:20:20. Formarea nanoparticulelor de argint este favorizată îndeosebi la aceste două rapoarte de amestecare mai sus menţionate atât la 180 minute de la debutul sintezei cît mai ales pe un interval mai larg de timp; comportarea amestecurilor de extracte la rapoartele de amestecare investigate indică un raport optim de amestecare pentru acest sistem (extract *Sapindus mukorossi* : extract *Salvia officinalis* : azotat de argint 10 mM) situat în intervalul 1:10: 0 – 1:20 :20.

A fost realizată de asemenea şi o analiză comparativă pe baza datelor de spectroscopie UV-VIS având în vedere sinteza nanoparticulelor de argint cu amestec de extracte şi respectiv prin utilizarea componenţilor / extractelor individuali. În cazul raportului volumetric de amestecare 1:10:10 se remarcă la 5 zile un maxim de absorbţie foarte bine delimitat, îngust ca lărgime de bandă cu intensitate semnificativ crescută comparativ cu extractul de salvie, indicând o distribuţie granulometrică redusă şi o stabilizare superioară a nanoparticulelor din punct de vedere dimensional; pentru acest raport de amestecare (comparativ cu celelalte) spectrul UV-VIS sugerează un efect sinergetic al celor două extracte.

O diferenţă notabilă în cazul amestecului de extracte comparativ cu extractul de *Sapindus mukorossi* ca atare se observă în cazul raportului volumetric egal cu 1:1:1 respectiv unei concentraţii de 2% (% vol.) de extract. Influenţa extractului de *Sapindus mukorossi* în amestec se observă în toate cazurile investigate, variaţia ariei relative pentru extractele în amestec fiind similară variaţiei extractului de *Sapindus mukorossi* ca atare. Aria relativă asociată nanoparticulelor de argint înregistrează o creştere lentă aproximativ liniară în timp ce sugerează un proces de stabilizare datorat în special extractului de *Sapindus mukorossi*. Variaţia / diferenţa mai accentuată observată în cazul raportului 1:1:1 ar putea fi asociată unui efect de stabilizare manifestat mai pregnant în etapa premicelară; diferenţierea faţă de cazul utilizării numai a extractului de salvie este evidentă, în acest caz procesul de reducere a ionilor de argint cu formare de noi particule desfăşurându-se cu viteză crescută, variaţia ariei relative putând fi asociată însăşi aglomerării nanoparticulelor formate.

Implicarea speciilor chimice din extractul de *Sapindus mukorossi* în procesul de reducere rezultă, în special în cazul concentraţiilor apropiate sau superioare (2%, 3% şi 4%) concentraţiei critice micelare, din variaţia ariei relative în primele 80 minute de contactarea precursorilor pentru amestecul de extracte comparativ cu extractul de salvie; nu trebuie exclusă nici posibilitatea modificării valorii concentraţiei critice micelare a extractului de *Sapindus mukorossi* aflat în amestec cu cel de salvie comparativ cu extractul ca atare.

Hidrogel compozit cu matrice polimerică PVA-HC (reticulare prin cicluri de temperatură) - Prezenţa nanoparticulelor de argint poate fi evidenţiată în spectrul de absorbţie UV-VIS prin existenţa unui maxim de absorbţie bine definit (localizat la 425.68 nm / 0.433 - absorbanţă) prezent numai în spectrul probei de hidrogel cu nanoparticule de argint. Alura benzii de absorbţie sugerează existenţa unor nanoparticule cu un spectru granulometric relativ îngust, cu precizarea că prelevarea probei în vederea analizei s-a efectuat din supernatant existând prin urmare posibilitatea existenţei unor nanoparticule şi în matricea hidrogelului care nu au migrat în soluţie apoasă.

Hidrogeluri compozite cu matrice polimerică PVA-HC (reticulare prin iradiere) - Existenţa nanoparticulelor de argint este evidenţiată în spectrul de absorbţie UV-VIS al probelor de hidrogel prin maxime de absorbţie în domeniul 400 – 430 nm.

- În cazul absenţei extractului vegetal din amestecul de sinteză maximele de absorbţie sunt deplasate către lungimi de undă mai mari, sugerând existenţa unor nanoparticule de mai mari dimensiuni, în timp ce prezenţa extractului vegetal determină deplasarea acestor maxime către lungimi de undă mai mici; această deplasare ar putea fi datorată efectului de stabilizare a compuşilor din extractul vegetal care determină o stabilizare dimensională a nanoparticulelor. Totodată rolul extractului vegetal ca agent reducător poate fi sugerat şi de amplitudinea maximelor de absorbţie superioară comparativ cu amestecurile fără extract vegetal, indiferent de doza de iradiere.

- La o doză superioară de iradiere se remarcă o intensificare a maximului de absorbţie (îndeosebi în cazul absenţei extractului vegetal din amestec) concomitent cu o relativă îngustare a benzii de absorbţie.
- Datele obţinute ar putea sugera o primă direcţie de optimizare a procedeului de sinteză în sensul găsirii unui raport optim între doza de iradiere şi conţinutul de extract din amestecul de sinteză.
- Analiza UV-VIS la 100 zile de la preparare a probelor de hidrogel cu matrice polimerică PVA-HC reticulate prin iradiere pune în evidenţă o stabilitate deosebită a sistemelor respective, spectrele de absorbţie fiind aproape indentice cu cele înregistrate la 5 zile.

Hidrogeluri compozite cu matrice polimerică PAA-A (reticulare prin cicluri de temperatură) - Spectrele de absorbţie UV-VIS înregistrate pentru probele de hidrogel cu matrice polimerică PAA-A pun în evidenţă apariţia unor maxime tip bandă care pot fi atribuite formării şi existenţei nanoparticulelor de argint. Aceste observaţii sugerează posibilitatea implicării compuşilor din extractul de *Sapindus mukorossi* nu numai în reducerea, formarea şi stabilizarea nanoparticulelor de argint dar şi în reticularea scheletului polimeric de bază.

- Pentru probele de hidrogel cu NPAg, maximele tip bandă înregistrate (hidrogel cu NPAg – extract de *Salvia officinalis*: 416.14 nm / 1.466 A şi 352.42 nm / 1.487 A; hidrogel cu NPAg – extract de *Sapindus mukorossi*: 426.23 nm / 0.507 A; hidrogel cu NPAg – amestec de extracte: 434.05 nm / 0.612 A) sugerează existenţa unui număr relativ mare de nanoparticule cu o distribuţie granulometrică largă.
- Comparativ cu spectrul extractelor vegetale poate fi remarcată o diminuare semnificativă a maximelor prezente în extractele vegetale îndeosebi pentru probele în care este prezent extractul de *Salvia officinalis*. Această modificare ar putea confirma implicarea anumitor compuşi din extractul de *Salvia officinalis* în procesul de reducere şi stabilizare a nanoparticulelor, aceştia influenţând procesul menţionat într-un grad mai ridicat comparativ cu compuşii din extractul de *Sapindus mukorossi*.
- Stabilitatea nanoparticulelor de argint în cadrul hidrogelurilor poate fi pusă în evidenţă şi prin înregistrarea spectrelor de absorbţie în UV-VIS la intervale de timp de la sinteză. Modificări notabile în spectrul de absorbţie apar îndeosebi în cazul hidrogelului cu nanoparticule de argint – extract de *Sapindus mukorossi*, maximul de absorbţie fiind redus ca intensitate în timp, acest lucru putând fi datorat înglobării / reţinerii în gelul prezent în probă a unei fracţiuni din nanoparticulele prezente iniţial în soluţie.

Hidrogeluri compozite cu matrice polimerică PAA-A (reticulare prin iradiere) - Spectrele de absorbţie au pus în evidenţă existenţa unor maxime / benzi de absorbţie ce pot fi asociate existenţei nanoparticulelor de argint şi o serie de particularităţi dintre care pot fi menţionate:

- Toate probele analizate indică o intensificare a maximului de absorbţie odată cu creşterea dozei de iradiere. Această modificare este mai accentuată pentru probele de hidrogel cu NPAg – amestec de extracte şi respectiv hidrogel cu NPAg – fără extract / amestec de extracte. Acest lucru poate fi datorat generării în sistem a unui număr crescut de radicali liberi generaţi în principal de matricea polimerică dar şi de o serie de compuşi din extractele vegetale. Alura maximelor de absorbţie pentru probele cu şi respectiv fără extract vegetal indică (deplasarea maximului către lungimi de undă mai mici) rolul compuşilor din extractul vegetal la stabilizarea nanoparticulelor cu formarea unor nanoparticule de dimensiuni mai reduse. Doza de iradiere, aşa cum indică spectrele de absorbţie, pentru hidrogelurile cu NPAg – extract de *Salvia officinalis* şi respectiv *Sapindus mukorossi* nu influenţează semnificativ generarea de nanoparticule; rezultatele obţinute ar sugera un posibil efect sinergetic (atât în ceea ce priveşte generarea cât şi stabilizarea nanoparticulelor) datorat compuşilor prezenţi în cele două extracte în urma iradierii.

- Deplasarea poziţiei maximului este semnificativă mai ales pentru hidrogelul cu NPAg – amestec de extracte vegetale sugerând existenţa unor nanoparticule de dimensiuni mai mari odată cu creşterea dozei de iradiere. Absenţa unei deplasări semnificative a maximului de absorbţie odată cu creşterea dozei de iradiere sugerează faptul că dimensiunea nanoclusterilor de argint metalic formaţi nu este influenţată semnificativ de doza de iradiere [317].
- Stabilitatea nanoparticulelor de argint în toate sistemele testate se dovedeşte a fi deosebită pentru toate sistemele analizate şi la ambele doze de iradiere. Această comportare indică alături de rolul stabilizant al compuşilor din extractele vegetale şi implicare matricii polimerice / componenţilor acesteia în procesul de stabilizare a nanoparticulelor.

Concluzii rezultate în urma studiului sintezei nanoparticulelor de argint / hidrogelurilor compozite prin analiza de spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)

Studiul sintezei nanoparticulelor de argint cu extract de Salvia officinalis a apelat şi la analiza de spectroscopie în infraroşu cu transformată Fourier (FTIR) urmărindu-se identificarea modificărilor structurale care ar sugera natura interacţiilor dintre nanoparticulele de argint şi componenţii extractului vegetal, la diferite valori ale pH-ului, şi, de asemenea, de a observa potenţiale corelaţii cu metodele de caracterizare ale extractului vegetal. Având in vedere ca prezentul studiu a urmărit şi influenţa pH-ului asupra dinamicii creşterii nanoparticulelor, au fost urmărite modificările în spectrul IR ale extractului apos în soluţie bazică şi în soluţie acidă. Modificările spectrale observate pot fi atribuite modificărilor structurale cauzate de adăugarea solutiei de hidroxid de potasiu în extract cu efect asupra funcţiunilor care conţin gruparea carbonil. Privită în ansamblu apariţia noilor picuri de absorbţie în spectru indică modificarea importantă a unor grupări funcţionale din structura compuşilor prezenţi în extract în mediu bazic; modificările observate în spectrele IR ale extractului în mediu acid şi alcalin pot fi atribuite schimbările structurale datorate hidrolizei grupelor amidice; acest lucru ar putea explica şi modificările apărute în spectrele IR ale extractului de salvie după adăugarea azotatului de argint şi răspunsul plasmonic slab al amestecului azotat de argint : extract vegetal în soluţie acidă.

Analiza FTIR (realizată pentru extractul vegetal, în soluţie neutră, acidă şi bazică, şi respectiv pentru amestecurile de sinteză) a pus în evidenţă în spectrele IR pentru extractul vegetal a unei benzi largi de absorbţie cu un maxim centrat la 3400 cm^{-1} ce poate fi corelat cu conţinutul de compuşi fenolici pus în evidenţă prin determinările efectuate pentru conţinutul de fenoli total, flavonoide şi taninuri. Pe de altă parte au fost identificate modificări structurale, în cazul extractului vegetal în soluţie acidă şi alcalină, constând în deplasarea unor picuri şi apariţia unora noi, ce au fost asociate acţiunii hidroxidului sau acidului introdus în soluţie. Modificările semnificative au fost observate în domeniul 1600-1800 cm^{-1}, datorate vibraţiilor de întindere a legăturilor C-O specifice compuşilor cu grupări carbonilice. În urma adăugării azotatului de argint la extractul vegetal, s-au constat deplasări ale unor picuri după formarea nanoparticulelor metalice; aceste deplasări putând fi asociate interacţiilor dintre unele grupe funcţionale ale speciilor organice cu nanoparticulele metalice la interfaţa metal – soluţie. Înregistrarea spectrelor FTIR, în cazul studiului influenţei temperaturii asupra sintezei nanoparticulelor de argint cu extract de *Salvia officinalis*, s-a realizat pentru a obține informații referitoare la natura interacțiilor dintre nanoparticulele de argint și compușii prezenți în extractul vegetal. Deplasarea unor maxime prezente în spectru după formarea nanoparticulelor de argint poate fi asociată interacțiilor dintre grupele funcționale ale speciilor organice cu suprafața metalică la nivelul interfeței acesteia.

Grupările funcționale ce ar putea fi implicate în stabilizarea nanoparticulelor sintetizate cu extract de *Sapindus mukorossi* au fost investigate prin spectroscopie FTIR, o serie de studii recente în domeniu indicând posibilitatea detectării directe saponinelor în extractele apoase și alcoolice brute, înaintea purificării, utilizând spectroscopia FTIR, reducând astfel durata analizei și necesitatea etapelor de purificare preliminare. Profilul FTIR al extractului vegetal și nanoparticulelor de argint sintetizate evidențiază existența biomoleculelor, cu grupe funcționale specifice flavonoidelor și saponinelor, ce pot acționa ca stabilizatori ai nanoparticulelor; modificările spectrale observate sugerează stabilizarea nanoparticulelor de argint prin intermediul grupelor funcționale asociate biomoleculelor precum flavonoidele și saponinele, prezente în extract, aceste interacții decurgând prin intermediul grupelor carboxilice de la nivelul saponinelor ca și al grupelor carbonil din structura flavonoidelor.

Hidrogel compozit cu matrice polimerică PVA-HC (reticulare prin cicluri de temperatură) - Se poate remarca o similitudine între spectrele IR în cazul probelor de hidrogeluri cu matrice hibridă PVA-HC, respectiv cu extract de *Salvia officinalis*, nanoparticule de argint, azotat de argint și matrice polimerică ca atare. Acest lucru ar sugera o înglobare avansată a componenților nanomaterialului obținut în matricea polimerică. Principalele modificări observate în spectrul IR apar îndeosebi între componenții matricii polimerice (hidrolizatul de colagen și alcoolul polivinilic) și matricea polimerică obținută pe baza acestora. Maximele semnificative înregistrate în spectrele FTIR ale nanomaterialului tip hidrogel cu matrice polimerică hibridă alcool polivinilic – hidrolizat de colagen și nanoparticule de argint reticulare, precum și cele asociate probelor martor sunt prezentate în Anexa 7 (tabelul 7.1).

Hidrogel compozit cu matrice polimerică PVA-HC (reticulare prin iradiere)

Spectrele FTIR în cazul hidrogelurilor cu matrice polimerică PVA-HC și nanoparticule de argint reticulate prin iradiere la 20 kGy nu prezintă modificări semnificative comparativ cu probele martor ceea ce ar sugera o încorporare avansată a nanoparticulelor de argint în matricea polimerică. Modificările spectrale observate sunt legate de deplasarea ușoară a unor picuri în spectrul probelor cu nanoparticule de argint comparativ cu spectrul probelor martor.

Inițial, spectrele apar similare indicând faptul că matricea polimerică / structura de bază a colagenului suferă modificări minore în urma iradierii. Cu toate acestea modificările observate pot oferi indicații asupra modificărilor structurale datorate reticulării îndeosebi prin intermediul benzilor amidice. Banda asociată amidei A ($\approx$3258 cm^{-1} în cazul probei neiradiate) suferă modificări minore în urma iradierii deplasându-se ușor către numere de undă mai mari în probele iradiate concomitent cu o creștere în intensitate îndeosebi în cazul probelor cu azotat de argint dar fără extract vegetal, deplasarea sau reducerea intensității acestei benzi fiind legată de scindarea structurii colagenice helicoidale. Poziția benzii de a absorbție asociată amidei I ($\approx$1630 cm^{-1} în cazul probei neiradiate; vibrații de întindere C=O din legătura amidică) se deplasează ușor spre numere undă mai mari în spectrul probelor iradiate cu o reducere a intensității benzii spectrale. În general această bandă localizată între 1650 cm^{-1} și 1635 cm^{-1} apare în cazul colagenului cu structură helicoidală respectiv structură spiralată aleatorie. Scăderea în intensitate a benzii de absorbție asociată amidei I (1600-1690 cm^{-1}) în cazul probelor iradiate ar indica faptul că iradierea induce reticulări în moleculele de colagen prin formarea de legături peptidice. Această bandă fiind deosebit de senzitivă la mici variaţii ale geometriei moleculare şi modului de realizare a legăturilor de hidrogen, scăderea în intensitate poate fi asociată dispariţiei unor structuri secundare ale colagenului (alfa-helix, beta-structura; structura secundară constituie o aranjare ordonată a polipeptidei într-o formă mai compactă stabilizată prin legături de hidrogen). Scăderea în intensitate a benzilor spectrale asociate amidei I şi II concomitent cu deplasarea acestora către numere de undă mai mari în cazul probelor iradiate poate indica formarea legăturilor de hidrogen între grupele aminice ale colagenului şi grupele hidroxil din alcoolul polivinilic. Banda de absorbţie asociată amidei II (~1535 cm^{-1} în cazul probei neiradiate; vibraţii de deformare N-H şi de întindere C-N) poate fi influenţată sensibil în urma iradierii; poziţionarea acestei benzi către numere de undă mai mari ar indica o structură helicoidală (~1550 cm^{-1} în cazul colagenului pur). Banda de absorbţie centrată la ~1238 cm^{-1} asociată amidei III (proba neiradiată) suferă o scindare în două picuri de intensitate redusă în spectrul probelor iradiate această modificare fiind asociată aminoacizilor reziduali din compoziţia colagenului denaturat în urma iradierii. În urma expunerii la iradiere cu radiaţii gamma, colagenul şi materialele colagenice suferă procese de reticulare şi scindare / degradare. În general reticularea predomină în cazul în care proba se află în mediu apos în timp ce în cazul probei uscate predomină scindarea / denaturarea. Mecanismul de reticulare propus de unii autori [337] implică radicalii hidroxil rezultaţi în urma radiolizei apei care interacţionează cu catena polimerică formând un radical polimeric intermediar care ulterior poate induce reticulări intermoleculare sau degradări prin reacţii intra şi intermoleculare.

Hidrogeluri compozite cu matrice polimerică PAA-A (reticulare prin cicluri de temperatură) - Interpretarea spectrelor FTIR a avut în vedere identificarea maximelor de absorbţie care suferă modificări în mediile analizate (extract vegetal brut, componenţii matricii polimerice şi hidrogeluri cu nanoparticule de argint). Modificările poziţiei maximelor spectrale pot fi asociate adsorbţiei constituenţilor extractului vegetal pe suprafaţa nanoparticulelor de argint, legăturilor care pot apare în urma reticulării matricii polimerice şi interacţiei dintre aceasta şi / sau nanoparticulele de argint respectiv extractul vegetal.

Spectrul FTIR al matricii polimerice prezintă în general similarităţi cu spectrul poliacrilamidei (PAA), diferenţe notabile observându-se mai ales comparativ cu spectrul amidonului în regiunea sub 1800 cm^{-1}. Interacţiile dintre grupele funcţionale cu azot prezente în matricea polimerică şi atomii metalici se manifestă în general într-o deplasare către numere de undă mai mari a benzilor corespunzătoare grupelor funcţionale cu azot în spectrul FTIR. Amidonul nativ prezintă în spectrul FTIR caracteristici vibraţionale complexe datorate ciclului piranozic din unităţile glicozidice în regiunea sub 800 cm^{-1}. Caracteristicile spectrale ale amidonului iradiat sunt similare cu cele ale celui nativ cu uşoare deplasări ale maximelor. Aceste deplasări nu indică o modificare clară şi evidentă a structurii amidonului. Cu toate acestea aceste modificări minore în special pentru benzile atribuite legăturilor C-H şi O-H ar putea sugera afectarea stabilităţii legăturilor de hidrogen inter şi intramoleculare în procesului de iradiere.

Hidrogeluri compozite cu matrice polimerică PAA-A (reticulare prin iradiere) - Analiza FTIR a hidrogelurilor compozite a dus la înregistrarea unor spectre de absorbţie relativ similare însă cu o serie de particularităţi care sugerează existenţa unor interacţii între matricea polimerică / componenţii acesteia – compuşii din extractul vegetal – nanoparticulele de argint:

- Banda spectrală largă din spectrul probei martor se reduce ca intensitate în cazul hidrogelurilor cu NPAg concomitent cu o îngustare a benzii. Maximul de absorbţie de la ~3190 cm^{-1} persistă îndeosebi în cazul hidrogelului cu NPAg generate prin iradiere în prezenţa de azotat de argint (~3182 cm^{-1}). Prezenţa acestei benzi poate fi asociată vibraţiilor de întindere O-H, grupelor OH caracteristice compuşilor din extractul / extractele vegetale, grupelor OH saponinice. Modificarea acestei benzi ar putea fi datorată compuşilor polifenolici din extract / extracte care acţionează ca şi captori ai radicalilor rezultaţi în urma iradierii.

- Maximul localizat la ~2930 cm^{-1} este redus ca intensitate în cazul hidrogelurilor cu NPAg / extract de *Salvia officinalis* şi respectiv *Sapindus mukorossi* cu uşoară deplasare către numere de undă mai mici. Acest maxim poate fi asociat vibraţiilor de întindere C-H, CH$_2$- şi CH$_3$-, vibraţiilor de întindere ale C-H metilenic asimetric.
- În spectrul hidrogelurilor cu NPAg / extract *Sapindus mukorossi* şi amestec extracte apare un maxim situat la ~1722 cm^{-1} şi respectiv ~1719 cm^{-1}. Prezenţa acestui maxim asociat vibraţiilor de întindere C=O, combinări aromatice, acid carboxilic, cetonă, ester sugerează implicarea compuşilor din extract (saponine) în reducerea / stabilizarea NPAg şi o posibilă interacţie cu componenţi matricii polimerice.
- Cele trei maxime asociate benzii spectrale din proba martor (~1659 cm^{-1}, ~1605 cm^{-1} şi ~1553 cm^{-1}) şi hidrogelul cu NPAg / azotat de argint nu îşi modifică semnificativ poziţia fiind însă diminuate sensibil în cazul hidrogelurilor cu NPAg / extracte vegetale. Această variaţie sugerează o posibilă interacţie dintre compuşi prezenţi în extract şi matricea polimerică / componenţi acesteia. Totodată maximul de la ~1553 cm^{-1} este diminuat semnificativ îndeosebi pentru hidrogelurile cu NPAg / extract *Sapindus mukorossi* şi amestec extracte. Prezenţa acestei benzi poate fi asociată vibraţiilor de întindere C=O (1659 cm^{-1}) şi respectiv vibraţiilor de îndoire N-H (1605 cm^{-1}) ale grupelor amidice.
- Maximul localizat la ~1445 cm^{-1} este diminuat semnificativ în spectrul hidrogelurilor cu NPAg / extracte sau amestec de extracte rămânând aproape nemodificat în cazul hidrogelului cu NPAg obţinute prin iradiere. Nanoparticulele de argint ar putea fi fixate în matricea polimerică şi prin intermediul compuşilor din extractul vegetal care ar putea acţiona ca un liant între matrice şi NPAg contribuind la reticulare şi stabilizarea nanoparticulelor.
- Maximul localizat la ~1402 cm^{-1} apare şi în spectrul hidrogelului cu NPAg / extract de *Salvia officinalis* fiind absent în spectrul hidrogelului cu NPAg / extract de *Sapindus mukorossi* şi respectiv foarte diminuat în spectrul hidrogelului cu NPAg / amestec de extracte (P11-ir20); prezenţa acestui maxim poate fi asociată vibraţiilor de întindere C-N caracteristice benzii amidice grefate pe scheletul amidonului. Acest lucru sugereză interacţia anumitor compuşi specifici extractului de *Sapindus mukorossi* cu matricea polimerică / amidonul.
- În cazul hidrogelurilor cu NPAg / extract de *Sapindus mukorossi* sau amestec de extracte apare un maxim distinct centrat la ~1240 cm^{-1} respectiv ~1244 cm^{-1}. Maximul ar putea fi asociat prezenţei compuşilor din extractul de *Sapindus mukorossi*; legături C-O-C şi grupe ester carboxilic, legături C-CH$_3$, întinderi legaturi aril – O în eteri aromatici, C-O- inele epoxi şi oxiran, întindere C-N amine primare aromatice.
- Maximul de la ~1150 cm^{-1} prezent în spectrul matricii polimerice şi al hidrogelurilor cu NPAg / extract de *Salvia officinalis* şi respectiv azotat de argint poate fi asociat vibraţiilor de întindere C-O-C. În spectrul hidrogelului cu NPAg / extract de *Sapindus mukorossi* şi respectiv amestec de extracte acest maxim este absent indicând o posibilă interacţie dintre compuşii ai extractului de *Sapindus mukorossi* şi matricea polimerică.

Concluzii rezultate în urma studiului sintezei nanoparticulelor de argint / hidrogelurilor compozite prin analiza de difracție de raze X (XRD)

Difractogramele înregistrate la sinteza nanoparticulelor de argint cu extract de *Sapindus mukorossi*, pentru diferite rapoarte volumetrice extract : soluţie ionică, au permis evaluarea comparativă, structural şi compoziţional, a probelor supuse analizei. Difractogramele probelor martor (extract) prezintă un maxim larg bine definit în domeniul 2θ de 10-25° fiind absente maxime înguste, sugerând astfel caracterul amorf al extractului apos uscat. Pentru amestecurile de sinteză intensitatea maximului asociat caracterului amorf scade pe măsura creşterii conţinutului de extract în amestec concomitent cu apariţia unor maxime înguste sugerând formarea unor compuşi cristalini în timpul sintezei. Prezenţa concomitentă a fazei amorfe şi cristaline după sinteză sugerează ataşarea unor compuşi din extract la nanoparticulele formate, comportare ce ar confirma şi rezultatele obţinute prin spectroscopia în ultraviolet-vizibil şi infraroşu.

Datele de difracţie experimentale şi standard confirmă identificarea argintului ca fază cristalină în amestecurile studiate; pentru maximele semnificative sunt indicate ungiurile de difracţie, distanţele interplanare şi indicii Miller. Prin compararea intensităţii maximului localizat la 38° se observă că valorile cele mai ridicate au fost înregistrate pentru amestecul cu raport volumetric de sinteză 1:1, extract : sare ionică, intensitatea acestui maxim fiind redusă pentru rapoartele de sinteză de 1:2 şi respectiv 1:4. De asemenea acest maxim este diminuat în mare măsură la raportul volumetric de sinteză 2:1, fiind absent în difractograma aferentă raportului volumetric 4:1.

Analiza XRD a confirmat prezenţa argintului cristalin în probele studiate în special în cazul raportului volumetric de sinteză egal cu 1: 1 şi inferior acestuia, fiind de asemenea pusă în evidenţă şi prezenţa azotatului de argint nereacţionat. Prin raportare şi la o serie de date de literatură, difracţia de raze X a permis obţinerea de informaţii referitoare la identificarea nanoparticulelor şi evoluţia cristalinităţii probelor investigate.

Analiza de difracţie de raze X (XRD) a avut în vedere evaluarea cristalinităţii nanomaterialelor investigate precum şi confirmarea prezenţei compuşilor argintului fiind analizate hidrogelurile compozite obţinute cu extracte de *Salvia officinalis*, *Sapindus mukorossi* şi amestec de extracte, respectiv matricile polimerice corespunzătoare.

Rezultatele difractogramelor, pentru hidrogelurile cu matrice polimerică PAA-A, au indicat diferenţe între hidrogelurile obţinute cu extract / amestec de extracte de *Sapindus mukorossi* (P10-1902 şi P11-1902) şi cele obţinute numai cu extract de *Salvia officinalis* (P9-1902) referitoare la prezenţa respectiv absenţa unor picuri în cazul probelor menţionate anterior. Picurile observate la valori 2θ de aproximativ 32° alături de asimetria picului de la 38° pot sugera prezenţa oxidului de argint AgO monoclinic centrosimetric ((ICDD 04-007-1374) cu planele corespunzătoare (2.0.0), (-1.1.1) şi (-2.0.2). Azotatul de argint ortorombic non-centrosimetric (ICDD 01-074-4790) poate fi considerat prezent în cazul probelor P10-1902 şi P11-1902 datorită picurilor observate la valori 2θ de aproximativ 20°, 21°, 24°, 30° care pot fi asociate planelor de cristalizare (1.1.1), (2.0.1), (0.2.0) şi (1.1.2). Aceste observaţii duc la concluzia că utilizarea diferiţilor agenţi reducători prezenţi în extracte contribuie la proprietăţile nanomaterialelor obţinute. Prin urmare extractul de *Salvia officinalis* ca şi agent reducător are o comportare diferită faţă de cel de *Sapindus mukorossi*; în primul caz procesul de sinteză poate fi considerat mai eficient întrucât în produsul final nu a fost identificat azotat de argint sau oxid de argint sau aceştia sunt prezenţi sub limita de detecţie a tehnicii de difracţie de raze X. În cazul amestecului de extracte, influenţa ambelor extracte a fost observată asupra proprietăţilor produsului final.

Influenţa agentului reducător (extractului vegetal) utilizat a fost evidenţiată de asemenea prin compararea gradului de cristalinitate relativ. Datele obţinute indică o creştere a gradului de cristalinitate în ordinea P10, P9 și respectiv P11, rezultatele indicând caracterul mixt, cristalin și amorf, al materialelor sintetizate precum și că tipul de extract utilizat ca agent reducător și varianta de reticulare aplicată, influențează cristalinitatea produsului final.

Picurile înregistrate pentru hidrogelurile cu matrice polimerică PVA/HC au fost asociate unor compuși organici în care argintul se află legat de structura macromoleculară în diferite rapoarte stoechiometrice. Ca urmare picurile localizate la valori 2θ de aproximativ 29°, 32°, 38°, 40°, 42°, 46°, unele de intensitate redusă, pot fi datorate compușilor argint – alcool polivinilic (Ag-PVA) cu formule moleculare precum: $Ag(C_2H_4O)_{48}$ – ICDD 00-058-1070, $Ag(C_2H_4O)_{121}$ – ICDD 00-058-1069, $Ag(C_2H_4O)_{243}$ – ICDD 00-058-1068. Diferențele observate în difractogramele hidrogelurilor sintetizate și probelor control / martor, atât în cazul reticulării prin cicluri termice cât și prin iradiere, indică influența procedeului de sinteză aplicat asupra cristalinității și compoziției matricii polimerice.

Concluzii rezultate în urma studiului sintezei nanoparticulelor de argint / hidrogelurilor compozite prin microscopie electronică de baleiaj și spectroscopie de raze X cu dispersie după energie (SEM-EDS)

Analiza prin microscopie cu scanare electronică (SEM) a fost utilizată pentru a caracteriza dimensiunea, forma și morfologia nanoparticulelor de argint sintetizate cu extract de *Salvia officinalis*. Din imaginile SEM s-a putut observa că atunci când în amestecul inițial de sinteză azotatul de argint se află în exces față de extract se formează conglomerate cu model fractal de cristalizare. Dimensiunea conglomeratelor și reducerea numărului de nanoparticule sunt direct proporționale cu conținutul de azotat de argint în amestec. Un conținut mai ridicat de azotat de argint în amestec conduce la formarea de particule cu dimensiuni micro și nanometrice cu formă sferică și cilindrică (tije și nanotije). O scădere a numărului de nanoparticule formate în soluție poate fi observată pentru probele la care extractul de salvie se află în exces volumetric față de azotatul de argint; totodată se constată și o reducere a dimensiunii nanoparticulelor formate. În cazul raportului de amestecare volumetric azotat de argint : extract de salvie egal cu 1:4 au fi putut puse în evidență și nanoparticule cubice alături de cele sferice.

În urma analizei SEM, la sinteza nanoparticulelor de argint cu extract de *Sapindus mukorossi*, poate fi observată formarea de conglomerate în cazul utilizării unei concentrații mai mari de extract în amestecul inițial de sinteză concomitent cu o reducere a conținutului de nanoparticule; în toate cazurile au fost puse în evidență nanoparticule de formă sferică.

Analiza prin microscopie cu scanare electronică utilizată pentru a caracteriza dimensiunea, forma și morfologia nanoparticulelor de argint sintetizate cu amestec de extracte, a avut în vedere probele preparate la rapoarte de amestecare ale componenților de 1:2:2 și respectiv 1:10:10 (amestecuri de sinteză din categoria celor la care extractul de *Salvia officinalis* și azotat de argint se află în exces față de extractul de *Sapindus mukorossi*, și la care au fost observate modificări notabile în urma monitorizării UV-VIS). Din imaginile SEM s-au putut observa formarea și a unor conglomerate a căror dimensiune se reduce pe măsura scăderii conținutului de extract de *Sapindus mukorossi* în amestecul de sinteză conglomeratelor; aceeași tendință apare și în ceea ce privește dimensiunea nanoparticulelor de argint aproximativ sferice și numărul acestora (reducerea dimensiunii și creșterea numărului de nanoparticule pentru raportul de amestecare 1:10:10 comparativ cu raportul de amestecare 1:2:2).

Hidrogeluri compozite cu matrice polimerică PVA-HC (reticulare prin cicluri de temperatură și iradiere) - Morfologia / forma nanoparticulelor de argint este relativ complexă, unele dintre acestea prezentând forme polignale asociate în general ca sferice. Necesitatea uscării suspensiei înainte de efectuarea observațiilor duce la aglomerări ale nanoparticulelor, forma reală a particulelor în coloid fiind astfel mai dificil de observat cu acuratețe. Au fost puse în evidență relativ de formă sferică și polidisperse, fiind prezente și aglomerări, cu dimensiuni în intervalul 21÷37 nm. Spectrele EDS au pus în evidență alături de spoturile asociate argintului și cele asociate carbonului, oxigenului și azotului ce confirmă prezența stabilizatorilor constituiți din catene alchilice în probele examinate. În zona centrală a spectrului poate fi observat clar picul asociat argintului localizat la 2.5 keV acest maxim fiind asociat liniilor K, L caracteristice argintului. Este cunoscut din literatura în domeniu că intensitățile liniilor spectrale sunt proporționale cu abundența elementului însă având în vedere că metoda EDS nu poate distinge între argintul elemental și atomii de argint prezenți în alți compuși, rezultatul analizei evidențiază valori ale concentrațiilor relative în probele investigate.

Hidrogeluri compozite cu matrice polimerică PAA-A (reticulare prin cicluri de temperatură și iradiere)

Analiza SEM pentru hidrogelurilor compozite cu NPAg utilizînd extract de *Salvia officinalis* a pus în evidență existența nanoparticulelor de formă aproximativ sferică, dispersate, cu dimensiuni în intervalul 20 – 60 nm. Concentrația medie relativă a argintului în probele investigate a variat între 13.6% (reticulare prin cicluri de temperatură), 28.5% (iradiere – 20 kGy) și respectiv 15.2% (iradiere – 50 kGy); valorile ridicate ale concentrației medii relative a carbonului și oxigenului indică existența stratului stabilizator indus de matricea polimerică și compușii fitochimici din extract asupra nanoparticulelor de argint. Creșterea conținutului de argint în urma iradierii / dozei de iradiere ar putea fi asociată și scindării catenelor polimerice ca rezultat al iradierii și ca urmare o scădere a conținutului de carbon și oxigen în stratul stabilizator din jurul nanoparticulelor; o tendință similară o înregistrează și variația raportului concentrației medii relative a argintului (C_{mAg}) la concentrația medie relativă a carbonului (C_{mC}) și respectiv a oxigenului (C_{mO}).

Pentru hidrogelurile compozite cu NPAg utilizînd extract de *Sapindus mukorossi* au fost observate nanoparticule de formă aproximativ sferică, dispersate, cu dimensiuni în intervalul 30 – 60 nm. Un aspect aparte referitor la aceste probe investigate îl constituie prezența peliculei de gel observabilă chair după procesarea probei în vederea analizei SEM-EDS. Valoarea raportului C_{mAg} / C_{mC} și C_{mAg} / C_{mO} înregistează și în acest caz o variație similară extractului de salvie. Valorile superioare în cazul concentrației medii relative a carbonului și oxigenului, pentru fiecare variantă de reticulare, comparativ cu cele ale extractului de salvie sugerează aderarea stratului stabilizator (matrice polimerică / compuși fitochimici din extract) într-o măsură mai mare.

Utilizarea amestecului de extracte la obținerea hidrogelurile compozite cu NPAg a evidențiat în urma analizei SEM-EDS existența nanoparticulelor de formă sferică, disperse (în unele cazuri pot fi observate și aglomerări de particule) cu dimensiuni cuprinse între 10 – 60 nm. O primă remarcă referitoare la rezultatele obținute este legată de obținerea unor valori superioare ale C_{mAg} comparativ cu extractele utilizate ca atare în condiții similare de sinteză / analiză ceea ce sugerează un efect sinergetic al compușilor fitochimici prezenți în cele două extracte relativ la reducerea / stabilizarea nanoparticulelor de argint în cadrul matricii polimerice. În al doilea rând poate fi remarcată o variație diferită a raportului concentrațiilor medii relative (C_{mAg} / C_{mC} și C_{mAg} / C_{mO}) față de hidrogelurile obținute cu extracte ca atare, respectiv valorile cele mai ridicate fiind obținute în cazul reticulării prin cicluri de temperatură.

Concluzii rezultate în urma evaluării activității antibacteriene a hidrogelurilor compozite cu nanoparticule de argint

Studiul microbiologic efectuat asupra hidrogelurilor compozite cu nanoparticule de argint s-a realizat în scopul evidențierii caracterului lor antimicrobian și determinării dozei minime bactericide asupra tulpinilor de bacterii testate. Au fost selectate două tulpini de bacterii (sub formă de culturi pure liofilizate) frecvent implicate în infecțiile intraspitalicești: *Escherichia coli* ATCC reg. 25922 - bacterie Gram negativă (condiționat patogenă, extrem de rezistentă la tratamentul cu antibiotice) și *Staphylococcus aureus* ATCC reg 25923 - bacterie Gram pozitivă, patogenă, din clasa stafilococilor coagulazo-pozitivi.

Eficiența hidrogelurilor compozite cu nanoparticule de argint a fost evaluată prin intermediul concentrației minime bactericide (CMB). Astfel într-o fază preliminară au fost repetate testele cu proporții mai reduse de hidrogeluri (0.8 ml și 0.5 ml / placă test) rezultatele indicînd și aceste cazuri lipsa coloniilor tipice de bacterii ceea ce indică un efect bactericid asupra ambelor tulpini bacteriene. Ca urmare a acestor teste s-a stabilit o sensibilitate diferențiată a tulpinilor bacteriene la acțiunea nanomaterialelor testate, tulpina de *Escherichia coli* fiind mai sensibilă decât cea de *Staphylococcus aureus*. Din acest motiv în testele ulterioare, testarea pe tulpină de *Escherichia coli* s-a efectuat plecând de la diluția de bază d_0 cu 0.5 ml hidrogel respectiv 0.8 ml hidrogel pentru testarea pe tulpină de *Staphylococcus aureus*. Pentru valori inferioare d_0 în plăci apar dezvoltate colonii tipice de bacterii hidrogelurile manifestând doar efect bacteriostatic.

