

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

# **REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT:** "NANOPARTICULE METALICE BIOCONJUGATE FITOSINTETIZATE CU POTENȚIALĂ ACTIVITATE ANTIBACTERIANĂ"

# CONDUCĂTOR DE DOCTORAT: Prof. univ. dr. Rodica-Mariana ION

**DOCTORAND**:

Ing. Nicolae-Mihail ŞTIRBESCU

TÂRGOVIȘTE

2022

# CUPRINS

REZUMAT	1
MULŢUMIRI	2
INTRODUCERE	6
CAPITOLUL I NOTIUNI GENERALE DESPRE MATERIALE	9
1.1. CLASIFICAREA MATERIALELOR	10
1.2. CLASIFICAREA NANOMATERIALELOR	15
1.3. PROPRIETĂȚILE NANOMATERIALELOR	22
1.3.1. Proprietățile mecanice	22
1.3.2. Proprietățile optice	27
1.3.3. Proprietățile magnetice	29
1.3.4. Proprietățile termice	30
1.3.5. Proprietățile electrice	32
CAPITOLUL II PROCEDEE GENERALE DE SINTEZĂ A	33
NANOMATERIALELOR	
2.1. METODE DE TIP BOTTOM-UP UTILIZATE PENTRU SINTEZA	33
NANOMATERIALELOR	20
2.2. METODE DE TIP TOP-DOWN UTILIZATE PENTRU SINTEZA	30
2 3 METODE DE SINTEZĂ A NANOPARTICUI ELOR METALICE	36
2.3.1 Metode chimice	36
2.3.2. Metode fizice	39
2.3.3. Metode biologice	41
CAPITOLUL III CARACTERIZAREA NANOMATERIALELOR	52
3.1. TEHNICI ANALITICE DE CARACTERIZARE A NANOMATERIALELOR	52
3.2. APLICATIILE NANOMATERIALELOR METALELOR NOBILE	56
3.2.1. Aplicatiile nanoparticulelor de argint	56
3.2.2. Aplicatiile nanoparticulelor de aur	60
3.2.3. Aplicațiile nanoparticulelor de platină	61
3.3. TOXICITATEA NANOMATERIALELOR METALELOR NOBILE	64
3.3.1. Toxicitatea nanoparticulelor de argint	64
3.3.2. Toxicitatea nanoparticulelor de aur	65
3.3.3. Toxicitatea nanoparticulelor de platină	67
CAPITOLUL IV APARATURA ANALITICĂ UTILIZATĂ ÎN STUDIUL	70
MATERIALELOR	
4.1. SPECTROMETRUL INFRAROȘU CU TRANSFORMATĂ FOURIER	70
(FTIR)	
4.2. SPECTROMETRUL RAMAN	72
4.3. SPECTROFOTOMETRUL UV-VIS	73
4.4. MICROSCOPIE OPTICA ȘI MICROSCOPIE ELECTRONICA DE SCANARE	/4
4.5. DIFRACTOMETRUL DE RAZE X (XRD)	77

CAPITOLUL V MATERIALE UTILIZATE ÎN STUDIU	79
5.1. TEHNICI DE SEPARARE A PRINCIPIILOR ACTIVE	80
5.2. DESCRIEREA MATERIALELOR UTILIZATE ÎN STUDIU	81
5.2.1. Plante	81
5.2.2. Fungi (Saccharomyces cerevisiae)	89
5.2.3. Oul de găină	91
CAPITOLIII. VI TESTE PRELIMINARE PENTRII GENERAREA	93
NANOPARTICULELOR METALELOR NOBILE (AUR, ARGINT ȘI	
PLATINĂ) ÎN EXTRACTE VEGETALE	
6.1. DETERMINAREA CONȚINUTULUI TOTAL DE FLAVONOIDE	93
6.2. DETERMINAREA CONȚINUTULUI TOTAL DE POLIFENOLI	94
6.3. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE	96
6.4. OBȚINEREA PRECURSORILOR UTILIZAȚI ÎN SINTEZĂ	97
6.4.1. Obținerea extractelor vegetale	97
6.4.2. Obținerea soluțiilor de azotat de argint, acid tetracloroauric și acid hexacloroplatinic	98
6.5. GENERAREA NANOPARTICULELOR DE AUR, ARGINT ȘI PLATINĂ CU EXTRACTE VEGETALE	98
6.6. TESTE PENTRU CONFIRMAREA GENERĂRII NANOPARTICULELOR METALELOR NOBILE (Au, Ag și Pt) CU EXTRACTE VEGETALE HIDRO- METANOLICE	100
6.6.1. Rezultatele analizei UV-Vis	100
6.6.2. Rezultatele analizelor FTIR si Raman	106
CAPITOLUL VII SINTEZA SI CARACTERIZAREA	118
NANOBIOMATERIALELOR ÎN SISTEMUL EXTRACT DE	
SACCHAROMYCES CEREVISIAE ȘI EXTRACTE VEGETALE	
7.1. SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA NANOPARTICULELOR DE ARGINT GENERATE ÎN EXTRACT DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	119
7.1.1. Obținerea precursorilor utilizați în sinteză	119
7.1.2. Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor de argint generate în extract de	119
Saccharomyces cerevisiae	
7.2. SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA NANOMATERIALELOR OBȚINUTE ÎN	121
SISTEMUL EXTRACT DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE, EXTRACTE	
VEGETALE ȘI SOLUȚIE AgNO <sub>3</sub> (10 <sup>-3</sup> M)	
7.2.1. Caracterizarea nanomaterialului obținut în sistemul extract de Saccharomyces	123
<i>cerevisiae</i> , extract de fructe de <i>Ribes uva-crispa</i> , și soluție de AgNO <sub>3</sub> (10 <sup>-3</sup> M)	
7.2.2. Caracterizarea nanomaterialului obținut în sistemul extract de <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> , extract de <i>Sambucus nigra</i> și soluție de AgNO <sub>3</sub> $(10^{-3} \text{ M})$	126
7.2.3. Caracterizarea nanomaterialului obținut în sistemul extract de Saccharomyces	128
<i>cerevisiae</i> , extract de Aronia melanocarpa și soluție de AgNO <sub>3</sub> (10 <sup>-3</sup> M)	
7.2.4. Caracterizarea nanomaterialului în sistemul extract de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , extract de <i>Lavandula angustifolia</i> și soluție de AgNO <sub>3</sub> (10 <sup>-3</sup> M)	130

# CAPITOLUL VIII SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA <sup>134</sup> NANOBIOMATERIALELOR PE BAZĂ DE COAJĂ/MEMBRANĂ DE COAJĂ DE OU ȘI EXTRACTE VEGETALE

8.1. SINTEZA SI CARACTERIZAREA NANOMATERIALELOR CU MATRICE 142 CONSTITUITĂ DIN COAJĂ DE OU ȘI MEMBRANĂ DE COAJĂ DE OU FUNCȚIONALIZATE CU NANOPARTICULE DE ARGINT OBȚINUTE CU EXTRACTE DE RIBES UVA-CRISPA ȘI ARONIA MELANOCARPA 8.1.1. Obținerea precursorilor utilizați în sinteză 142 8.1.2. Sinteza (in situ) și caracterizarea nanomaterialelor cu matrice constituită din 145 coajă de ou și membrană de coajă de ou funcționalizate cu nanoparticule de argint obținute cu extract de Ribes uva-crispa 8.1.3. Sinteza (in situ) și caracterizarea nanomaterialelor cu matrice constituită din 160 coajă de ou și respectiv membrană de coajă de ou funcționalizate cu nanoparticule de argint obținute cu extract de Aronia melanocarpa 8.1.4. Sinteza și caracterizarea nanomaterialului cu matrice constituită din 172 membrană de coajă de ou funcționalizată cu nanoparticule de argint obținute cu extract de Aronia melanocarpa (sinteză ex situ) 8.2. ACTIVITATEA ANTIBACTERIANĂ 183 8.2.1. Microorganisme testate 185 8.2.2. Procedură de lucru 186 8.2.3. Metodele de testare utilizate în analiză 187 8.2.4. Activitatea antibacteriană a nanomaterialelor obtinute în sistemul ES/ESM, 189 extracte de Ribes uva-crispa/Aronia melanocarpa și soluție de azotat de argint 8.2.5. Concentratia minimă inhibitorie (CMI) 193 199 CAPITOLUL IX CONTRIBUTII ORIGINALE 9.1.1. SINTEZA NANOPARTICULELOR DE ARGINT ÎN NECTAR DIN 200 FLOAREA DE MUSA BASJOO 200 9.1.2. CARACTERIZAREA NANOPARTICULELOR DE ARGINT GENERATE ÎN NECTAR DIN FLOAREA DE MUSA BASJOO 204 9.2. PERSPECTIVE DE DEZVOLTARE A CARIEREI 205 **CONCLUZII GENERALE** 209 **BIBLIOGRAFIE** 240 LISTA TABELELOR 243 LISTA FIGURILOR

#### **MULŢUMIRI**

Doresc să mulțumesc tuturor celor ce mi-au fost alături în această călătorie doctorală, în care m-am dezvoltat, atât ca om, cât și ca cercetător.

Îndeosebi, doresc să mulțumesc doamnei prof. univ. dr. Rodica Mariana Ion de la Universitatea Valahia din Târgoviște, Facultatea de Ingineria Materialelor și Mecanică, Școala Doctorală de Științe Inginerești, Domeniul Ingineria Materialelor, care m-a coordonat pe toată durata studiilor doctorale.

Adresez mulțumiri sincere doamnei prof. univ. dr. ing. Lavinia Buruleanu pentru sprijinul oferit în realizarea analizelor microbiologice, precum și doamnei prof. univ. dr. ing. Cristiana Rădulescu, Director al Institutului de Cercetare Științifică și Tehnologică Multidisciplinară (ICSTM), Universitatea Valahia din Târgoviște, pentru sprijinul profesional și susținerea oferită în toți acești ani.

De asemenea, sunt recunoscător membrilor comisiei de îndrumare, prof. univ. dr. Cornel Marin, prof. univ. dr. Tanța Setnescu și prof. univ. dr. ing. Lavinia Buruleanu, pentru asistența și sprijinul acordat pe durata studiilor doctorale, pentru sfaturile și explicațiile științifice acordate.