Pentru hidrogelurile compozite cu matrice polimerică PVA-HC s-a observat că pe măsură ce crește diluția hidrogelului (reticulare prin cicluri de temperatură), respectiv scade concentrația nanoparticulelor de de argint / ionilor de argint în mediu, numărul de colonii specifice de *Staphylococcus aureus* crește considerabil; bacteriile se dezvoltă optim cu cât sunt mai puțin expuse acțiunii metalului / ionilor metalici, multiplicarea acestora fiind din ce în ce mai puțin inhibată. Probele cu reticulare prin iradiere sunt singurele care mai prezintă efect bacteriostatic la diluția d_3 (10^{-3}), respectiv un număr de colonii sub 300, care conform standardului de numărare, mai poate fi acceptat în interpretarea rezultatelor. O comportare similară s-a constat și în cazul testelor efectuate pe tulpină de *Escherichia coli*, hidrogelurile cu reticulare prin iradiere fiind și de această dată cele care mai prezintă efect bacteriostatic la diluția d_3 (10^{-3}). Valorile relativ mai ridicate ale numărului de colonii în cazul tulpinii de *Escherichia coli* comparativ cu cea de *Staphylococcus aureus*, pentru același hidrogel și aceeași diluție, trebuie să ia în considerare diluția de bază d_0 de la care s-a pornit (diferită pentru cele două tulpini bacteriene). Cu toate acestea în cazul ambelor tulpini bacteriene chiar la diluții mai mici (10^{-1}, 10^{-2}, și chiar 10^{-3}) ale hidrogelurilor, acestea încep să-și piardă efectul bactericid, având totuși un efect bacteriostatic destul de puternic - demonstrat de numărul relativ mic de colonii dezvoltate în plăci și îndeosebi hidrogelurile cu nanoparticule de argint obținute cu extract vegetal și supuse reticulării prin iradiere.

Efectul bacteriostatic superior în cazul hidrogelurilor cu reticulare prin iradiere, cu extract de *Salvia officinalis* relativ la hidrogelurile cu azotat de argint (hidrogeluri cu nanoparticule de argint generate prin iradiere), sugerează un posibil efect bacteriostatic amplificat și de compuși prezenți în extractul vegetal.

În cazul hidrogelurile compozite cu matrice polimerică PAA-A, majoritatea tipurilor de hidrogeluri testate prezintă un efect bacteriostatic semnificativ la diluția $d_1(10^{-1})$, diminuat în mare măsură la diluția $d_2(10^{-2})$ respectiv absent la diluția $d_3(10^{-3})$ (număr de colonii peste 300, care conform standardului de numărare menționat în teză nu mai poate fi acceptat în interpretarea rezultatelor). Dintre probele testate se remarcă îndeosebi hidrogelurile cu extract de *Salvia officinalis* (reticulare prin cicluri de temperatură) și respectiv cu amestec de extracte (reticulare prin iradiere), care prezintă efect bacteriostatic chiar la diluția $d_3(10^{-3})$; hidrogelul cu amestec de extracte reticulat prin iradiere – 50 kGy este singurul care mai prezintă efect bactericid la diluția $d_1(10^{-1})$ pe tulpină de *Staphylococcus aureus*.

Rezultatele obținute sugerează și o contribuție la activitatea antimicrobiană din partea compușilor din extractele vegetale (prezenți la nivelul matricii polimerice și la nivelul nanoparticulelor de argint ca agenți stabilizatori). Generarea nanoparticulelor de argint prin iradiere contribuie de asemenea la efectul antimicrobian al materialului final (valori aproximativ similare sau relativ superioare odată cu creșterea dozei de iradiere) însă nu în aceeași măsură ca extractul vegetal, așa cum sugerează valorile obținute pentru probele cu extract vegetal comparativ cu cele fără extract supuse iradierii.

Pe de altă parte pentru același tip de material (matrice polimerică, extract vegetal) procedeul de reticulare prin iradiere comparativ cu cel prin cicluri de temperatură induce o scădere a potențialului antimicrobian la diluțiile testate; această comportare reiese dacă se compară datele pentru hidrogelurile cu extract de *Salvia officinalis* și extract de *Sapindus mukorossi*. Iradierea în aceste cazuri poate determina o reducere a conținutului de compuși asociați extractului prin intermediul radicalilor liberi generați care ar „consuma" o parte din aceștia.

O comportare atipică în seriile de hidrogeluri menționate anterior o au hidrogelurile obținute cu amestec de extracte în sensul că iradierea / doza de iradiere amplifică efectul bactericid; valorile superioare asociate efectului bacteriostatic (hidrogel cu amestec de extracte reticulat prin cicluri de temperatură), dacă se iau în considerare valorile pentru diluția $d_1(10^{-1})$, și apropiate ca valoare de cele pentru hidrogelul cu extract de *Salvia officinalis* neiradiat, sugerează o activitate antimicrobiană datorată extractului de salvie și totodată un posibil efect sinergetic datorat celor două extracte în amestec.

Hidrogelurile cu nanoparticule de argint / matrice polimerică PAA-A testate pe tulpină de *Escherichia coli* au dus la rezultate aproximativ similare cu testarea pe tulpină de *Staphylococcus aureus* cu unele particularități care vor fi menționate în cele ce urmează. Majoritatea tipurilor de hidrogeluri testate prezintă un efect bacteriostatic la diluția $d_1(10^{-1})$, diminuat în mare măsură la diluția $d_2(10^{-2})$ respectiv absent la majoritatea probelor pentru diluția $d_3(10^{-3})$ (număr de colonii peste 300, care conform standardului de numărare menționat în teză nu mai poate fi acceptat în interpretarea rezultatelor). Dintre probele testate se remarcă îndeosebi hidrogelurile cu extract de salvie (reticulare prin cicluri de temperatură) și cel cu amestec de extracte (reticulare prin iradiere – 50 kGy) care prezintă încă efect bacteriostatic la diluția $d_3(10^{-3})$.

Rezultatele obținute sugerează și de această dată o contribuție la activitatea antimicrobiană din partea compușilor din extractele vegetale. Generarea nanoparticulelor de argint prin iradiere contribuie de asemenea la efectul antimicrobian al materialului final (valori aproximativ similare sau relativ superioare odată cu creșterea dozei de iradiere) însă nu în aceeași măsură ca extractul vegetal, așa cum sugerează valorile obținute pentru probele cu extract vegetal comparativ cu cele fără extract (hidrogeluri cu $AgNO_3$ / iradiere).

Pentru același tip de material (matrice polimerică, extract vegetal) procedeul de reticulare prin iradiere comparativ cu cel prin cicluri de temperatură induce o scădere a potențialului antimicrobian la diluțiile testate; iradierea în aceste cazuri poate determina o reducere a conținutului de compuși asociați extractului prin intermediul radicalilor liberi generați și care ar „consuma" o parte din aceștia. O comportare atipică în seriile de hidrogeluri menționate anterior, ca și în cazul tulpinii de *Staphylococcus aureus* o au hidrogelurile obținute cu amestec de extracte, iradierea / doza de iradiere amplificând efectul bactericid; valorile superioare asociate efectului bacteriostatic (hidrogel cu amestec de extracte reticulat prin cicluri de temperatură), dacă se ia în considerare valoarea pentru diluția $d_1(10^{-1})$, și aproximativ identică pentru hidrogelul cu extract de *Salvia officinalis* neiradiat sugerează o activitate antimicrobiană datorată îndeosebi extractului de salvie și totodată un posibil efect sinergetic datorat amestecului dintre cele două extracte.

Datele obținute indică faptul că toate hidrogelurile compozite cu nanoparticule de argint sintetizate prezintă un efect bacteriostatic la tulpinile de *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus* însă pentru valori diferite ale CMB. Concentrațiile / dozele minime bactericide pot fi deduse în funcție de diluția de bază d_0 (10^0), 0.5 ml pentru *Escherichia coli* și respectiv 0.8 ml pentru *Staphylococcus aureus*, de la care se fac diluțiile inițiale și de ultima diluție la care nanomaterialul a mai prezentat efect bacteriostatic (ultima diluție la care s-a înregistrat un număr de colonii / placă mai mic de 300, conform ISO 7218 [196] de numărare și interpretare a rezultatelor analizelor microbiologice).

7.2 Contribuții proprii

În cadrul tezei de doctorat „Nanomateriale pe bază de extracte naturale cu aplicații biomedicale”, au fost aduse următoarele contribuții personale:

1) A fost realizat un studiu documentar extins asupra nanoparticulelor metalice / nanomaterialelor, axat pe sinteza „verde” a nanoparticulelor de argint cu extracte din plante și principalilor factori care intervin în biosinteza acestora, nanomaterialelor cu matrice polimerică funcționalizate cu nanoparticule de argint respectiv hidrogelurilor compozite cu nanoparticule de argint. De asemenea au fost considerate aspecte legate de mecanismul acțiunii antimicrobiene a nanoparticulelor de argint și toxicologiei acestora.
2) S-a realizat un studiu asupra sintezei nanoparticulelor de argint cu extract de *Salvia officinalis*, studiu care a avut în vedere aspecte legate de dinamica procesului de creștere a nanoparticulelor de argint, influența raportului de combinare sare ionică : extract vegetal, influența pH-ului și a temperaturii asupra procesului de sinteză.
3) Similar studiului efectuat cu extract de *Salvia officinalis* s-a realizat și un studiu asupra sintezei nanoparticulelor de argint cu extract de *Sapindus mukorossi* în care alături de influența pH-ului și raportului de combinare sare ionică : extract vegetal a fost evidențiat și rolul concentrației critice micelare a extractului utilizat.
4) Demersul de cercetare a avut în vedere și sinteza nanoparticulelor de argint cu amestec de extracte (*Salvia officinalis* și *Sapindus mukorossi*) axându-se pe influența pH-ului și raportului de amestecare între extractele individuale.
5) Au fost obținute hidrogelurile compozite cu nanoparticule de argint, cu matrice polimerică (alcool polivinilic – hidrolizat de colagen și respectiv poliacrilamidă – amidon), având la bază atât compuși sintetici (alcoolul polivinilic și poliacrialamida) cât și compuși naturali (hidrolizatul de colagen și amidonul) cu grad ridicat de biocompatibilitate. Varianta de sinteză aplicată, formarea nanoparticulelor *in situ* în cadrul unui hidrogel preformat, a implicat obținerea într-o primă fază a hidrogelul preformat ce acționează ca un microreactor în care nanoparticulele au fost obținute cu ajutorul extractelor vegetale menționate anterior. Metodele de reticulare aplicate matricii polimerice (reticulare prin cicluri de temperatură / congelare – decongelare și respectiv reticularea prin iradiere) au avut în vedere dezvoltarea unor produse și procese care să reducă sau să elimine utilizarea și generarea unor substanțe potențial nocive.
6) A fost realizată o caracterizare prin metode moderne de analiză nanoparticulelor de argint și nanomaterialelor sintetizate, un aspect aparte în acest sens fiind aplicat în cadrul spectroscopiei în ultraviolet-vizibil utilizându-se ca parametru aria relativă asociată nanoparticulelor de argint.
7) Asupra nanomaterialelor sintetizate a fost realizat un studiu microbiologic în vederea evaluării proprietăților antibacteriene, demonstrându-se că toate nanomaterialele obținute au efect bactericid sau bacteriostatic asupra unor bacterii cu incidență ridicată în infecțiile nosocomiale (*Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli*).
8) Problematica abordată în cadrul tezei de doctorat, legată de o serie de aspecte fundamentale din domeniul nanomaterialelor pentru aplicații biomedicale, se înscrie între direcțiile principale de acțiune ale programelor de cercetare de excelență prin care se promovează cunoașterea științifică în domeniul nanomaterialelor. Dezvoltarea de nanomateriale biocompatibile, cu funcționalitate ridicată și efecte secundare reduse în cazul aplicațiilor medicale, permițând terapii performante și tratamente de succes, reprezintă un domeniu important prin prisma potențialului lucrativ dar și a sănătății populației.

7.3 Perspective de cercetare

Extinderea ariei de cercetare aferentă domeniului abordat în cadrul prezentei tezei de doctorat („Nanomateriale pe bază de extracte naturale cu aplicaţii biomedicale”), ar putea avea în vedere următoarele aspecte / teme:

- Sursa / tipul şi concentraţia extractelor de plante – modalitatea de obţinere şi caracterizarea extractului vegetal (utilizarea extractului sub formă uscată / liofilizare);
- Corelarea compoziţiei chimice şi a parametrilor de sinteză cu proprietăţile nanomaterialelor sintetizate;
- Sinteza unor materiale ce includ extracte naturale cu rol terapeutic şi cu acţiune sinergică bine determinată;
- Cuantificarea producţiei de nanomaterial / nanoparticule, stabilirea unei durate de obţinere pentru un anumit volum de nanoparticule, standardizarea condiţiilor pentru obţinerea de particule monodisperse, stabilitatea nanoparticulelor obţinute prin sinteză verde;
- Identificarea materialelor derivate din plante adecvate sintezei unor nanomateriale / nanoparticule specifice;
- Clarificarea mecanismelor biochimice şi moleculare implicate de formarea de nanoparticule specifice;
- Realizarea de teste de citotoxicitate şi extinderea studiilor microbiologice şi la alte tulpini bacteriene cu incidenţă nosocomială crescută.

Bibliografie selectivă

1. Lu, I. şi S. Ozcan, *Green nanomaterials: On track for a sustainable future*, **2015**, Nano Today, 10, 417-420.
2. Shamim, N. şi V. K. Sharma, *Sustainable Nanotechnology and the Environment: Advances and Achievements*, American Chemical Society, N. Shamim (Ed.), Washington, DC, **2013**, 11-39.
3. Peralta-Videa, J. R., Y. Huang, J. G. Parsons, L. Zhao, L. Lopez-Moreno, J. A. Hernandez-Viezcas şi J. L. Gardea-Torresdey, *Plant-based green synthesis of metallic nanoparticles: scientific curiosity or a realistic alternative to chemical synthesis ?*, **2016**, Nanotechnol. Environ. Eng., 1:4, https://doi.org/10.1007/s41204-016-0004-5
4. American Society for Testing and Materials, *Standard terminology relating to nanotechnology*, **2012**, E 2456-06, West Conshohocken PA.
5. *Commission Joint Research Centre Reference Report*, **2011**, Official Journal of the European Union, http://ec.europa.eu/environment/index_en.htm.
6. Bradley, B., *The great big question about really tiny materials*, **2015**, Fortune, 171(4), 192-202.
7. Charitidis, C. A., P. Georgiou, M. A. Koklioti, A-F. Trompeta şi V. Markakis, *Manufacturing nanomaterials: from research to industry*, **2014**, Manuf. Rev., 1:11, doi:10.1051/mfreview/2014009.
8. Vance, M. E., T. Kuiken, E. P. Vejerano, S. P. McGinnis, M. F. Hochella, D. Rejeski şi M. S. Hull, *Nanotechnology in real world: redeveloping the nanomaterial consumer products inventory*, **2015**, Beilstein J. Nanotechnol., 6, 1769-1780, doi:10.3762/bjnano.6.181.
9. Pacioni, N. L., C. D. Borsarelli, V. Rey şi A. V. Veglia, *Synthetic Routes for the Preparation of Sliver Nanoparticles*, **2015**, în Silver Nanoparticle Applications in the fabrication and Design of Medical and Biosensing Devices, Alarcon, E; Griffith, M.; Udekwu, K. I. (Eds.), http://www.springer.com/978-3-319-11261-9.
21. Prabhu, S. şi E. K. Poulose, *Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects*, **2012**, Nano Lett., 2(32), 1-10, http://www.inl-journal.com/content/2/1/32.
27. Durán N. şi P. D. Marcato, *Nano-Antimicrobials: Chapter 12 Biotechnological Routes to Metallic Nanoparticles Production: Mechanistic Aspects, Antimicrobial Activity, Toxicity and Industrial Applications*, Cioffi N., Rai M. (Ed.), Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; **2012**, 337-374.
35. Pop, A., S. Muste, C. Mureşan, C. Pop şi L. Salanţă, *Comparative study regarding the importance of sage (Salvia officinalis L.) in terms of antioxidant capacity and antimicrobial activities*, **2013**, Hop and medicinal plants, XXI(1-2), 41-42.
44. Baharara, J., T. Ramezani, M. Mousavi şi M. Asadi-Samani, *Antioxidant and anti-inflamatory activity of green synthesized silver nanoparticles using Salvia officinalis extract*, **2017**, Annals of Tropical Medicine and Public Health, 10, 1265-1270.
46. Sati, S. C., A. Sharma, O. P. Sati, D. M. Sati şi S. K. Kothiyal, *Chemical constituents and bioactivities of genus Sapindus*, **2011**, International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy, 2(2), 403-409.
47. Upadhyay A. şi D. K. Singh, *Pharmacological effects of Sapindus mukorossi*, **2012**, Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paolo, 54(5), 273-280.
66. Rybinski, W. V., *Editorial overview: natural surfactants*, **2001**, Current Opinions in Colloid Interface Science, 6, 146-147.
94. Polte, J., X. Tuaev, M. Wuithschick, A. Fischer, A. F. Thuenemann, K. Rademann, R. Kraehnert şi F. Emmerling, **2012**, *Formation mechanism of silver nanoparticles:*

analogies and differences to the growth of gold nanoaprticles, ACS Nano, 6(7), 5791-5802.

97. Palza, H., *Antimicrobial Polymers with Metal Nanoparticles*, **2015**, International Journal of Molecular Sciences, 16, 2099-2116.
118. Thoniyot, P., M. J. Tan, A. Abdul Karim, D. J. Young ’Ħ X. J. Loh, *Nanoparticle-hydrogel composites: Concept, design, and applications of these promising, multifunctional materials*, **2015**, Advanced Science, 2(1-2), 1400010.
172. Yildirimer, L., T. K. Nguyen Thanh, M. Loizidou ’Ħ A. M. Seifalian, *Toxicological considerations of clinically applicable nanoparticles*, **2011**, Nano Today, 6, 585-607.
183. Turker-Kaya, S. ’Ħ C. W. Huck, *A Review of Mid-Infrared and Near-Infrared Imaging: Principles, Concepts and Applications in Plant Tissue Analysis*, **2017**, Molecules 2017, 22, 168; doi:10.3390/molecules22010168.
213. **Olteanu, R. L**., C. M. Nicolescu, M. Bumbac, I. D. DulamŁ, R.M Ion ’Ħ I. R. Suica-Bunghez, *Study on Critical Micelle Concentration influence in Green Synthesis of Silver Nanoparticles assisted by Sapindus mukorossi aqueous extract*, **2018**, Revista de Chimie, 69(6), 1339-1345.
218. **Olteanu, R. L**., C. M. Nicolescu ’Ħ M. Bumbac, *Influence of Phytochemical Reductive Capacity on Ultraviolet–visible Spectroscopic Behavior of Silver Nanoparticles*, **2017**, Analytical Letters, 50(17), 2786-2801.
219. Nicolescu, C. M., **R. L. Olteanu** ’Ħ M. Bumbac, *Growth Dynamics Study of Silver Nanoparticles Obtained by Green Synthesis using Salvia officinalis Extract*, **2017**, Analytical Letters, 50(17), 2802-2821.
223. Dumitrescu, C., **R. L. Olteanu**, M. Bumbac ’Ħ L. M. Gorghiu, *Antioxidant Effect of Some Flavonoids on Organic Substrate*, **2009**, Revista de Chimie, 60(4), 329-331.
224. Ahmed, S., M. Ahmad, B. L. Swami ’Ħ S. Ikram, *A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise*, **2016**, Journal of Advanced Research, 7(1), 17-28.
248. Tmakova, L., R. Sekretar ’Ħ S. Schmidt, *Plant-derived surfactants as an alternative to synthetic surfactants: surface and antioxidant activities*, **2016**, Chemical Papers, 70(2), 188-195.
259. Upadhayay, L. S. B. ’Ħ N. Verma, *Recent Developments and Applications in Plant-extract Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles*, **2015**, Analytical Letters 48(17), 2676-2692.
276. Bumbac, M., **R. L. Olteanu**, R. M. Ion ’Ħ C. M. Nicolescu, *Influence of temperature on the growth of silver nanoparticles synthesized using Salvia officinalis aqueous extract*, **2018**, Revista de Chimie, 69(8), 1934-1938.

LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE

A. *Lista lucrărilor publicate în reviste cotate ISI*

(38 lucrări din care 4 în domeniul tezei de doctorat)

A.1 Lista lucrărilor publicate în domeniul tezei de doctorat

1. **R. L. Olteanu**, C. M. Nicolescu, M. Bumbac, *Influence of Phytochemical Reductive Capacity on Ultraviolet-visible Spectroscopic Behavior of Silver Nanoparticles*, Analytical Letters, 50(17), 2786-2801, 2017.
2. C. M. Nicolescu, **R. L. Olteanu**, M. Bumbac, *Growth Dynamics Study of Silver Nanoparticles Obtained by Green Synthesis using Salvia officinalis Extract*, Analytical Letters, 50(17), 2802-2821, 2017.
3. **R. L. Olteanu**, C. M. Nicolescu, M. Bumbac, I. D. Dulamă, R. M. Ion, I. R. Suica-Bunghez, *Study on Critical Micelle Concentration influence in Green Synthesis of Silver Nanoparticles assisted by Sapindus mukorossi aqueous extract,* Revista de Chimie, 69(6), 1339-1345, 2018.
4. M. Bumbac**, R. L. Olteanu**, R. M. Ion. C. M. Nicolescu, *Influence of temperature on the growth of silver nanoparticles synthesized using Salvia officinalis aqueous extract*, Revista de Chimie, 69(8), 1934-1938, 2018.

A.2 Lista lucrărilor publicate în domeniul conex (chimie) al tezei de doctorat (citări selective)

1. S. Jipa, T. Zaharescu, W. Kappel, T. Setnescu, M. Lungulescu, **R. L. Olteanu**, *Vegetal polyphenols as antioxidants in polymers*, Journal of Optoelectronics and Advanced Materials, 10(4), 837-840, 2008.
2. C. Dumitrescu, **R. L. Olteanu**, M. Bumbac, L. M. Gorghiu, *Antioxidant effect of Some Flavonoids on Organic Substrate*, Revista de Chimie, 60(4), 329-331, 2009.
3. L. M. Gorghiu, C. Dumitrescu, **R. L. Olteanu**, S. Jipa, *Natural compunds with antioxidant activity*, Buletinul USMV-CN, 63, 188-193, 2007.
4. C. Rădulescu, **R. L. Olteanu**, C. Stihi, M. Florescu, D. Lazurca, I. D. Dulamă, R. M. Știrbescu, S. Teodorescu, *Chemometric Assessment of Spectroscopic Techniques and Antioxidant Activity for Hippophae rhamnoides L. Extracts Obtained by Different Isolation Methods*, Analytical Letters, DOI:10.1080/00032719.2019.1590379, 2019.
5. C. M. Nicolescu, M. Bumbac, **R. L. Olteanu**, G. C. Alecu (Holban), D. N. Boboacă-Mihăescu, C. Necula, C. Rădulescu, *Influence of extraction method on chemical composition from red grapes skin extract*, Journal of Science and Arts, 19, 1(46), 201-208, 2019.

B. *Participări la conferințe naționale / internaționale cu lucrări în domeniul tezei de doctorat / domeniul conex (chimie)*

1. The Fourth Edition of International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences (IC-ANMBES 2016), Brașov, România:
    1.1 *Characterization of Silver and Copper Nanoparticles Synthesized by Bottom-Up Approach Using Plant Extracts,* **R. L. Olteanu**, C. M. Nicolescu, M. Bumbac, Book of Abstracts, ISSN 2360-3461, ISSN-L 2360-3461, pag. 91.
    1.2 *Study on the Synthesis Process of Silver Nanoparticles in Salvia Officinalis Extract Using UV-VIS Spectroscopy,* C. M. Nicolescu, **R. L. Olteanu**, M. Bumbac, Book of Abstracts, ISSN 2360-3461, ISSN-L 2360-3461, pag. 92.

2. The Fifth Edition of International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences (IC-ANMBES 2018), Brașov, România:

   2.1 *Bioactive Properties and Chemical Composition of Juglans Regia L. Extracts*, C. Radulescu, C. Stihi, M. Florescu, D. Lazurca, I. D. Dulama, S. Teodorescu, **R. L. Olteanu**, R. M. Știrbescu, Book of Abstracts, ISSN 2360-3461, ISSN-L 2360-3461, pag. 167.

   2.2 Pollution Effects on Painted Pottery of Romanian Cultural Heritage, C. Rădulescu, A. Bintintan, M. Gligor, R. M. Ion, I. D. Dulamă, C. Stihi, S. Teodorescu, R. M. Știrbescu, **R. L. Olteanu**, I. A. Bucurică, Book of Abstracts, ISSN 2360-3461, ISSN-L 2360-3461, pag. 169.

3. 11th International Conference of Materials Science and Engineering (BraMat 2019), Brașov, România:

   3.1 *Banana flower nectar – mediated synthesis of silver nanoparticles*, N. M. Știrbescu, S. Teodorescu, **R. L. Olteanu**, R. M. Știrbescu.

4. Scientific Conference of Doctoral Schools SCDS-UDJG – „Perspectives and challenges in doctoral research” – 7th Edition 2019, Universitatea „Dunărea de Jos” Galați, România:

   4.1 *Functionalization of cotton fibres with silver nanoparticles obtained by synthesis with Sapindus mukorossi water extract*, **R. L. Olteanu**, M. Bumbac, C. M. Nicolescu, B. C. Șerban, O. Buiu.

Curriculum vitae Europass

Informaţii personale

Nume / Prenume	**OLTEANU, Radu Lucian**
Adresă(e)	Bulevardul Mircea cel Bătrân, Bl. A1, Sc. D, Ap. 62, 130082, Târgovişte, ROMANIA
Telefon(oane)	+40-245-212415 (home) Mobil: +40-723-178444 +40-245-213382 (office)
Fax(uri)	+40-245-213382 (office)
E-mail(uri)	raduolteanu110@yahoo.com
Naţionalitate(-tăţi)	Română
Data naşterii	9 iulie 1967
Sex	Masculin

Experienţa profesională

Perioada	**Aprilie 2016 – prezent**
Funcţia sau postul ocupat	Asistent cercetare – Institutul de Cercetare Stiintifica si Tehnologica Multidisciplinara
Numele şi adresa angajatorului	Universitatea "Valahia" din Târgovişte, Aleea Sinaia, Nr. 13, 130024 Târgovişte
Activităţi şi responsabilităţi principale	Prelevare si preparare probe, analiza instrumentala (FTIR, UVVIS), activitati de testare si analize chimice, activitate de cercetare si publicistica
Perioada	**Martie 2000 – Aprilie 2016**
Funcţia sau postul ocupat	Asistent universitar - Catedra Chimie (Martie 2000 – Septembrie 2008), Asistent universitar - Departamentul de Ştiinţe şi Tehnologii avansate (Octombrie 2008 – Aprilie 2016)
Numele şi adresa angajatorului	Universitatea "Valahia" din Târgovişte, B-dul Regele Carol I, Nr. 2, 130024 Târgovişte
Activităţi şi responsabilităţi principale	1. Activităţi didactice: Conducere de lucrări de laborator / seminar / proiect: Tehnologie chimică, Chimie tehnică, Chimie organică, Prelucrări de date, Chimie Fizica si Coloidala; 2. Activitate de cercetare şi publicistică (producţie ştiinţifică în domeniul educaţiei şi chimiei); 3. Responsabilităţi în cadrul facultăţii şi universităţii: activităţi de organizare şi coordonare al concursului de admitere la nivelul universităţii, în calitate de Membru al Comisiei Tehnice de Admitere a Universităţii Valahia din 2004 până în prezent; activităţi de organizare laboratoare.
Perioada	**Martie 1999 – Martie 2000**
Funcţia sau postul ocupat	Preparator universitar- Catedra Chimie
Numele şi adresa angajatorului	Universitatea "Valahia" din Târgovişte, B-dul Regele Carol I, Nr. 2, 130024 Târgovişte
Activităţi şi responsabilităţi principale	1. Activităţi didactice: Conducere de lucrări de laborator / seminar / proiect: Chimie generală, Tehnologie chimică; 2. Responsabilităţi în cadrul facultăţii şi universităţii: activităţi de organizare laboratoare, participare la concursul de admitere la nivelul universităţii 3. Activitate de cercetare şi publicistică (producţie ştiinţifică).
Perioada	**Septembrie 1998 – Martie 1999**
Funcţia sau postul ocupat	Traducator limba engleză
Numele şi adresa angajatorului	Universitatea "Valahia" din Târgovişte, B-dul Regele Carol I, Nr. 2, 130024 Târgovişte
Activităţi şi responsabilităţi principale	Activităţi de traducere / editare / elaborare articole ştiinţifice şi publicaţii
Perioada	Iulie 1995 – August 1998
Funcţia sau postul ocupat	Inginer

Numele şi adresa angajatorului	S.C. Nubiola România S.R.L.
Activităţi şi responsabilităţi principale	Departament tehnic

Educaţie şi formare

Perioada	**Martie 2015**
Calificarea / diploma obţinută	Certificat de instruire
Disciplinele principale studiate / competenţe profesionale dobândite	Utilizarea tehnicii UV-VIS, efectuarea analizelor si dezvoltarea de metode de analiza (Prezentarea teoriei UV-VIS; Pregatirea probelor; Operarea spectrofotometrului Thermo Scientific Evolution 260BIO; Aplicatii in domeniile: industria cosmetica, chimie clinica si sanatate, industria alimentara, stiinta materialelor, academic, etc.; Utilizare sofware: INSIGHT, CUE, EnzLab manual, Lambda-SPX, SpectoquantR
Numele şi tipul instituţiei de învăţământ / furnizorului de formare	Berd Trading SRL

Perioada	**Octombrie 2005 – Septembrie 2006** (2 semestre – program de masterat)
Calificarea / diploma obţinută	Diplomă de Master
Disciplinele principale studiate / competenţe profesionale dobândite	Managementul proiectelor
Numele şi tipul instituţiei de învăţământ / furnizorului de formare	Universitatea "Valahia" din Târgovişte – Facultatea de Ştiinţe Economice
Nivelul în clasificarea naţională sau internaţională	Învăţământ postuniversitar

Perioada	**Octombrie 1998 – Decembrie 1999** (3 semestre)
Calificarea / diploma obţinută	Certificat de specializare postuniversitară - specializarea Informatică
Disciplinele principale studiate / competenţe profesionale dobândite	Informatică
Numele şi tipul instituţiei de învăţământ / furnizorului de formare	Universitatea "Valahia" din Târgovişte - Departamentul pentru pregătirea personalului didactic şi educaţie continuă
Nivelul în clasificarea naţională sau internaţională	Învăţământ postuniversitar

Perioada	**Septembrie 1990 – Iunie 1995** (10 semestre)
Calificarea / diploma obţinută	Diploma de Inginer în profilul Chimie, specializarea Tehnologia Substanţelor Anorganice
Disciplinele principale studiate / competenţe profesionale dobândite	Chimie
Numele şi tipul instituţiei de învăţământ / furnizorului de formare	Universitatea Politehnica Bucureşti, Facultatea de Chimie Industrială
Nivelul în clasificarea naţională sau internaţională	Învăţământ superior

Perioada	**Septembrie 1981 – Iunie 1985** (4 ani)
Calificarea / diploma obţinută	Diploma de bacalaureat Certificat de calificare în meseria „Oficiant sanitar"
Disciplinele principale studiate / competenţe profesionale dobândite	Chimie - Biologie
Numele şi tipul instituţiei de învăţământ / furnizorului de formare	Liceul Sanitar Târgovişte
Nivelul în clasificarea naţională sau internaţională	Învăţământ mediu

Aptitudini şi competenţe personale

Limba(i) maternă(e) **Limba română**

Limba(i) străină(e) cunoscută(e)

Autoevaluare

Nivel european (*)

	Înţelegere				**Vorbire**				**Scriere**	
	Ascultare		Citire		Participare la conversaţie		Discurs oral		Exprimare scrisă	
Engleză	C2	Utilizator experimentat	C2	Utilizator experimentat	C1	Utilizator experimentat	C1	Utilizator experimentat	C2	Utilizator experimentat
Franceză	B2	Utilizator independent	B2	Utilizator independent	B2	Utilizator independent	B2	Utilizator independent	B2	Utilizator independent

(*) Nivelul Cadrului European Comun de Referinţă Pentru Limbi Străine

Competenţe şi abilităţi sociale

a) Spirit de echipă - experienţa lucrului în echipă a fost dobândită în cadrul diferitelor contracte / proiecte desfăşurate, în care am activat în calitate de membru în echipa de lucru;
b) Corectitudine;
c) Adaptabilitate, abilităţi de comunicare şi capacitate de relaţionare – dobândite atât datorită responsabilităţilor din cadrul facultăţii şi universităţii, cât şi în urma proiectelor desfăşurate la nivel naţional şi internaţional.

Competenţe şi aptitudini utilizare a calculatorului

Foarte bune cunoştinţe de utilizare a calculatorului dobândite în cadrul studiilor postuniversitare de specializare, de la operare folosind pachetele de programe de editare texte şi foi de calcul şi până la tehnologii moderne care folosesc tehnologii informaţionale şi ale comunicaţiilor (TIC) în educaţie: tehnologii informaţionale pentru educaţie continuă (e-learning), interacţiune şi comunicare virtuală, platforme de învăţare orientate Web.

Alte competenţe şi aptitudini

Capacitate de motivare a colectivului în care lucrez, comunicare, deschidere, iniţiativă, gândire analitică, echilibru, loialitate, determinare şi orientare spre rezultate.

Informaţii suplimentare

Doctorand
Domeniul de doctorat: Stiinte Ingineresti – Ingineria Materialelor
„Nanomateriale pe baza de extracte naturale cu aplicatii biomedicale” – conducator de doctorat: prof. Dr. R.M.Ion.

a) **8 Programe / Contracte naţionale de cercetare desfăşurate / în curs de desfăşurare** – roluri îndeplinite:

- ***8 - membru în echipa de lucru*** a proiectului);

b) **8 Proiecte / Granturi internaţionale educaţionale** - roluri îndeplinite:
8 – tutor / membru în echipa de lucru a proiectului
c) **1 Grant intern de cercetare ştiinţifică** (Universitatea “Valahia” din Târgovişte) – rol îndeplinit: ***membru în echipa de lucru a proiectului***;
d) **75 Lucrări ştiinţifice publicate**
e) **80 Comunicări ştiinţifice** - din care 28 la conferinţe internaţionale şi 52 la conferinţe naţionale;
f) **3 Monografii, manuale şi cărţi universitare, îndrumare de laborator:** în edituri recunoscute, cu ISBN;
g) Membru al asociaţiilor profesionale şi al colectivelor de cercetare acreditate:
• Membru al Societăţii Naţionale de Chimie;

Referinţe pot fi obţinute de la toţi colaboratorii din ţară şi străinătate cu care am lucrat / lucrez în cadrul diferitelor contracte / proiecte. Informaţii suplimentare se pot afla din paginile web ale contractelor / proiectelor desfăşurate:, http://fiste.ssai.valahia.ro, http://vccsse.ssai.valahia.ro,

MINISTRY OF NATIONAL EDUCATION
“VALAHIA” UNIVERSITY OF TÂRGOVIȘTE
IOSUD – ENGINEERING SCIENCES DOCTORAL SCHOOL
FUNDAMENTAL DOMAIN *ENGINEERING SCIENCES*
DOMAIN *MATERIALS ENGINEERING*

NANOMATERIALS BASED ON NATURAL EXTRACTS WITH BIOMEDICAL APPLICATIONS

-PhD Thesis Summary-

PhD Superviser:
Prof. univ. dr. chim. Rodica Mariana ION

PhD Student:
Radu Lucian OLTEANU

TÂRGOVIȘTE
2019

CONTENT

PhD Thesis (***PhD Thesis Summary***)

THE STAGE OF KNOWLEDGE

EXPERIMENTAL PART

OWN CONTRIBUTIONS

In the ***PhD Thesis Summary***:

*   ***figures and tables keep the numbering from the PhD Thesis***;
** ***the indicated bibliography is selective keeping the numbering from PhD Thesis***.

Keywords: natural extracts, *Salvia officinalis*, *Sapindus mukorossi*, silver nanoparticles, composite hydrogels with silver nanoparticles, *in-situ* synthesis, UV-VIS, XRD, FTIR, SEM-EDS, antimicrobial activity, *Staphiloccocus aureus*, *Escherichia coli*, microbiological test.

Acknowledgments

I would like to thank the scientific supervisor of the present doctoral thesis, the university professor chemistry doctor Rodica Mariana Ion, for her attentive guidance, high professionalism, and the continuous support offered during the entire preparation period of the doctoral thesis.

Mrs. univ. prof. dr. eng. Cristiana Rădulescu, manager of the Multidisciplinary Science and Technological Research Institute (ICSTM) from Valahia University of Târgoviște and my ICSTM colleagues for the specialized technical support offered during the investigations within the doctoral thesis.

Mr. univ. prof. dr. Radu Setnescu and the researchers from the Department of Advanced Materials within the National Research Institute for Electrical Engineering (ICPE-CA) Bucharest: CS III dr. Marius Lungulescu and CS drd. Virgil Marinescu for the granted support in the accomplishment of the experimental research.

Dr. Gilda Constantinescu, coordinator of the Microbiology Laboratory within the Veterinary Sanitary and Food Safety Directorate of Târgoviște, for conducting the microbiological studies related to the doctoral thesis.

A special mention is addressed to my colleagues, CS dr. eng. Cristina Mihaela Nicolescu and lecturer dr. Marius Bumbac, for their professional support, involvement, understanding and trust throughout the doctoral period. I thank them once again for all the support provided in experimental research and beyond.

Last but not least, I thank to the family and friends for their moral support, patience, encouragement and trust in this period.

For Carmen, Cristina and Marius

Radu Lucian Olteanu

1. INTRODUCTION

The issue addressed in the doctoral thesis, related to a number of fundamental aspects in the field of nanomaterials for biomedical applications, line up between the main directions of action (National Research, Development and Innovation Strategy 2014 - 2020) of the research programs of excellence through which scientific knowledge in the field of nanomaterials is promoted regarding the development and integration of the economic agents at CEEX consortium level and the requirements of the European Union and the developed European countries. The development of biocompatible nanomaterials, with high functionality and reduced side effects in the case of medical applications, allowing for successful therapies and treatments, is an important area from the perspective of the lucrative potential but also of the population's health.

The eco-nanotechnology (green nanotechnology), resulted from combining nanotechnology with the principles and practices of green chemistry (green chemistry is based on a set of principles or rather a philosophy that encourages the development of products and processes that reduce or eliminate the use and generation of potential substances) could be an important element in the development of an environmentally sustainable society in the 21 century. The processes and procedures currently applied in the field of eco-nanotechnology involve the use of natural sources, nontoxic solvents and energy efficient processes in obtaining nanomaterials [1]. Herbal extracts are one of the most studied categories at present being regarded as one of the most promising sources of natural reducing agents. A particularly successful field is the synthesis of metal nanoparticles, with medical applications and in electronics, using plant extracts as reducing agents [2].

In the first three decades of the 21s century the society was placed in front of a large number of nanoproducts. According to the NCPI (Nanotechnology Consumer Products Inventory) report, in 2016, 622 companies from 32 countries produced 1814 nanoproducts together. There are a number of expressions associated with nanotechnology, but two of the most commonly used terms are "nanomaterial" and "nanoparticle". Although both terms are sometimes used as synonyms, the American Society for Testing and Materials (ASTM) [4] states that "the nanoparticle (NP) is a subclassification of a two- or three dimensional ultrafine particle larger than 0.001 μm (1 nm) and smaller than 0.1 μm (100 nm) which may or may not have an intensive size-related propertyò. On the other hand, the European Union has defined the nanomaterial (NM) as an "natural, incidental or manufactured material containing particles in an unbound state or in aggregate or agglomerated form, for which more than 50% of the particle size distribution, of one or more dimensions, it is in the range 1 - 100 nm "[5]. According to recent publications [3, 6, 7, 8], the development of the green synthesis of nanomaterials beyond the laboratory scale should take into account the clarification of the aspects regarding: quantifying the production of nanomaterials / nanoparticles, establishing a production duration for a certain volume of nanomaterial / nanoparticles, standardization of the conditions for obtaining specific monodisperse particles, stability of nanoparticles obtained by green synthesis, identification of materials derived from plants most suitable for the synthesis of specific nanomaterials / nanoparticles, clarification of the biochemical and molecular mechanisms involved in the formation of specific nanoparticles.

The performed studies, which were the basis for the elaboration of the present doctoral thesis, intended to exploit the potential of some plant extracts for the synthesis of silver nanoparticles and respectively to obtain nanomaterials type composite hydrogels with silver nanoparticles, by a "green" synthesis method, with potential biomedical applications.