Mulțumesc colectivului din Institutul de Cercetare Științifică și Tehnologică Multidisciplinară, din care fac parte, pentru suportul necondiționat acordat în activitatea de cercetare. Rămân profund recunoscător colegilor mei din ICSTM, în special colegilor CSIII dr. Ioana Daniela Dulamă, CSIII dr. ing. Cristina Mihaela Nicolescu, CSIII dr. Anca Irina Gheboianu, CS dr. Radu Lucian Olteanu și CS dr. Sofia Teodorescu.

Mulțumesc familiei mele pentru sprijinul moral, pentru înțelegerea pasiunii mele pentru plante, natură și pentru tot sprijinul dăruit.

Autorul

#### INTRODUCERE

Materialele sunt importante pentru omenire datorită beneficiilor care pot fi obținute din reglarea proprietăților lor. Știința materialelor este un domeniu larg și poate fi considerat a fi un domeniu interdisciplinar, în cadrul său fiind incluse studiile structurii și proprietăților oricărui material, crearea de noi tipuri de materiale și manipularea proprietăților unui material pentru a se potrivi nevoilor unei aplicații specifice. Tehnologia secolului XXI necesită miniaturizarea dispozitivelor, în timp ce performanța lor finală este îmbunătățită considerabil. Nanomaterialele au câștigat importanță în progresele tehnologice datorită proprietăților îmbunătățite.

Nanoparticulele fac parte din categoria materialelor avansate utilizate frecvent în știința și tehnologia actuală datorită gamei largi de aplicabilitate. Biosinteza nanoparticulelor de metal sau oxid de metal (utilizând plante, ciuperci, bacterii, fungi, alge etc.), cu morfologia dorită (formă, dimensiune și natura cristalină) reprezintă idei ecologice prezentate sub denumirea de "chimie verde" fiind unul dintre scopurile cercetărilor actuale.

Teza de doctorat intitulată "NANOPARTICULE METALICE BIOCONJUGATE FITOSINTETIZATE CU POTENȚIALĂ ACTIVITATE ANTIBACTERIANĂ" se încadrează în domeniul *Ingineria Materialelor*, din cadrul Școlii Doctorale de Științe Inginerești, având ca obiectiv principal studiul nanomaterialelor obținute din diferite tipuri de probe biologice.

Teza de doctorat conține **250** de pagini, **35** de tabele, **144** de figuri și **561** de referințe bibliografice, fiind structurată în două părți (partea teoretică și partea experimentală).

**Obiectivul general** al tezei de doctorat a constat în producerea, caracterizarea și testarea nanomaterialelor pe bază de extracte din plante, prin metode prietenoase cu mediul înconjurător. Materialele vegetale utilizate în studiu au fost alese în urma unor cercetări amănunțite a literaturii de specialitate cu privire la compușii bioactivi (flavonoide, terpenoide, proteine, enzime, pigmenți etc.) ce sunt benefici organismului uman, acționând ca antioxidanți în protejarea acestuia.

**Scopul** tezei de doctorat a constat în dezvoltarea metodelor de obținere a unor nanomateriale, prietenoase mediului înconjurator. Extractele vegetale utilizate în prezenta teză de doctorat au fost caracterizate prin metode spectroscopice (UV-Vis, FTIR și Raman). În acest sens, a fost folosit material vegetal recoltat de autor, la momentul optim și în perioada de maximă maturitate a plantei, din zona geografică a județului Dâmbovița, și fiind procesat în stare proaspătă/uscată. Nanomaterialele formate cu ajutorul acestor extracte vegetale au fost, de asemenea, caracterizate prin diferite tehnici analitice (UV-Vis, FTIR, Raman, XRD și SEM-EDS) și analize microbiologice. Compușii bioactivi existenți în materialele vegetale sunt responsabili pentru bioreducerea ionilor de argint (de la Ag<sup>+</sup> la Ag<sup>0</sup>), aur (de la Au<sup>3+</sup> la Au<sup>0</sup>) și platină (de la Pt<sup>4+</sup> la Pt<sup>0</sup>), precum și pentru stabilizarea nanoparticulelor de aur, argint și platină.

O serie de studii științifice de la nivel mondial au evidențiat faptul că, nanoparticulele metalice au aplicații în diferite domenii, cum ar fi, domeniul biologiei, farmaceutic, medical etc., așadar acestă lucrare reprezintă o completare a cercetărilor mondiale, susținând proprietățile deosebite ale nanomaterialelor obținute cu ajutorul unor extracte vegetale, provenite din sursa vegetală terapeutică autohtonă, atât din mediul natural, cât și din culturi ecologice proprii, care promovează agricultura regenerativă.

Elemente de noutate ale tezei de doctorat sunt legate de:

- prepararea unor extracte vegetale originale, provenite din sursă vegetală terapeutică autohtonă;
- investigarea complexă a profilului fitochimic al extractelor hidroalcoolice obținute din materiale vegetale autohtone, provenite din cultură ecologică;
- optimizarea condițiilor de lucru în procesele de obținere a extractelor hidroalcoolice și a nanoparticulelor;
- generarea de nanoparticule metalice de aur, argint şi platină (prin metode ecologice, economice şi rapide), în extracte vegetale (*Ribes uva-crispa*, *Sambucus nigra*, *Aronia melanocarpa*, *Prunus mahaleb*, *Malus purpurea* şi *Lavandula angustifolia*);
- caracterizarea nanoparticulor metalice de aur, argint şi platină (prin metode ecologice, economice şi rapide), în extracte vegetale (*Ribes uva-crispa*, *Sambucus nigra*, *Aronia melanocarpa*, *Prunus mahaleb*, *Malus purpurea* şi *Lavandula angustifolia*);
- obținerea și caracterizarea unui nanobiomaterial în sistemul extract de Saccharomyces cerevisiae, extract din plante (Ribes uva-crispa, Sambucus nigra, Aronia melanocarpa, Prunus mahaleb, Malus purpurea și Lavandula angustifolia) și soluție de azotat de argint;
- obținerea și caracterizarea unui nanobiomaterial în sistemul coajă/membrană de coajă de ou, extract din plante (*Ribes uva-crispa* și *Aronia melanocarpa*) și soluție de azotat de argint;

- studiul microbiologic al unor nanomateriale prin care s-a dovedit acțiunea antibacteriană asupra anumitor tulpini bacteriene;
- generarea nanoparticulelor metalice de argint direct din inflorescența de *Musa basjoo*.

Cercetările viitoare au ca scop utilizarea acestor nanomateriale în scop terapeutic (preparare de plasturi și creme, cu proprietăți antioxidante și antimicrobiene). Datorită proprietăților lor antioxidante, noile bio-nanostructuri de argint și de aur, pot fi folosite în terapia bolilor cauzate de stresul oxidativ.

#### Structura tezei de doctorat

Teza de doctorat, cu titlul **"NANOPARTICULE METALICE BIOCONJUGATE FITOSINTETIZATE CU POTENȚIALĂ ACTIVITATE ANTIBACTERIANĂ"**, este structurată pe două părți, *partea I - Studiul de literatură* și *partea a II-a – Partea experimentală* ce însumează 9 capitole.

**Partea I - Studiul de literatură**, cuprinde 4 capitole, care se referă la stadiul cunoașterii nanomaterialelor la nivel mondial, fiind tratate și o serie de aspecte teoretice, legate de tehnicile analitice folosite pentru îndeplinirea obiectivelor prezentei teze de doctorat, avantaje și dezavantaje, aparatură și aplicații.

Partea a II-a - Partea experimentală, Contribuții originale este structurată în 4 capitole după cum urmează: Capitolul V prezintă descrierea materialelor vegetale autohtone utilizate în studiu; următoarele trei capitole sunt legate de contribuțiile originale aduse în domeniul nanomaterialelor. Astfel, în Capitolul VI sunt prezentate testele preliminare pentru generarea nanoparticulelor metalelor nobile în extractele vegetale autohtone selectate. În Capitolul VII s-a urmărit sinteza și caracterizarea nanomaterialelor obținute prin sinteză *in situ* în sistemul extract de *Saccharomyces cerevisiae* și extracte vegetale. În Capitolul VIII s-a urmărit sinteza și caracterizarea nanomaterialelor obținute prin sinteză *in situ* în sistemul extract de Saccharomyces cerevisiae și extracte vegetale. În Capitolul VIII s-a urmărit sinteza și caracterizarea nanomaterialelor obținute în sistemul coajă/membrană de coajă de ou și extracte vegetale. S-a realizat sinteza *in situ* și *ex situ* a nanomaterialelor pe bază de coajă/membrană de coajă de ou și extracte vegetale și s-a analizat activitatea antimicrobiană. Capitolul IX prezintă succint contribuția originală a autorului în domeniul de doctorat *Ingineria Materialelor*. Fiecare capitol se încheie cu concluzii, în care sunt punctate sintetic elementele de maximă importanță și originalitate.

La finalul lucrării de doctorat sunt prezentate **Concluziile generale** ale tezei de doctorat din care rezultă că scopul și obiectivele stabilite au fost îndeplinite. Sunt subliniate

**Contibuțiile Originale** și **Perspectivele de dezvoltare ulterioară** pentru o înțelegere unitară a întregii cercetări științifice. Teza de doctorat cuprinde, de asemenea, un număr impresionant de **Referințe bibliografice**.

Diseminarea cercetărilor științifice prezentate în teza de doctorat, au făcut și vor face obiectul unor publicații în reviste de prestigiu internaționale (indexate în Web of Science – Clarivate Analytics), a unor cereri de brevet și comunicări la conferințe de specialitate.

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

#### MATERIALE UTILIZATE ÎN STUDIU

Prezentul studiu a avut ca material principal diverse plante din flora spontană a regiunii de sud a României. În acest scop au fost prelevate 20 de specii de plante, recoltate personal în primăvara, vara și toamna anului 2016. O parte dintre acestea au fost spălate și uscate în condiții optime (spații închise, ventilate, ferite de lumina solară și la temperatura camerei), iar altele au fost folosite în stare proaspătă, la scurt timp după momentul recoltării.

## 1. Plante

Din toate cele 20 de plante culese și aduse în laborator în condiții optime, în urma analizelor preliminare de stabilire a principiilor active, au fost selectate șase plante (Figura 1): *Ribes uva-crispa* (fruct), *Sambucus nigra* (fruct), *Aronia melanocarpa* (fruct), *Malus purpurea* (fruct), *Prunus mahaleb* (fruct) și *Lavandula angustifolia* (flori). A fost supusă investigațiilor și o probă de nectar de *Musa basjoo* (nectar din floare).

Cele șase plante au fost selectate deoarece fac parte din cultura proprie, controlată ("bio"). În cele ce urmează vor fi prezentate principalele caracteristici ale celor șase plante selectate, dar și a plantei din care provine proba de nectar.



Ribes uva-crispa



Sambucus nigra



Aronia melanocarpa



Lavandula angustifolia

*Malus purpurea* Figura 1. Plantele selectate pentru studiu

Prunus mahaleb

#### 2. Fungi (Saccharomyces cerevisiae)

*Saccharomyces cerevisiae* este o ciupercă unicelulară, cu un ADN genomic nuclear organizat în 16 cromozomi [1]. Genomul său a fost complet secvențiat de Goffeau și colaboratorii în 1996 [1] și s-a constatat că conține aproximativ 6 000 de gene, dintre care 5 570 sunt prezise ca fiind gene care codifică proteinele.

Saccharomyces cerevisiae este un organism model, un instrument valoros pentru toate aspectele cercetării de bază. Spre deosebire de alte organisme model, cum ar fi *Escherichia coli* sau *Caenorhabditis elegans*, este cea mai valoroasă specie pentru o varietate de aplicații industriale [2].

#### 3. Oul de găină

Unele cercetări recente au evidențiat rolul benefic al ouălor de găină pentru consum, în mod special pentru persoanele active din punct de vedere fizic [3]. Consumul de ouă este esențial din punct de vedere nutrițional, colectând lipide esențiale, proteine, vitamine, minerale și oligoelemente, oferind în același timp o sursă moderată de calorii (aproximativ 140 kcal/100 g), un potențial culinar mare și costul economic scăzut [4]. Trebuie menționat că nici coaja de ou și nici membranele sale nu sunt de obicei consumate, deși membranele de coajă de ou sunt comestibile. Consumul mediu de ouă/om/an în lume variază de la 62 (India) la peste 358 (Mexic) și este chiar mai mic în țările africane (36 ouă/om/an). Ouăle de găină pe care le consumăm în dieta zilnică nu sunt fertilizate și sunt produse de găini crescute în mod specific în întreaga lume, pentru consumul uman [5].

Alături de plante în foarte multe ramuri ale industriei se utilizează *Saccharomyces cerevisiae*, motiv pentru care a fost introdus în prezentul studiu. De asemenea, oul de găină a fost introdus în studiu deoarece face parte din alimentația cotidiană, iar coaja de ou care conține numeroși nutrienți este considerată cel mai des ca și deșeu.

TESTE PRELIMINARE PENTRU GENERAREA NANOPARTICULELOR METALELOR NOBILE (AUR, ARGINT ȘI PLATINĂ) ÎN EXTRACTE VEGETALE

Pentru prima parte a studiului după o analiză riguroasă a literaturii de specialitate au fost analizate cele 20 de plante. Rezultatele analizei parametrilor fitochimici sunt prezentate în Figura 2.





Pentru generarea nanoparticulelor de aur, argint și platină s-a procedat în felul următor:

a) Peste 5 mL extract din substrat vegetal au fost adăugați 2 mL soluție de azotat de argint (10<sup>-3</sup> M). Amestecul obținut a fost ținut pe baia de ultrasunete Bioblock Scientific timp de 30 minute la o temperatură de 40°C, apoi mutat în etuva Memmert timp de o oră, la o temperatură de 60°C. Peste noapte amestecul de sinteză a fost ținut la întuneric și la temperatura camerei.

b) Peste 5 mL extract din substrat vegetal au fost adăugați 2 mL soluție de acid tetracloroauric (10<sup>-3</sup> M). Amestecul obținut a fost ținut pe baia de ultrasunete Bioblock Scientific timp de 30 minute la o temperatură de 40°C, apoi mutat în etuva Memmert timp de o oră, la o temperatură de 60°C. Peste noapte amestecul de sinteză a fost ținut la întuneric și la temperatura camerei.

c) Peste 5 mL extract din substrat vegetal au fost adăugați 2 mL acid haxacloroplatinic (10<sup>-3</sup> M). Amestecul obținut a fost ținut pe baia de ultrasunete Bioblock Scientific timp de 30 minute la o temperatură de 40°C, apoi mutat în etuva Memmert timp de o oră, la o temperatură de 60°C. Peste noapte amestecul de sinteză a fost ținut la întuneric și la temperatura camerei.

Analiza UV-Vis a fost realizată utilizând spectrofotometrul JASCO V-570 (UV-Vis-NIR) de la Analytical Instruments, cu sistem dublu fascicul, cu un singur monocromator în domeniul de lungimi de undă 190-2 500 nm, a cărui sursă de lumină este o lampă cu halogen în domeniul de lungimi de undă 330-2 500 nm, cu o rezoluție de 0,5 nm.

Pentru extractul din fructe de *Malus purpurea* în amestec cu soluție de azotat de argint s-a efectuat analiza UV-Vis la 1h, 3h, 6h respectiv 24h de la preparare în vederea stabilirii generării nanoparticulelor.

În Figura 3 este reprezentată suprapunerea spectrelor UV-Vis pentru amestecul dintre extractul hidroalcoolic din fructe de *Malus purpurea* și soluția de azotat de argint. Se poate observa un maxim spectral specific nanoparticulelor de argint în zona 440-480 nm care devine mai pronunțat odată cu trecerea timpului. După 24h procesul de generare al nanoparticulelor de argint s-a stabilizat.