1.1. Purpose and objectives of the PhD thesis

The aim of the doctoral thesis is to investigate the possibilities of synthesizing a certain type of nanomaterials, respectively composite hydrogels, with hybrid polymeric matrix (based on two components, a synthetic and a natural polymer) and functionalized with silver nanoparticles (synthesized through extracts of *Salvia officinalis* and *Sapindus mukorossi*). For a relevant study in a first phase, was experimented the synthesis of silver nanoparticles with the mentioned plant extracts and subsequently the synthesis of the composite hydrogels with silver nanoparticles generated *in situ* through the same extracts. In a final phase, the antimicrobial activity of the synthesized nanomaterials was tested by *in vitro* and preliminary *in vivo* tests in order to evaluate their potential for biomedical applications. The results obtained during the elaboration of the thesis can be, in perspective, the subject of a new research.

The general objective of the present doctoral thesis is the "green" synthesis of nanomaterials type composite hydrogels with silver nanoparticles by the method of forming the reactive nanoparticles within a preformed gel (generation of nanoparticles being realized *in situ*), physically cross-linked (freezing - thawing) respectively by irradiation.

The specific objectives:

- The synthesis of silver nanoparticles with *Salvia officinalis* involving a small number of reagents and specific technical equipment, with minimal economic and logistical implications; study of the influence of the ion salt / extract ratio, pH and temperature on the synthesis process.
- The synthesis of silver nanoparticles with *Sapindus mukorossi* extract involving a small number of reagents and specific technical equipment, with minimal economic and logistical implications; study of the influence of the ion salt / extract ratio, pH and temperature on the synthesis process.
- The synthesis of silver nanoparticles with a mixture of extracts (*Salvia officinalis* and *Sapindus mukorossi*) for highlighting the reducing potential of the *Salvia officinalis* extract and that of the stabilizing agent of *Sapindus mukorossi* extract respectively.
- The obtaining of composite hydrogels with silver nanoparticles generated *in situ* through extracts of *Salvia officinalis*, *Sapindus mukorossi* and a mixture of extracts, physically cross-linked (freezing - thawing) and by irradiation.
- The study of the antibacterial properties of hydrogels functionalized with silver nanoparticles, determined qualitatively and semi-quantitatively by establishing the minimum bactericidal and bacteriostatic concentration relative to two strains of pathogenic bacteria (*Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*) often involved in in-hospital infections.

1.2. Description of the thesis chapters

The doctoral thesis is structured in 7 chapters, the first three chapters being dedicated to the documentary study regarding the current state of knowledge in the complex field of metal nanomaterials / nanoparticles, and the next four chapters to experimental research and own contributions.

Chapter 1 of the thesis is an introductory one, presenting a brief incursion into the issues addressed and a series of aspects regarding the state of the green synthesis of nanomaterials as well as the purpose and general and specific objectives of the thesis.

A detailed description of metallic nanomaterials / nanoparticles in general and especially of those with silver nanoparticles starting from synthesis, classification and their biomedical applications, is included in **chapter 2** of the thesis. Within this chapter, the green synthesis of silver nanoparticles has been emphasized through plant extracts, nanomaterials with silver nanoparticles with polymeric matrix and respectively composite hydrogels with silver nanoparticles.

Chapter 3 contains a series of information related to the antimicrobial activity of silver nanoparticles / nanomaterials with silver nanoparticles on pathogenic microorganisms and some aspects related to their toxicology.

The experimental part of the doctoral thesis begins with **chapter 4** dedicated to a brief presentation of the investigation techniques applied in the study of the synthesized nanoparticles / nanomaterials and of the plant extracts used.

Chapter 5 presents aspects related to the synthesis of silver nanoparticles with extracts of *Salvia officinalis* and *Sapindus mukorossi* through the ratio of the combination extract / ionic salt precursor, the pH and the synthesis temperature, as well as investigations on the synthesized nanoparticles, the obtained results being discussed.

Chapter 6 includes the synthesis of composite hydrogels (with polymeric matrix polyvinyl alcohol ï collagen hydrolysate and polyacrylamide - starch respectively) with silver nanoparticles generated *in situ* using extracts of *Salvia officinalis* and *Sapindus mukorossi* as well as investigations on these nanomaterials. Within the same chapter, the evaluation of the antibacterial activity of the obtained nanomaterials is presented.

Chapter 7 of the PhD thesis presents own conclusions and contributions.

At the end of the doctoral thesis are included the bibliographic notes consulted during the years of the thesis development, the list of papers published in the field of the doctoral thesis and the annexes structured in 11 parts which include a series of data obtained from the experimental research carried out within the thesis.

EXPERIMENTAL PART

4. INVESTIGATION TECHNIQUES USED IN THE STUDY

The methods of physical-structural analysis of materials are the basic elements in determining the relationship between structure - property - processing for any field of materials science. They provide data on their behavior and properties related to structure, the nature of interaction forces, structural organization. As each field of materials science has specific methods of investigation, they can be subclassified into structural, physical and analytical methods common to any type of material.

4.1 Ultraviolet-visible spectroscopy

UV-VIS absorption spectroscopy allowed: 1) identification of the presence of silver nanoparticles in colloidal solution / hydrogel nanomaterial (usually the presence of silver nanoparticles in the analyzed sample is evidenced by the existence of a spectral maximum in the range 400 - 480 nm); 2) informations regarding: the size, the particle size distribution, the agglomeration / aggregation of the nanoparticles (the monochromatic and hypochromatic displacement of the maximum absorption associated with the increase or decrease of the size of the nanoparticles; the hyperchromic effect corroborated with the narrowing of the absorption band and the reduction of the respective distribution; the hypochromic effect corroborated by the enlargement of the absorption band and the bathochromic displacement in the case of enlargement of the dimensional distribution and aggregation of the nanoparticles).

The ultraviolet-visible absorption spectra were recorded using a Thermo-Evolution-260Bio absorption spectrophotometer in the 200-375 nm range (using yard vats as sample holder) and 375-700 nm respectively (using quartz cuvettes as sample support) at a range of 2 nm. Material samples were taken at different stages of the synthesis process or at time intervals after obtaining the final product. The hydrogel samples were previously diluted for spectrum recording using bidistilled water as a solvent; as a control sample, bidistilled water and plant extracts were used as the case, in the same dilution ratio with the analyzed samples.

4.2 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

The FTIR spectroscopy system for advanced research, used for analysis, was composed of the FT-IR Vertex 80 spectrometer in the ATR - attenuated total reflection mode. The analyzed samples (colloidal solutions of nanoparticles, polymeric matrix components, polymeric matrices and composite hydrogels with silver nanoparticles) were evaporated to dryness previously (drying in the oven for 72 hours / 30°C) without pasting with potassium bromide or with pill in some cases. Usually, the analysis of samples with as little manipulation as possible is preffered to avoid their contamination [49], the chemical reagents used for fixation, binding or elution can lead to the relocation of trace elements and change the native and structural chemical composition of the samples [183]. The results obtained were compared with data from literature articles in the field regarding the types of aqueous plant extracts and similar polymeric matrices; IR radiation absorption was recorded in transmittance coordinates (T) - wavenumber (ν, cm-1) or absorbance (A) - wavenumber, in the range 4000 - 400 cm^{-1} at a spectral resolution of 2 cm^{-1}.

The interpretation of the FTIR spectra considered the identification of the absorption maxima that undergo changes in the analyzed media (crude vegetable extract, polymeric matrix components and hydrogels with silver nanoparticles). The changes of the position of the spectral maxima may be associated with the adsorption [184, 185, 186, 187, 188] of the constituents of the plant extract on the surface of the silver nanoparticles, the bonds that may occur following the cross-linking of the polymeric matrix and the interaction between matrix and / or the silver nanoparticles, respectively the plant extract.

4.3 X-ray diffraction (XRD)

The structural characterization of synthesized silver nanoparticles, polymeric matrices and hydrogel type nanomaterials was performed with a Rigaku Ultima IV model diffractometer. The crystalline phases of the nanoparticle powder structure were identified by comparing the diffractograms obtained with the diffraction lines existing in the International ICDD (International Center for Diffraction Data) databases [189]. The ICDD - PDF2 files studied for the identification of crystalline phases were: 00-031-1238 for silver chloride, 00-030-1137 for silver phosphate and 00-004-0783 for metallic silver.

The XRD analysis considered the evaluation of the crystallinity of the investigated nanomaterials as well as the confirmation of the presence of the silver compounds being analyzed the hydrogel type nanomaterials obtained with extracts of *Salvia officinalis*, *Sapindus mukorossi* and a mixture of extracts, respectively the corresponding polymeric matrices. The data obtained from the XRD scans were imported into the PDXL program and Rietveld analysis was performed for crystallographic refinement. The crystalline models were based on the ICDD cards for silver (ICDD-PDF 04-003-7118), the silver oxide (ICDD-PDF 04-007-1374) and the silver nitrate (ICDD-PDF 01-074-4790) respectively .

4.4 Scanning electronic microscopy and X-ray spectroscopy with energy dispersion (SEM-EDS)

The device used in the analysis consisted of a field emission scanning electron microscope (FESEM) model Carl Zeiss-Auriga, dedicated to the study of microscopic structures and surfaces of different types of materials: organic and inorganic samples (polymers, polycomposite materials, plastics) magnetic conductive or not. For the analysis of the nanoparticles (from colloidal solutions) synthesized in the first phase of the experimental study, was used a device consisting of a Hitachi SU-70 field emission scanning electron microscope coupled with an energy dispersion spectrometer (EDS) and the wavelength (WDS); variable acceleration voltage 0.1÷30 kV, magnification range 30X÷800.000X and 1 nm resolution at acceleration voltage of 15 kV.

Energy-dispersive X-ray spectrometer (EDX or EDS) is an instrument capable of performing the compositional analysis of the characteristic X-rays generated by the interaction between the incident electron beam and the sample surface. Among the characteristics / advantages and disadvantages of the EDS method compared to the wavelength dispersion spectrometry method (WDX or WDS), we can mention: simultaneous analysis of numerous elements in a short time, high detection sensitivity, low detection limit (╔ 0.3%) compared to WDX, minimal deterioration of the analyzed sample.

As an advantage of the SEM technique, can be mentioned the high resolution in characterizing the shape and size of the nanoparticles, but a number of limitations must be considered due to the effects of the charge (due to the accumulation of static electric fields), the incompatibility with the liquid or wet samples, the operation under vacuum conditions, as well as a degree of uncertainty of ╔10% in the quantitative analysis [9, 190, 191].

4.5 Microbiological techniques used in the study

The biocidal potential, namely ***the investigation of the antimicrobial properties of the hydrogel-type nanomaterials***, was performed in the microbiology laboratory of the Veterinary Sanitary and Food Safety Directorate of Târgovi’Ħe, DâmboviŞa. The laboratory, equipped standard from the point of view of the technical equipments (sterile working conditions including sterilization of the instrumentation, the working material and the enclosure), uses the aseptic technique to avoid any cross-contamination of the cultures of microorganisms, culture media, material and instrumentation, etc.

Antimicrobial properties of hydrogel nanomaterials with silver nanoparticles were investigated by a microbiological study on two pure cultures of bacteria from the Gram-negative (*Escherichia coli*) and Gram-positive (*Staphylococcus aureus*) strains; the selection of the mentioned bacteria had in view their incidence in nosocomial infections (nosocomial infection or intrahospital infection, is that infection that is not present or is not in the incubation period when the patient was admitted to the hospital and the is overdosed to the disease which the patient was hospitalized).

Bacterial strains were grown on specific and / or selective nutrient media, in the presence of variable doses of hydrogel with silver nanoparticles, incubated at optimum temperatures for standard durations, and afterwards the indirect counting of colony-forming units (UFCs) was used. The antimicrobial capacity of the hydrogel type and the minimum bactericidal dose can be determined by correlating the number of colonies developed with the hydrogel dose in the sample. The stage of multiplication of microorganisms or the assessment of the degree of infection of the sample can be established by counting microorganisms or UFC. For a more accurate count, a sample is usually diluted, in a first stage before seeding, of the sample to be analyzed (the hydrogel with antimicrobial potential) or the inoculum of microorganisms used in a sterile environment; usually the decimal dilution is applied in sterile peptonic water (this medium is recommended by ISO Committee by ISO 6579:1993 specification), physiological serum (9% NaCl solution) or physiological peptonate serum [192].

In the case of the study performed on the hydrogel samples, the indirect method of counting the microorganisms was used, respectively the Koch cultural method (the plate culture method) which is based in principle on the seeding of a known volume of microbial cell suspension on culture medium, in Petri dishes. containing a certain amount of sample to be analyzed - as such or eluted; after an optimal incubation period, the colonies are counted, considering that each colony appears as a result of multiplying a single cell.

In parallel, a ***test of antifungal activity*** was performed on the Penicillium (*Penicillium glaucum*) strain, as many species of this genus are decaying agents, being commonly encountered in the air microhotta; activity testing was performed at U.S.A.M.V. - The Faculty of Veterinary Medicine, the clinical laboratory within the College of Veterinary Doctors. The test technique as well as the working protocol applied to the composite hydrogel samples with silver nanoparticles was performed in compliance with the norms according to the existing standardized methods [200, 201, 202].

For a first ***assessment of the degree of acute toxicity***, the synthesized hydrogel-type nanomaterials were subjected to a series of preliminary pharmacological tests (the test was performed at the U.S.A.M.V. Bucharest - Faculty of Veterinary Medicine, clinical laboratory within the College of Veterinary Doctors). In the acute toxicity test experiment, Swiss white mice (20±2 g in weight) and Wistar white rats (140±20 g in weight) were used with uniform distribution by sex (20 animals, 10 males and 10 females on each batch and dose), from the USAMV biobased - Bucharest. During the *in vivo* experiments, the handling of animals was made having in view the approval of the Ethics Committee of the U.S.A.M.V. - Bucharest, in strict accordance with international ethical regulations.

4.6 Characterization methods for vegetal extracts used in the study

The obtained plant extracts were characterized by measuring the pH (the value recorded was 6.8 for *Salvia officinalis* and 4.2 respectively for *Sapindus mukorossi*) and the spectrophotometric evaluation of the phytochemical species involved in the synthesis process.

Antioxidant activity (AA,%) was evaluated using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and recording the absorbance at 517 nm based on the method described in the literature [207]. The total flavonoid content was determined based on the aluminum chloride test at 510 nm [208], the results being expressed in mg catechin / ml. The vanillin assay [209, 210] at 500 nm was applied to determine the total tannin content; the results were expressed in mg catechin / ml. For the total terpenoid content the method described in literature [211] was applied at 608 nm, the results being expressed in mg linalool / ml. The plant extracts were also characterized in order to determine the total phenol content by applying the Folin-Ciocalteu method, in accordance with the international standard ISO 14502-1: 2005 (E) [212], adapted to the working conditions; for calibration, different concentration of gallic acid solutions were used, the standards and samples being measured at 765 nm and the total phenol content being expressed in mg of gallic acid / ml extract.

The usual spectrophotometric methods for determining the critical micellar concentration (CMC) use additives whose changes in UV-VIS absorbance or fluorescence emission indicates the formation of micelles.

The method of micellization of a dye, proposed by Patist et al. [58], was adapted to the working conditions for the CMC determination of the extract by using an aqueous solution of methylene blue ($C_{16}H_{18}ClN_3S$) 10^{-4}M. The visible absorption spectra were recorded in the 500 - 800 nm range, on a 1 nm scan interval, the wavelength corresponding to the maximum absorption (λ_{max}) being recorded. From the graphical representation of λ_{max} according to the concentration of the extract in solution, the CMC was determined according to the intersection point of the two approximations / linear trends of the segments corresponding to the obtained curve.

The method based on the correlation of the signal due to the surface plasmon resonance of the silver nanoparticles with the surfactant concentration. To determine the CMC based on the plasmonic response of the nanoparticles, mixtures of plant extract and stable solution of silver nanoparticles were used, the tests being performed at room temperature by recording the absorbance of the samples at a fixed wavelength (418 nm), corresponding to the maximum absorption registered for the stable solution of silver nanoparticles. The absorbance values were represented according to the extract concentration fort each measurement, the CMC being determined as the value corresponding to the inflection point identified from the representation of the maximum absorbance variation (A_{max}) as a function of the vegetable extract content in the test solution.

As a variant of the applied method, ***the CMC determination*** was ***performed based on the variation of the wavelength of the maximum absorption (λ_{max}) with the extract content added to the silver nanoparticles solution***, the CMC value obtained (2.53±0.19%, v/v) being close to the values recorded by applying the two methods described above. The variation of the wavelength associated with the absorption maximum in the UV-VIS spectrum took into account the fact that there is not a single value of the absorbance maximum, the absorption maximum being flattened; taking into account this aspect, was recorded the first value of the maximum in the range 650 - 300 nm.

OWN CONTRIBUTIONS

5. SILVER NANOPARTICLES SYNTHESIS USING *SALVIA OFFICINALIS* AND *SAPINDUS MUKOROSSI* EXTRACTS

5.1 *Salvia officinalis* and *Sapindus mukorossi extracts synthesis*

As extraction procedure the solvent extraction was chosen in order to obtain plant extracts due to its speed, ease and cost efficiency. The extracts were obtained by static extraction at room temperature in the coated container, the extraction ratio (dry plant material / solvent volume, g/ml) being maintained in all extraction procedures. After completion of the extraction the mixture was filtered and centrifuged to obtain a clear extract and the supernatant was stored at 4 °C for further use in experimental determinations. The same stock solution from each extract was used in all related determinations [218, 219].

5.2 Characterization of *Salvia officinalis* and *Sapindus mukorossi* extracts

The tests for the identification of active components in the aqueous extracts of *Salvia officinalis* and *Sapindus mukorossi* were performed based on standard procedures [231, 232, 233] allowing to identification of saponins, terpenoids, steroids, tannins and flavonoids.

Table 5.1 Indicators of the phytochemical content of aqueous extracts of *Salvia officinalis* and *Sapindus mukorossi* [218, 219]

Indicator / Extract type	***Antioxidant activity (%)***	***Flavonoids (mg/ml)***	***Tannins (mg/ml)***	***Terpenoids (mg/ml)***	***Polyphenols (mg/ml)***
Salvia officinalis	28.92±0.88	304.60±3.40	188.00±2.35	95.61±0.89	170.92±2.44
Sapindus mukorossi	27.01±0.92	182.54±1.66	83.31±1.12	251.00±2.21	168.88±2.78
*each value represent the average for three tests ± standard deviation					

In the experimental approach who aimed the influence of the phytochemical reducing capacity on the synthesis of silver nanoparticles with plant extracts, which results were published [218], which also included the extract of *Salvia officinalis*, was made a correlation between the indicators of the phytochemical content of plant extracts and their reducing capacity.

As mentioned above, the extract of *Sapindus mukorossi* has been particularly noted for its qualities of natural surfactant due to its high saponin content. A particular property of these is the arrangement of molecules in organized molecular aggregates, the micelles, when the surfactant concentration reaches a certain value called ***critical micellar concentration*** [245]. It is generally accepted that CMC is not defined by a well-defined value but by a concentration range associated with micelles formation [248, 249].

The dye micellization method, proposed by Patist et al. [58], was adapted to the working conditions for CMC determination of the extract by using an aqueous solution of methylene blue ($C_{16}H_{18}ClN_3S$) of 10^{-4}M concentration.

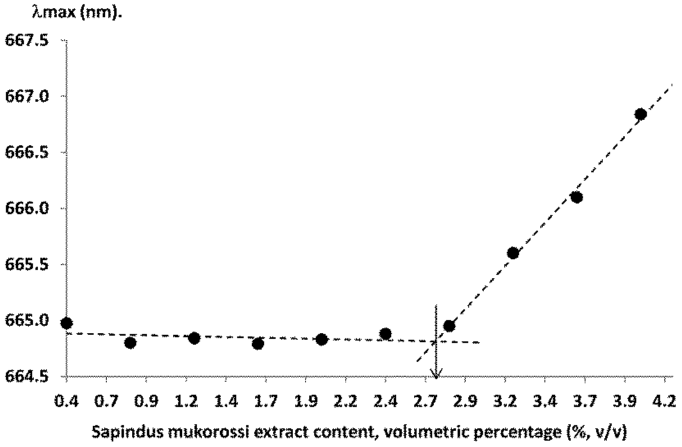


Figure 5.4 Determination of the critical micellar concentration (CMC = 2.71 ± 0.11%, v/v) for the aqueous extract of *Sapindus mukorossi* by the method of micellization of a dye (methylene blue 10^{-4} M) [213].

The method based on the correlation of the signal due to the surface plasmonic resonance of the silver nanoparticles with the surfactant concentration has been studied among others by Salem et al. when determining the critical micellar concentration for a series of synthetic surfactants.

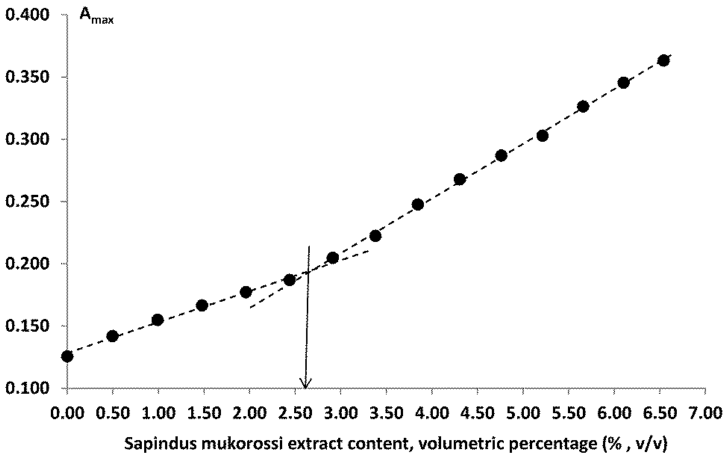


Figure 5.5 Determination of the micellar critical concentration (CMC = 2.68 ± 0.13%, v/v) for the aqueous extract of *Sapindus mukorossi* based on the band sensitivity associated with the surface plasmon resonance of silver nanoparticles (418 nm) [213].

As a variant of the applied method, ***the CMC determination*** was performed also ***based on the variation of the wavelength associated with the maximum absorption (λ_{max}) with the extract content added to the silver nanoparticles solution***, the CMC value obtained (2.53 ± 0.19%, v/v) being close to the values recorded by applying the two methods described above.

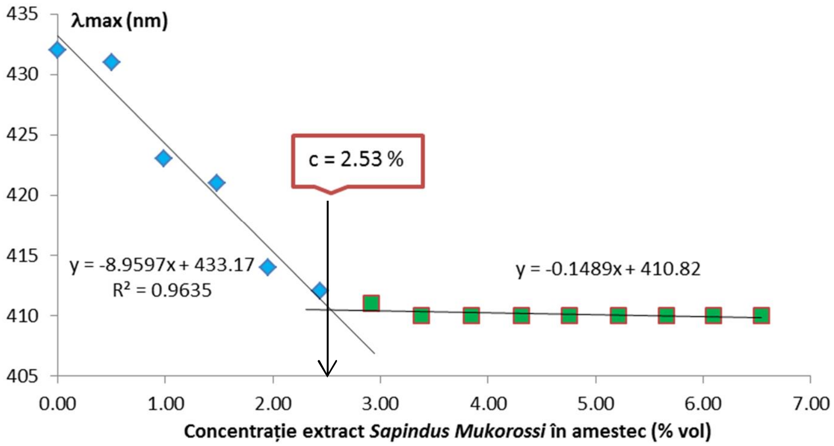


Figure 5.6 Determination of the micellar critical concentration (CMC = 2.53±0.19%, v/v) based on the variation of the maximum absorption wavelength, for the colloidal solution of silver nanoparticles, with the addition of *Sapindus mukorossi* extract.

The spectroscopic methods applied led to a good correlation between the values determined for the critical micellar concentration (2.71 ± 0.11%, v/v and 2.68 ± 0.13%, v/v respectively).

5.3 Silver nanoparticles synthesis using *Salvia officinalis* extract

5.3.1 Growth dinamics study of silver nanoparticles. Influence of the ionic salt : extract ratio

The dynamics of formation and growth of metallic colloidal nanoparticles has been described by different theories that establish models for the nucleation and growth of nanoparticles. A different approach to these theories is made by Jorg Polte [215] who presents nanoparticles growth models based on their colloidal stability. Polte's nanoparticle formation model comprises four stages in which the reduction and coalescence occur simultaneously but at different speeds.

The synthesis of silver nanoparticles using *Salvia officinalis* extract can be included in the model proposed by Polte in the second category of synthesis (it includes the processes in which the reduction and coalescence take place at the same time and is carried out concurrently until stable colloidal nanoparticles are formed). judging by the composition of the extraction mixture as presented in the literature, which includes weakly reducing species. However, changes in working conditions could lead to different dynamics of the nanoparticles growth process.

By correlating the spectral changes in UV-VIS, as an indicator of the morphological changes of the silver nanoparticles, with the experimental parameters (pH, the initial mixing ratio of silver nitrate / *Salvia officinalis* extract), can be obtained informations regarding the growth of the nanoparticles and optimal working parameters for the synthesis of silver nanoparticles using plant extracts [92, 258, 259].

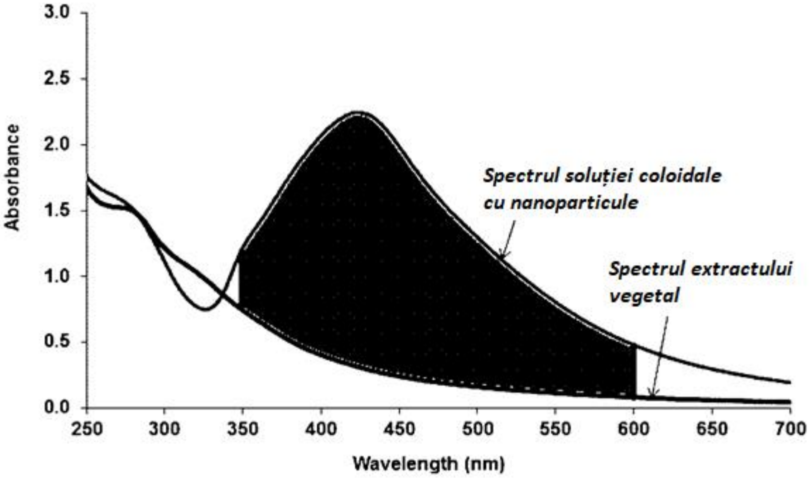


Figure 5.9 The relative area associated with the plasmonic response of silver nanoparticles calculated from UV-VIS spectra recorded for the plant extract and the colloidal solution of nanoparticles.

The graphical representation of the relative area as a function of time has been preferred relative to the values associated with the maximum absorption over time because the absorption bands have different characteristics (maximum intensity, bandwidth, shape) depending on the ratios of silver nitrate / sage extract nitrogen. The selected wavelength domain considered that the main plasmonic changes of silver nanoparticles in UV-VIS spectra appear in this area [261]. The reason for the selection of the relative area instead of the maximum absorption was that the plasmonic response of the metal nanoparticles is influenced by the reaction medium. In the growth stage the process is dynamic, accompanied by breaking and bonding, with effect on the size and shape of the nanoparticles and the metal interface.

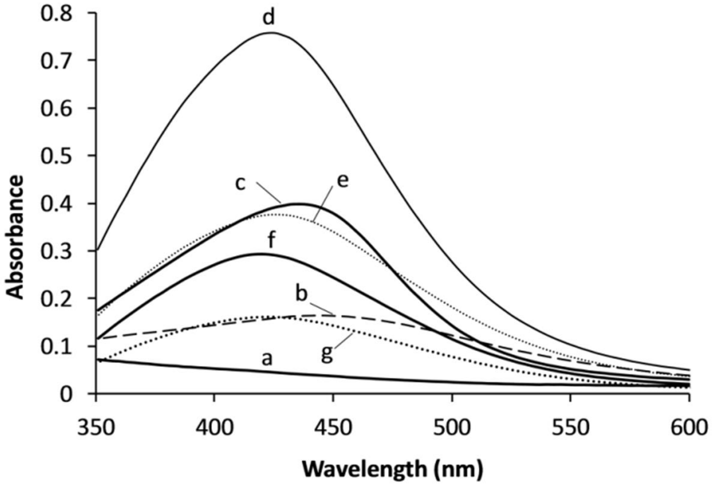


Figure 5.10 UV-VIS absorption spectra at 3 hours for different volumetric mixing ratios of 10 mM silver nitrate : *Salvia officinalis* extract: (a) 1:5, (b) 1:3, (c) 1:2, (d) 1:1, (e) 2:1, (f) 3:1 and (g) 5:1.

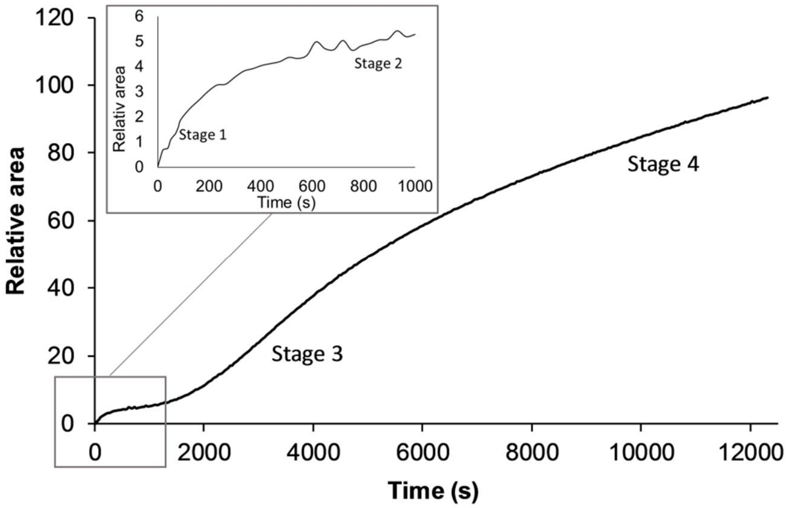


Figure 5.11 Evolution of the relative area over time for the synthesis mixture of 10 mM silver nitrate 10 mM : *Salvia officinalis* extract equal to 1: 1 [219].

The evolution of the UV-VIS spectrum over time indicates a rapid growth of silver nanoparticles in the first three hours from the moment of mixing the components. However, are present differences between the rate of increase of the absorbance intensity and the position of the maximum absorption. Considering the aspect of the spectrum (Figure 5.10) in the range 350-600 nm, it can be appreciated that the highest nanoparticle content was obtained when the initial mixture contained equal volumes of 10 mM silver nitrate and sage extract.

The aspect of the curves of variation of relative area as a function of time varies with the initial mixing ratio between sage extract and silver nitrate. For all the syntheses performed experimentally, the relative growth rate of the area was calculated as the slope of the linear portion of the graph plotted in figure 5.11. For each of the four stages of the silver nanoparticle growth process, mentioned above and highlighted in figure 5.11, the notations v_1, v_2, v_3 and v_4 were assigned, the respective values being presented in table 5.3.

Table 5.3 The values of the relative velocity of the relative area, from the UV-VIS spectra, associated with the silver nanoparticles for the four stages of the nanoparticle growth process

Volumetric ratio silver nitrate : vegetal extract in the synthesis mixture	***Relative speed of increase of relative area (arbitrary units / second)***			
	v_1	v_2	v_3	v_4
1:5	0.0450	0.0004	-	-
1:3	0.0422	0.0006	0.0038	0.0012
1:2	0.0251	0.0018	0.0050	0.0035
1:1	0.0176	0.0021	0.0138	0.0052
2:1	0.0136	0.0010	0.0066	0.0035
3:1	0.0028	0.0006	0.0044	0.0027
5:1	0.0026	0.0005	0.0016	0.0009

A first aspect that can be observed is that the relative growth rate in the first stage, which involves a reduction process that occurs at a higher rate of particle growth, is influenced by the extract content in the solution. As a result, the use of solutions in which the mixing ratio is favorable to the extract leads to higher growth rates of the relative areas. It can be concluded that the rate of increase of the relative area (implicitly of the plasmonic response) in the first stage of nanoparticle formation and growth is proportional to the content of the plant extract or reducing species presents therein in the synthesis mixture. In the second stage of the nanoparticle growth process, the main processes that contribute to the emergence of stable colloidal nanoparticles are the reduction and diffusion, and the samples with a volumetric mixing ratio of ionic salt : vegetable extract equal to 1 : 1 provide optimal conditions for nanoparticle growth.

The formation of nanoparticles in the autocatalytic acceleration step of their growth is attributed to an autocatalytic process, the metal ions adsorbed to the metal-solution interface are initially reduced and then incorporated into the growing particle; the mixtures with a volumetric mixing ratio of 10 mM silver nitrate : sage extract equal to 1 : 1 recorded the highest growth rates of the plasmonic signal (Table 5.3). In the fourth stage, the same order of evolution of relative velocities is maintained, suggesting the optimal volumetric mixing ratio of ionic salt 1 : 1 vegetable extract in obtaining an intense plasmonic response.

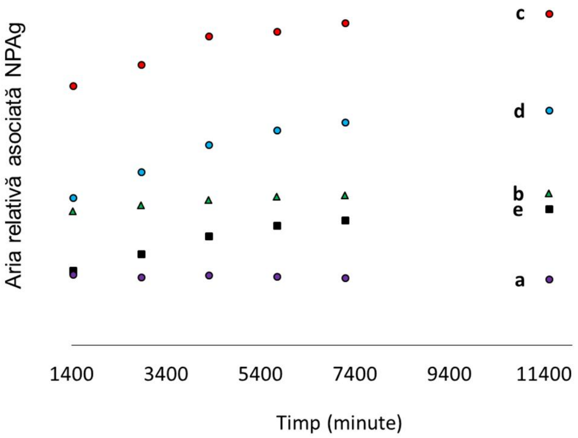
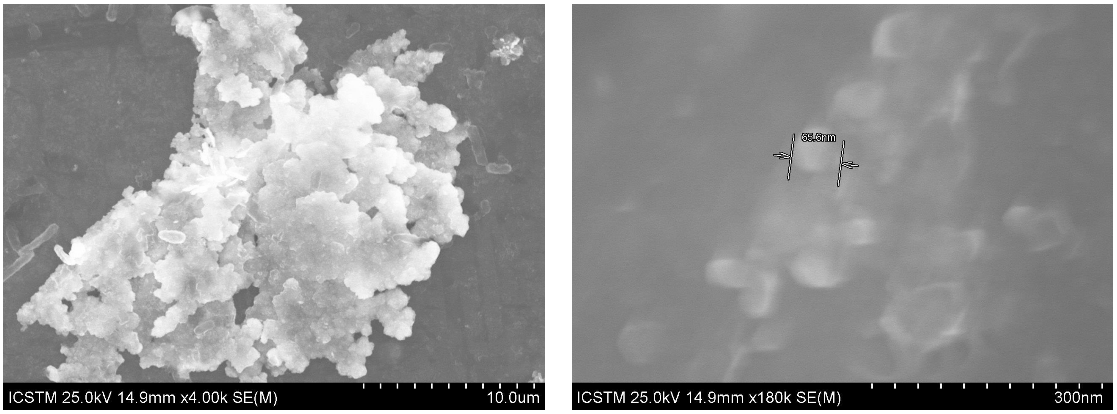
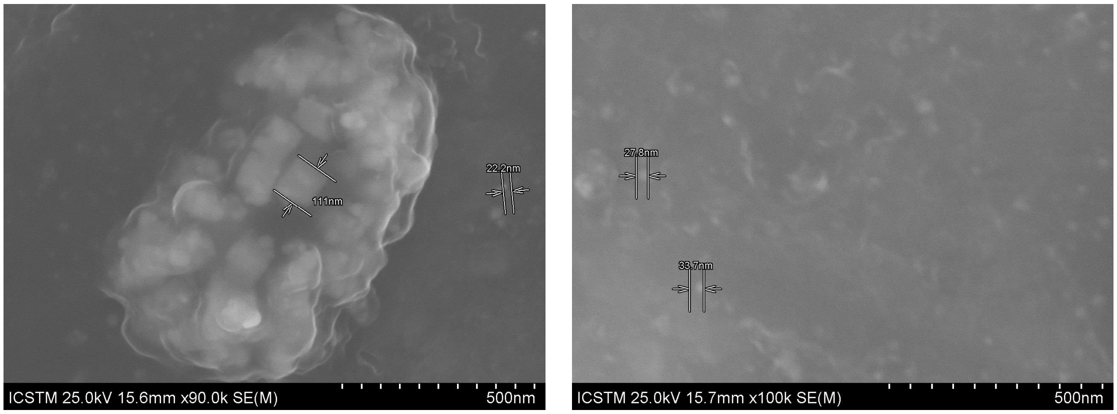


Figure 5.12 The variation of relative area over time for volumetric mixing ratios of 10 mM silver nitrate: sage extract equal to: (a) 1:5, (b) 1:2, (c) 1:1, (d) 2:1 and (e) 5:1 [219].



(a) (b)

Figure 5.13 SEM images for samples with volumetric mixing ratio $AgNO_3$ 10 mM : *Salvia officinalis* extract equal to 5 : 1, (a) conglomerates with fractal crystallization pattern, (b) particles with nanometric dimensions.



(a) (b)

Figure 5.20 SEM images of the nanoparticles highlighted for samples with volumetric mixing ratio $AgNO_3$ 10 mM : *Salvia officinalis* extract equal to 1 : 4 - (a) and respectively 1: 5 - (b).

In order to obtain informations on the stoichiometry of the reaction medium of the entire equilibrium process, the mixture was initially tested at room temperature by recording the UV-VIS spectrum and the silver nitrate content was systematically varied (0 - 100%); UV-VIS spectra were recorded for information on the reaction products. The stages of the experimental approach were performed to obtain information related to the optimal volumetric ratio of silver nitrate : plant extract necessary for the synthesis of stable silver nanoparticles.

The experimental results indicated an optimal mixing ratio of the precursors equal to 1 : 1 (10 mM silver nitrate solution : sage extract) in the case of silver nanoparticles biosynthesis with *Salvia officinalis* extract at ambient temperature.

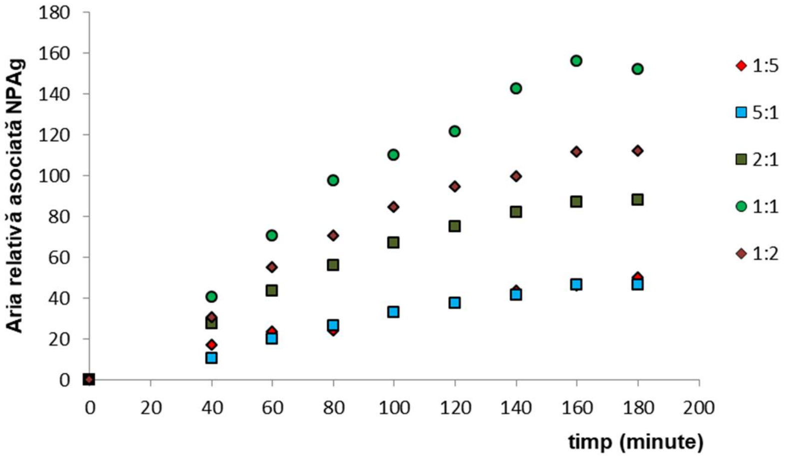


Figure 5.22 The evolution of the relative area in time, calculated from the UV-VIS spectrum, associated with the silver nanoparticles, within 3 hours from the beginning of the synthesis (25°C) for different volumetric mixing ratios of the precursors (*Salvia officinalis* extract : silver nitrate 10 mM).

By representing the relative area according to the volumetric content of silver nitrate in the mixture (%, v/v) at time intervals from the beginning of the synthesis (25°C), are noticed small values for a low ionic salt content, this behavior being correlated with the existence of a small number of silver nanoparticles in solution (Figure 5.24). An increase of the plasmonic response is observed in the case of an excess of ionic salt relative to the content of vegetable extract (silver nitrate content over 50%, v/v), higher values of the relative area being recorded. It follows that the initial volumetric mixing ratio of the precursors equal to 1 : 1 can be considered as optimal for the biosynthesis of silver nanoparticles with *Salvia officinalis* extract at 25°C.

5.3.2 The pH effect

The pH is an important experimental parameter in the growth dynamics of silver nanoparticles because its value can influence most of the equilibria involved in the process. The tested samples, obtained by mixing sage extract with pH buffer solution in different proportions, showed stable pH values.

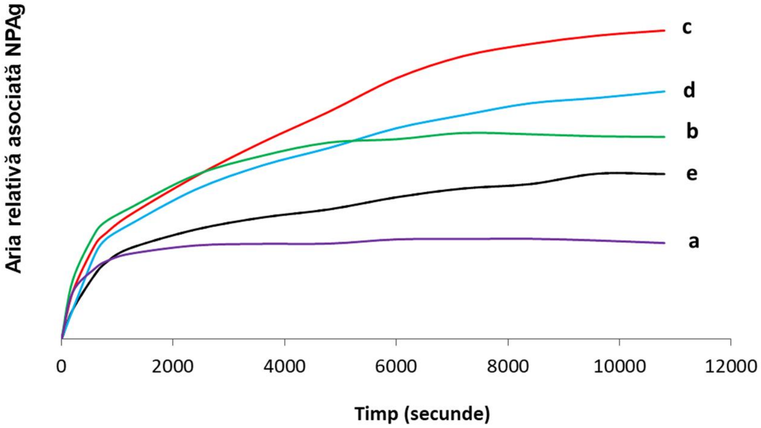


Figure 5.25 Variation of relative area over time in basic environment (pH = 11.5) for different mixing ratios (v/v) silver nitrate : sage extract: (a) 1:5, (b) 1:2, (c) 1:1, (d) 2:1 and (e) 5:1 [219].

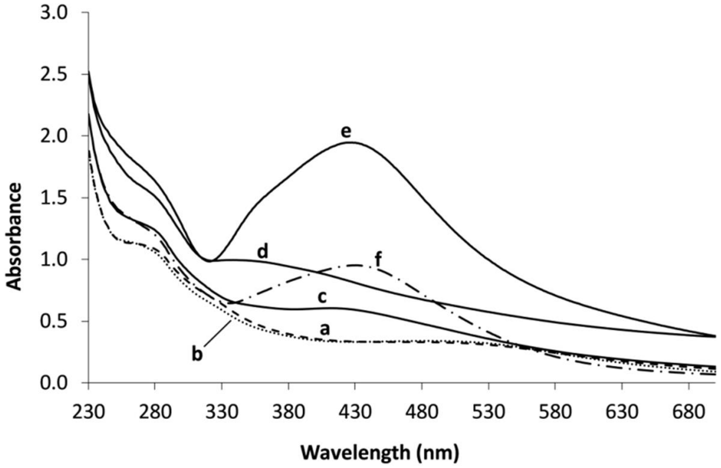


Figure 5.26 UV-VIS absorption spectra for silver nanoparticle solutions, at a volumetric mixing ratio of silver nitrate : sage extract equal to 1 : 1, at different pH values: (a) pH = 2.3, (b) pH = 2.8, (c) pH = 6.3, (d) pH = 10.5, (e) pH = 11.8, (f) pH = 6.8 (without pH buffer) [219].

The evolution of the relative growth rate (calculated as the slope of the line on the linear portion of the variation of the relative area over time), at different pH values, for the volumetric mixing ratio of silver nitrate : *Salvia officinalis* extract equal to 1 : 1, is shown in the table 5.4. The values v_1, v_2, v_3 and v_4 respectively correspond to the four stages of the nanoparticle growth process corresponding to the model proposed in the presented study. The relative areas are attributed to the plasmonic response of silver nanoparticles and the calculation method has been detailed previously.

Table 5.4 The values of the relative growth rate of the relative area associated with the silver nanoparticles at different pH values for mixing ratio (v/v) silver nitrate : *Salvia officinalis* extract equal to 1:1.

pH of the synthesis mixture	***Relative speed of increase of relative area (arbitrary units / second)***			
	v_1	v_2	v_3	v_4
6.8 (without pH buffer)	0.0176	0.0021	0.0138	0.0052
11.8	0.4439	0.0025	-	-
10.5	0.0255	0.0031	0.0081	0.0049
6.3	0.0106	0.0023	0.0092	0.0072
2.8	0.0098	0.0023	0.0072	0.0030
2.3	0.0028	0.0002	0.0061	0.0009

The speed associated with the first stage of the growth process (v_1) has high values in the case of mixtures with alkaline pH which can be attributed to the formation of silver oxide. As a result, in the alkaline solution, in the initial phase, the oxidation of silver to silver oxide plays an important role in the overall mechanism of silver nanoparticle formation.

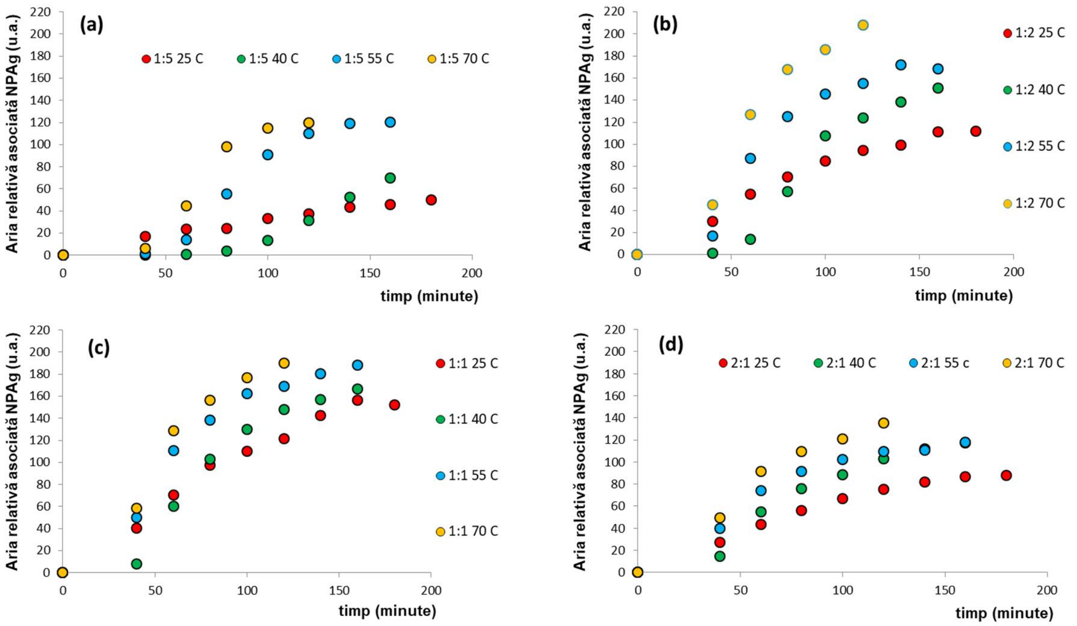
The infrared spectroscopy analysis aimed to identify the structural changes that would suggest the nature of the interactions between the silver nanoparticles and the components of the plant extract, at different pH values, and also to observe potential correlations with the characterization methods of the plant extract. The recorded spectra were obtained for obtaining information on the structural characteristics and the modifications that would result as a result of the pH change of the aqueous solution in which the silver nanoparticles were synthesized [272]. The changes observed in the IR spectra of the extract in acid and alkaline environment can be attributed to the structural changes due to the hydrolysis of the amide groups; this could also explain the changes in the IR spectra of sage extract after the addition of silver nitrate and the weak plasmonic response of the mixture silver nitrate : vegetable extract in acid solution.

The FTIR analysis (performed for the vegetable extract, in neutral, acidic and basic solution, and for the synthesis mixtures respectively) showed in the IR spectra for the plant extract a wide absorption band with a maximum centered at 3400 cm^{-1} which can be correlated with the content of phenolic compounds highlighted by determinations made for the content of total phenols, flavonoids and tannins. On the other hand, structural changes were identified, in the case of the vegetable extract in acid and alkaline solution, consisting of the displacement of some peaks and the appearance of new ones, which were associated with the action of the hydroxide or acid introduced into the solution. Significant changes were observed in the range 1600-1800 cm^{-1}, due to the stretching vibrations of C-O bonds specific to compounds with carbonyl groups. Following the addition of silver nitrate to the plant extract, some peaks were displaced after the formation of the metal nanoparticles; these displacements can be associated with the interactions between some functional groups of the organic species with the metal nanoparticles at the metal-solution interface.

5.3.3 The temperature effect

In this section are presented a number of issues related to the influence of temperature on the biosynthesis process of silver nanoparticles with the use of *Salvia officinalis* extract. It is known that the reaction temperature plays an important role in the spatial and dimensional distribution of the particles, especially in the case of silver nanoparticles [92]. The experimental determinations based on the involved procedure are intended to optimize the experimental parameters of the studied biosynthesis process taking into account the changes in the UV-VIS spectrum.

Figure 5.31 shows the variation of the relative area in time, associated with silver nanoparticles in the first three hours from the beginning of the synthesis at different working temperatures and mixing ratios of the precursors.



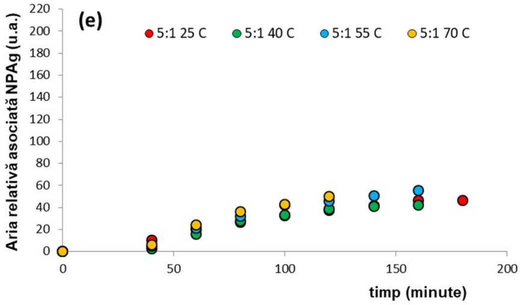
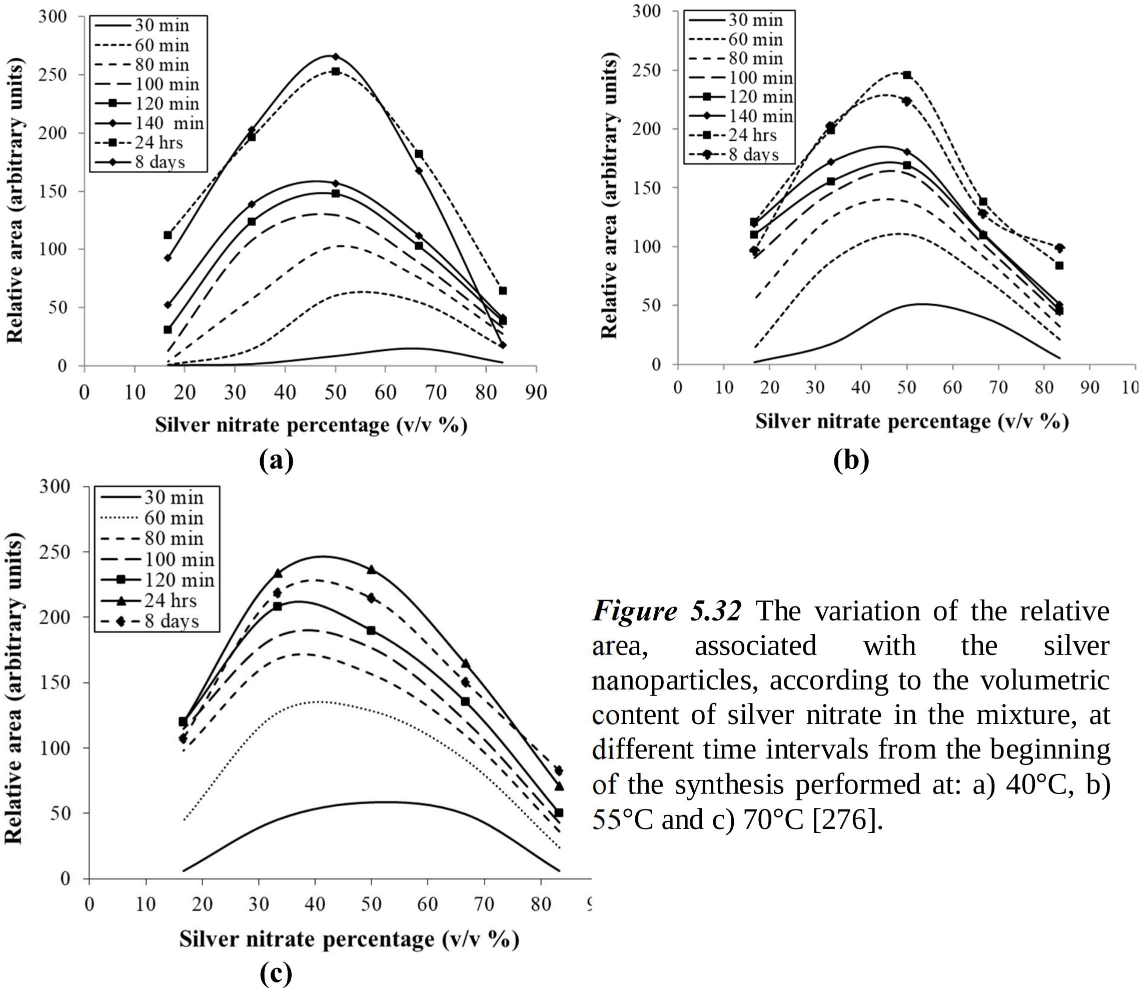


Figure 5.31 The evolution in time of the relative area, calculated from the UV-VIS spectrum, associated with silver nanoparticles, within 3 hours from the beginning of the synthesis at 25, 40, 55 and 70°C, respectively, for volumetric mixing ratios *Salvia officinalis* extract : 10 mM silver nitrate equal to: a) 1:5, b) 1:2, c) 1:1, d) 2:1 and e) 5:1.

The recording of the UV-VIS spectra for the studied mixtures (Figures 5.1-5.3 - Annex 5) allowed the calculation of the relative area associated with the silver nanoparticles present in the solution (Figure 5.31), while a number of changes in the spectra aspect can be highlighted: when the ionic salt is in excess (volumetric ratios of silver nitrate : extract greater than 1 : 1); the displacement of λ_{max} to higher values may be correlated with the formation of larger nanoparticles and a thinner coating.

The results obtained suggest that the formation of silver nanoparticles following the biosynthesis process with *Salvia officinalis* extract is based on a balance capable of determining a continuous change in the shape and size of the nanoparticles depending on the Ag^+ / reducing species ratio and stabilizing species.



(a)

(b)

(c)

Figure 5.32 The variation of the relative area, associated with the silver nanoparticles, according to the volumetric content of silver nitrate in the mixture, at different time intervals from the beginning of the synthesis performed at: a) 40°C, b) 55°C and c) 70°C [276].

Figure 5.32 shows, in the first three hours after the beginning of the synthesis, an initial optimum volumetric ratio of silver nitrate mixing: sage extract equal to 1 : 1 at 40 and 55°C respectively, with maximum values of the relative area being obtained for this ratiot. When the temperature rises to 70°C the maximum of the relative area moves to lower values of the silver nitrate content in the solution, this behavior being an indication of the aggregation of the synthesized nanoparticles [265, 277].

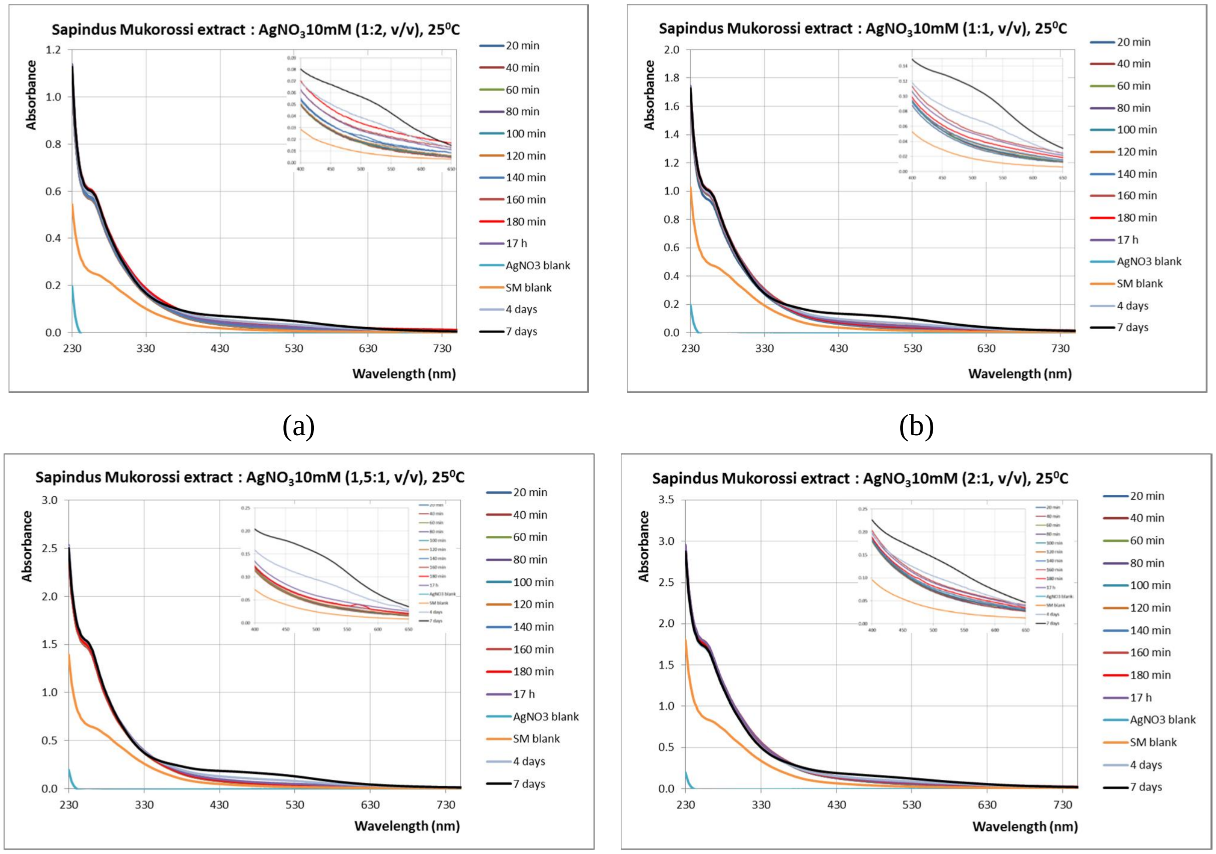
5.4 Silver nanoparticles synthesis using *Sapindus mukorossi* extract

The experimental study has investigated initially the behavior of *Sapindus mukorossi* extract as a reducing and stabilizing agent for the synthesis of silver nanoparticles using as a precursor 10 mM silver nitrate solution. Tests were carried out with samples having variable proportions (volumetric ratios) of the extract maintaining the ionic salt content constantly, at a pH of the synthesis mixture due to the plant extract (Table 5.6).

Table 5.6. Synthesis mixtures used for silver nanoparticles generation (3 hours / 25^0C) with *Sapindus mukorossi* extract / $AgNO_3$ 10 mM solution.

Curr. no.	***Sample code***	***Volumetric ratio extract : ionic solution***	***Modul de preparare al amestecurilor de sinteză***			***pH***
			Bidistilled water (ml)	*Sapindus mukorossi* extract (ml)	$AgNO_3$ 10mM solution (ml)	
1	SM0.5-1Ag10	1 : 2	48.50	0.50	1.00	4.51
2	SM1-1Ag10	1 : 1	48.00	1.00	1.00	4.33
3	SM1.5-1Ag10	1.5 : 1	47.50	1.50	1.00	4.34
4	SM2-1Ag10	2 : 1	47.00	2.00	1.00	4.28

For UV-VIS analysis, control samples with the same volumetric extract ratios were used, at dilutions identical to the samples of colloidal silver nanoparticle solutions obtained.



(a) (b)

(c) (d)

Figure 5.35 UV-VIS spectra recorded for mixtures of *Sapindus mukorossi* extract and 10 mM silver nitrate (static contact / 25°C / acid pH of the reaction medium due to the plant extract) at different volume ratios: a) 1:2, b) 1:1, c) 1.5:1 and d) 2:1 (insertion: spectral interval 400 ï 650 nm).

The data obtained from the UV-VIS analysis show an extremely slow reduction of silver ions by the compounds present in the plant extract under the established synthesis conditions (static contact / 25°C / acid pH of the reaction medium due to the plant extract).

However, it can be observed (Figure 5.35 - b, c) the formation of nanoparticles especially at the volumetric ratios 1:1 and 1.5:1 (corresponding to volumetric concentrations of extract in mixture of 2% and 3% respectively). In this concentration range, the value of the critical micellar concentration of the extract was also determined - 2.7% average value (Chapter 5.2 - Characterization of *Salvia officinalis* and *Sapindus mukorossi* extracts); this behavior suggests the favorable involvement of the micelles formed in solution in the process of reducing and stabilization of the silver nanoparticles.

5.4.1 The pH and ionic salt : extract ratio influence

In the next stage of the experimental study the synthesis of silver nanoparticles was performed for five concentration values of the extract in the mixture (around the average critical micellar concentration determined - 2.7%) at 25ºC; the mixture was monitorised by UV-VIS analysis in the range 230-750 nm (as control samples were used extract samples - diluted with bidistilled water - at concentrations similar to the tested mixtures).

After a period of three hours after contacting the components, there was no significant change in the color of the solution which could be a first indication of the presence of silver nanoparticles. The mixture samples were further maintained at ambient temperature and analyzed by UV-VIS spectrophotometry 24 hours after the beginning of the synthesis. At 24 hours after mixing, the color of the mixtures was visibly changed, indicating the presence of silver nanoparticles in the colloidal solution.

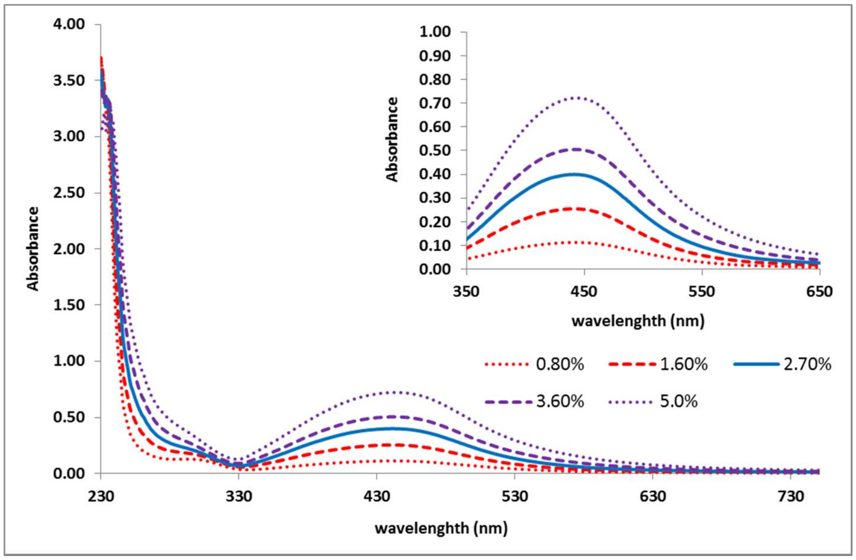
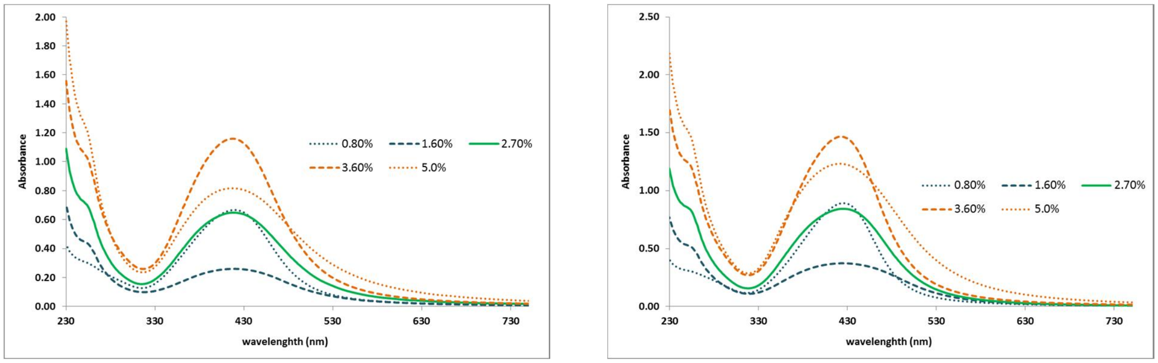


Figure 5.37 UV-VIS spectra recorded for colloidal silver nanoparticles solution for synthesis with *Sapindus mukorossi* extract / 10 mM silver nitrate (static contact / 25°C / 24 hours) depending on the concentration of the extract in the mixture (% vol).

From figure 5.37, it can be observed the increase of the absorption maximum with the increase of the concentration of the extract in the mixture, especially at values higher than the critical micellar concentration (2.7%). The absorption peaks generally retain the same absorption band shape centered at approximately 440 nm. In the tested synthesis conditions it is found that there is a very slow global synthesis process.

The results obtained at this stage suggest an important influence of the pH reaction medium in the process of reducing and stabilizing. As a result, in a second phase of the experimental study, the behavior of the synthesis mixtures at basic pH values was investigated (pH adjustment was performed with 1M potassium hydroxide solution), constantly maintaining the volumetric mixing ratio of the components extract : ionic salt equal to 1:1.

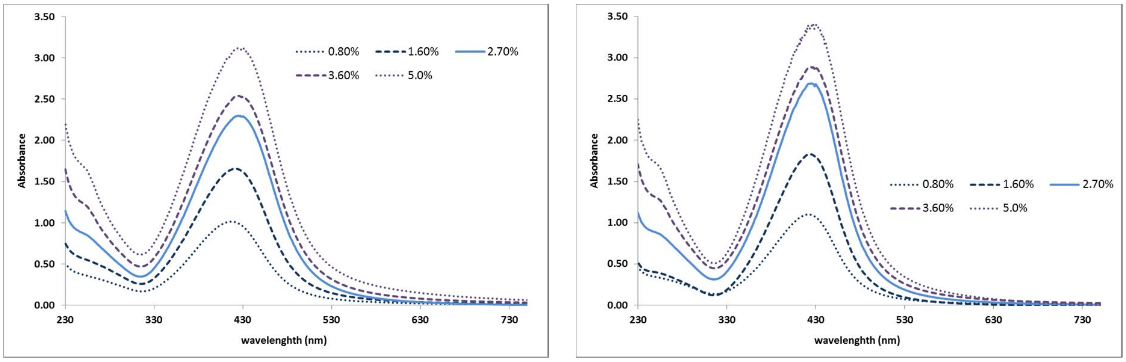


(a) (b)

Figure 5.41 UV-VIS spectra recorded for colloidal solution of silver nanoparticles for synthesis with *Sapindus mukorossi* extract / 10 mM silver nitrate (static contact / 25°C / basic pH) depending on the concentration of the extract in the mixture (% vol): a) 3 hours; b) 3 days.

For both the acidic and basic pH values, the formation of the nanoparticles is influenced by the concentration of the extract in the synthesis mixture being noticeable at values higher than the critical micellar concentration.

In the third phase of the experimental study, the synthesis was performed at basic pH values (pH adjustment with 1M KOH solution), maintaining constant (1:1) the mixing ratio between the components of the mixture (extract: ionic solution) and at pH values of the mixture due to the vegetable extract (acidic pH) modifying the mixing ratio between the components (1:4, 1:2, 1:1, 2:1 and 4: 1); the synthesis was performed for five concentration values (around the determined average critical micellar concentration - 2.7%) at 25°C (thermostatic water bath) with 10 mM $AgNO_3$ solution, by static contact. The mixture was monitored by UV-VIS analysis (range 230-750 nm, as control extract samples were used - dilution with bidistilled water - at concentrations in extract similar to the tested mixtures).



(a) (b)

Figure 5.43 UV-VIS spectra recorded for colloidal solution of silver nanoparticles for synthesis with *Sapindus mukorossi* extract / 10 mM silver nitrate (static contact / 25°C / basic pH) depending on the concentration of the extract in the mixture (% vol): a) 3 hours; b) 3 days.

The observed trends cannot be interpreted only considering mainly the stabilizing role of the extract, being expected that an increase of its concentration will lead to smaller dimensions of the nanoparticles, the role of the extract being not limited to that of reducing / stabilizing agent. The results suggest that the dimensional distribution of silver nanoparticles is determined by a balance between the reactivity of the precursors and coalescence in the initial period, which could be influenced by controlling the initial pH of the reactants respectively of the reaction mixture.

5.4.2 Critical micellar concentration influence

The influence of micellar critical concentration (CMC) has been noticed since the beginning of the study of the synthesis of silver nanoparticles with *Sapindus mukorossi* extract. As a result, in the present subchapter, a more detailed study was conducted with emphasis on this feature of the extract.

The synthesis of silver nanoparticles was achieved by mixing the extract with 10 mM silver nitrate solution in different proportions in acidic and basic medium; for the experiments performed in acidic medium, the acidity of the medium (pH = 4.4) was provided by the extract after mixing the precursors. The basic medium was adjusted with 1M sodium hydroxide solution to a pH value of 8.2.

Figure 5.46 shows the UV-VIS absorption spectra for the solutions with silver nanoparticles obtained by mixing the precursors (extract: ionic solution) in a volumetric ratio of 1:1. The insertion of the diagram shows the variation of the relative area associated with the nanoparticles according to the extract content of the synthesis mixture.

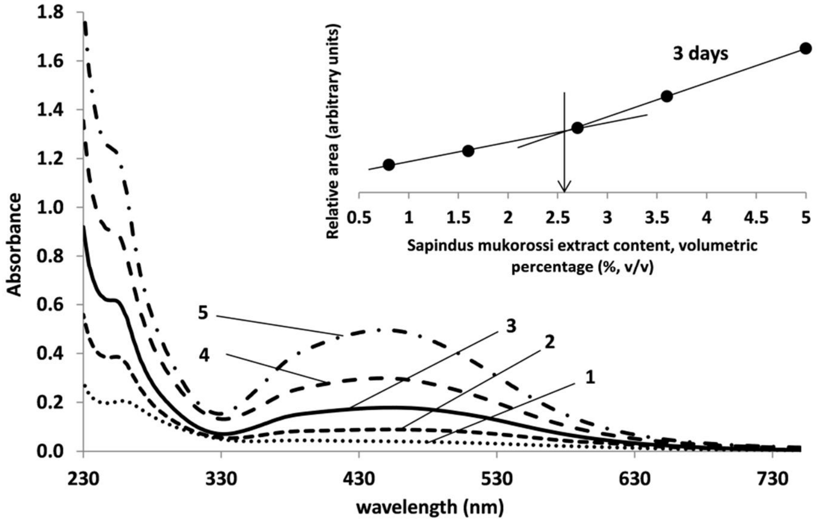


Figure 5.46 UV-VIS absorption spectra (72 hours / acid medium, pH = 4.4, 1:1 synthesis volumetric ratio, *Sapindus mukorossi* extract : silver nitrate) for nanoparticle solutions at different values of the extract concentration in the mixture (%, v/v): 1) 0.8%, 2) 1.6%, 3) 2.7%, 4) 3.6% and 5) 5% [213].

Both the control samples (the extract solutions at the appropriate dilutions) and the synthesis mixtures recorded a pH around 4.4 indicating the buffering property of the plant extract. The pH value correlates with the structure of the saponins, as weakly acidic species, present in the aqueous extract of *Sapindus mukorossi* [239]. Under the applied synthesis conditions the formation of nanoparticles is a very slow process, noticeable changes in both the color of the solutions (colorless to pale pink and red) and the UV-VIS spectra were observed at 72 hours after the precursors were contacted.

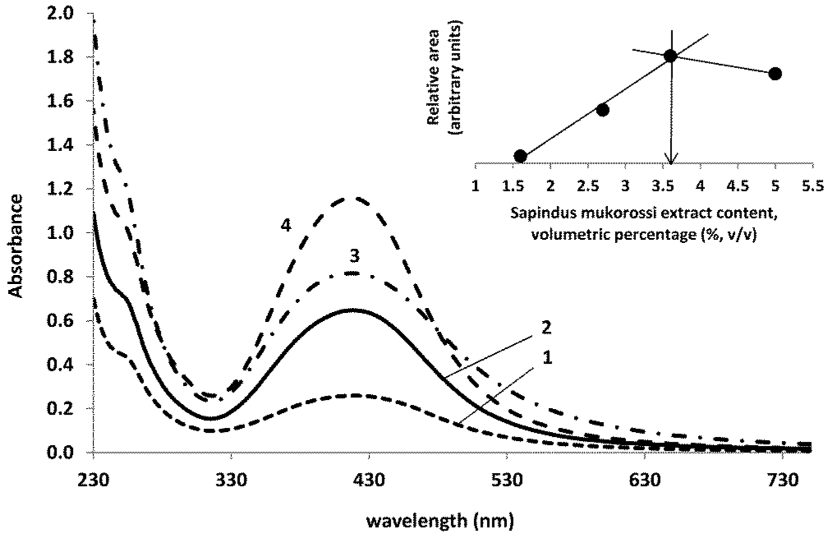


Figure 5.47 UV-VIS absorption spectra (3 hours / basic medium, pH = 8.2, 1:1 synthesis volume ratio, *Sapindus mukorossi* extract : silver nitrate) for nanoparticle solutions at different values of the concentration of the extract in the mixture (%, v/v): 1) 1.6%, 2) 2.7%, 3) 3.6% and 4) 5% [213].

The CMC values determined from the variation of the relative areas in the basic environment, corresponding to the turning point, showed similar values in both cases: 3.65±0.19% at 3 hours and 3.68±0.12% respectively at 72 hours. The increase of the CMC value in the basic environment compared to the acidic environment can be associated with the existence of the chemical acidic weak species from the extract, with the addition of the alkaline solution (potassium hydroxide) the acid functional groups suffering a deprotonation forming a mixture of compounds with a weak hydrophobic character. The decrease of the hydrophobic nature of the solutions can lead to higher CMC values.

The FTIR profile of plant extract and synthesized silver nanoparticles highlights the existence of biomolecules, with specific functional groups of flavonoids and saponins, which can act as stabilizers of nanoparticles [282]. These observations suggest stabilization of silver nanoparticles through functional groups associated with biomolecules such as flavonoids and saponins, present in the extract; these interactions result through carboxylic groups from the saponins as well as carbonyl groups from the structure of flavonoids [52, 282].

XRD diffractograms in the case of the control samples (extract) show a well-defined maximum in the 2ẽ range of 10-25° narrow maxima being absent, thus suggesting the amorphous character of the dry aqueous extract. For the synthesis mixtures the intensity of the maximum associated with the amorphous character decreases as the content of the extract content in the mixture increases with the appearance of narrow maxima, suggesting the formation of crystalline compounds during the synthesis. The simultaneous presence of the amorphous and crystalline phase after synthesis suggests the attachment of some compounds from the extract to the formed nanoparticles, behavior that would confirm the results obtained by ultraviolet-visible and infrared spectroscopy. XRD analysis confirmed the presence of crystalline silver in the studied samples especially in the case of the volumetric synthesis ratio equal to 1:1 and below, the presence of unreacted silver nitrate being also highlighted. By referring also to a series of literature data [283, 284] the X-ray diffraction allowed to obtain information regarding the identification of the nanoparticles and the evolution of the crystallinity of the investigated samples.

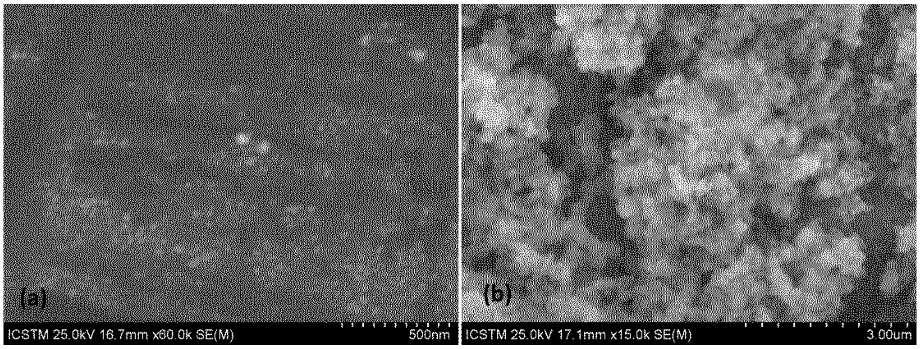


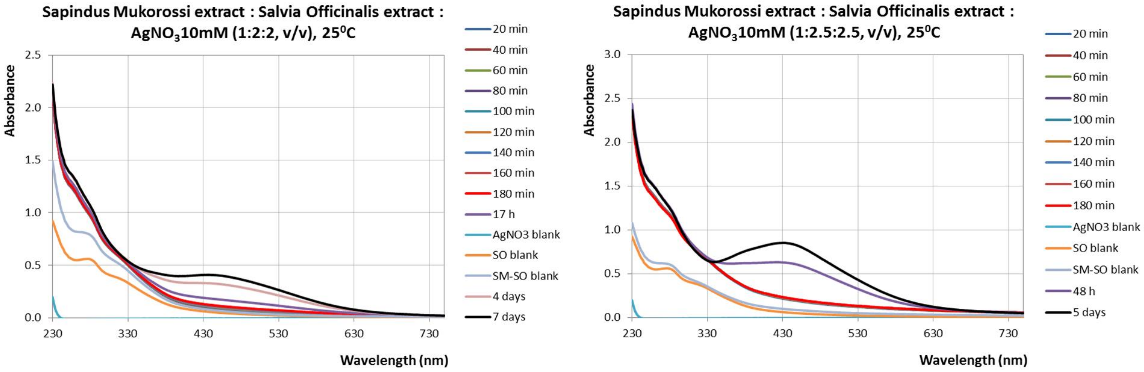
Figure 5.51 SEM images of the synthesis mixture extract *Sapindus mukorossi* : 10 mM silver nitrate equal to 1:1 for values of the extract content in the mixture (% vol) of a) 0.8% and b) 2.7%.

5.5 Silver nanoparticles synthesis using extract mixture of *Salvia officinalis* and *Sapindus mukorossi*

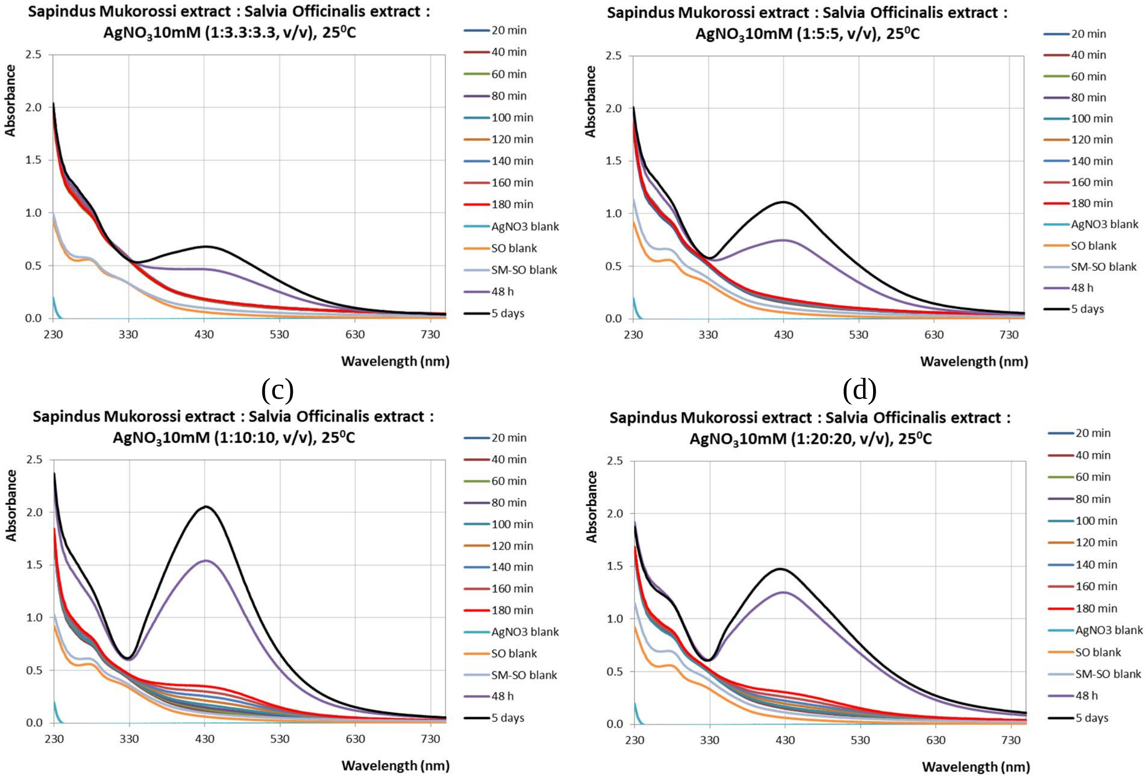
5.5.1 The mixing ratio effect between *Salvia officinalis* and *Sapindus mukorossi* extracts

The experimental study followed the behavior of the mixture of aqueous extracts (*Salvia officinalis* and *Sapindus mukorossi*) as reducing and stabilizing agent for the synthesis of silver nanoparticles using as a precursor 10 mM silver nitrate solution. Sample tests were performed with varying proportions (volumetric ratios) of the two extracts, maintaining the ionic salt content constantly, at a pH of the synthesis mixture due to the two extracts.