Figura 3. Spectrul UV-Vis pentru amestecul dintre extractul hidroalcoolic din fructe de *Malus purpurea* și soluția de azotat de argint

Pentru a evidenția generarea nanoparticulelor de platină din amestecul de extract de fructe de *Malus purpurea* cu soluție de acid hexacloroplatinic s-a efectuat analiza UV-Vis la 60 minute, 180 minute respectiv 24h de la preparare.

În Figura 4 este reprezentată suprapunerea spectrelor UV-Vis pentru amestecul dintre extractul hidroalcoolic din fructe de *Malus purpurea* și soluția de acid hexacloroplatinic. Se poate observa un maxim spectral specific nanoparticulelor de platină în zona 270-290 nm care devine mai pronunțat cu cât crește valoarea timpului.



Figura 4. Spectrul UV-Vis pentru amestecul dintre extractul hidroalcoolic din fructe de *Malus purpurea* și soluția de acid hexacloroplatinic

Pentru analiza la 60 minute proba inițială formată din extract hidroalcoolic din fructe de *Malus purpurea* și soluție de acid hexacloroplatinic (10<sup>-3</sup>M) în raport de 1:1 a fost diluată cu apă bidistilată în raport 1:20 (1 mL soluție diluat cu 20 mL apă bidistilată); s-a utilizat cuvă de cuarț de 10 mm și martor apă bidistilată. Această probă a fost scanată ulterior la 180 minute respectiv 24h.

Pentru a evidenția generarea nanoparticulelor de aur din amestecul de extract de fructe de *Malus purpurea* cu soluție de acid tetracloroauric s-a efectuat analiza UV-Vis la 60 minute, 180 minute respectiv 24h de la preparare.

În Figura 5 este reprezentată suprapunerea spectrelor UV-Vis pentru amestecul dintre extractul hidroalcoolic din fructe de *Malus purpurea* și soluția de acid tetracloroauric. Se poate observa un maxim spectral specific nanoparticulelor de platină în zona 560-580 nm localizat în spectru la 556,5 nm/A=2,58 (la 60 minute) și respectiv 557,2 nm/A=2,85 (la 180 minute) care devine mai pronunțat cu cât crește valoarea timpului.





Pentru analiza la 60 minute proba inițială formată din extract hidroalcoolic din fructe de *Malus purpurea* și soluție de acid tetracloroauric (10<sup>-3</sup>M) în raport de 1:1 a fost diluată cu apă bidistilată în raport 1:4 (1 mL soluție diluat cu 4 mL apă bidistilată); s-a utilizat cuvă de cuarț de 10 mm și martor apă bidistilată. Această probă a fost scanată ulterior la 180 minute respectiv 24h.

Pentru realizarea analizei FTIR a fost utilizat accesoriul ATR cu cristal de diamant pe care s-a pus o picătură din amestecul de analizat, iar pentru analiza Raman s-a folosit ca și acesoriu celula pentru lichide în care s-a introdus un recipient din sticlă cu volumul de 2 mL cu amestecul de analizat.



Figura 6. Spectrele FTIR pentru soluțiile coloidale de nanoparticule de argint (albastru), aur (roșu) și platină (verde) pe bază de extract din fructe de *Aronia melanocarpa* 

Figura 7. Spectrele Raman pentru soluțiile coloidale de nanoparticule de argint (albastru), aur (roșu) și platină (verde) pe bază de extract din fructe de *Aronia melanocarpa* 

Spectrele FTIR înregistrate (Figura 6) pentru soluțiile coloidale de nanoparticule de argint obținute utilizând extractele investigate au evidențiat prezența unor maxime spectrale ce pot fi asociate/atribuite prezenței compușilor fitochimici din extractul/extractele vegetale:  $\sim 3300 \text{ cm}^{-1}$  – maxim intens tip bandă (atribuit grupărilor OH asociate compușilor polifenolici și solventului de extracție),  $\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$  (asociat vibrațiilor de întindere C=C *aromatice*, grupărilor carbonil),  $\sim 1410 \text{ cm}^{-1}$  (vibrații de îndoire în plan ale legăturii C–H vinilice, vibrații de îndoire ale grupărilor OH fenolice sau alcoolilor terțiari),  $\sim 1110 \text{ cm}^{-1}$  (vibrații de îndoire în plan C–H aromatice, vibrații de îndoire în plan O–H aromatice, vibrații de întindere CO, R(Aril)CHOH). Datele spectrale Raman (Figura 7) au completat datele spectrale FTIR fiind evidențiate de asemenea o serie de maxime comune soluțiilor coloidale investigate:  $\sim 444 \text{ cm}^{-1}$  (vibrații de formare C–O asociate alcoolilor în plan ale legăturii C–O asociate alcoolilor în plan ale grupării C–O asociate alcoolilor primari, vibrații de îndoire în plan ale legăturii C–OH aromatice),  $\sim 495 \text{ cm}^{-1}$  (vibrații de îndoire C–H vinilice și aromatice),  $\sim 1014 \text{ cm}^{-1}$  (vibrații de îndoire în plan C–H aromatice, vibrații de îndoire CO alcoolice).