The samples were analyzed by UV-VIS spectrometry in the range 230-750 nm (wavelength accuracy: ± 0.8 nm, repeatability: ≤ 0.1 nm, photometric range: >3.5 A) by continuous monitoring for 3 hours (25°C) at 20 minutes interval; subsequently monitoring was carried out at longer intervals to observe the changes occurring in the UV-VIS spectrum. For analysis, control samples with the same volumetric ratios of extracts were used at dilutions identical to the samples of colloidal solutions of silver nanoparticles.



(a) (b)



(c) (d)

(e) (f)

Figure 5.54 UV-VIS spectra recorded for the synthesis mixture *Sapindus mukorossi* extract : *Salvia officinalis* extract : 10 mM $AgNO_3$ (25°C) at volumetric ratios of: a) 1:2:2 (pH = 6.24), b) 1:2.5:2.5 (pH = 6.32), c) 1:3.3:3.3 (pH = 5.87), d) 1:5:5 (pH = 6.15), e) 1:10:10 (pH = 6.62) and f) 1:20:20 (pH = 6.90).

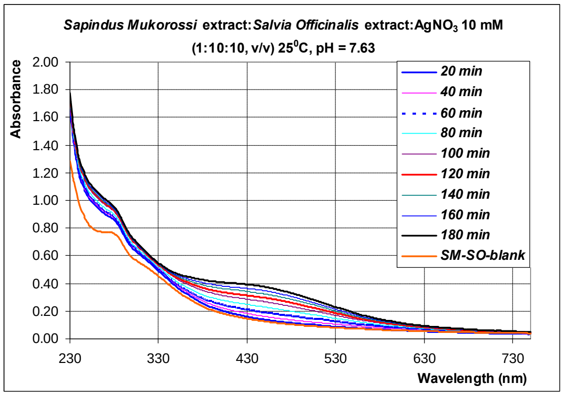
For mixing ratios between components in which *Salvia officinalis* extract and silver nitrate are in excess of *Sapindus mukorossi* extract (1:2:2 → 1:20:20, Figure 5.54) during initial monitoring (3 hours at 20 minutes interval), significant changes in the spectrum were observed especially for the mixing ratios 1:10:10 and 1:20:20 respectively (Figure 5.54 - e, f).

Scanning electron microscopy (SEM) analysis was used to characterize the size, shape and morphology of the synthesized silver nanoparticles. From the SEM images we could observe the formation of some conglomerates whose size is reduced as the content of extract of *Sapindus mukorossi* decreases in the synthesis mixture; the same tendency also occurs with respect to the size of the approximately spherical silver nanoparticles and their number (the reducing of the size and increasing the number of nanoparticles for the mixing ratio 1:10:10 compared to the mixing ratio 1:2:2).

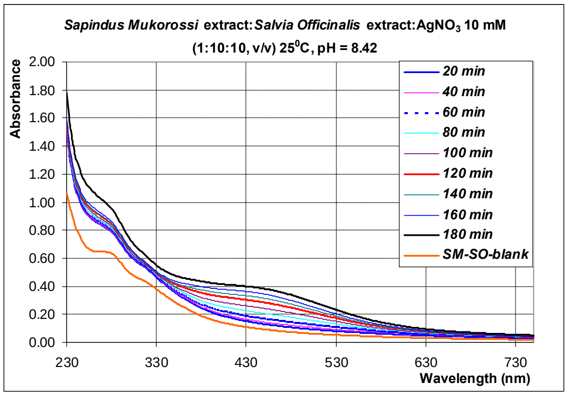
A notable difference in the case of the mixture of extracts compared to the extract of *Sapindus mukorossi* as such, is observed in the case of the volumetric ratio equal to 1:1:1 respectively to a concentration of 2% (% vol.) of the extract. The involvement of the chemical species from *Sapindus mukorossi* extract in the reduction process results especially in the case of near or higher concentrations (2%, 3% and 4%) of the critical micellar concentration, from the variation of the relative area in the first 80 minutes of contacting the precursors for the mixture of extracts compared to sage extract; should not be excluded the possibility of changing the critical micellar concentration value of *Sapindus mukorossi* extract mixed with sage as compared to the extract as such.

5.5.2 The pH effect on silver nanoparticles synthesis with extract mixture of *Salvia officinalis* and *Sapindus mukorossi*

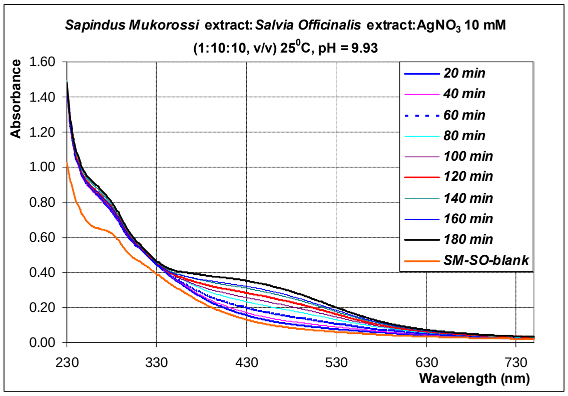
In a first phase, taking into account the previous results (studying the behavior of the mixture of extracts at varying proportions of *Sapindus mukorossi* extract at a pH due to the compounds present in the extracts), the test was performed at different (increasing) pH values by adding potassium hydroxide 0.1M. Sample tests were performed at a constant volumetric ratio of extracts of *Sapindus mukorossi* and *Salvia officinalis* and of $AgNO_3$ solution respectively.



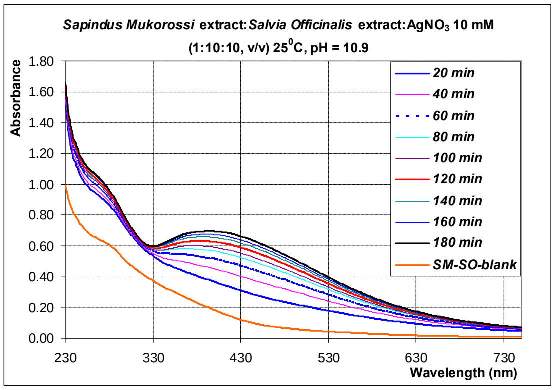
(a)



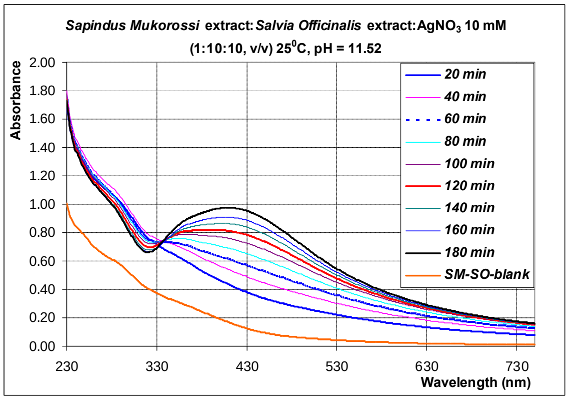
(b)



(c)



(d)



(e)

Figure 5.68 UV-VIS spectra recorded for the mixture of *Sapindus mukorossi* and *Salvia officinalis* extracts / 10 mM silver nitrate at alkaline pH of the reaction medium: a) pH = 7.63; b) pH = 8.42; c) pH = 9.93; d) pH = 10.9; e) pH = 11.56.

6. SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF COMPOSITE HYDROGELS WITH SILVER NANOPARTICLES GENERATED USING *SALVIA OFFICINALIS* AND *SAPINDUS MUKOROSSI* EXTRACTS

The synthesis of nanomaterials hydrogel-type based on hybrid polymer matrix (the polymeric matrix was based on two components, a synthetic polymer - polyacrylamide or polyvinyl alcohol - and a natural polymer or a derivative thereof - starch or collagen hydrolysate) was performed having in view to obtain materials - biocompatible, non-toxic, with antimicrobial potential - with silver nanoparticles for biomedical applications, the synthesis stages involving avoiding the use of chemical reagents with toxic potential and at the same time applying a "green synthesis" process. The incorporation of silver nanoparticles into the polymeric matrix was accomplished by the *in situ* method through a natural extract acting as reducing and stabilizing agent.

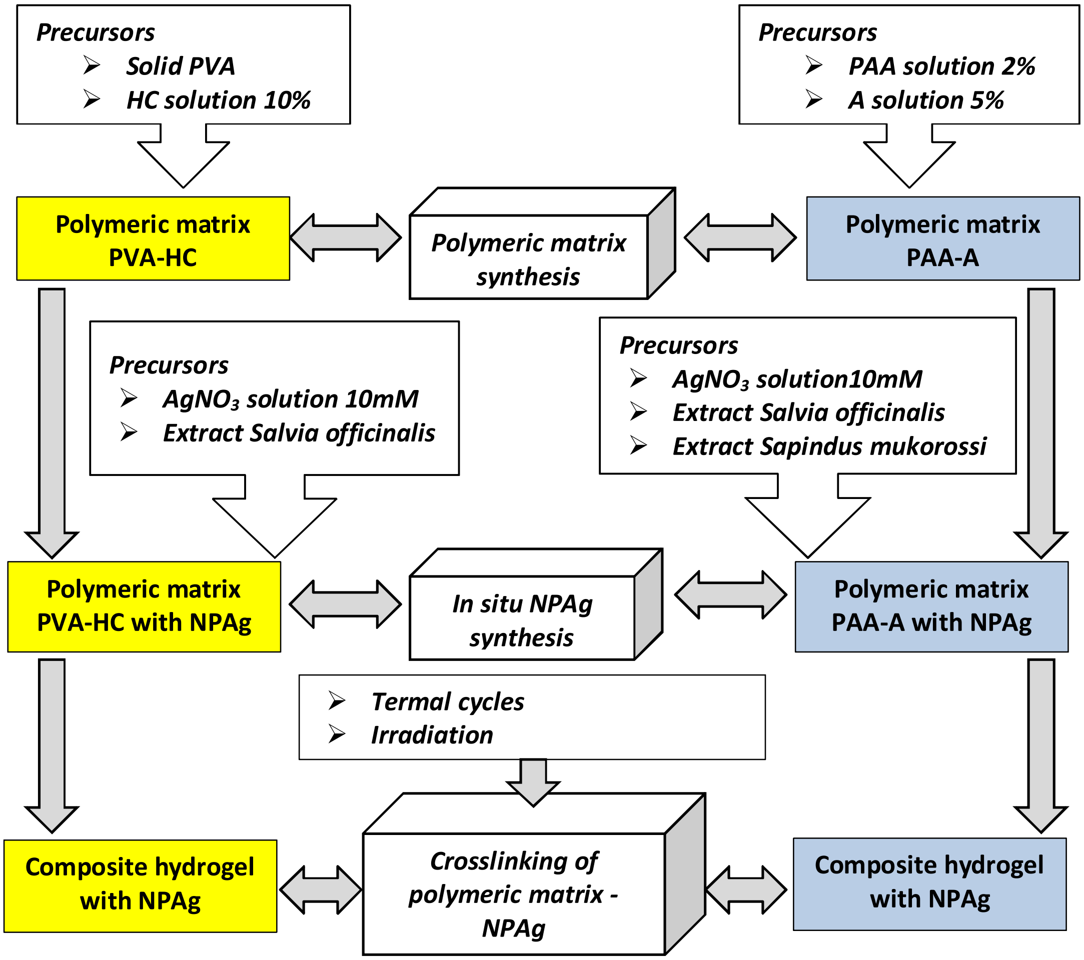


Figure 6.1 Synthesis of composite hydrogels with polymeric matrix based on polyvinyl alcohol (PVA) ï collagen hydrolisate (HC) and polyacrylamide (PAA) - starch (A) and silver nanoparticles (NPAg).

The experimental approach to obtain hydrogel-type nanomaterials was aimed to apply synthesis conditions which involve reducing the involvement of potentially toxic chemical agents and applying processes that affect to a limited degree the natural precursors (plant extracts). The general scheme of synthesis of composite hydrogels with polymeric matrix based on polyvinyl alcohol (PVA) - hydrolysed collagen (HC) and polyacrylamide (PAA) - starch (A) respectively is shown in figure 6.1.

The crosslinking of the polymeric matrix was performed either by thermal freeze-thaw cycles (the material samples were subjected to 3 thermal cycles each cycle consisting of 23 hours maintenance at -20°C followed by one hour maintenance at 25°C ambient temperature) or by ***irradiation with ionizing radiations*** (at irradiation doses of 20 kGy and 50 kGy respectively). After crosslinking the material samples were stored in the dark (9ºC) throughout performed tests / analyzes. The modality of crosslinking of the polymeric matrix envisaged a number of aspects from which can be mentioned: avoiding the use of chemical reagents with toxic potential and that could interact with the compounds present in the plant extracts, the nature of the polymeric matrix components and consequently the possible modifications induced by the method of applied crosslinking, the modifications induced on the compounds in the composition of the plant extracts.

6.1 The ultraviolet-visible spectroscopy study of composite hydrogels with silver nanoparticles, with polymeric matrix polyvinyl alcohol-collagen hydrolysate and polyacrylamide-starch

6.1.1 Composite hydrogel with polymeric matrix PVA-HC crosslinked by temperature cycles

The hydrogel samples were previously diluted and homogenized by magnetic stirring for one hour at 25°C. There were used as control samples for comparing, samples of polymeric matrix as such, polymeric matrix with *Salvia officinalis* extract and polymeric matrix with silver nitrate respectively.

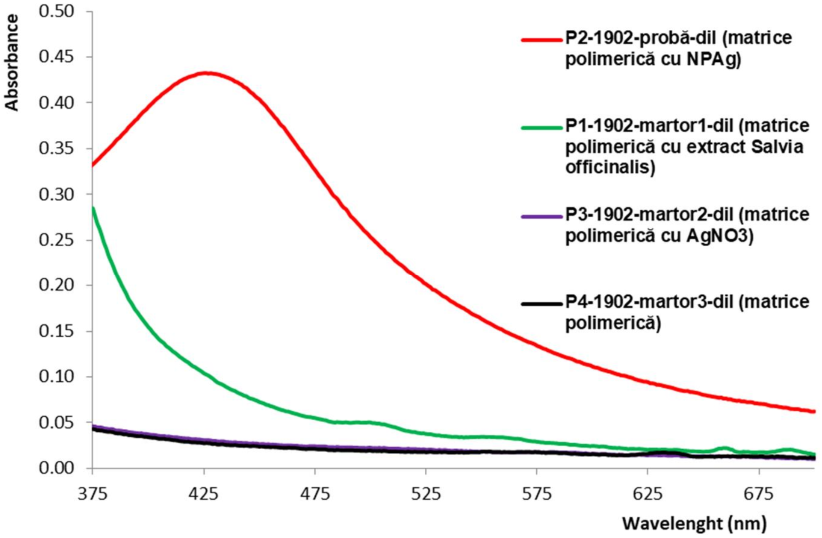


Figure 6.5 UV-VIS absorption spectra for composite hydrogel based on PVA-HC matrix with crosslinking through temperature cycles - diluted samples (after the crosslinking step).

The presence of silver nanoparticles can be highlighted in the UV-VIS absorption spectrum (Figure 6.5) by the existence of a well-defined absorption maximum (located at 425.68 nm / 0.433 - absorbance) present only in the hydrogel sample spectrum with silver nanoparticles. The aspect of the absorption band suggests the existence of nanoparticles in solution with a relatively narrow particle size profile, specifying that the sampling for analysis was performed from the supernatant and existing therefore the possibility of nanoparticles in the matrix of the hydrogel that did not migrate in aqueous solution.

6.1.2 Composite hydrogel with polymeric matrix PVA-HC crosslinked by irradiation

Table 6.2 Method of preparing the composite hydrogel with PVA-HC matrix crosslinked by irradiation for UV-VIS analysis

Sample code	***Sample dilution for UV-VIS analysis***	***Observations***
P1-0412-ir-20-dil	2 ml sample (2.05 g) / 38 ml bidistilled water	Polymer matrix control sample with *Salvia officinalis* extract (irradiation at 20 kGy). The scan was performed within 5 days of the completion of the crosslinking step. Translucent, colorless appearance. The spectrum has no absorption maxima.
P1-0412-ir-50-dil	2 ml sample (2.04 g) / 38 ml bidistilled water	Polymer matrix control sample with *Salvia officinalis* extract (irradiation at 50 kGy). The scan was performed within 5 days of the completion of the crosslinking step. Translucent, colorless appearance. The spectrum has no absorption maxima.
P2-0412-ir-20-dil	2 ml sample (2.06 g) / 38 ml bidistilled water	Polymer matrix control sample with NPAg (irradiation at 20 kGy). The scan was performed within 5 days of the completion of the crosslinking step. Light yellow-brown coloring. The spectrum shows an absorption band with a maximum centered at 404.82 nm / 0.292 A.
P2-0412-ir-50-dil	2 ml sample (2.04 g) / 38 ml bidistilled water	Polymer matrix control sample with NPAg (irradiation at 50 kGy). The scan was performed within 5 days of the completion of the crosslinking step. Light yellow-brown coloring. The spectrum shows an absorption band with a maximum centered at 407.34 nm / 0.323 A.
P3-0412-ir-20-dil	2 ml sample (2.05 g) / 38 ml bidistilled water	Polymer matrix control sample with $AgNO_3$ (irradiation at 20 kGy). The scan was performed within 5 days of the completion of the crosslinking step. Light yellow-brown coloring. The spectrum shows an absorption band with a maximum centered at 420.69 nm / 0.175 A.
P3-0412-ir-50-dil	2 ml sample (2.06 g) / 38 ml bidistilled water	Polymer matrix control sample with $AgNO_3$ (irradiation at 50 kGy). The scan was performed within 5 days of the completion of the crosslinking step. Light yellow-brown coloring. The spectrum shows an absorption band with a maximum centered at 417.99 nm / 0.245 A.
P4-0412-ir-20-dil	2 ml sample (2.04 g) / 38 ml bidistilled water	Polymer matrix control sample (irradiation at 20 kGy). The scan was performed within 5 days of the completion of the cross-linking step. Translucent, colorless appearance. The spectrum has no absorption maxima
P4-0412-ir-50-dil	2 ml sample (2.03 g) / 38 ml bidistilled water	Polymer matrix control sample (irradiation at 50 kGy). The scan was performed within 5 days of the completion of the cross-linking step. Translucent, colorless appearance. The spectrum has no absorption maxima

The existence of silver nanoparticles is evidenced in the UV-VIS absorption spectrum of hydrogel samples (PVA-HC polymeric matrix crosslinked by irradiation) through absorption maxima in the range 400 - 430 nm respectively: 401.18 nm / 0.294 (A) - P2- 0412-

ir-20-dil, 421.44 nm / 0.173 (A) - P3-0412-ir-20-dil, 407.61 nm / 0.325 (A) - P2-0412-ir-50-dil and 418.0 nm / 0.245 (A)) - P3-0412-ir-50-dil. In the absence of the plant extract from the synthesis mixture (samples P3-0412-ir-20-dil and P3-0412-ir-50-dil) the absorption maxima are shifted to higher wavelengths, suggesting the existence of larger nanoparticles dimensions, while the presence of the plant extract determines the movement of these maxima to smaller wavelengths; this displacement could be due to the stabilizing effect of the compounds in the plant extract which causes a dimensional stabilization of the nanoparticles.

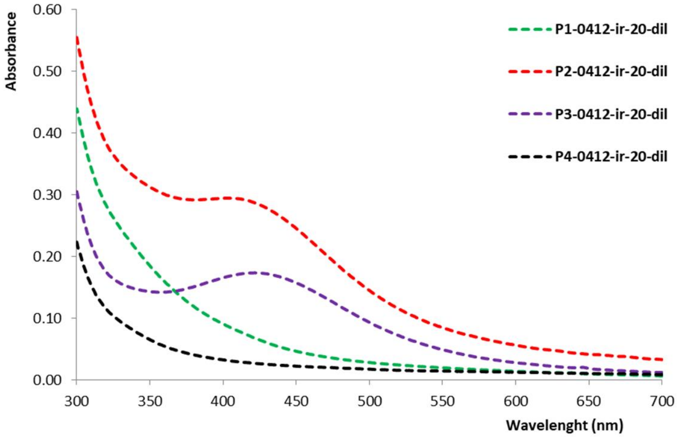


Figure 6.8 UV-VIS absorption spectrum for composite hydrogel PVA-HC matrix with irradiation crosslinking (20 kGy) - 5 days after irradiation.

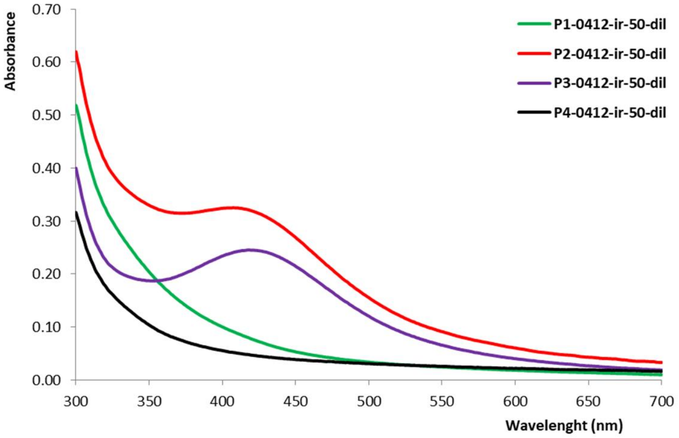


Figure 6.9 UV-VIS absorption spectrum for composite hydrogel PVA-HC matrix with irradiation crosslinking (50 kGy) - 5 days after irradiation.

The role of the vegetable extract as a reducing agent may also be suggested by the amplitude of the higher absorption maxima compared to the mixtures without vegetable extract, at both irradiation doses. At a higher dose of irradiation, it is noted an increase of the maximum absorption (especially in the case of the absence of the vegetable extract in the mixture) in the same time with a relative narrowing of the absorption band.

The data obtained could suggest a first direction of optimization of the synthesis process in order to find an optimal ratio between the irradiation dose and the extract content of the synthesis mixture.

6.1.3 Composite hydrogels with polymeric matrix PAA-A crosslinked by temperature cycles

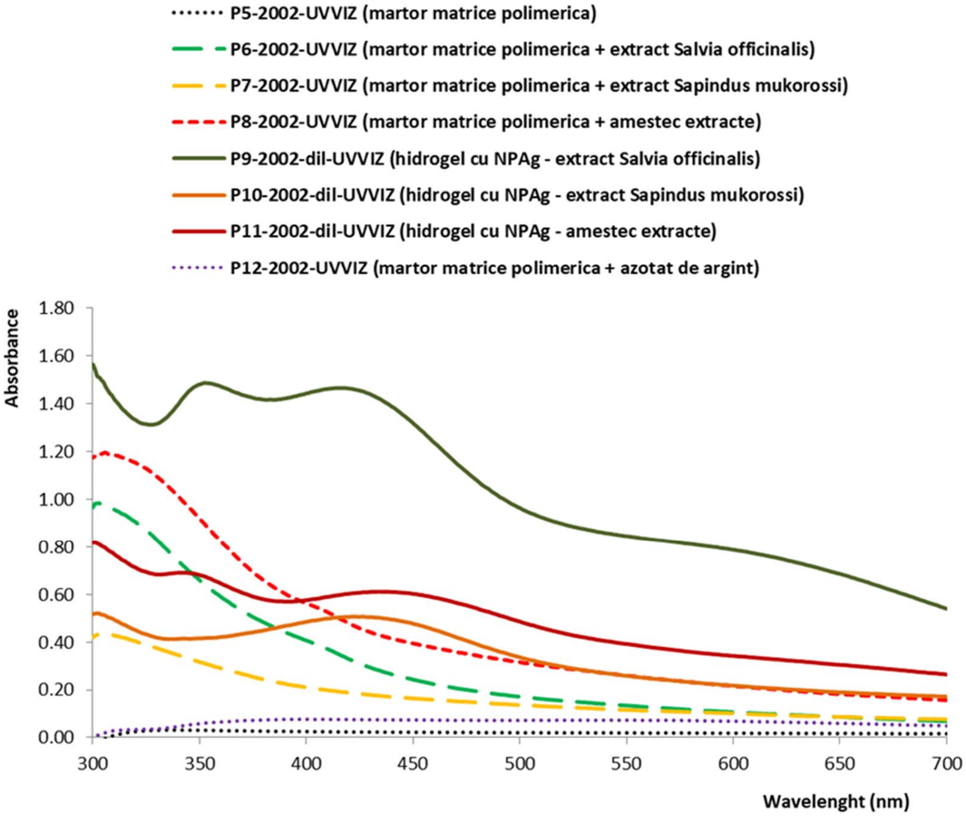
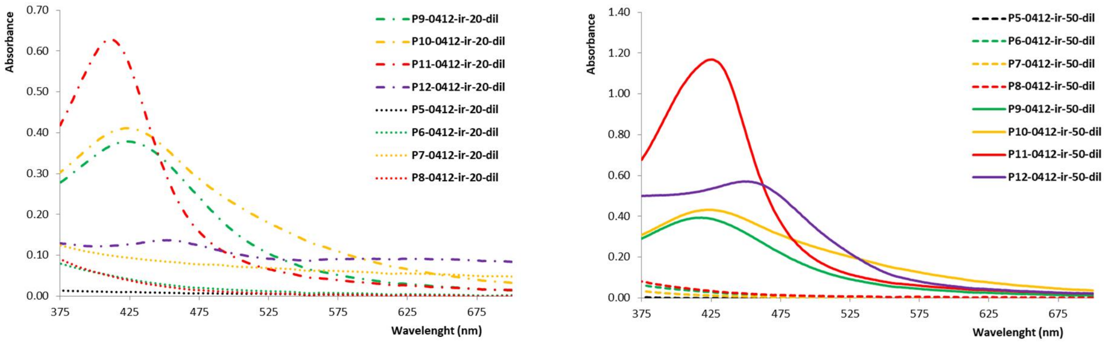


Figure 6.12 UV-VIS absorption spectra for composite hydrogels with PAA-A matrix with crosslinking through temperature cycles compared to the spectra recorded for polymer matrix controls (after crosslinking step - 14 days / blank bidistilled water)

The obtained results suggest the possibility of the compounds from *Sapindus mukorossi* extract to be involved not only in reducing, forming and stabilizing silver nanoparticles but also in the crosslinking of the basic polymeric skeleton.

For NPAg hydrogel samples, the recorded band-type maxima suggest the existence of a relatively large number of nanoparticles with a large particle size distribution. In comparison with the spectrum of plant extracts, a significant decrease of the maxima present in plant extracts can be noted, especially for the samples in which the *Salvia officinalis* extract is present. This modification could confirm the involvement of certain compounds in the *Salvia officinalis* extract in the process of reducing and stabilization of nanoparticles, which influence the process mentioned in a higher degree compared to the compounds from the *Sapindus mukorossi* extract.

6.1.4 Composite hydrogels with polymeric matrix PAA-A crosslinked by irradiation



(a) (b)

Figure 6.15 UV-VIS absorption spectra for composite hydrogels with PAA-A matrix with irradiation crosslinking compared to control sample spectra (after crosslinking / blank bidistilled water) - 60 days from synthesis: a) 20 kGy and b) 50 kGy

Stabilitatea nanoparticulelor de argint în toate sistemele testate se dovedeşte a fi deosebită pentru toate sistemele analizate la ambele doze de iradiere. Această comportare indică alături de rolul stabilizant al compuşilor din extractele vegetale şi implicare matricii polimerice / componenţilor acesteia în procesul de stabilizare a nanoparticulelor.

6.2 The infrared spectroscopy (FTIR) study of composite hydrogels with silver nanoparticles, with polymeric matrix polyvinyl alcohol-collagen hydrolysate and polyacrylamide-starch

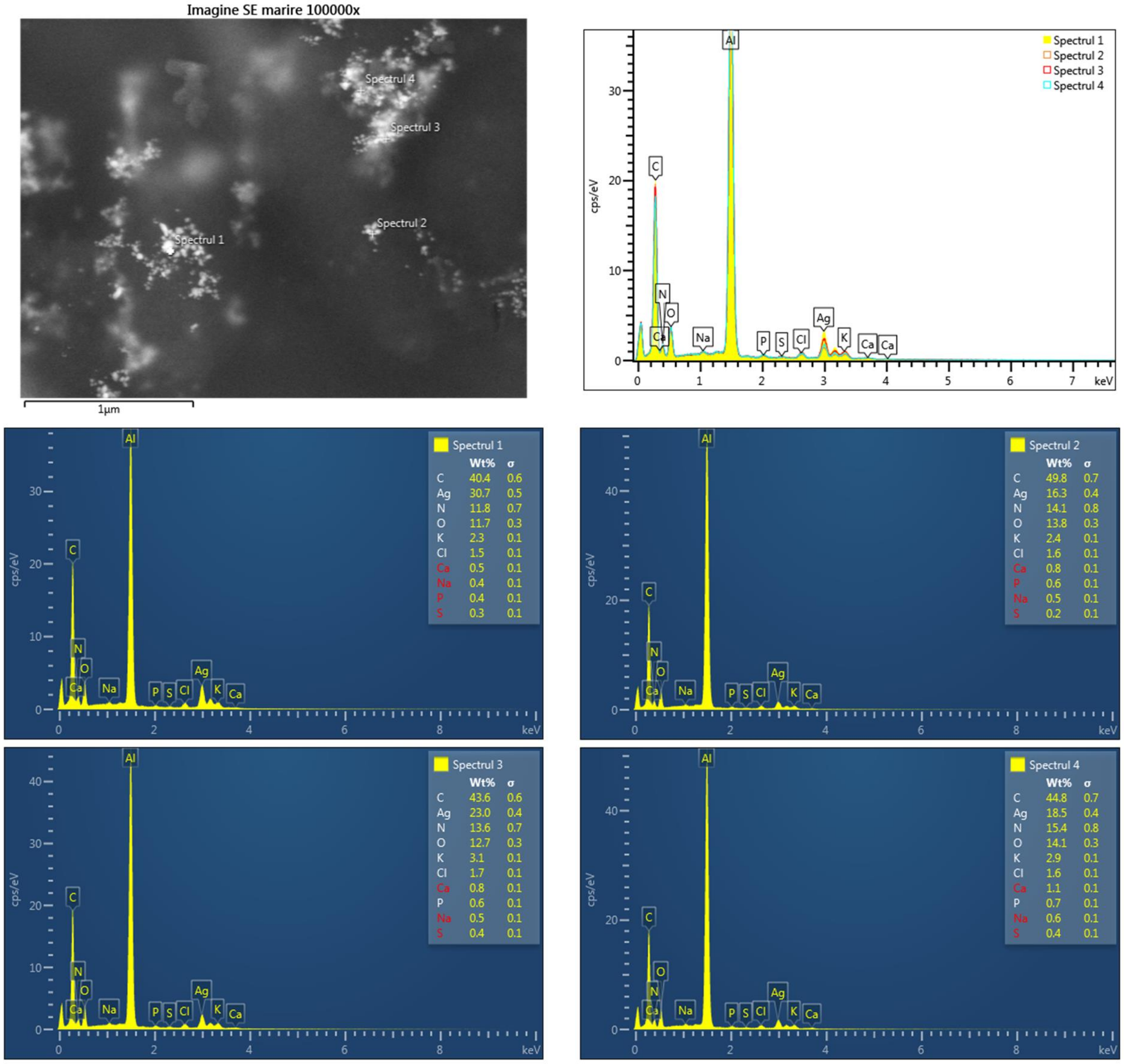
FTIR analysis was performed using a FTIR spectroscopy system for advanced research composed from a Vertex 80 FT-IR spectrometer (ATR - attenuated total reflection; diamond head). The obtained results were compared with literature data regarding types of aqueous plant extracts and similar polymeric matrices. The interpretation of the FTIR spectra considered the identification of the absorption maxima that undergo changes in the analyzed media (crude vegetable extract, polymeric matrix components and hydrogels with silver nanoparticles). The changes in the position of the spectral maxima can be associated with the adsorption [184, 185, 186, 187, 188] of the constituents of the plant extract on the surface of the silver nanoparticles, the bonds that may occur as a result of the crosslinking of the polymeric matrix and the interaction between it and / or the silver nanoparticles, respectively the plant extract.

The similarity between the IR spectra in the case of the PVA-HC hybrid matrix hydrogel samples (respectively with *Salvia officinalis* extract, silver nanoparticles, silver nitrate and polymeric matrix as such - Annex 7: figures 7.1-7.2), suggests an advanced incorporation of components of the nanomaterial obtained in the polymeric matrix. The main changes observed in the IR spectrum occur mainly between the components of the polymeric matrix and the polymeric matrix obtained on their basis. FTIR analysis of composite hydrogels with PAA-A polymeric matrix and irradiation crosslinking (50kGy) led to the recording of spectral changes, especially in the case of NPAg / *Sapindus mukorossi* hydrogels and mixtures of extracts respectively, compared to the polymeric matrix and NPA / hydrogels *Salvia officinalis* extract and silver nitrate.

6.3 Characterization by electronic microscopy (SEM-EDS) of composite hydrogels with polymeric matrix polyvinyl alcohol – collagen hydrolysate and polyacrylamide - starch

The device used in the analysis was constituted by a scanning electron microscope with field emission (FESEM) Carl Zeissï Auriga model, dedicated to the study of microscopic structures and surfaces of different types of materials: organic and inorganic samples (polymers, polycomposite materials, plastics) magnetic conductive or no; the functional parameters of the device are mentioned in subchapter 4.4 - figure 4.6.

6.3.1 Analysis by scanning electron microscopy (SEM-EDS) of composite hydrogels with PVA-HC polymeric matrix



Spectrul 1

	Wt%	σ
C	40.4	0.6
Ag	30.7	0.5
N	11.8	0.7
O	11.7	0.3
K	2.3	0.1
Cl	1.5	0.1
Ca	0.5	0.1
Na	0.4	0.1
P	0.4	0.1
S	0.3	0.1

Spectrul 2

	Wt%	σ
C	49.8	0.7
Ag	16.3	0.4
N	14.1	0.8
O	13.8	0.3
K	2.4	0.1
Cl	1.6	0.1
Ca	0.8	0.1
P	0.6	0.1
Na	0.5	0.1
S	0.2	0.1

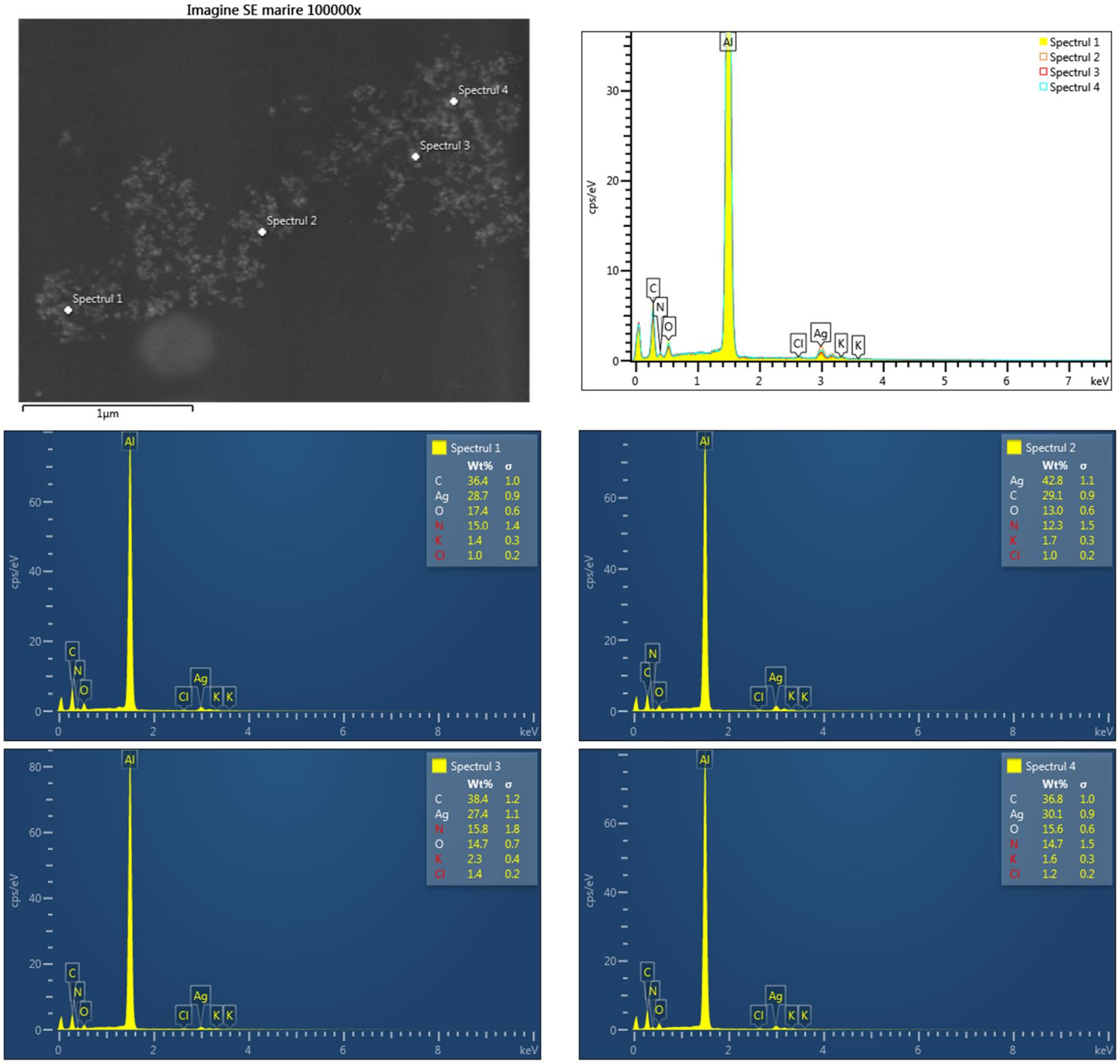
Spectrul 3

	Wt%	σ
C	43.6	0.6
Ag	23.0	0.4
N	13.6	0.7
O	12.7	0.3
K	3.1	0.1
Cl	1.7	0.1
Ca	0.8	0.1
P	0.6	0.1
Na	0.5	0.1
S	0.4	0.1

Spectrul 4

	Wt%	σ
C	44.8	0.7
Ag	18.5	0.4
N	15.4	0.8
O	14.1	0.3
K	2.9	0.1
Cl	1.6	0.1
Ca	1.1	0.1
P	0.7	0.1
Na	0.6	0.1
S	0.4	0.1

Figure 6.37 SEM-EDS analysis for composite hydrogel with PVA-HC matrix crosslinked through temperature cycles (magnification order: 100,000X, 1 µm scale) / mapping of chemical elements in the interest microzone.



Spectrul 1

	Wt%	σ
C	36.4	1.0
Ag	28.7	0.9
O	17.4	0.6
N	15.0	1.4
K	1.4	0.3
Cl	1.0	0.2

Spectrul 2

	Wt%	σ
Ag	42.8	1.1
C	29.1	0.9
O	13.0	0.6
N	12.3	1.5
K	1.7	0.3
Cl	1.0	0.2

Spectrul 3

	Wt%	σ
C	38.4	1.2
Ag	27.4	1.1
N	15.8	1.8
O	14.7	0.7
K	2.3	0.4
Cl	1.4	0.2

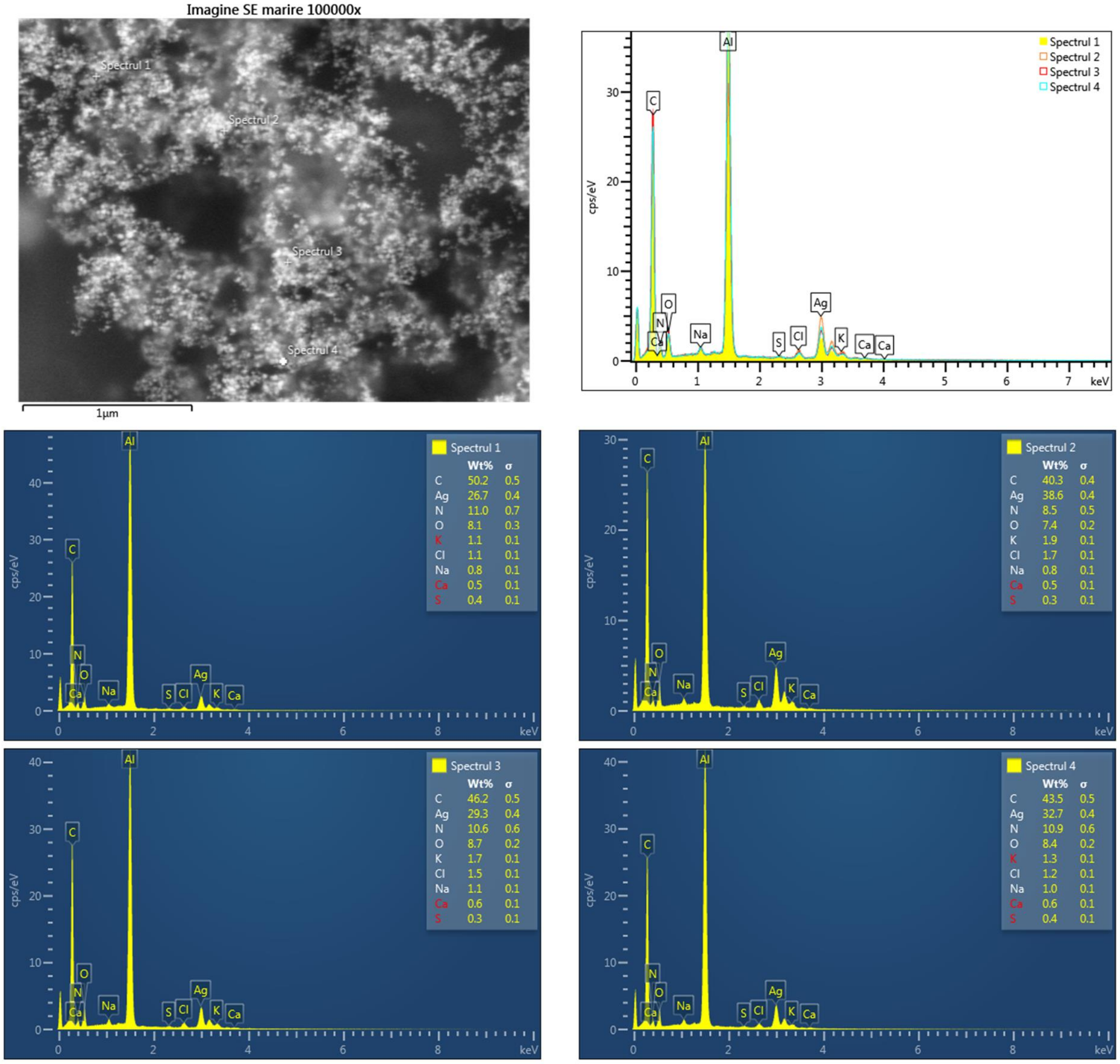
Spectrul 4

	Wt%	σ
C	36.8	1.0
Ag	30.1	0.9
O	15.6	0.6
N	14.7	1.5
K	1.6	0.3
Cl	1.2	0.2

Figure 6.39 SEM-EDS analysis for composite hydrogel with PVA-HC matrix crosslinked through irradiation (20 kGy) (magnification order: 100,000X, 1 μm scale) / mapping of chemical elements in the interest microzone.

The morphology / shape of the silver nanoparticles (Figures 6.36.-6.41, Annex 9 - Figure 9.1) is relatively complex, some of them having generally associated polygonal shapes as spherical. Relatively spherical and polydisperse particles were highlighted, and agglomerations were present, with dimensions in the range 21÷37 nm. The blurry details appear as a result of the sample loading which shows a low electrical conductivity of the environment which can be associated with the existence of the stabilizing layer around the nanoparticles consisting of the polymeric matrix / phytochemical compounds from the plant extract.

The EDS spectra highlighted the spots associated with silver and those associated with carbon, oxygen and nitrogen, which confirm the presence of stabilizers consisting of alkyl chains in the examined samples [342, 343]. In the central area of the spectrum it can be clearly observed the peak associated with the silver located at 2.5 keV this maximum being associated with the K, L lines characteristic of the silver [344, 345, 346]. The intensities of the spectral lines are proportional to the abundance of the element, but given that the EDS method cannot distinguish between the elemental silver and the silver atoms present in other compounds [342, 345, 346], the result shows values of the relative concentrations in the investigated samples.



Spectrul 1	Wt%	σ
C	50.2	0.5
Ag	26.7	0.4
N	11.0	0.7
O	8.1	0.3
K	1.1	0.1
Cl	1.1	0.1
Na	0.8	0.1
Ca	0.5	0.1
S	0.4	0.1

Spectrul 2	Wt%	σ
C	40.3	0.4
Ag	38.6	0.4
N	8.5	0.5
O	7.4	0.2
K	1.9	0.1
Cl	1.7	0.1
Na	0.8	0.1
Ca	0.5	0.1
S	0.3	0.1

Spectrul 3	Wt%	σ
C	46.2	0.5
Ag	29.3	0.4
N	10.6	0.6
O	8.7	0.2
K	1.7	0.1
Cl	1.5	0.1
Na	1.1	0.1
Ca	0.6	0.1
S	0.3	0.1

Spectrul 4	Wt%	σ
C	43.5	0.5
Ag	32.7	0.4
N	10.9	0.6
O	8.4	0.2
K	1.3	0.1
Cl	1.2	0.1
Na	1.0	0.1
Ca	0.6	0.1
S	0.4	0.1

Figure 6.41 SEM-EDS analysis for composite hydrogel with PVA-HC matrix crosslinked through irradiation (50 kGy) (magnification order: 100,000X, 1 μm scale) / mapping of chemical elements in the interest microzone.

6.3.2 Analysis by scanning electron microscopy (SEM-EDS) of composite hydrogels with PAA-A polymeric matrix

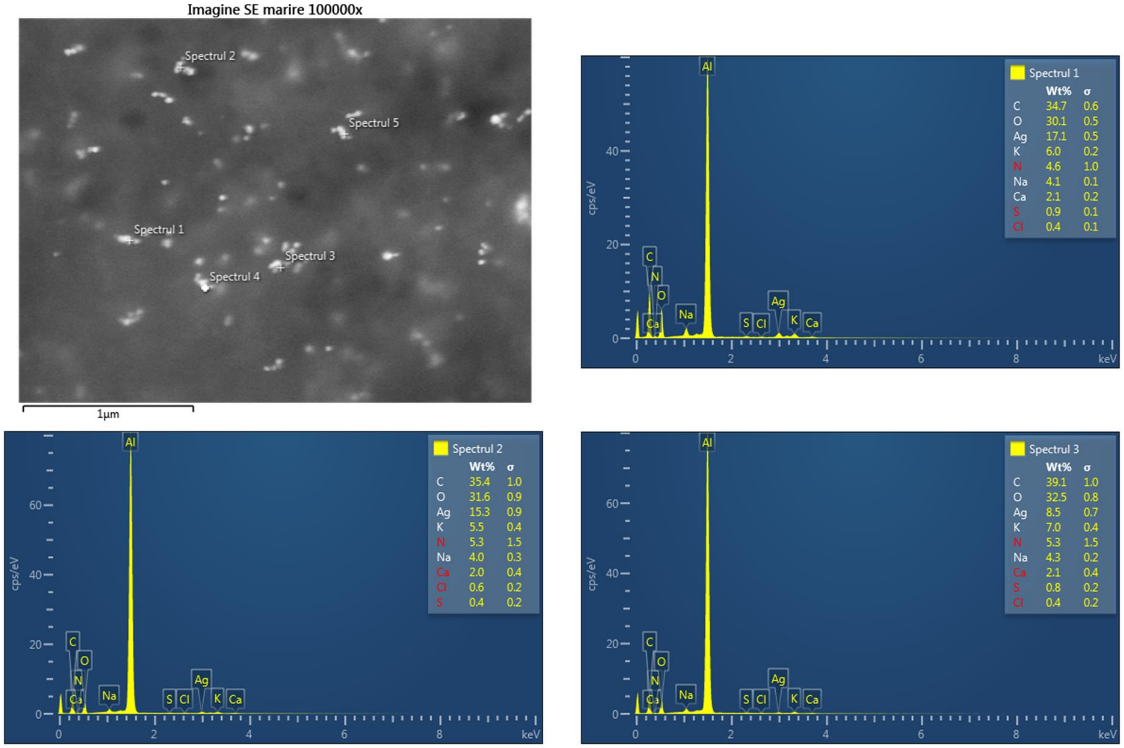


Figure 6.43 SEM-EDS analysis for composite hydrogel PAA-A matrix / *Salvia officinalis* extract with crosslinking by temperature cycle (magnification order: 100,000X, 1 µm scale) / mapping of chemical elements in the interest microzone

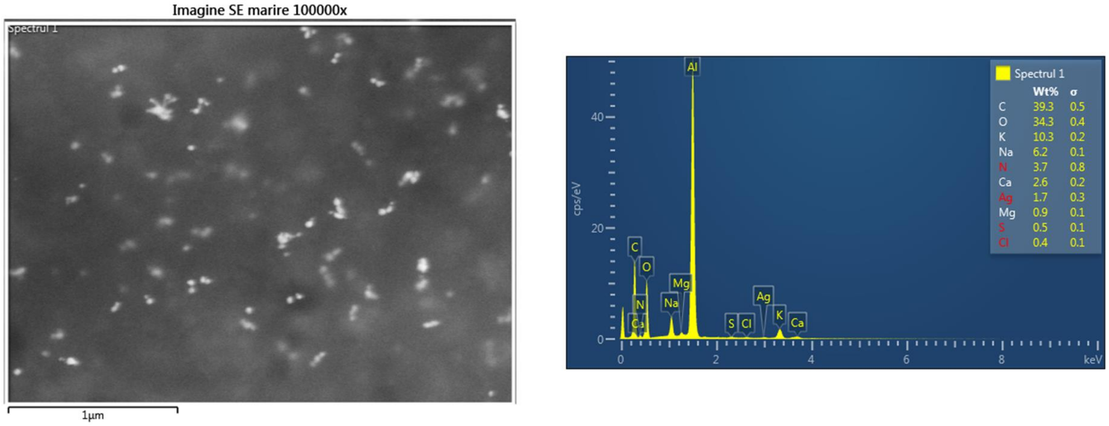
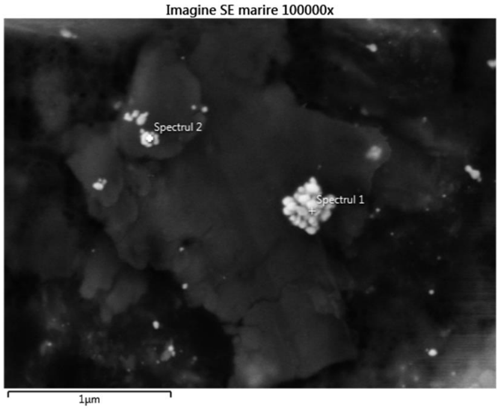


Figure 6.45 SEM-EDS analysis for composite hydrogel PAA-A matrix / *Sapindus mukorossi* extract with crosslinking by temperature cycle (magnification order: 100,000X, 1 µm scale) / mapping of chemical elements in the interest microzone



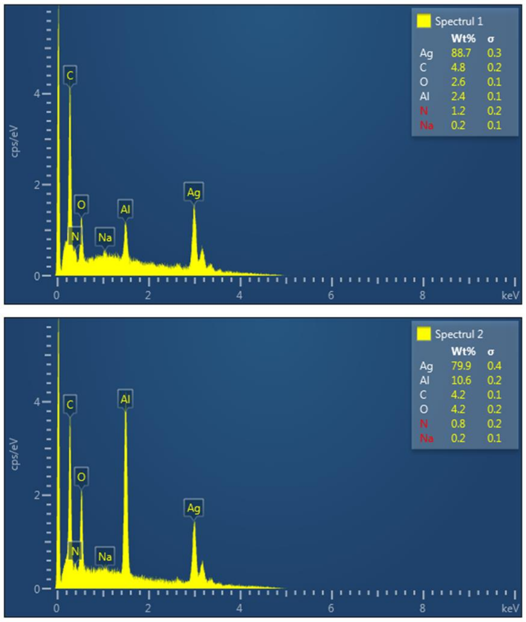


Figure 6.47 SEM-EDS analysis for composite hydrogel PAA-A matrix / extracts mixture with crosslinking by temperature cycle (magnification order: 100,000X, 1 µm scale) / mapping of chemical elements in the interest microzone

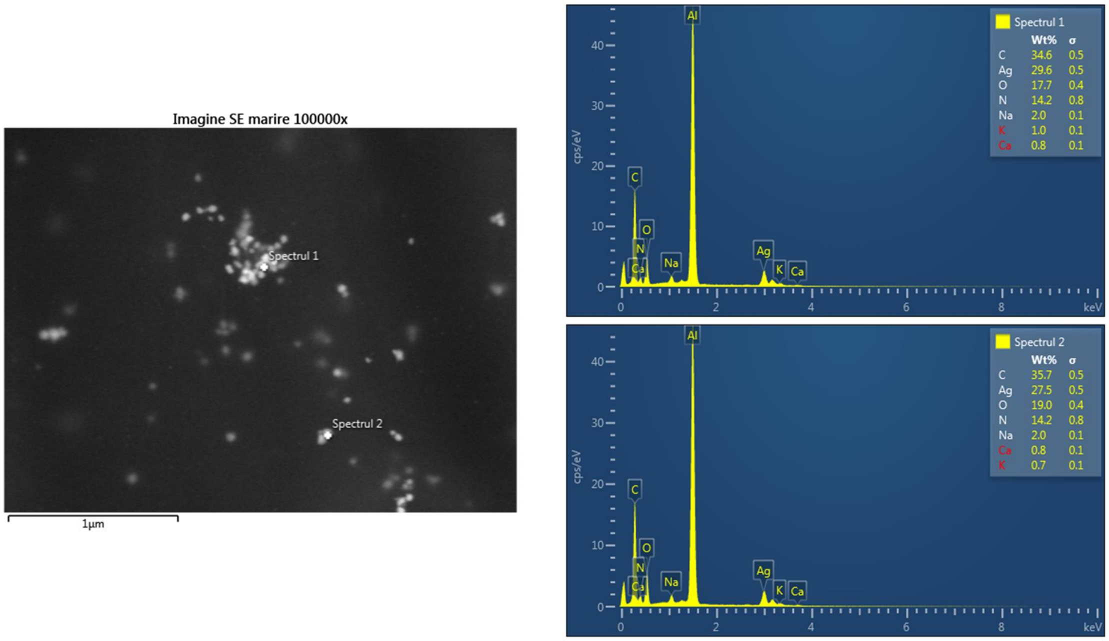
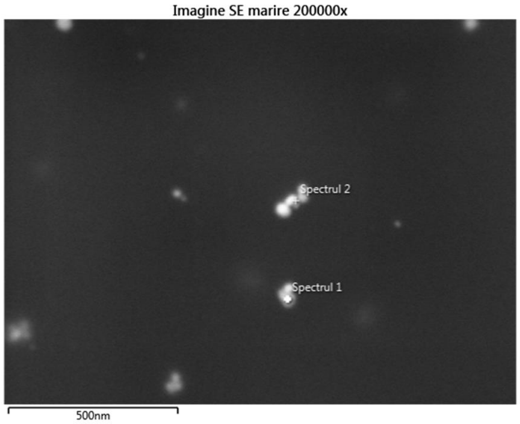


Figure 6.49 SEM-EDS analysis for composite hydrogel PAA-A matrix / *Salvia officinalis* extract with crosslinking by irradiation ï 20 kGy (magnification order: 100,000X, 1 µm scale) / mapping of chemical elements in the interest microzone



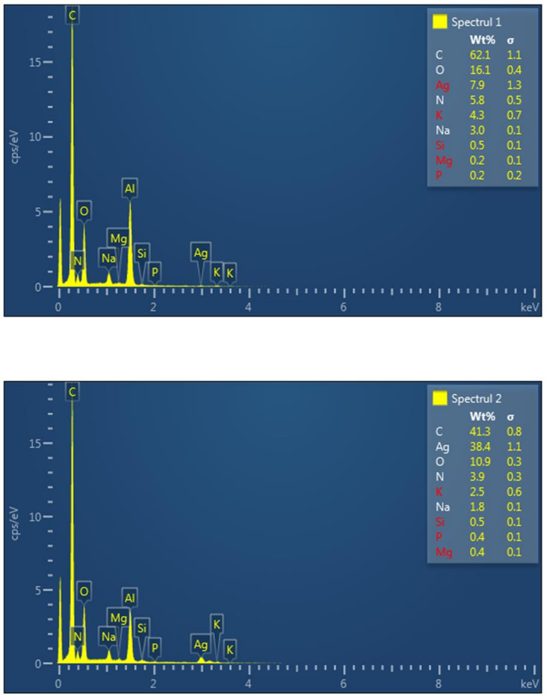


Figure 6.51 SEM-EDS analysis for composite hydrogel PAA-A matrix / *Sapindus mukorossi* extract with crosslinking by irradiation ï 20 kGy (magnification order: 100,000X, 1 µm scale) / mapping of chemical elements in the interest microzone

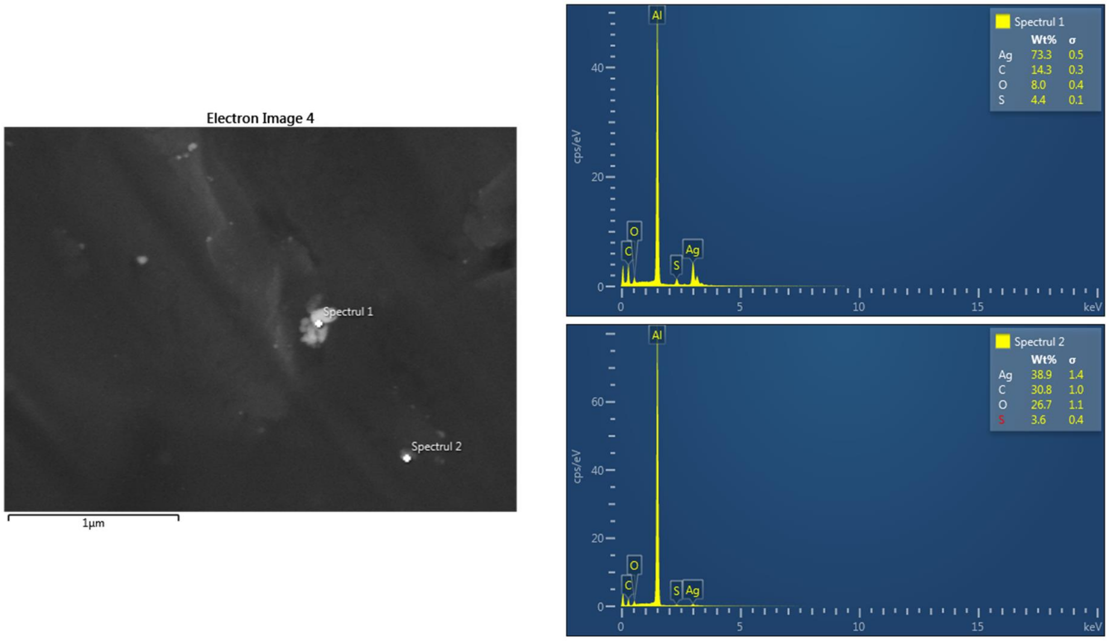


Figure 6.53 SEM-EDS analysis for composite hydrogel PAA-A matrix / extracts mixture with crosslinking by irradiation ï 20 kGy (magnification order: 100,000X, 1 µm scale) / mapping of chemical elements in the interest microzone

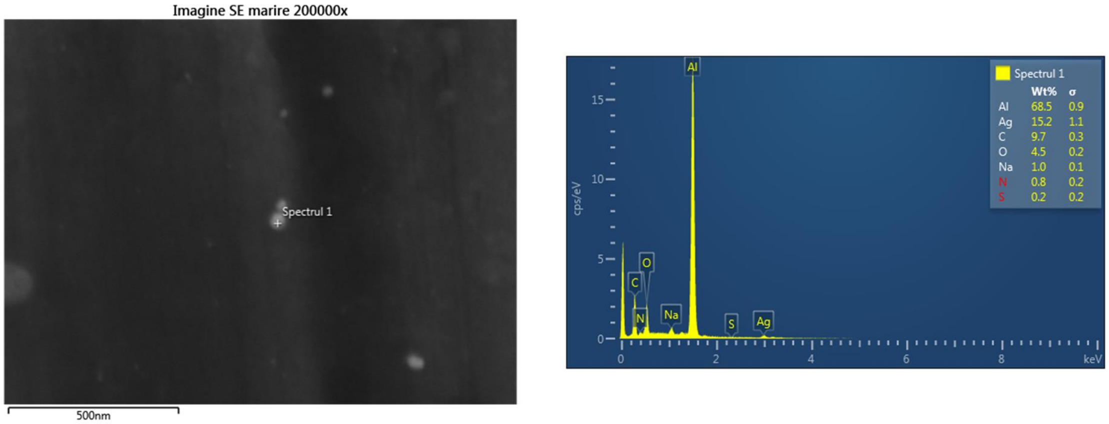


Figure 6.55 SEM-EDS analysis for composite hydrogel PAA-A matrix / *Salvia officinalis* extract with crosslinking by irradiation ï 50 kGy (magnification order: 100,000X, 1 µm scale) / mapping of chemical elements in the interest microzone

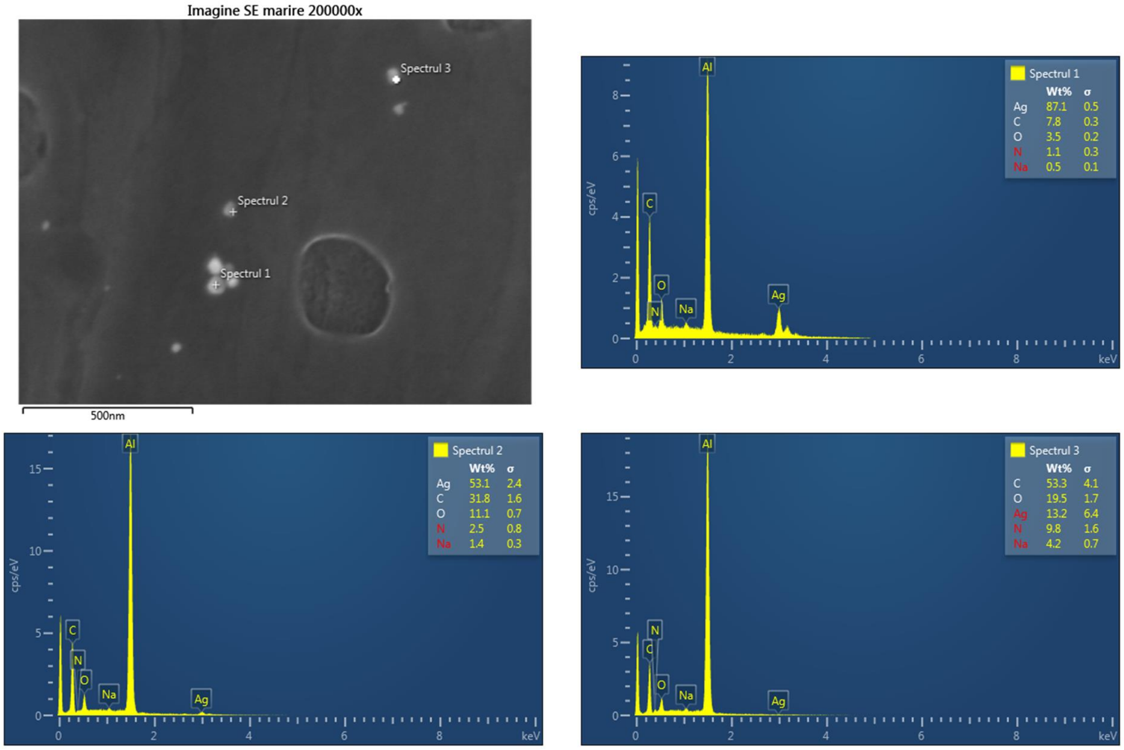


Figure 6.57 SEM-EDS analysis for composite hydrogel PAA-A matrix / *Sapindus mukorossi* extract with crosslinking by irradiation ï 20 kGy (magnification order: 100,000X, 1 µm scale) / mapping of chemical elements in the interest microzone

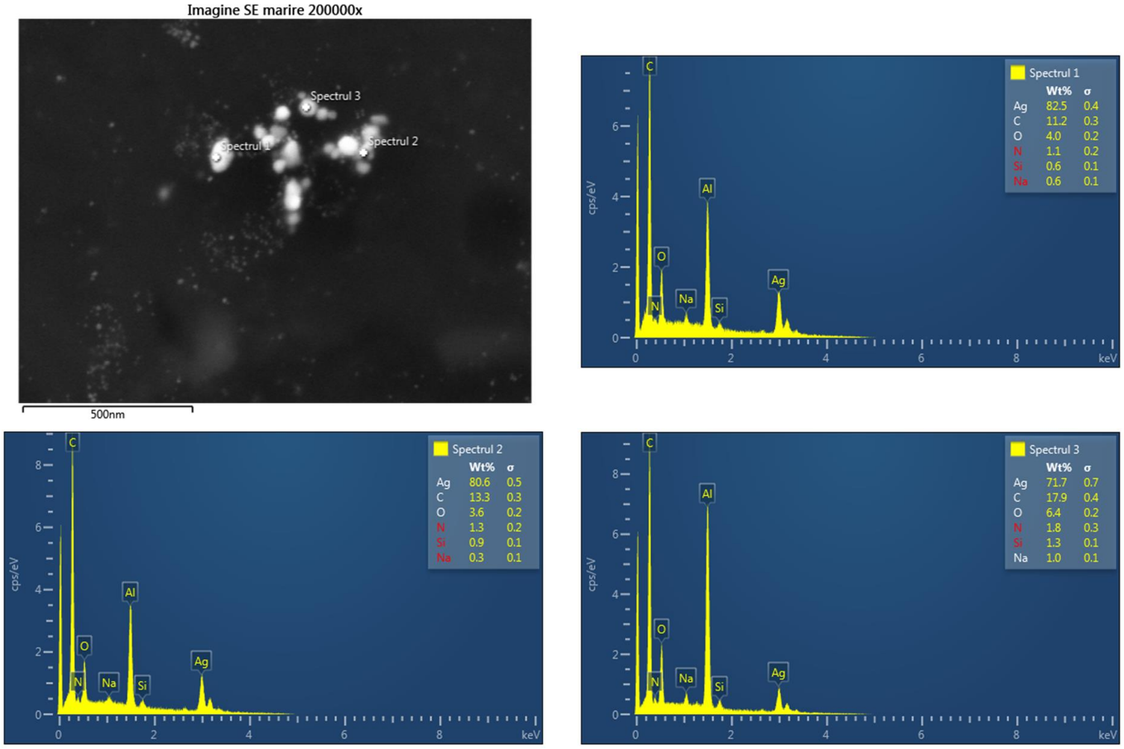


Figure 6.59 SEM-EDS analysis for composite hydrogel PAA-A matrix / extracts mixture with crosslinking by irradiation ï 20 kGy (magnification order: 100,000X, 1 μm scale) / mapping of chemical elements in the interest microzone

SEM analysis for the composite hydrogels (PAA-A polymeric matrix) with NPAg using *Salvia officinalis* extract revealed the existence of nanoparticles of approximately spherical shape, dispersed, with dimensions in the range 20-60 nm. The relative average concentration of silver in the investigated samples varied between 13.6% (crosslinking through temperature cycles), 28.5% (irradiation - 20 kGy) and 15.2% (irradiation - 50 kGy) respectively; the high values of the relative average concentration of carbon and oxygen indicate the existence of the stabilizing layer induced by the polymeric matrix and the phytochemical compounds from the extract on the silver nanoparticles. For composite hydrogels (PAA-A polymeric matrix) with NPAg using *Sapindus mukorossi* extract, nanoparticles of approximately spherical shape, dispersed, with dimensions in the range of 30-60 nm were observed. A special aspect regarding these investigated samples is the presence of the observable gel film after processing the sample for the SEM-EDS analysis. The higher values, in this case, of the relative average concentration of carbon and oxygen, for each crosslinking version, compared to those of sage extract, suggest the adhesion of the stabilizing layer (polymeric matrix / phytochemical compounds from the extract) to a greater extent.

In the case of using the mixture of extracts to obtain the composite hydrogels (PAA-A polymeric matrix) with NPAg, the SEM-EDS analysis revealed the existence of spherical shaped nanoparticles, dispersed (in some cases particle agglomerations) with dimensions between 10-60 nm. A first remark regarding the results obtained is related to obtaining higher values of C_{mAg} compared to the extracts used as such under similar conditions of synthesis / analysis, which suggests a synergistic effect of the phytochemical compounds present in the two extracts relative to the reduction / stabilization of nanoparticles. silver within the polymeric matrix.

6.4 Analysis by X-ray diffraction (XRD) of composite hydrogels with silver nanoparticles, with polymeric matrix polyvinyl alcohol-collagen hydrolysate and polyacrylamide-starch

Structural characterization of polymeric matrices and composite hydrogels was performed on material samples (30± 2°C) dried in the oven for 24 hours, milled and separated into two granulometric fractions (1 mm mesh); the analysis was performed on the fine fraction deposited on the standard diffractometer quartz substrates. The data obtained from the XRD scans were imported into the PDXL program and Rietveld analysis was performed for crystallographic refinement. The details regarding the crystallographic models used are presented in table 6.13.

Table 6.13 Parameters of crystalline structure for a series of silver compounds

Phase	***Chemical formula***	***Crystalline system***	***Spatial group***	***Density*** (g/cm^3)	***No. Card ICDD-PDF***
Silver	Ag	Cubic	Fm-3m (225)	10.396	04-003-7118
Silver oxide	AgO	Monoclinical	P21/c (14)	7.684	04-007-1374
Azotat de argint	$AgNO_3$	Orthorombical	P212121 (19)	4.346	01-074-4790
Ag-PVA	$Ag(C_2H_4O)_{48}$	Tetragonal	-	9.610	00-058-1070
Ag-PVA	$Ag(C_2H_4O)_{121}$	Tetragonal	-	9.610	00-058-1069
Ag-PVA	$Ag(C_2H_4O)_{243}$	Tetragonal	-	9.610	00-058-1068

Table 6.14 Relative crystalline degree for composite hydrogels with polyacrylamide-starch polymeric matrix

Sample code	***Crosslinking***	***Peak intensity (cps)***		***Crystallinity (%)***
		$I_{2\theta = 17°}$	$I_{2\theta = 38°}$	
Polymeric matrix PAA-A				
P5-1902	CT ï termal cycles	3469	-	-
P5-0412-ir20	ir20 ï irradiation 20 kGy	3195	-	-
P5-0412-ir50	ir50 ï irradiation 50 kGy	2747	-	-
Composite hydrogels with NPAg / Salvia officinalis extract				
P9-1902	CT ï termal cycles	1558	3072	66.35
P9-0412-ir20	ir20 ï irradiation 20 kGy	1769	1899	51.77
P9-0412-ir50	ir50 ï irradiation 50 kGy	1375	1849	57.35
Composite hydrogels with NPAg / Sapindus mukorossi extract				
P10-1902	CT ï termal cycles	2438	2162	47.00
P10-0412-ir20	ir20 ï irradiation 20 kGy	2966	1680	36.16
P10-0412-ir50	ir50 ï irradiation 50 kGy	2659	1573	37.17
Composite hydrogels with NPAg / extracts mixture				
P11-1902	CT ï termal cycles	2609	2818	51.93
P11-0412-ir20	ir20 ï irradiation 20 kGy	1645	1347	45.02
P11-0412-ir50	ir50 ï irradiation 50 kGy	2697	2127	44.09

The data presented in table 6.14 indicate an increase in the degree of crystallinity in the order P10, P9 and P11 respectively, the results indicating the mixed, crystalline and amorphous character of the synthesized materials as well as that the type of extract used as reducing agent and the crosslinking variant applied have influence on the crystallinity of the final product. In the case of crosslinking through thermal cycles, the nanomaterials based on *Salvia officinalis* extract as such (66.35%) or in mixture (51.93%) have a relatively higher degree of crystallinity compared to the nanomaterial obtained with *Sapindus mukorossi* extract (47%); a similar variation is observed in the case of the crosslinking by irradiation at both applied irradiation doses.

The variant of crosslinking applied (thermal cycles and irradiation with gamma radiation respectively) also influences the degree of relative crystallinity, which has higher values in the case of crosslinking by thermal cycles compared to the variant by irradiation. For all three categories of hydrogels (depending on the type of extract), there are relatively small differences in the values of the degree of crystallinity depending on the irradiation dose.

6.5 Antimicrobial activity evaluation of composite hydrogels with silver nanoparticles, with polymeric matrix polyvinyl alcohol-collagen hydrolysate and polyacrylamide-starch

Testing the antifungal effect of the synthesized materials firstly highlights the role of plant extracts. As mentioned in the specialized studies, even in the case of extracts (*Salvia officinalis*, *Sapindus mukorossi*) whose chemical composition was not identical, the results indicated a similar antifungal activity; the antifungal effect is not associated with one of the major compounds present in the extract but with the synergy of other compounds that are in small proportions [354, 355, 356].

The comparative evaluation of the results obtained (table 6.15) for the control samples (with extract) and the hydrogels with silver nanoparticles indicates the determined role of the compounds of the extract / extracts in the antifungal effect. In the acute toxicity test experiment, Swiss white mice (20±2 g in weight) and Wistar white rats (140±20 g in weight) were used, with uniform distribution by sex (20 animals, 10 males and 10 females on each batch and dose), from the biobase USAMV - Bucharest.

Tabelul 6.17 The results of the biochemical tests at the end of the observation period after the administration of sample P11-1902 (hydrogel sample with polyacrylamide-starch matrix and silver nanoparticles obtained with a mixture of extracts) on Wistar rat

No. crt.	***Parameter / biochemical indicator***	***Registered value***	***Reference value range*** [357, 358]
1	Hb - hemoglobin	11 g / 100 ml	8 ï 15 g / 100 ml
2	RBC (Red Blood Cells) - erytrocites	7.0 mil. / mm^3 blood	5.5 ï 10 mil / mm^3
3	WBC (White Blood Cells) - leucocytes	12000 / mm^3 blood	10000 ï 15000 / mm^3
4	MONO (Monocytes) - monocytes	3 %	max. 5 %
5	BASO (Basophils) - basofiles	< 1 %	0.0 ï 0.7 %
6	EOS (Eosinophils) - eozynofiles	2.1 %	2 ï 4 %
7	NEU (Neutrophils) - neutrofiles	54 %	50 ï 55 %
8	LYM (Lymphocytes) - lymfocites	28 %	25 ï 35 %
9	CHOL (Cholesterol) - cholesterol	126 mg / 100 ml	135 mg / 100 ml, average
10	CREA (Creatinine Kinase) - creatinin	0.3 mg / 100 ml blood	0.3 ï 0.5 mg / 100 ml
11	ALB (Albumin) - albumin	2.3 mg / 100 ml blood	2.1 ï 4.0 mg / 100 ml
12	AMYL (Amylase) - amylaze	740 mg / 100 ml blood	300 ï 1500 mg / 100 ml
13	GLU (Glucose) - glucose	44 mg / 100 ml blood	40 mg / 100 ml, average
14	ALKP (Alkaline phosphatase)	29 mg / 100 ml blood	8 ï 80 mg / 100 ml

Experienced animals were subjected to observations regarding behavior, vital signs, noting the occurrence of any suggestive changes to a toxic condition, at 24 hours, 48 hours, 72 hours and 14 days after dosing [359].

The microbiological study on the composite hydrogels with silver nanoparticles was performed in order to highlight their antimicrobial character and to determine the minimum bactericidal dose on the strains of bacteria tested. Two strains of bacteria (in the form of pure lyophilized cultures) were selected, frequently involved in intrahospital infections: *Escherichia coli* ATCC reg. 25922 - Gram-negative bacterium (pathogenic condition, extremely resistant to antibiotic treatment) and *Staphylococcus aureus* ATCC reg 25923 - Gram-positive, pathogenic Gram bacterium of coagulase-positive staphylococci, with high risk of postoperative infection.

Antimicrobial activity for composite hydrogels with silver nanoparticles was determined at concentrations obtained by decimal dilutions, according to the working protocol (presented in subchapter 4.5). The volume of culture medium used for each bacterial strain was kept constant (15 ml) and the concentration of the tested hydrogels varied. The plates with nutrient media, hydrogel and inoculum of bacteria were incubated aerobically, for variable durations depending on the bacterial genus, in parallel being performed microbiological tests and for the polymeric matrix corresponding to each type of hydrogel (PVA-HC and PAA-A), considered as control. For the test of composite hydrogels with silver nanoparticles, the same procedure was adopted regardless of their synthesis mode. In a first phase, a series of preliminary tests were performed on each type of synthesized hydrogel and the corresponding control samples (polymeric matrices). To confirm the results, preliminary tests were performed in duplicate for all hydrogel samples and both bacterial strains.

The efficiency of composite hydrogels with silver nanoparticles was evaluated by means of the minimum bactericidal concentration (CMB). Thus, in a preliminary phase, the tests with smaller proportions of hydrogels (0.8 ml and 0.5 ml / test plate) were repeated, the results also indicating the lack of typical bacterial colonies, indicating a bactericidal effect on both bacterial strains. As a result of these tests, a differentiated sensitivity of the bacterial strains to the action of the tested nanomaterials was established, the strain of *Escherichia coli* being more sensitive than that of *Staphylococcus aureus*. For this reason, in subsequent tests, *Escherichia coli* strain assay was performed starting from the basic dilution d_0 with 0.5 ml hydrogel and 0.8 ml hydrogel respectively for *Staphylococcus aureus* strain testing. For lower values d_0 in plates appear typical colonies of bacteria, the hydrogels showing only bacteriostatic effect. The basic dilution term d_0 (10^0) will be used in the following for the samples in which the hydrogels are used as such not taken into physiological serum.

Due to the small volume of the hydrogel taken in the test sample, it is difficult to achieve a uniform distribution on the Petri dish; for this reason, for the determination of CMB in the case of the two bacterial strains, the tests were performed with successive decimal dilutions (according to the technique described in subchapter 4.5) for all hydrogel samples:

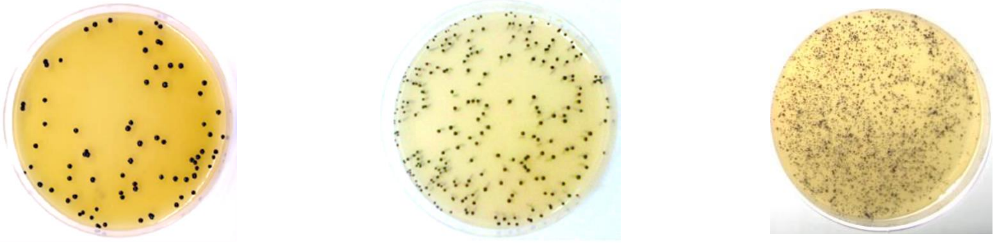

(a) **(b)** **(c)**

Figure 6.69 P2-0412 hydrogel ï Petri plates after testing on *Staphylococcus aureus* strain at different dilutions: a) $d_1(10^{-1})$, b) $d_2(10^{-2})$ and c) $d_3(10^{-3})$.

As the images of the Petri test plates suggest the same type of bacteriostatic behavior, only a series of suggestive images were presented for each type of hydrogel with silver nanoparticles and for each type of bacterial strain, the bacteriostatic behavior being detailed in tabular form (tables 6.19-6.23).