În cazul soluțiilor coloidale de nanoparticule de aur și platină spectrele FTIR au evidențiat, similar celor înregistrate pentru nanoparticulele de argint, maxime spectrale asociate prezenței compușilor fitochimici din extractele vegetale, localizate la ~ 3300 cm<sup>-1</sup>, ~ 1640 cm<sup>-1</sup>, ~ 1110 cm<sup>-1</sup> și respectiv ~ 1020 cm<sup>-1</sup>. Datele spectrale Raman, în afara caracteristicilor comune/maximelor spectrale cu soluțiile coloidale de nanoparticule de argint (maxime prezente la ~ 444, ~ 495, ~ 950 si ~ 1 014 cm<sup>-1</sup>) au prezentat o serie de aspecte diferentiale în functie de precursorii de sinteză (materia primă vegetală si respectiv solutia ionică); astfel în cazul soluțiilor coloidale de nanoparticule de aur se remarcă maxime spectrale distincte localizate la ~ 721, ~ 854 și ~ 1 460 cm<sup>-1</sup> (în cazul extractului de *Ribes* uva-crispa, asociate vibrațiilor metilenice de catenă, vibrațiilor C-H provenite de la nucleul aromatic 1,4-disubstituit, vibrațiilor de deformare O-H coplanare și respectiv vibrațiilor de întindere C=C-C asociate nucleului aromatic și vibrațiilor de deformare metilenice din alcooli), ~ 510, ~ 1120, ~ 1320, ~ 1460 și ~ 1990 cm<sup>-1</sup> (în cazul extractului de Aronia melanocarpa, asociate vibrațiilor de deformare C-O alcoolice din alcooli primari și secundari, vibrațiilor de întindere C-O din alcooli terțiari, vibrațiilor C-C de catenă, vibrațiilor de deformare O-H în plan, vibrațiilor de răsucire metilenice din structurile alcoolice, vibrațiilor de îndoire C–H asociate grupărilor metil – CH<sub>3</sub>, vibrațiilor de deformare metilenice, benzilor de combinare aromatice).

Prezența compușilor fitochimici în soluțiile coloidale de nanoparticule metalice sintetizate (argint, aur și platină) evidențiată prin rezultatele analizelor spectrale FTIR și Raman contribuie la stabilizarea nanobiostructurilor prezente în soluție, asigurând totodată un potențial reducător și antioxidant remanent [6-11].

# SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA NANOBIOMATERIALELOR ÎN SISTEMUL EXTRACT DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE ȘI EXTRACTE VEGETALE

În această etapă a studiului au fost sintetizate nanoparticule de argint folosind ca matrice extract de *Saccharomyces cerevisiae*.

Pentru soluțiile coloidale de nanoparticule de argint pe bază de extract de *Saccharomyces cerevisiae* au fost efectuate teste de imagistică realizate prin microscopie optică precum și analiza SEM-EDS (Figurile 8-9). În imaginea obținută în urma analizei SEM pentru nanomaterialul obținut în sistemul extract de *Saccharomyces cerevisiae*, extractul de *Ribes uva-crispa* și soluție de AgNO<sub>3</sub> prezentată în Figura 8 (realizată la o tensiune de accelerare de 30 kV și distanță de lucru de 16 mm, la un factor de mărire de 4 500x), se poate observa că s-au format nanoparticule de argint care acoperă în proporție de aproximativ 0,6 % suprafața celulelor de *Saccharomyces cerevisiae*.





Figura 8. Imagine SEM pentru nanomaterialul obținut în sistemul extract de *Saccharomyces cerevisiae*, extract de *Ribes uva-crispa* și soluție de AgNO<sub>3</sub>

Figura 9. Spectrul EDS pentru nanomaterialul obținut în sistemul extract de *Saccharomyces cerevisiae*, extract de *Ribes uva-crispa* și soluție de AgNO<sub>3</sub>

De asemenea s-au observat nanoparticule de argint aglomerate și perfect separate de celulele de *Saccharomyces cerevisiae* (imaginile de mai jos), concentrația de nanoparticule de argint în aglomerare fiind de aproximativ 15,25 %.



Figura 10. a) Imagine obținută prin analiza SEM pentru aglomerarea de nanoparticule de argint și b) Harta de distribuție a argintului în aglomerarea de nanoparticule analizată

Imaginea obținută în urma analizei SEM (Figura 10a) pentru aglomerarea de nanoparticule de argint în nanomaterialul obținut în sistemul extract de *Saccharomyces cerevisiae*, extractul de *Ribes uva-crispa* și soluția de AgNO<sub>3</sub> este realizată la o tensiune de accelerare de 30 kV și distanță de lucru de 16 mm, la un factor de mărire de 60 000x.