Table 6.23 Minimum bactericidal concentration (CMB) for bacterial strains *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

No.crt.	***Sample code***	***CMB (ml / ml inoculum / 24 hours)***		***Hydrogel type / polymeric matrix***
		Escherichia coli	***Staphylococcus aureus***	
1	**P2-0412**	$0.5\cdot10^{-2}$	$0.8\cdot10^{-2}$	***Hydrogels with Salvia officinalis extract / PVA-HC***
2	**P2-0412-ir20**	**$0.5\cdot10^{-3}$**	**$0.8\cdot10^{-3}$**	
3	**P2-0412-ir50**	**$0.5\cdot10^{-3}$**	**$0.8\cdot10^{-3}$**	
4	**P3-0412-ir20**	$0.5\cdot10^{-2}$	$0.8\cdot10^{-2}$	***Hydrogels with $AgNO_3$ – irradiation / PVA-HC***
5	**P3-0412-ir50**	$0.5\cdot10^{-2}$	$0.8\cdot10^{-2}$	
6	**P9-2002**	**$0.5\cdot10^{-3}$**	**$0.8\cdot10^{-3}$**	***Hydrogels with Salvia officinalis extract / PAA-A***
7	**P9-0412-ir20**	$0.5\cdot10^{-2}$	$0.8\cdot10^{-2}$	
8	**P9-0412-ir50**	$0.5\cdot10^{-2}$	$0.8\cdot10^{-2}$	
9	**P10-2002**	$0.5\cdot10^{-2}$	$0.8\cdot10^{-2}$	***Hydrogels with Sapindus mukorossi extract / PAA-A***
10	**P10-0412-ir20**	$0.5\cdot10^{-2}$	$0.8\cdot10^{-2}$	
11	**P10-0412-ir50**	$0.5\cdot10^{-2}$	$0.8\cdot10^{-2}$	
12	**P11-2002**	$0.5\cdot10^{-2}$	$0.8\cdot10^{-2}$	***Hydrogels with extracts mixture / PAA-A***
13	**P11-0412-ir20**	$0.5\cdot10^{-2}$	**$0.8\cdot10^{-3}$**	
14	**P11-0412-ir50**	**$0.5\cdot10^{-3}$**	**$0.8\cdot10^{-3}$**	
15	**P12-0412-ir20**	$0.5\cdot10^{-1}$	$0.8\cdot10^{-1}$	***Hydrogels with $AgNO_3$ – irradiation / PAA-A***
16	**P12-0412-ir50**	$0.5\cdot10^{-1}$	$0.8\cdot10^{-1}$	

7. CONCLUSIONS AND OWN CONTRIBUTIONS

7.1 Conclusions

The research activity related to the doctoral thesis had as a general objective the "green" synthesis of composite hydrogels, functionalized with silver nanoparticles, the characterization of these materials and the evaluation of their potential for biomedical applications. The research carried out within the thesis focused on the possibilities to synthesize a certain type of nanomaterials, respectively hydrogels, with hybrid polymer matrix (based on two components, a synthetic and a natural polymer) and functionalized with silver nanoparticles (synthesized by using plant extracts of *Salvia officinalis* and *Sapindus mukorossi*). For a relevant study in a first phase, the synthesis of silver nanoparticles with the mentioned plant extracts was experimented and subsequently the synthesis of the composite hydrogels with silver nanoparticles generated *in situ* through the same extracts. In a final phase, the antimicrobial activity of the synthesized nanomaterials was evaluated by *in vitro* tests and preliminary *in vivo* tests.

The specific objectives of the doctoral thesis were achieved by obtaining the hydrogel-type nanomaterials through the synthesis techniques proposed within the general objective of the thesis, nanomaterials that were subsequently characterized by specific methods of analysis.

The synthesis methods applied (both for obtaining natural extracts, for the synthesis of silver nanoparticles and for composite hydrogels) considered the following aspects: the use of natural sources, nontoxic solvents, process parameters that allow the reproducibility of the methods, the use of equipment and a logistics economically advantageous as well as aspects of environmental protection.

Silver nanoparticles are one of the most commonly used classes of nanoparticles as a functionalizing agent of polymers due in particular to the electrical, optical, catalytic and in particular antimicrobial properties well established and investigated in particular in colloidal systems. However, many practical applications of silver nanoparticles involve their inclusion in various substrates and matrices. From this point of view, polymers are a preferred class of materials due to their specific morphology, chemical nature and structure with long polymeric chains that allow the incorporation and advanced dispersion of nanoparticles. In addition, a number of functional groups of polymers can be used as active centers for the controlled synthesis of nanoparticles.

The commonly applied process for dispersing silver nanoparticles in the polymer matrix involves the capture of silver cations by the polymer chains followed by reduction with reducing agents. This process, compared to the mixing of two components and the polymerization in the presence of the pre-synthesized silver nanoparticles, presents two advantages: firstly the existence of macromolecular chains improves the dispersion of the nanoparticles in the polymeric matrix and partially prevents the formation of aggregates and secondary, the polymer substrate lead to a small size of nanoparticles, a narrow particle size distribution and relatively well defined shapes.

The variant of applied synthesis, the formation of the reactive nanoparticles within a preformed hydrogel, involves obtaining in a first phase of the preformed hydrogel which acts as a microreactor in which the nanoparticles are formed from precursors after a series of necessary treatments. This process gained popularity mainly due to the technological advantages, compared to the *ex situ* method, the size and morphology of the nanoparticles could be controlled relatively easier. The metal ions can be absorbed by the functional groups of the hydrogel by electrostatic or ion-dipole interactions, and then reduced to the metal nanoparticles by reducing agents from the natural extracts. Irradiation crosslinking is a technique that does not involve the use of chemical reagents, thus preserving the biocompatibility of the polymer and at the same time ensuring the modification of the polymer and its sterilization. Hydrogels prepared by freeze-thaw technique have shown to have significant potential in many applications due to certain properties, preferable to gels obtained by traditional crosslinking techniques, related to the lack of toxicity and superior mechanical strength; Exposure to repeated cycles of freezing and thawing at room temperature results in the formation of crystallites that act as physical crosslinks within the polymeric matrix. The phytochemical compounds present in the plant extracts could also contribute to the stabilization of the polymeric matrix, contributing in addition with antioxidant, pharmacological and therapeutic potential to the nanobiomaterial.

A hydrophilic environment is particularly important in the antimicrobial applications because water facilitates the release of silver ions from nanoparticles encapsulated in the polymeric matrix; at the same time the material will maintain a moist environment around the wound thus ensuring a hydration for optimal healing. Biopolymers are an important group mainly due to their availability, low cost and biocompatibility. Considering that many applications of silver nanocomposites are aimed at biomedical treatment, hydrogels are important benchmarks in this field.

From the category of synthesized materials, simple / multicomponent hydrogels have expanded in the field of controlled release of drug principles but also in fields such as tissue engineering where polymeric biomaterials perform many functions, capturing the interest of researchers over the last decade due to the intrinsic properties of medical applications; biocompatibility, the ability to release water-soluble compounds from the polymer network and their versatility in modeling physico-chemical properties allow the generation of new biomaterials.

Conclusions from the study of the synthesis of silver nanoparticles / composite hydrogels by ultraviolet-visible spectroscopy (UV-VIS) analysis

By correlating the spectral changes in UV-VIS, as an indicator of the morphological changes of the silver nanoparticles, with the experimental parameters (pH, the initial mixing ratio of silver nitrate / *Salvia officinalis* extract) one can draw conclusions regarding the growth of the nanoparticles and the optimal working parameters. for the synthesis of silver nanoparticles using plant extracts.

In the experimental approach performed the ultraviolet-visible absorption spectroscopy was used as an analytical technique to characterize the plant extract and to monitor the synthesis process of the silver nanoparticles. Process parameters such as pH, temperature, sage extract content (corresponding to a certain extraction method), ionic solution concentration, reaction time, etc. influences the reduction reaction of the metal ion, the growth of the nanoparticles and the stabilization phase. Therefore the dimensional and morphological distribution of silver nanoparticles is the result of the different kinetics of all the steps involved in the process of nanoparticle formation. This influence is reflected in the absorption band that appears in the range 350-600 nm, which accumulates the plasmonic properties of all the silver nanoparticles present in the solution. The growth dynamics of the nanoparticles can be monitored by the kinetic control of the process, the usual variant being the variation of the concentration of the type of reducing and stabilizing species. Thus, in order to obtain information regarding the stages of the nanoparticle growth process, solutions of sage extract and silver nitrate were mixed in different ratios.

The relative area as a function of time in the range 350-600 nm was calculated, the relative area representing the surface delimited by the absorption spectrum in the case of samples with silver nitrate. It was considered that the value of this area could be correlated with the existence and the content of nanoparticles that give a plasmonic response. The graphical representation of the relative area as a function of time has been preferred to represent the values associated with the maximum absorption over time because the absorption bands have different characteristics (maximum intensity, bandwidth, shape) depending on the ratios of silver nitrate / sage extract. The selected wavelength domain considered that the main plasmonic changes of silver nanoparticles in UV-VIS spectra appear in this area. The reason for the selection of the relative area instead of the maximum absorption was that the plasmonic response of the metal nanoparticles is influenced by the reaction medium. In the growth stage the process is dynamic, accompanied by breaking and bonding, with effect on the size and shape of the nanoparticles and the metal interface.

The evolution of the UV-VIS spectrum over time indicates a rapid growth of silver nanoparticles in the first three hours from the moment of mixing the components. However, differences between the rate of increase of the absorbance intensity and the position of the maximum absorption appear. Considering the aspect of the spectrum in the range 350-600 nm, it can be appreciated that the highest content of nanoparticles was obtained when the initial mixture contained equal volumes of 10 mM silver nitrate and sage extract. In case of representing the relative area as a function of time for the studied synthesis mixtures, the four stages with different kinetics of the nanoparticle growth process can be identified. The dynamics of the process is similar to the mechanism proposed by Polte [215] for the formation of gold nanoparticles obtained by Turkevich method [214].

In the growth model described in the present study the processes involved are: reduction of metal ions, diffusion of metal ions and metal particles in solution, adsorption and reduction of metal ions at the interface, coalescence of colloidal unstable nanoparticles. Considering the evolution of the nanoparticle growth process, at one point one of the individual processes may have a greater weight in the dynamics of the global growth process. Another experimental observation is that the allure of the curves of the variation of the relative area as a function of time varies with the initial mixing ratio between sage extract and silver nitrate. For all the syntheses performed experimentally, the relative growth rate of the area was calculated as the slope of the linear portion of the relative area evolution as a function of time.

Monitoring the formation of nanoparticles over eight days revealed a slow and continuous increase in the relative area for mixtures in which the volume of silver nitrate 10 mM is in excess of that of the extract. At the same time, a slight shift of the maximum absorption in the UV-VIS spectrum towards larger wavelengths could be observed, behavior that can be correlated with the formation of large nanoparticles.

In order to obtain information on the stoichiometry of the reaction medium of the entire equilibrium process, a procedure similar to the continuous variation method was also applied. In a first step the mixture was tested at room temperature by recording the UV-VIS spectrum and the silver nitrate content was systematically varied (0 - 100%); UV-VIS spectra were recorded for information on the reaction products. The stages of the experimental approach were performed to obtain information related to the optimal volumetric ratio of silver nitrate : plant extract necessary for the synthesis of stable silver nanoparticles.

When the initial reaction mixture contained equal volumes of silver nitrate and *Salvia officinalis* extract (1:1 mixing volume ratio), the UV-VIS spectrum showed the highest absorbance value at about 425 nm. In the case of mixing reports in which the ionic salt is in excess, a bathochromic displacement of the maximum absorption was observed; this displacement may be correlated with the formation of larger nanoparticles. If the vegetable extract is in excess of the volume of silver nitrate, the UV-VIS spectrum shows more attenuated absorption maxima, correlated with a lower content of nanoparticles in the mixture. The value of the wavelength corresponding to the maximum absorption (λ_{max}) is shifted to smaller wavelengths compared to the mixing at the 1:1 ratio indicating the presence of smaller particles; this behavior could be due to the ionic solution as a limiting reactant in this case.

The experimental results indicated an optimal mixing ratio of the precursors equal to 1:1 (10 mM silver nitrate solution : sage extract) in the case of silver nanoparticles with *Salvia officinalis* extract at ambient temperature.

pH is an important experimental parameter in the growth dynamics of silver nanoparticles because its value can influence most of the equilibria involved in the process. The tested samples, obtained by mixing in different proportions the extract of *Salvia officinalis* with pH buffer solution, showed stable pH values; subsequently, after the addition of silver nitrate, in ratios corresponding to the plant extract, only a slight change (± 0.5 pH units) of the pH value of the final synthesis mixture was found. The differences observed in the recorded spectra derive mainly from their amplitude, the intensities of the maximum absorption who are lower and become closer as the pH decreases. The introduction of the phosphate ion into the system (together with the pH buffer solution) influences the plasmonic response of the silver nanoparticles formed, the difference can be observed in the case of the mixture with pH equal to 6.3 (containing buffer solution) compared to the mixture with pH equal to 6.8 (without buffer solution); the difference between the two spectra is due to the phosphate ions present in the solution and consecutively to the colloidal metallic particle interface - solution. Following addition to the phosphoric acid in the synthesis mixture, the relative area variation over time is similar to autocatalytic reactions.

The evolution of the relative growth rate (calculated as the slope of the line on the linear portion of the variation of the relative area over time), at different pH values, for the volumetric ratio of mixing of silver nitrate : *Salvia officinalis* extract equal to 1:1, was determined based on the values of v_1, v_2, v_3 and v_4 respectively which correspond to the four stages of the nanoparticle growth process corresponding to the model proposed in the presented study. The samples with pH values of 10.5, 6.3, 2.8 and 2.3, measured after the addition of the buffer solution, have relatively close velocity values in the third step (v_3), a stage in which the nanoparticle growth process is accelerated due to the autocatalytic reduction at metal-solution interface. The difference between these values is given by the time duration associated with this stage in the variation curves of the relative area as a function of time. Therefore with the decrease of the pH value in the synthesis mixture, the time corresponding to the third step is also reduced. The speed associated with the first stage of the growth process (v_1) has high values in the case of mixtures with alkaline pH which can be attributed to the formation of silver oxide. As a result, in the alkaline solution, in the initial phase, the oxidation of silver to silver oxide plays an important role in the overall mechanism of silver nanoparticle formation.

It is known that the reaction temperature plays an important role in the spatial and dimensional distribution of the particles, especially in the case of silver nanoparticles. The experimental tests based on the approach procedure were intended to optimize the experimental parameters of the studied biosynthesis process taking into account the changes in the UV-VIS spectrum.

The recording of UV-VIS spectra for the studied mixtures allowed the calculation of the relative area associated with the silver nanoparticles present in the solution, while a series of changes in the spectra aspects can be highlighted: when the ionic salt is in excess (volumetric ratios of silver nitrate : extract larger than 1:1) the displacement of λ_{max} to higher values may be correlated with the formation of larger nanoparticles and a thinner coating. The results obtained suggest that the formation of silver nanoparticles following the biosynthesis process with *Salvia officinalis* extract is based on a balance capable of determining a continuous change in the shape and size of the nanoparticles depending on the ratio Ag^+ / reducing and stabilizing species. The process proceeds continuously, in correlation with the specific conditions of the reaction medium until a certain equilibrium related to the dimensional and spatial distribution of the nanoparticles is reached. Although the relative areas calculated on the basis of UV-VIS spectra have high values for mixtures that were initially heated, the value of the absorbance associated with the maximum is low as the value of the absorption bands is also wide compared to the values of the mixture at ambient temperature. This behavior suggests that the silver nanoparticles are in high proportion when the mixture is initially heated but at the same time, the spatial and dimensional distribution is wider compared to the non-heated samples.

The experimental study performed with the use of *Sapindus mukorossi* extract initially pursued its behavior as a reducing and stabilizing agent, in the synthesis of silver nanoparticles using as a precursor 10 mM silver nitrate solution. Tests were carried out with samples having variable proportions (volumetric ratios) of the extract, maintaining the ionic salt content constantly, at a pH of the synthesis mixture due to the vegetable extract. For UV-VIS analysis, control samples with the same volumetric extract ratios were used, at dilutions identical to the samples of colloidal silver nanoparticle solutions obtained.

The data obtained from the UV-VIS analysis show an extremely slow reduction of the silver ions by the compounds present in the plant extract under the established synthesis conditions (static contact / 25°C / acidic pH of the reaction medium due to the plant extract). However, the formation of nanoparticles can be observed, especially at the 1:1 and 1.5:1 volumetric ratios (corresponding to 2% and 3% v/v extract in mixtures). In this concentration range was also determined the value of the critical micellar concentration of the extract - 2.7% average value; this behavior suggests the favorable involvement of the micelles formed in solution in the process of reducing and stabilizing the silver nanoparticles.

In the next stage of the experimental study the synthesis of silver nanoparticles with *Sapindus mukorossi* extract was performed for five concentration values of the extract in the mixture (around the determined average critical micellar concentration - 2.7%) at 25ºC (thermostatic water bath) in excess of 10 mM $AgNO_3$ solution, without dilution, by static contact; the mixture was monitored by UV-VIS analysis in the range 230-750 nm (as control samples were used extract samples - diluted with bidistilled water - at concentrations similar to the tested mixtures). From the UV-VIS spectra there is a slight shift of the maximum absorption towards the higher wavelength which could be correlated with the existence in solution of the larger aggregates / nanoparticles (the existence of the deposits would confirm this, some of the large size particles precipitating). At the same time, a stabilization of the absorption maximum is observed for the concentrations of 1.6%, 2.7%, 3.6% and about 5% around the absorbance of 0.28; the behavior in the UV-VIS spectrum could also be related to the formation of the micellar aggregates that influence the plasmonic response, in the concentration range mentioned above, forming the micelle of comparable size. The pH values are kept approximately in the same domain for all synthetic mixtures (pH: 4.14 - 4.63) after 4 days of synthesis, with small variations, the decrease being due to the possible release of hydrogen ions by the polyphenolic compounds following the reduction of the ions. silver from the solution.

The results obtained at this stage of the experimental approach suggest an important influence in the reducing and stabilizing process of the reaction medium pH. As a result, the behavior of the synthesis mixtures at basic pH values (pH adjustment was performed with 1M potassium hydroxide solution) was investigated, maintaining the mixing volume ratio of the extract : ionic salt equal to 1:1. UV-VIS spectral analysis confirmed the importance of pH as one of the decisive factors in the synthesis. At basic pH values, the silver nanoparticles formation process proceeds with an increased global velocity, from the absorption maxima aspects resulting the formation of an increased number of smaller nanoparticles (the value of the wavelength associated with the maximum moves to smaller values compared to the mixtures. at acidic pH) and a narrower particle size distribution (well defined absorption maxima for basic pH compared to absorption bands for acidic pH values). For both acidic and basic pH values, the formation of the nanoparticles is influenced by the concentration of the extract in the synthesis mixture, being noticeable at values higher than the critical micellar concentration.

Under acidic pH conditions of the reaction medium the synthesis of silver nanoparticles proceeds extremely slowly under the given conditions (25°C / acidic pH due to plant extract / 10 mM silver nitrate / static contact); a noticeable change in the UV-VIS spectra appears 3 days after the beginning of the synthesis, being observed the existence of large absorption bands whose intensity decreases with the increase of the content of plant extract in the mixture. This behavior suggests a competitive equilibrium existing in the synthesis mixture between silver and hydrogen ions, fixed and released respectively at by the saponin hydroxyl groups. The bathochromic displacement of the absorption band maxima compared to the mixtures at basic pH suggests the existence in solution of the larger silver nanoparticles and a relatively large particle size spectrum. The plasmonic response of silver nanoparticles could also be attenuated by the existence of micelles formed around the nanoparticles. For all the mixing reports tested (1:4, 1:2, 1:1, 2:1 and 4:1), a stabilization of the pH of the solution around 4.3 is also observed after three days of contact which would also suggested the behavior of the plant extract as an acid pH buffer. Literature data [278] also suggest that under acidic pH conditions a partial dissolution of nanoparticles formed occurs, inversely proportional to their size; the UV-VIS spectra recorded would confirm such behavior.

The influence of micellar critical concentration (CMC) has been noticed since the beginning of the study of the synthesis of silver nanoparticles with *Sapindus mukorossi* extract. Both the control samples (the extract solutions at the appropriate dilutions) and the synthesis mixtures recorded a pH around 4.4 indicating the buffering property of the plant extract; the pH value correlates with the structure of the saponins, as weakly acidic species, presents in the aqueous extract of *Sapindus mukorossi*. Under the applied synthesis conditions the formation of nanoparticles is a very slow process, noticeable changes in both the color of the solutions and the UV-VIS spectra were observed 72 hours after the precursors were contacted. The recorded spectra show broad absorption bands centered at around 450 nm for all the investigated samples, it can be observed that a marked increase of the absorbance with reaching and exceeding the value of 2.6±0.10% extract in the synthesis mixture. The linear variation of the relative area, calculated on the basis of UV-VIS spectra in the range of 350-600 nm, for the nanoparticle solutions, presents a turning point corresponding to an extract content of 2.6%, which confirms the hypothesis that the micelles could constitute structures that contribute to the nanoparticles formation.

The increase of the CMC value in the basic environment compared to the acidic environment can be associated with the existence of the chemical species from the acidic weak extract, with the addition of the alkaline solution (potassium hydroxide) the acid functional groups suffering a deprotonation by forming a mixture of compounds with a weak hydrophobic character. The decrease of the hydrophobic nature of the solutions can lead to higher CMC values; the diagrams recorded in acidic and basic environment respectively indicate a significant influence of CMC in the formation of silver nanoparticles under the applied synthesis conditions.

Synthesis of silver nanoparticles with mixture of extracts revealed that for mixing ratios between components in which the extract of *Salvia officinalis* and silver nitrate are in excess of the extract of Sapindus mukorossi (1:2:2 - 1:20:20) during the initial monitoring (3 hours at 20 minutes intervals) significant spectral especially in the mixing reports 1:10:10 and 1:20:20 respectively. The formation of silver nanoparticles is especially favored in these two mixing reports mentioned above, both at 180 minutes after the beginning of the synthesis and especially over a longer period of time; the behavior of the mixtures of the extracts in the investigated mixing reports indicates an optimal mixing ratio for this system (*Sapindus mukorossi* extract : *Salvia officinalis* extract : 10 mM silver nitrate) located in the range 1:10:10 - 1:20:20.

A comparative analysis was also performed based on UV-VIS spectroscopy data considering the synthesis of silver nanoparticles with mixture of extracts and respectively by using individual components / extracts. In the case of the mixing volumetric ratio 1:10:10 a very well delimited absorption maximum is observed at 5 days, as a narrow bandwidth with significantly increased intensity compared to sage extract, indicating a reduced particle size distribution and a higher stabilization of the nanoparticles from a dimensional point of view; for this mixing ratio (compared to the others) the UV-VIS spectrum suggests a synergistic effect of the two extracts.

A notable difference in the case of the mixture of extracts compared with the extract of *Sapindus mukorossi* as such is observed in the case of the volumetric ratio equal to 1:1:1 respectively to a concentration of 2% (% vol.) of the extract. The influence of *Sapindus mukorossi* extract in the mixture is observed in all investigated cases, the variation of the relative area for the extracts in the mixture being similar to the variation of the extract of *Sapindus mukorossi* as such. The relative area associated with the silver nanoparticles shows a slow growth approximately linear while suggesting a stabilization process due in particular to the extract of *Sapindus mukorossi*. The more pronounced variation / difference observed in the case of the 1:1:1 ratio could be associated with a stabilization effect more pronounced during the pre-cellular stage; the differentiation from the case of using only the sage extract is obvious, in this case the process of reducing the silver ions with the formation of new particles taking place at high speed, but the variation of the relative area can be associated with the agglomeration of the formed nanoparticles.

The involvement of the chemical species from *Sapindus mukorossi* extract in the reduction process results especially in the case of near or higher concentrations (2%, 3% and 4%) relative to the critical micellar concentration, from the variation of the relative area in the first 80 minutes of contacting the precursors for the mixture of extracts compared to sage extract; cannot be excluded also the possibility of changing the value of the critical micellar concentration of *Sapindus mukorossi* extract mixed with sage as compared to the extract as such be excluded.

Composite hydrogel with PVA-HC polymeric matrix (crosslinking through temperature cycles) - The presence of silver nanoparticles can be highlighted in the UV-VIS absorption spectrum by the existence of a well-defined absorption maximum (located at 425.68 nm / 0.433 - absorbance) present only in the hydrogel sample spectrum with silver nanoparticles. The aspect of the absorption band suggests the existence of nanoparticles in solution with a relatively narrow particle size spectrum, specifying that the sampling for analysis was performed from the supernatant and therefore the possibility existence of nanoparticles in the matrix of the hydrogel that did not migrate in aqueous solution.

Composite hydrogels with PVA-HC polymeric matrix (irradiation crosslinking) - The existence of silver nanoparticles is evidenced in the UV-VIS absorption spectrum of hydrogel samples by absorption maxima in the 400-430 nm range.

- In the absence of the vegetable extract from the synthesis mixture, the absorption maxima are shifted to larger wavelengths, suggesting the existence of larger nanoparticles, while the presence of the vegetable extract causes the displacement of these maxima to smaller wavelengths; this displacement could be due to the stabilizing effect of the compounds in the plant extract which causes a dimensional stabilization of the nanoparticles. At the same time, the role of the vegetable extract as a reducing agent can be suggested by the amplitude of the higher absorption maxima compared to the mixtures without vegetable extract, for both irradiation doses.

- At a higher dose of irradiation, it is noted an increase of the maximum absorption (especially in the case of the absence of the vegetable extract in the mixture) in the same time with a relative narrowing of the absorption band.
- The data obtained could suggest a first direction of optimization of the synthesis process in order to find an optimal ratio between the irradiation dose and the extract content of the synthesis mixture.
- The UV-VIS analysis at 100 days from the preparation of the hydrogel samples with PVA-HC matrix shows a high stability of the respective systems, the absorption spectra being almost identical to those recorded at 5 days.

Composite hydrogels with PAA-A polymeric matrix (crosslinking through temperature cycles) - UV-VIS absorption spectra recorded for hydrogel samples with PAA-A polymer matrix highlight the appearance of band-type maxima that can be attributed to the formation and existence of the silver nanoparticles. These observations suggest the possibility of involvement of the compounds from *Sapindus mukorossi* extract not only in reducing, forming and stabilizing silver nanoparticles but also in the crosslinking of the basic polymeric backbone.

- For NPAg hydrogel samples the recorded band-type maxima (NPAg hydrogel - *Salvia officinalis* extract: 416.14 nm / 1.466 A and 352.42 nm / 1.487 A; NPAg hydrogel - *Sapindus mukorossi* extract: 426.23 nm / 0.507 A; hydrogel with NPAg - mixture of extracts: 434.05 nm / 0.612 A) suggests the existence of a relatively large number of nanoparticles with a large particle size distribution.
- In comparison with the spectrum of plant extracts, a significant decrease of the maximums present in the plant extracts can be noticed, especially for the samples in which the extract of *Salvia officinalis* is present. This modification could confirm the involvement of certain compounds from the *Salvia officinalis* extract in the process of reducing and stabilizing of the nanoparticles, which influence the process mentioned in a higher degree compared to the compounds from *Sapindus mukorossi* extract.
- The stability of silver nanoparticles within hydrogels can also be highlighted by recording absorption spectra in UV-VIS at time intervals from synthesis. Noticeable changes in the absorption spectrum occur especially in the case of the hydrogel with silver nanoparticles - *Sapindus mukorossi* extract, the maximum absorption being reduced in intensity over time, this may be due to the incorporation / retention in the gel of a fraction of the nanoparticles presented initially in solution.

Composite hydrogels with PAA-A polymeric matrix (irradiation crosslinking) - Absorption spectra have highlighted the existence of absorption maxima / bands that can be associated with the existence of silver nanoparticles and a number of particularities from which may be mentioned:

- All the analyzed samples indicate an increase of the absorption maximum with the increase of the irradiation dose. This change is more pronounced for the samples of NPAg hydrogel - mixture of extracts and respectively NPAg hydrogel - without extract / mixture of extracts. This may be due to the generation in the system of an increased number of free radicals generated mainly by the polymeric matrix but also by a number of compounds in plant extracts. The aspect of absorption maxima for the samples with and without vegetable extract respectively, indicates (the shift of the maximum towards smaller wavelengths) the role of the compounds from the vegetable extract in stabilizing the nanoparticles with the formation of smaller nanoparticles. The irradiation dose, as indicated by the absorption spectra, for the hydrogels with NPAg - extract of *Salvia officinalis* and *Sapindus mukorossi* respectively, does not significantly influence the generation of nanoparticles; the obtained results would suggest a possible synergistic effect (both in terms of generation and stabilization of nanoparticles) due to the compounds present in the two extracts following irradiation.

- The displacement of the maximum position is significant especially for the hydrogel with NPAg - mixture of plant extracts, suggesting the existence of larger nanoparticles with the increasing of irradiation dose. The absence of a significant displacement of the absorption maximum with the increase of the irradiation dose suggests that the size of the metallic silver nanoclusters formed is not significantly influenced by the irradiation dose [317].
- The stability of the silver nanoparticles in all tested systems proves to be great for all the analyzed systems at both irradiation doses. This behavior indicates along with the stabilizing role of the compounds from the plant extracts and the involvement of the polymeric matrix / its components in the stabilization process of the nanoparticles.

Conclusions from the study of the synthesis of silver nanoparticles / composite hydrogels by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis

The study of the synthesis of silver nanoparticles with *Salvia officinalis* extract also used Fourier transform (FTIR) infrared spectroscopy analysis to observe potential correlations with the characterization methods of the vegetable extract. Given that the present study also looked at the influence of pH on the growth dynamics of nanoparticles, the changes in the IR spectrum of the aqueous extract in basic and acid solution were followed. The observed spectral changes can be attributed to the structural changes caused by the addition of the potassium hydroxide solution in the extract having an effect on the functions containing the carbonyl group. The overall appearance of the new absorption peaks in the spectrum indicates the important modification of some functional groups from the structure of the compounds present in the extract in basic environment; the changes observed in the IR spectra of the extract in acidic and alkaline environment can be attributed to the structural changes due to the hydrolysis of the amide groups, this could also explain the changes in the IR spectra of sage extract after the addition of silver nitrate and the weak plasmonic response of the silver nitrate mixture : vegetable extract in acid solution.

The FTIR analysis (performed for the vegetable extract, in neutral, acidic and basic solution, and for the synthesis mixtures respectively) showed in the IR spectra for the plant extract a wide absorption band with a maximum centered at 3400 cm^{-1} which can be correlated with the content of phenolic compounds highlighted by determinations made for the content of total phenols, flavonoids and tannins. On the other hand, structural changes were identified in the case of the vegetable extract in acid and alkaline solution, consisting of the displacement of some peaks and the appearance of new ones, which were associated with the action of the hydroxide or acid introduced into solution. Significant changes were observed in the range 1600-1800 cm^{-1}, due to the stretching vibrations of C-O bonds specific to compounds with carbonyl groups. Following the addition of silver nitrate to the plant extract, some peaks were displaced after the formation of the metal nanoparticles; these displacements can be associated with the interactions between some functional groups of the organic species with the metal nanoparticles at the metal-solution interface. FTIR spectra recording studying the influence of temperature on the synthesis of silver nanoparticles with *Salvia officinalis* extract, was performed to obtain information regarding the nature of the interactions between the silver nanoparticles and the compounds present in the plant extract. The displacement of some maxima present in the spectrum after the formation of the silver nanoparticles can be associated with the interactions between the functional groups of the organic species with the metallic surface at its interface.

Functional groups that might be involved in stabilizing nanoparticles synthesized with *Sapindus mukorossi* extract have been investigated by FTIR spectroscopy, a series of recent studies in the field indicating the possibility of direct detection of saponins in crude aqueous and alcoholic extracts, before purification, using FTIR spectroscopy, reducing thus the duration of the analysis and the need for preliminary purification steps. The FTIR profile of plant extract and synthesized silver nanoparticles highlights the existence of biomolecules, with specific functional groups of flavonoids and saponins, which can act as stabilizers of nanoparticles; The observed spectral changes suggest the stabilization of silver nanoparticles through functional groups associated with biomolecules such as flavonoids and saponins, present in the extract, these interactions arising through carboxylic groups at the level of saponins as well as carbonyl groups in the flavonoid structure.

Composite hydrogel with PVA-HC polymeric matrix (crosslinking through temperature cycles) - A similarity between IR spectra can be observed for the samples of PVA-HC hybrid matrix hydrogels, respectively with *Salvia officinalis* extract, silver nanoparticles, silver nitrate and polymeric matrix as such. This would suggest an advanced incorporation of the components of the nanomaterial obtained in the polymeric matrix. The main changes observed in the IR spectrum occur mainly between the components of the polymeric matrix (collagen hydrolysate and polyvinyl alcohol) and the polymeric matrix obtained on their basis. Significant peaks recorded in the FTIR spectra of the hydrogel-type nanomaterial with hybrid polymer matrix polyvinyl alcohol - collagen hydrolysate and silver nanoparticles, as well as those associated with the control samples, are presented in Annex 7 (Table 7.1).

Composite hydrogel with PVA-HC polymeric matrix (irradiation crosslinking)

FTIR spectra for PVA-HC polymeric matrix hydrogels and silver nanoparticles crosslinked by irradiation at 20 kGy show no significant changes compared to the control samples, which would suggest an advanced incorporation of silver nanoparticles into the polymeric matrix. The observed spectral changes are related to the slight displacement of some peaks in the sample spectrum with silver nanoparticles compared to the control sample spectrum.

Initially, the spectra appear similar indicating that the polymer matrix / the basic structure of the collagen undergoes minor changes after irradiation. However, the observed changes can give indications on the structural changes due to crosslinking, especially through the amide bands. The band associated with the amide A (╔3258 cm^{-1} in the case of the non-irradiated sample) undergoes minor changes due to the irradiation, moving slightly to higher wavenumbers in the irradiated samples, with an increase in intensity, especially in the case of silver nitrate samples but without plant extract, the displacement or reduction of the intensity of this band being related to the cleavage of the helical collagen structure. The position of the absorption band associated with the amide I (╔1630 cm^{-1} in the case of the non-irradiated sample; stretching vibrations C=O from the amide bond) moves slightly to higher wavenumbers in the spectrum of the irradiated samples with a reduction in the intensity of the spectral band. In general, this band located between 1650 cm^{-1} and 1635 cm^{-1} appears in the case of collagen with helical structure or random spiral structure. The decrease in intensity of the absorption band associated with amide I (1600-1690 cm^{-1}) in the case of irradiated samples would indicate that irradiation induces crosslinking in the collagen molecules by the formation of peptide bonds. This band being particularly sensitive to minor variations in molecular geometry and hydrogen bonding, the decrease in intensity may be associated with the disappearance of secondary collagen structures (alpha-helix, beta-structure; secondary structure constitutes an ordered polypeptide arrangement in a more compact form stabilized by hydrogen bonds). The decrease in intensity of the spectral bands associated with amide I and II concomitantly with their shift to higher wavenumbers in the case of irradiated samples may indicate the formation of hydrogen bonds between the amine groups of collagen and the hydroxyl groups of polyvinyl alcohol. The absorption band associated with amide II (╔1535 cm^{-1} in the case of the non-irradiated sample; N-H deformation and C-N stretching vibrations) can be significantly influenced by irradiation; positioning this band to higherr wavenumbers would indicate a helical structure (╔1550 cm^{-1} in the case of pure collagen). The absorption band centered at ~1238 cm^{-1} associated with amide III (non-irradiated sample) undergoes a split in two peaks of reduced intensity in the spectrum of irradiated samples, this modification being associated with the residual aminoacids in the composition of the denatured collagen following irradiation. Following exposure to irradiation with gamma radiation, collagen and collagenous materials undergo crosslinking and cleavage / degradation processes. In general, the crosslinking predominates if the sample is in aqueous environment whereas in the case of the dry sample the cleavage / distortion predominates. The crosslinking mechanism proposed by some authors [337] involves the hydroxyl radicals resulting from the radiolysis of water that interacts with the polymer chain forming an intermediate polymeric radical that can subsequently induce intermolecular crosslinking or degradation by intra- and intermolecular reactions.

Composite hydrogels with PAA-A polymeric matrix (crosslinking through temperature cycles) - The interpretation of the FTIR spectra aimed to identify the absorption maxima that undergo changes in the analyzed media (crude plant extract, polymeric matrix components and hydrogels with silver nanoparticles). Changes in the position of the spectral maxima can be associated with the adsorption of the constituents of the plant extract on the surface of the silver nanoparticles, the bonds that may occur following the crosslinking of the polymeric matrix and the interaction between it and / or the silver nanoparticles, respectively the plant extract.

The FTIR spectrum of the polymeric matrix generally has similarities to the polyacrylamide (PAA) spectrum, notable differences being observed especially compared to the starch spectrum in the region below 1800 cm^{-1}. The interactions between the nitrogen functional groups present in the polymeric matrix and the metal atoms are generally manifested in a shift to larger wavenumbers of the bands corresponding to the nitrogen functional groups in the FTIR spectrum. The native starch has complex vibrational characteristics due to the pyranose cycle in the glycosidic units in the region below 800 cm^{-1} in the FTIR spectrum. The spectral characteristics of the irradiated starch are similar to those of the native one with slight displacements of the maxima. These shifts do not indicate a clear and obvious change in the starch structure. However, these minor changes, especially for the bands attributed to the C-H and O-H bonds, may suggest that the stability of the inter- and intramolecular hydrogen bonds is affected in the irradiation process.

Composite hydrogels with PAA-A polymeric matrix (irradiation crosslinking) - FTIR analysis of composite hydrogels has led to the recording of relatively similar absorption spectra but with a number of particularities that suggest the existence of interactions between the polymeric matrix / its components - compounds from the vegetable extract - silver nanoparticles:

- ➢ The broad spectral band from the control sample spectrum is reduced in intensity in the case of NPAg hydrogels in the same time with a narrowing of the band. The maximum absorption from ╔3190 cm^{-1} persists especially in the case of the NPAg hydrogel generated by irradiation in the presence of silver nitrate (╔3182 cm^{-1}). The presence of this band may be associated with the O-H stretching vibrations, the OH groups characteristic of the compounds in the plant extracts, the saponin OH groups. The modification of this band could be due to the polyphenolic compounds in the extract / extracts that act as captors of the radicals resulting from the irradiation.

- The maximum located at ╓2930 cm^{-1} is reduced in intensity in the case of hydrogels with NPAg / extract of *Salvia officinalis* and *Sapindus mukorossi* respectively with slight displacement to smaller wavenumbers. This maximum may be associated with the C-H, CH_2- and CH_3- stretching vibrations, the asymmetrical C-H stretching vibrations.
- In the spectrum of hydrogels with NPAg / *Sapindus mukorossi* extract and extracts mixture a maximum appears at ╓1722 cm^{-1} and ╓1719 cm^{-1} respectively. The presence of this maximum associated with the stretching vibrations C=O, aromatic combinations, carboxylic acid, ketone, ester, suggests the involvement of the compounds of the extract (saponins) in the reduction / stabilization of NPAg and a possible interaction with the components of the polymeric matrix.
- The three maxima associated with the spectral band in the control sample (╓1659 cm^{-1}, ╓1605 cm^{-1} and ╓1553 cm^{-1}) and the hydrogel with NPAg / silver nitrate do not significantly change their position but are significantly reduced in the case of NPAg hydrogels. / vegetable extract. This variation suggests a possible interaction between the compounds present in the extract and the polymeric matrix / its components. At the same time, the maximum at ╓1553 cm^{-1} is significantly reduced especially for the hydrogels with NPAg / *Sapindus mukorossi* extract and extracts mixture. The presence of this band can be associated with the stretching vibrations C=O (1659 cm^{-1}) and respectively the bending vibrations N-H (1605 cm^{-1}) of the amide groups.
- The maximum located at ╓1445 cm^{-1} is significantly decreased in the spectrum of NPAg hydrogels / extracts or mixture of extracts remaining almost unchanged in the case of NPAg hydrogels obtained by irradiation. The silver nanoparticles could be fixed in the polymeric matrix and through the compounds of the plant extract which could act as a binder between the matrix and the NPAg contributing to the crosslinking and stabilization of the nanoparticles.
- The maximum localized at ╓1402 cm^{-1} also appears in the spectrum of the hydrogel with NPAg / extract of *Salvia officinalis* being absent in the spectrum of the hydrogel with NPAg / extract of *Sapindus mukorossi* and respectively very diminished in the spectrum of the hydrogel with NPAg / mixture of extracts (P11-ir20); the presence of this maximum may be associated with the C-N stretching vibrations characteristic of the amide strip grafted on the starch skeleton. This suggests the interaction of certain specific compounds of *Sapindus mukorossi* extract with the polymeric matrix / starch.
- In the case of hydrogels with NPAg / *Sapindus mukorossi* extract or mixture of extracts, is present a distinct maximum centered at ╓1240 cm^{-1} respectively ╓1244 cm^{-1}. The maximum could be associated with the presence of compounds in *Sapindus mukorossi* extract; C-O-C bonds and carboxylic ester groups, C-CH_3 bonds, aryl-O bondings in aromatic ethers, aromatic C-O- epoxy and oxirane rings, primary aromatic C-N amines.
- The maximum from ╓1150 cm^{-1} present in the spectrum of the polymeric matrix and of the hydrogels with NPAg / *Salvia officinalis* extract and silver nitrate respectively can be associated with the C-O-C stretching vibrations. In the spectrum of the hydrogel with NPAg / *Sapindus mukorossi* extract and mixture of extracts respectively this maximum is absent indicating a possible interaction between compounds of *Sapindus mukorossi* extract and the polymeric matrix.

Conclusions from the study of the synthesis of silver nanoparticles / composite hydrogels by X-ray diffraction (XRD)

The diffractograms recorded at the synthesis of silver nanoparticles with *Sapindus mukorossi* extract, for different volumetric ratios extract : ionic solution, allowed comparative, structural and compositional evaluation, of the samples under analysis. The diffractograms of the control samples (extract) show a well-defined maximum in the 2ẽ range of 10-25° being absent narrow maxima, thus suggesting the amorphous character of the dry aqueous extract. For the synthesis mixtures the intensity of the maximum associated with the amorphous character decreases as the content of the extract content in the mixture increases with the appearance of narrow maxima, suggesting the formation of crystalline compounds during the synthesis. The concomitant presence of the amorphous and crystalline phase after synthesis suggests the attachment of some compounds from the extract to the formed nanoparticles, behavior that would confirm the results obtained by ultraviolet-visible and infrared spectroscopy. The experimental and standard diffraction data confirm the identification of silver as a crystalline phase in the studied mixtures; for significant maxima, diffraction angles, interplanar distances and Miller indices are indicated. By comparing the intensity of the localized maximum at 38°, it is observed that the highest values were recorded for the mixture with 1:1 volumetric synthesis ratio, extract : ionic salt, the intensity of this maximum being reduced for the synthesis ratios of 1:2 and 1:4 respectively. Also, this maximum is greatly decreased at the 2:1 synthesis volumetric ratio, being absent in the 4:1 volumetric ratio diffractogram.

XRD analysis confirmed the presence of crystalline silver in the samples studied especially in the case of the volumetric synthesis ratio equal to 1:1 and below, the presence of unreacted silver nitrate being also highlighted. By referring also to a series of literature data, the X-ray diffraction allowed to obtain information regarding the identification of the nanoparticles and the evolution of the crystallinity of the investigated samples.

X-ray diffraction (XRD) analysis aimed at evaluating the crystallinity of the investigated nanomaterials as well as confirming the presence of silver compounds by analyzing the composite hydrogels obtained with extracts of *Salvia officinalis*, *Sapindus mukorossi* and mixture of extracts, respectively corresponding polymeric matrices.

The diffractogram results for hydrogels with PAA-A polymeric matrix indicated differences between the hydrogels obtained with extract / mixture of *Sapindus mukorossi* extracts (P10-1902 and P11-1902) and those obtained only with *Salvia officinalis* extract (P9-1902) regarding the presence or absence of peaks in the case of the aforementioned samples. The peaks observed at 2ẽ values of approximately 32° along with the asymmetry of the peak at 38° may suggest the presence of centrosymmetric monoclinic AgO silver oxide ((ICDD 04-007-1374) with corresponding planes (2.0.0), (-1.1.1) and (-2.0.2). Non-centrosymmetric orthorhombic silver nitrate (ICDD 01-074-4790) can be considered present for samples P10-1902 and P11-1902 due to the peaks observed at 2ẽ values of about 20°, 21° , 24°, 30° which may be associated with the crystallization plans (1.1.1), (2.0.1), (0.2.0) and (1.1.2). These observations lead to the conclusion that the use of the different reducing agents present in the extracts contributes to the properties of the obtained nanomaterials, therefore the extract of *Salvia officinalis* as a reducing agent has a different behavior from that of *Sapindus mukorossi;* in the first case the synthesis process can be considered more efficient since silver nitrate or silver oxide were not identified in the final produt or these are present below the detection limit of the X-ray diffraction technique. In the case of the mixture of extracts, the influence of both extracts was observed on the properties of the final product.

The influence of the reducing agent (vegetable extract) used was also highlighted by comparing the relative crystallinity. The data obtained indicate an increase in the degree of crystallinity in the order P10, P9 and P11 respectively, the results indicating the mixed, crystalline and amorphous character of the synthesized materials as well as that the type of extract used as reducing agent and the crosslinking variant applied, influence the crystallinity of the final product. .

The peaks recorded for the PVA / HC polymeric matrix hydrogels were associated with organic compounds in which silver is linked to the macromolecular structure in different stoichiometric ratios. As a result peaks located at 2ẽ values of approximately 29°, 32°, 38°, 40°, 42°, 46°, some of low intensity, may be due to silver - polyvinyl alcohol (Ag-PVA) compounds with molecular formulas such as: $Ag(C_2H_4O)_{48}$ - ICDD 00-058-1070, $Ag(C_2H_4O)_{121}$ - ICDD 00-058-1069, $Ag(C_2H_4O)_{243}$ - ICDD 00-058-1068. The differences observed in the diffractograms of the synthesized hydrogels and the control samples, both in the case of crosslinking by thermal cycles and by irradiation, indicate the influence of the synthesis process applied on the crystallinity and composition of the polymeric matrix.

Conclusions from the study of the synthesis of silver nanoparticles / composite hydrogels by scanning electron microscopy and energy dispersion X-ray spectroscopy (SEM-EDS)

Scanning electron microscopy (SEM) analysis was used to characterize the size, shape and morphology of silver nanoparticles synthesized with *Salvia officinalis* extract. From the SEM images it was observed that when in the initial synthesis mixture the silver nitrate is in excess of the extract, conglomerates with fractal crystallization pattern are formed. The size of the conglomerates and the reduction of the number of nanoparticles are directly proportional to the silver nitrate content in the mixture. Higher content of silver nitrate in the mixture results in the formation of particles with micro and nanometric dimensions with spherical and cylindrical shape (rods and nanowires). A decrease in the number of nanoparticles formed in the solution can be observed for the samples in which the sage extract is excessively volumetric with respect to the silver nitrate; at the same time, there is a reduction in the size of the formed nanoparticles. In the case of the volumetric mixing ratio of silver nitrate: sage extract equal to 1:4 cubic nanoparticles next to the spherical ones could be highlighted.

Following the SEM analysis, in the synthesis of silver nanoparticles with *Sapindus mukorossi* extract, it can be observed the formation of conglomerates when a higher concentration of extract is used in the initial synthesis mixture together with a reduction of the nanoparticles content; in all cases nanoparticles of spherical shape were highlighted.

Scanning electron microscopy analysis used to characterize the size, shape and morphology of the silver nanoparticles synthesized with mixture of extracts, took into account the samples prepared in mixing ratios of the components of 1:2:2 and 1:10:10 respectively (synthesis mixtures from those in which the extract of *Salvia officinalis* and silver nitrate are in excess of the extract of *Sapindus mukorossi*, and which have been noticeable changes following UV-VIS monitoring). From the SEM images we could observe the formation of some conglomerates whose size is reduced as the content of extract of *Sapindus mukorossi* decreases in the synthesis mixture; the same tendency also occurs with respect to the size of the approximately spherical silver nanoparticles and their number (reducing the size and increasing the number of nanoparticles for the mixing ratio 1:10:10 compared to the mixing ratio 1:2:2).

Composite hydrogels with PVA-HC polymeric matrix (crosslinking through temperature cycles and irradiation) - The morphology / shape of silver nanoparticles is relatively complex, some of them having generally associated polygonal shapes as spherical. The need to dry the suspension before making observations leads to agglomerations of the nanoparticles, the actual shape of the colloid particles being thus more difficult to accurately observe. Relatively spherical and polydisperse, with agglomerations, with dimensions in the range 21÷37 nm. The EDS spectra highlighted with the spots associated with silver and those associated with carbon, oxygen and nitrogen that confirm the presence of stabilizers consisting of alkyl chains in the examined samples. In the central area of the spectrum can be clearly observed the peak associated with the silver located at 2.5 keV this maximum being associated with the K, L lines characteristic of the silver. It is known from the literature in the field that the intensities of the spectral lines are proportional to the abundance of the element, but given that the EDS method cannot distinguish between the elemental silver and the silver atoms present in other compounds, the result of the analysis shows values of the relative concentrations in the investigated samples.

Composite hydrogels with PAA-A polymeric matrix (crosslinking through temperature cycles and irradiation)

SEM analysis for NPAg composite hydrogels using *Salvia officinalis* extract revealed the existence of nanoparticles of approximately spherical shape, dispersed, with dimensions in the range 20 - 60 nm. The relative average concentration of silver in the investigated samples varied between 13.6% (crosslinking through temperature cycles), 28.5% (irradiation - 20 kGy) and 15.2% (irradiation - 50 kGy) respectively; the high values of the relative average concentration of carbon and oxygen indicate the existence of the stabilizing layer induced by the polymeric matrix and the phytochemical compounds in the extract on the silver nanoparticles. The increase of the silver content following the irradiation / dose of irradiation could also be associated with the cleavage of the polymeric chains as a result of the irradiation and consequently a decrease of the carbon and oxygen content in the stabilizing layer around the nanoparticles; a similar trend is recorded by the variation of the ratio of the relative average concentration of silver (C_{mAg}) to the relative average concentration of carbon (C_{mC}) and oxygen (C_{mO}) respectively.

For the composite hydrogels with NPAg using *Sapindus mukorossi* extract, nanoparticles of approximately spherical shape, dispersed, with dimensions in the range of 30 - 60 nm were observed. A special aspect regarding these investigated samples is the presence of the observable gel film after processing the sample for the SEM-EDS analysis. The value of the ratio C_{mAg} / C_{mC} and Cm_{Ag} / C_{mO} also shows a variation similar to sage extract in this case. The higher values in the case of the relative average concentration of carbon and oxygen, for each crosslinking variant, compared to those of sage extract, suggest the adhesion of the stabilizing layer (polymeric matrix / phytochemical compounds from the extract) to a greater extent.

The use of the mixture of extracts to obtain the composite hydrogels with NPAg revealed from the SEM-EDS analysis the existence of spherical shaped nanoparticles (in some cases particle agglomerations can be observed) with dimensions between 10 - 60 nm. A first remark regarding the results obtained is related to obtaining higher values of C_{mAg} compared to the extracts used as such under similar conditions of synthesis / analysis, which suggests a synergistic effect of the phytochemical compounds present in the two extracts relative to the reduction / stabilization of nanoparticles. silver within the polymeric matrix. Secondly, a different variation of the ratio of the relative average concentrations (C_{mAg} / C_{mC} and C_{mAg} / C_{mO}) to the hydrogels obtained with extracts as such can be observed, respectively the highest values being obtained in the case of crosslinking through temperature cycles.

Conclusions from the evaluation of the antibacterial activity of the composite hydrogels with silver nanoparticles

The microbiological study performed on composite hydrogels with silver nanoparticles was made in order to highlight their antimicrobial character and to determine the minimum bactericidal dose on the strains of tested bacteria. Two strains of bacteria (in the form of pure lyophilized cultures) were selected, frequently involved in intrahospital infections: *Escherichia coli* ATCC reg.25922 - Gram-negative bacterium (pathogenic condition, highly resistant to antibiotic treatment) and *Staphylococcus aureus* ATCC reg25923 - Gram-positive, pathogenic Gram of coagulase-positive staphylococci.

The efficiency of composite hydrogels with silver nanoparticles was evaluated by means of the minimum bactericidal concentration (CMB). Thus, in a preliminary phase, the tests with smaller proportions of hydrogels (0.8 ml and 0.5 ml / test plate) were repeated, the results also indicating the lack of typical bacterial colonies, indicating a bactericidal effect on both bacterial strains. As a result of these tests, a differentiated sensitivity of the bacterial strains to the action of the tested nanomaterials was established, the strain of *Escherichia coli* being more sensitive than that of *Staphylococcus aureus*. For this reason, in subsequent tests, *Escherichia coli* strain assay was performed starting from the basic dilution d_0 with 0.5 ml hydrogel and 0.8 ml hydrogel respectively for *Staphylococcus aureus* strain testing. For lower d_0 values in plates appear typical colonies of bacteria, hydrogels showing only bacteriostatic effect.

For composite hydrogels with PVA-HC polymer matrix it was observed that as the dilution of the hydrogel increases (crosslinking through temperature cycles), respectively the concentration of silver nanoparticles / silver ions decreases in the environment, the number of specific colonies of *Staphylococcus aureus* increases considerably; the bacteria develop optimally with the less exposed to the action of the metal / metal ions, their multiplication being less and less inhibited. Irradiation crosslinking samples are the only ones that exhibit bacteriostatic effect at dilution d_3 (10^{-3}), respectively a number of colonies below 300, which according to the counting standard, can still be accepted in interpreting the results. A similar behavior was observed for the *Escherichia coli* strain assays, with the irradiation crosslinked hydrogels having also the most bacteriostatic effect at dilution d_3 (10^{-3}). The relatively higher values of the number of colonies in the case of *Escherichia coli* strain compared to that of *Staphylococcus aureus*, for the same hydrogel and the same dilution, must take into account the basic dilution d_0 from which it started (different for the two bacterial strains). However, in both bacterial strains even at lower dilutions (10^{-1}, 10^{-2}, and even 10^{-3}) of the hydrogels, they begin to lose their bactericidal effect, yet having a rather strong bacteriostatic effect - demonstrated by the relatively small number of colonies developed in plates - in particular hydrogels with silver nanoparticles obtained with vegetable extract and subjected to irradiation. The superior bacteriostatic effect in the case of irradiation crosslinked hydrogels, with extract of *Salvia officinalis* relative to silver nitrate hydrogels (hydrogels with silver nanoparticles generated by irradiation), suggests a possible amplified bacteriostatic effect by the compounds present in the plant extract.

In the case of composite hydrogels with PAA-A polymeric matrix, most of the hydrogel types tested have a significant bacteriostatic effect at dilution d_1 (10^{-1}), greatly diminished at dilution d_2 (10^{-2}) and absent at dilution d_3 (10^{-3}) (number of colonies over 300, which according to the counting standard mentioned in the thesis can no longer be accepted in interpreting the results). Notable among the tested samples are hydrogels with *Salvia officinalis* extract (crosslinking through temperature cycles) and respective with mixture of extracts (crosslinking through irradiation), which have bacteriostatic effect even at dilution d_3 (10^{-3}); the hydrogel with extracts mixture irradiated - 50 kGy is the only one that exhibit bactericidal effect at dilution d_1 (10^{-1}) on *Staphylococcus aureus* strain. The results also suggest a contribution to the antimicrobial activity of compounds in plant extracts (present at the level of the polymeric matrix and at the level of the silver nanoparticles as stabilizing agents). The generation of silver nanoparticles by irradiation also contributes to the antimicrobial effect of the final material (approximately similar or relatively higher values with increasing irradiation dose) but not to the same extent as the plant extract, as suggested by the values obtained for the samples with vegetable extract compared to those without extract subject to irradiation.

On the other hand, for the same type of material (polymeric matrix, plant extract), the irradiation crosslinking process compared to the one with temperature cycles induces a decrease of the antimicrobial potential at the dilutions tested; this behavior results when comparing the data for hydrogels with *Salvia officinalis* extract and *Sapindus mukorossi* extract. Irradiation in these cases may result in a reduction in the content of compounds associated with the extract through the free radicals generated and which would "consume" part of them. An atypical behavior in the aforementioned hydrogel series is the hydrogels obtained by mixing extracts in the sense that irradiation / irradiation dose amplifies the bactericidal effect; the higher values associated with the bacteriostatic effect (hydrogel with mixture of extracts crosslinked through temperature cycles), considering the values for the dilution d_1 (10^{-1}), and close to those of the hydrogel with the non-irradiated *Salvia officinalis* extract, suggest an antimicrobial activity due to sage extract and also a possible synergistic effect due to the two extracts in the mixture.

Hydrogels with silver nanoparticles / PAA-A polymer matrix tested on *Escherichia coli* strain have shown results similar to *Staphylococcus aureus* strain testing with some of the features that will be discussed below. Most of the types of hydrogels tested have a bacteriostatic effect at dilution d_1 (10^{-1}), greatly diminished at dilution d_2 (10^{-2}), respectively absent at most samples for dilution d_3 (10^{-3}) (number of colonies over 300, which according to the counting standard mentioned in the thesis can no longer be accepted in interpreting the results). Notably are the hydrogels with sage extract (crosslinking through temperature cycles) and the mixture of extracts (crosslinking - 50 kGy), which still have bacteriostatic effect at dilution d_3 (10^{-3}).

The results obtained also suggest a contribution to the antimicrobial activity of compounds from plant extracts. The generation of silver nanoparticles by irradiation also contributes to the antimicrobial effect of the final material (approximately similar or relatively higher values with increasing irradiation dose) but not to the same extent as the plant extract, as suggested by the values obtained for the samples with vegetable extract compared to those without extract ($AgNO_3$ / irradiation). For the same type of material (polymeric matrix, plant extract) the irradiation crosslinking process compared to the one with temperature cycles induces a decrease of the antimicrobial potential at the dilutions tested; irradiation in these cases may result in a reduction in the content of compounds associated with the extract through the free radicals generated and which would "consume" part of them. Atypical behavior in the aforementioned hydrogel series, as in the case of *Staphylococcus aureus* strain, is obtained by the hydrogels obtained with a mixture of extracts, irradiation / irradiation dose amplifying the bactericidal effect; the higher values associated with the bacteriostatic effect (hydrogel with mixture of extracts crosslinked through temperature cycles), if the value for the dilution d_1 (10^{-1}) is taken into account, and approximately identical for the hydrogel with non-irradiated *Salvia officinalis* extract suggests antimicrobial activity due in particular to the sage extract and also a possible synergistic effect due to the mixture between the two extracts.

The data obtained indicate that all the composite hydrogels with synthesized silver nanoparticles have a bacteriostatic effect on the strains of *Escherichia coli* and

Staphylococcus aureus, but different CMB values. The minimum bactericidal concentrations / doses can be deduced according to the basic dilution d_0 (10^0), 0.5 ml for *Escherichia coli* and 0.8 ml respectively for *Staphylococcus aureus,* from which the initial dilutions are made and from the last dilution to which the nanomaterial had the effect. bacteriostatic (the last dilution with a number of colonies / plate less than 300, according to ISO 7218 [196] for counting and interpreting the results of microbiological analyzes).

7.2 Own contributions

In the frame of doctoral thesis "Nanomaterials based on natural extracts with biomedical applications", the following personal contributions were made:

1) An extensive documentary study on metallic nanoparticles / nanomaterials was made, focusing on the "green" synthesis of silver nanoparticles with plant extracts and the main factors involved in their biosynthesis, nanomaterials with polymer matrix functionalized with silver nanoparticles and composite hydrogels. with silver nanoparticles. Also, aspects related to the mechanism of antimicrobial action of silver nanoparticles and their toxicology were considered.
2) A study was performed on the synthesis of silver nanoparticles with *Salvia officinalis* extract, that considered aspects related to the dynamics of the growth process of silver nanoparticles, the influence of the combination ratio ionic salt : plant extract, the influence of pH and temperature on the synthesis process.
3) Like the study carried out with *Salvia officinalis* extract, a study was also performed on the synthesis of silver nanoparticles with *Sapindus mukorossi* extract, in which, together with the influence of pH and combination ratio ionic salt : vegetable extract, was also highlighted the critical micellar concentration of the extract used.
4) The research also considered the synthesis of silver nanoparticles with a mixture of extracts (*Salvia officinalis* and *Sapindus mukorossi*) focusing on the influence of pH and mixing ratio between individual extracts.
5) Were obtained composite hydrogels with silver nanoparticles, with polymeric matrix (polyvinyl alcohol - collagen hydrolisate and polyacrylamide - starch), based on both synthetic compounds (polyvinyl alcohol and polyacrylamide) and natural compounds (collagen hydrolysate and starch) with high degree of biocompatibility. The variant of applied synthesis, the formation of nanoparticles *in situ* within a preformed hydrogel, involved obtaining in a first phase the preformed hydrogel which acts as a microreactor in which the nanoparticles were obtained with the aid of the above mentioned plant extracts. The crosslinking methods applied to the polymeric matrix (crosslinking by temperature / freezing - thawing and irradiation crosslinking, respectively) have considered the development of products and processes that reduce or eliminate the use and generation of potentially harmful substances.
6) A characterization by modern methods of analysis of the silver nanoparticles and of the synthesized nanomaterials has been realized, a special aspect in this respect being applied to the ultraviolet-visible spectroscopy using as a parameter the relative area associated with the silver nanoparticles.
7) A microbiological study was carried out on the synthesized nanomaterials to evaluate the antibacterial properties, demonstrating that all the obtained nanomaterials have bactericidal or bacteriostatic effect on bacteria with high incidence in nosocomial infections (*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*).
8) The issue addressed in the doctoral thesis, related to a number of fundamental aspects in the field of nanomaterials for biomedical applications, is one of the main directions of action of the research programs of excellence through which scientific knowledge in the field of nanomaterials is promoted. The development of biocompatible nanomaterials, with high functionality and reduced side effects in the case of medical applications, allowing for successful therapies and successful treatments, is an important area from the perspective of the lucrative potential but also of the population's health.

7.3 Research perspectives

The extension of the research area related to the field addressed in the present PhD thesis ("Nanomaterials based on natural extracts with biomedical applications"), could consider the following aspects / themes:

- The source / type and concentration of plant extracts - the way of obtaining and characterizing the plant extract (use of the extract in dry form / lyophilized);
- Correlation of the chemical composition and the synthesis parameters with the properties of the synthesized nanomaterials;
- Synthesis of materials that include natural extracts with therapeutic role and with well-determined synergistic action;
- Quantifying the production of nanomaterials / nanoparticles, establishing a duration for obtaining a certain volume of nanoparticles, standardizing the conditions for obtaining monodisperse particles, stability of the nanoparticles obtained by green synthesis;
- Identification of materials derived from plants suitable for the synthesis of specific nanomaterials / nanoparticles;
- Clarification of the biochemical and molecular mechanisms involved in the formation of specific nanoparticles;
- Carrying out cytotoxicity tests and extending the microbiological studies and to other bacterial strains with high nosocomial incidence.

Selective bibliography

1. Lu, I. and S. Ozcan, *Green nanomaterials: On track for a sustainable future*, **2015**, Nano Today, 10, 417-420.
2. Shamim, N. and V. K. Sharma, *Sustainable Nanotechnology and the Environment: Advances and Achievements*, American Chemical Society, N. Shamim (Ed.), Washington, DC, **2013**, 11-39.
3. Peralta-Videa, J. R., Y. Huang, J. G. Parsons, L. Zhao, L. Lopez-Moreno, J. A. Hernandez-Viezcas and J. L. Gardea-Torresdey, *Plant-based green synthesis of metallic nanoparticles: scientific curiosity or a realistic alternative to chemical synthesis ?*, **2016**, Nanotechnol. Environ. Eng., 1:4, https://doi.org/10.1007/s41204-016-0004-5
4. American Society for Testing and Materials, *Standard terminology relating to nanotechnology*, **2012**, E 2456-06, West Conshohocken PA.
5. *Commission Joint Research Centre Reference Report*, **2011**, Official Journal of the European Union, http://ec.europa.eu/environment/index_en.htm.
6. Bradley, B., *The great big question about really tiny materials*, **2015**, Fortune, 171(4), 192-202.
7. Charitidis, C. A., P. Georgiou, M. A. Koklioti, A-F. Trompeta and V. Markakis, *Manufacturing nanomaterials: from research to industry*, **2014**, Manuf. Rev., 1:11, doi:10.1051/mfreview/2014009.
8. Vance, M. E., T. Kuiken, E. P. Vejerano, S. P. McGinnis, M. F. Hochella, D. Rejeski and M. S. Hull, *Nanotechnology in real world: redeveloping the nanomaterial consumer products inventory*, **2015**, Beilstein J. Nanotechnol., 6, 1769-1780, doi:10.3762/bjnano.6.181.
9. Pacioni, N. L., C. D. Borsarelli, V. Rey and A. V. Veglia, *Synthetic Routes for the Preparation of Sliver Nanoparticles*, **2015**, în Silver Nanoparticle Applications in the fabrication and Design of Medical and Biosensing Devices, Alarcon, E; Griffith, M.; Udekwu, K. I. (Eds.), http://www.springer.com/978-3-319-11261-9.
21. Prabhu, S. and E. K. Poulose, *Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects*, **2012**, Nano Lett., 2(32), 1-10, http://www.inl-journal.com/content/2/1/32.
27. Durán N. and P. D. Marcato, *Nano-Antimicrobials: Chapter 12 Biotechnological Routes to Metallic Nanoparticles Production: Mechanistic Aspects, Antimicrobial Activity, Toxicity and Industrial Applications*, Cioffi N., Rai M. (Ed.), Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; **2012**, 337-374.
35. Pop, A., S. Muste, C. Mureșan, C. Pop and L. Salanță, *Comparative study regarding the importance of sage (Salvia officinalis L.) in terms of antioxidant capacity and antimicrobial activities*, **2013**, Hop and medicinal plants, XXI(1-2), 41-42.
44. Baharara, J., T. Ramezani, M. Mousavi and M. Asadi-Samani, *Antioxidant and anti-inflamatory activity of green synthesized silver nanoparticles using Salvia officinalis extract*, **2017**, Annals of Tropical Medicine and Public Health, 10, 1265-1270.
46. Sati, S. C., A. Sharma, O. P. Sati, D. M. Sati and S. K. Kothiyal, *Chemical constituents and bioactivities of genus Sapindus*, **2011**, International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy, 2(2), 403-409.
47. Upadhyay A. and D. K. Singh, *Pharmacological effects of Sapindus mukorossi*, **2012**, Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paolo, 54(5), 273-280.
66. Rybinski, W. V., *Editorial overview: natural surfactants*, **2001**, Current Opinions in Colloid Interface Science, 6, 146-147.
94. Polte, J., X. Tuaev, M. Wuithschick, A. Fischer, A. F. Thuenemann, K. Rademann, R. Kraehnert and F. Emmerling, **2012**, *Formation mechanism of silver nanoparticles:*

analogies and differences to the growth of gold nanoaprticles, ACS Nano, 6(7), 5791-5802.

97. Palza, H., *Antimicrobial Polymers with Metal Nanoparticles*, **2015**, International Journal of Molecular Sciences, 16, 2099-2116.

118. Thoniyot, P., M. J. Tan, A. Abdul Karim, D. J. Young and X. J. Loh, *Nanoparticle-hydrogel composites: Concept, design, and applications of these promising, multifunctional materials*, **2015**, Advanced Science, 2(1-2), 1400010.

172. Yildirimer, L., T. K. Nguyen Thanh, M. Loizidou and A. M. Seifalian, *Toxicological considerations of clinically applicable nanoparticles*, **2011**, Nano Today, 6, 585-607.

183. Turker-Kaya, S. and C. W. Huck, *A Review of Mid-Infrared and Near-Infrared Imaging: Principles, Concepts and Applications in Plant Tissue Analysis*, **2017**, Molecules 2017, 22, 168; doi:10.3390/molecules22010168.

213. **Olteanu, R. L**., C. M. Nicolescu, M. Bumbac, I. D. DulamŁ, R.M Ion and I. R. Suica-Bunghez, *Study on Critical Micelle Concentration influence in Green Synthesis of Silver Nanoparticles assisted by Sapindus mukorossi aqueous extract*, **2018**, Revista de Chimie, 69(6), 1339-1345.

218. **Olteanu, R. L**., C. M. Nicolescu and M. Bumbac, *Influence of Phytochemical Reductive Capacity on Ultraviolet–visible Spectroscopic Behavior of Silver Nanoparticles*, **2017**, Analytical Letters, 50(17), 2786-2801.

219. Nicolescu, C. M., **R. L. Olteanu** and M. Bumbac, *Growth Dynamics Study of Silver Nanoparticles Obtained by Green Synthesis using Salvia officinalis Extract*, **2017**, Analytical Letters, 50(17), 2802-2821.

223. Dumitrescu, C., **R. L. Olteanu**, M. Bumbac and L. M. Gorghiu, *Antioxidant Effect of Some Flavonoids on Organic Substrate*, **2009**, Revista de Chimie, 60(4), 329-331.

224. Ahmed, S., M. Ahmad, B. L. Swami and S. Ikram, *A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise*, **2016**, Journal of Advanced Research, 7(1), 17-28.

248. Tmakova, L., R. Sekretar and S. Schmidt, *Plant-derived surfactants as an alternative to synthetic surfactants: surface and antioxidant activities*, **2016**, Chemical Papers, 70(2), 188-195.

259. Upadhayay, L. S. B. and N. Verma, *Recent Developments and Applications in Plant-extract Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles*, **2015**, Analytical Letters 48(17), 2676-2692.

276. Bumbac, M., **R. L. Olteanu**, R. M. Ion and C. M. Nicolescu, *Influence of temperature on the growth of silver nanoparticles synthesized using Salvia officinalis aqueous extract*, **2018**, Revista de Chimie, 69(8), 1934-1938.

LIST OF THE PUBLISHED PAPERS

A. *ISI articles*

(38 papers from which 4 in the doctoral thesis domain)

A.1 List of the published papers in the doctoral thesis domain

1. **R. L. Olteanu**, C. M. Nicolescu, M. Bumbac, *Influence of Phytochemical Reductive Capacity on Ultraviolet-visible Spectroscopic Behavior of Silver Nanoparticles*, Analytical Letters, 50(17), 2786-2801, 2017.
2. C. M. Nicolescu, **R. L. Olteanu**, M. Bumbac, *Growth Dynamics Study of Silver Nanoparticles Obtained by Green Synthesis using Salvia officinalis Extract*, Analytical Letters, 50(17), 2802-2821, 2017.
3. **R. L. Olteanu**, C. M. Nicolescu, M. Bumbac, I. D. DulamŁ, R. M. Ion, I. R. Suica-Bunghez, *Study on Critical Micelle Concentration influence in Green Synthesis of Silver Nanoparticles assisted by Sapindus mukorossi aqueous extract,* Revista de Chimie, 69(6), 1339-1345, 2018.
4. M. Bumbac**, R. L. Olteanu**, R. M. Ion. C. M. Nicolescu, *Influence of temperature on the growth of silver nanoparticles synthesized using Salvia officinalis aqueous extract*, Revista de Chimie, 69(8), 1934-1938, 2018.

A.2 List of the published papers in related domain (chemistry) of doctoral thesis (selective citations)

1. S. Jipa, T. Zaharescu, W. Kappel, T. Setnescu, M. Lungulescu, **R. L. Olteanu**, *Vegetal polyphenols as antioxidants in polymers*, Journal of Optoelectronics and Advanced Materials, 10(4), 837-840, 2008.
2. C. Dumitrescu, **R. L. Olteanu**, M. Bumbac, L. M. Gorghiu, *Antioxidant effect of Some Flavonoids on Organic Substrate*, Revista de Chimie, 60(4), 329-331, 2009.
3. L. M. Gorghiu, C. Dumitrescu, **R. L. Olteanu**, S. Jipa, *Natural compunds with antioxidant activity*, Buletinul USMV-CN, 63, 188-193, 2007.
4. C. RŁdulescu, **R. L. Olteanu**, C. Stihi, M. Florescu, D. Lazurca, I. D. DulamŁ, R. M. ῃtirbescu, S. Teodorescu, *Chemometric Assessment of Spectroscopic Techniques and Antioxidant Activity for Hippophae rhamnoides L. Extracts Obtained by Different Isolation Methods*, Analytical Letters, DOI:10.1080/00032719.2019.1590379, 2019.
5. C. M. Nicolescu, M. Bumbac, **R. L. Olteanu**, G. C. Alecu (Holban), D. N. BoboacŁ-MihŁescu, C. Necula, C. RŁdulescu, *Influence of extraction method on chemical composition from red grapes skin extract*, Journal of Science and Arts, 19, 1(46), 201-208, 2019.

B. *Participation at national / international conferences with papers in the field of doctoral thesis / related field (chemistry)*

1. The Fourth Edition of International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences (IC-ANMBES 2016), Bra’Hov, România:
    - 1.1 *Characterization of Silver and Copper Nanoparticles Synthesized by Bottom-Up Approach Using Plant Extracts,* **R. L. Olteanu**, C. M. Nicolescu, M. Bumbac, Book of Abstracts, ISSN 2360-3461, ISSN-L 2360-3461, pag. 91.
    - 1.2 *Study on the Synthesis Process of Silver Nanoparticles in Salvia Officinalis Extract Using UV-VIS Spectroscopy,* C. M. Nicolescu, **R. L. Olteanu**, M. Bumbac, Book of Abstracts, ISSN 2360-3461, ISSN-L 2360-3461, pag. 92.

2. The Fifth Edition of International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences (IC-ANMBES 2018), Brașov, România:
    - 2.1 *Bioactive Properties and Chemical Composition of Juglans Regia L. Extracts*, C. Radulescu, C. Stihi, M. Florescu, D. Lazurca, I. D. Dulama, S. Teodorescu, **R. L. Olteanu**, R. M. Știrbescu, Book of Abstracts, ISSN 2360-3461, ISSN-L 2360-3461, pag. 167.
    - *2.2 Pollution Effects on Painted Pottery of Romanian Cultural Heritage*, C. Rădulescu, A. Bintintan, M. Gligor, R. M. Ion, I. D. Dulamă, C. Stihi, S. Teodorescu, R. M. Știrbescu, **R. L. Olteanu**, I. A. Bucurică, Book of Abstracts, ISSN 2360-3461, ISSN-L 2360-3461, pag. 169.
3. 11th International Conference of Materials Science and Engineering (BraMat 2019), Brașov, România:
    - 3.1 *Banana flower nectar – mediated synthesis of silver nanoparticles*, N. M. Știrbescu, S. Teodorescu, **R. L. Olteanu**, R. M. Știrbescu.
4. Scientific Conference of Doctoral Schools SCDS-UDJG – „Perspectives and challenges in doctoral research" – 7th Edition 2019, Universitatea „Dunărea de Jos" Galați, România:
    - 4.1 *Functionalization of cotton fibres with silver nanoparticles obtained by synthesis with Sapindus mukorossi water extract*, **R. L. Olteanu**, M. Bumbac, C. M. Nicolescu, B. C. Șerban, O. Buiu.

Curriculum vitae Europass

Personal Informations

Name / Surname	**OLTEANU, Radu Lucian**
Address	Mircea cel Bătrân Boulevard, Bl. A1, Sc. D, Ap. 62, 130082, Târgovişte, ROMANIA
Phone	+40-245-212415 (home) Mobil: +40-723-178444 +40-245-213382 (office)
Fax	+40-245-213382 (office)
E-mail	raduolteanu110@yahoo.com
Nationality	Romanian
Date of birth	9 july 1967
Sex	male

Professional experience

Period	**April 2016 – present**
Occupation or position held	Research Assistant – Multidisciplinary Science and Technology Research Institute
Name and address of employer	"Valahia" University of Târgovişte, Sinaia Alley, No. 13, 130024 Târgovişte
Main activities and responsibilities	Sampling and preparation of samples, instrumental analysis (FTIR, UV-VIS), chemical testing and analysis activities, research and publication activity
Period	**Mars 2000 – April 2016**
Occupation or position held	Universitary Assistant - Department of Chemistry (Mars 2000 – September 2008), Universitary Assistant - Department of Advanced Science and Technology (October 2008 – April 2016)
Name and address of employer	"Valahia" University of Târgovişte, King Carol I Boulevard, No. 2, 130024 Târgovişte
Main activities and responsibilities	1. Didactical activities: Laboratory / seminar / project management: Chemical technology, Technical chemistry, Organic chemistry, Data processing, Physical and colloidal chemistry; 2. Research and publication activity (scientific production in the field of education and chemistry); 3. Responsibilities within the faculty and the university: activities of organization and coordination of the admission contest at the university level as a Member of the Technical Commission for Admission of Valahia University from 2004 to 2008; laboratory organizing activities.
Period	**Martie 1999 – Martie 2000**
Occupation or position held	Universitary Instructor- Department of Chemistry
Name and address of employer	Valahia" University of Târgovişte, King Carol I Boulevard, No. 2, 130024 Târgovişte
Main activities and responsibilities	1. Didactical activities: Laboratory / seminar / project management: General chemistry, Chemical technology; 2. Responsibilities within the faculty and the university: organizing laboratory activities, participating in the admission contest at the university level 3. Research and publication activity (scientific production)
Period	**September 1998 – Mars 1999**
Occupation or position held	English language translator
Name and address of employer	"Valahia" University of Târgovişte, King Carol I Boulevard, No. 2, 130024 Târgovişte
Main activities and responsibilities	Activities of translation / editing / elaboration of scientific articles and publications
Period	**Iulie 1995 – August 1998**
Occupation or position held	Engineer

Name and address of employer	S.C. Nubiola România S.R.L.
Main activities and responsibilities	Technical Department

Education and training

Period	**Mars 2015**
Qualification / diploma obtained	Certificat de instruire
The main disciplines studied / acquired professional competences	Use of UV-VIS technique, analysis and development of methods of analysis (UV-VIS theory presentation; Sample preparation; Thermo Scientific Evolution 260BIO spectrophotometer operation; Applications in the fields: cosmetic industry, clinical chemistry and health, food industry, materials science, academic, etc .; Software use: INSIGHT, CUE, EnzLab manual, Lambda-SPX, SpectoquantR
Name and type of educational institution / training provider	Berd Trading SRL
Period	**October 2005 – September 2006** (2 semesters – masters program)
Qualification / diploma obtained	Master Diploma
The main disciplines studied / acquired professional competences	Projects Management
Name and type of educational institution / training provider	Valahia" University of Târgovişte – Faculty of Economics
Level in national or international classification	Postgraduate education
Period	**October 1998 – December 1999** (3 semesters)
Qualification / diploma obtained	Postgraduate specialization certificate - Computer Science specialization
The main disciplines studied / acquired professional competences	Informatics
Name and type of educational institution / training provider	Valahia" University of Târgovişte - Department for the training of teaching staff and continuing education
Level in national or international classification	Postgraduate education
Period	**September 1990 – June 1995** (10 semesters)
Qualification / diploma obtained	Engineer diploma in Chemistry profile, specialization in Inorganic Substances Technology
The main disciplines studied / acquired professional competences	Chemistry
Name and type of educational institution / training provider	Polytechnic University of Bucharest, Faculty of Industrial Chemistry
Level in national or international classification	Higher Education
Period	**September 1981 – June 1985** (4 years)
Qualification / diploma obtained	High school diploma Certificate of qualification in the profession "Health Officer"
The main disciplines studied / acquired professional competences	Chemistry - Biology
Name and type of educational institution / training provider	Sanitary high school Târgovişte
Level in national or international classification	Secondary education

Personal skills and competences

Native language	**Romanian language**

Foreign language(s) known

Self-assessment	Understanding		Speaking		Writing
European level (*)	Listening	Reading	Participation in the conversation	Oral speach	Written expression
English	C2 Experienced user	C2 Experienced user	C1 Experienced user	C1 Experienced user	C2 Experienced user
Franch	B2 Independent user	B2 Independent user	B2 Independent user	B2 Independent user	B2 Independent user

(*)Level of the Common European Framework of Reference for Foreign Languages

Social skills and competences

a) Team spirit - the experience of teamwork was acquired in the different contracts / projects carried out, in which I activated as a member of the team.;
b) Rightness;
c) Adaptability, communication skills and ability to relate - acquired both due to the responsibilities of the faculty and the university, as well as from the projects carried out at national and international level.

Computer skills and abilities

Very good knowledge of computer use acquired in the postgraduate studies of specialization, from the operation using the packages of text editing programs and spreadsheets to the modern technologies that use information and communication technologies (ICT) in education: information technologies for e-learning, virtual interaction and communication, web-oriented learning platforms.

Other skills and competences

Ability to motivate the team I work in, communication, openness, initiative, analytical thinking, balance, loyalty, determination and results orientation.

Additional informations

PhD Student
Doctoral field: Engineering Sciences - Materials Engineering
„Nanomaterials based on natural extracts with biomedical applications” – PhD Superviser: prof. Dr. R.M.Ion.

a) **8 Programs / National research contracts / in progress** – roles performed:
- ***8 - member of the project work team***;

b) **8 Projects / International educational grants** - roles performed:
8 – tutor / membru în echipa de lucru a proiectului

c) **1 Internal scientific research grant** (“Valahia” University of Târgovişte) – role performed: ***member of the project work team***;
d) **75 Published scientific papers**
e) **80 Scientific communications** - of which 28 at international conferences and 52 at national conferences;
f) **3 Monographs, textbooks and university books, laboratory guidance:** in recognized publishers, with ISBN;
g) Member of professional associations and accredited research groups:
- Member of the National Chemistry Society;

References can be obtained from all the employees in the country and abroad with whom I worked / work in the different contracts / projects. Additional information can be found from the web pages of the contracts / projects carried out:, http://fiste.ssai.valahia.ro, http://vccsse.ssai.valahia.ro,