Tabelul 1. Rezultatul analizei EDS pentru aglomerarea de nanoparticule de argint în nanomaterialulobținut în sistemul extract de Saccharomyces cerevisiae, extract de Ribes uva-crispa și AgNO3





În această etapă a cercetării au fost realizate nanomateriale obținute în sistemul extract de *Saccharomyces cerevisiae*, extracte din materiale vegetale (*Ribes uva-crispa*, *Sambucus nigra*, *Aronia melanocarpa* și *Lavandula angustifolia*) și soluție de AgNO<sub>3</sub> 10<sup>-3</sup>M. S-a constatat că în cazul nanomaterialului obținut cu extract de *Ribes uva-crispa* nanoparticulele de argint sunt distribuite uniform pe suprafața extractului și pe celulele de *Saccharomyces cerevisiae*. În cazul nanomaterialului obținut cu extract de *Sambucus nigra* se poate concluziona că nanoparticulele de argint au fost încorporate în celulele de *Saccharomyces cerevisiae*, iar în cazul nanomaterialelor cu extracte de *Aronia melanocarpa* și *Lavandula angustifolia* nanoparticulele de argint sunt distribuite uniform pe suprafața cu extracte de *Aronia melanocarpa* și *Lavandula angustifolia* nanoparticulele de argint sunt distribuite uniform pe suprafața celulelor de *Saccharomyces cerevisiae*.

# SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA NANOBIOMATERIALELOR PE BAZĂ DE COAJĂ/MEMBRANĂ DE COAJĂ DE OU ȘI EXTRACTE VEGETALE

Pentru această etapă a studiului au fost sintetizate nanoparticule de argint folosind ca matrice coaja de ou respectiv membrana de coajă de ou și extracte vegetale. Pentru obținerea extractului vegetal s-a utilizat metoda macerării la un raport de amestecare material vegetal uscat:solvent hidroalcoolic egal cu 1:10 (g/mL), după cum se poate vedea în Figura 12:



Figura 12. Schema de obținere a extractelor vegetale utilizate la sinteza nanomaterialelor cu matrice din coajă de ou/membrană de coajă de ou

Pentru separarea cojii de ou de membrană (în prealabil materialul biologic – oul – a fost spălat succesiv la exterior cu apă bidistilată și acetonă) a fost utilizată o soluție de acid clorhidric HCl 1M prin imersia materialului biologic (coaja cu membrana atașată) în soluția acidă timp de 5 minute. După separarea celor două componente acestea au fost spălate cu apă bidistilată până la pH neutru, uscate (24h/40°C), mojarate, separate granulometric (sită 0.25 mm) și stocate la temperatura camerei în vederea realizării investigațiilor ulterioare. Pentru sinteza nanomaterialelor investigate a fost utilizată fracțiunea granulometrică cu d < 0.25 mm atât pentru coajă cât și pentru membrană (Figura 13).

Procedura de sinteză a nanomaterialelor cu matrice din coajă de ou/membrană de coajă de ou funcționalizată cu nanoparticule de argint obținute cu extracte de *Ribes uva-crispa* și *Aronia melanocarpa* este prezentată schematic în Figura 14.



Figura 13. Schema de obținere a matricei din coajă de ou/membrană de coajă de ou



Figura 14. Schema de sinteză a nanomaterialelor cu matrice din coajă de ou/membrană de coajă de ou funcționalizată cu nanoparticule de argint obținute cu extracte de *Ribes uva-crispa* și *Aronia melanocarpa* 

Monitorizarea generării nanoparticulelor de argint în sistemul coajă de ou/membrană de coajă de ou-extract de *Ribes uva-crispa*/extract de *Aronia melanocarpa* – soluție de azotat de argint, prin analiza UV-Vis prezentată în Figura 15 indică prezența nanoparticulelor în supernatant. Analiza SEM a putut evidenția prezența nanoparticulelor de argint respectiv a

argintului în compoziția nanomaterialelor pentru proba constituită din coajă de ou și soluție de azotat de argint, ceea ce reiese și din spectrul EDS prezentat în Figura 17. Spectrele FTIR nu au putut evidenția cert prezența nanoparticulelor de argint respectiv a argintului în compoziția nanomaterialelor. Analiza XRD pentru identificarea fazelor cristaline prezente în probe nu a putut confirma prezența argintului, după cum reiese din difractograma prezentată în Figura 18. Explicația ar putea fi reprezentată de un fenomen de mascare a maximelor caracteristice argintului și a compușilor acestuia de către componentul majoritar. Astfel, maxime corespondente unor compuși ai argintului care s-ar putea forma în condițiile de sinteză (componenți minoritari/în urme), dar care au valori reduse ale intensității maximelor de difracție care nu pot fi observate din cauza maximelor semnificative din matrice.



Figura 15. Spectrul UV-Vis pentru nanomaterialul obținut în sistemul ES-AG-Ag-144h







Figura 16. Imagine SEM pentru nanomaterialul obținut în sistemul ES-Ag



Figura 18. Difractograma XRD pentru nanomaterialul obținut în sistemul ES-Ag

## ACTIVITATEA ANTIBACTERIANĂ

În vederea testării activității antibacteriene a nanomaterialelor obținute în sistemul coajă/membrană de coajă de ou – extract de *Ribes uva-crispa*/extract de *Aronia melanocarpa* 

- soluție de azotat de argint, au fost folosite microorganismele *Escherichia coli* și *Streptococcus epidermidis*.

Metodele de testare au constat în determinarea zonei de inhibare și determinarea concentrației minime inhibitorii.

Pentru determinarea zonei de inhibare se prepară un inocul standardizat turbidimetric și în condiții aseptice se inoculează câte 1 mL de inocul, se agită pentru a se omogeniza și se ține proba la incubat timp de 16-20h la 35-37°C iar unul dintre tuburile martor se menține pentru aceeași perioadă la frigider.

În tuburile inoculate cu tulpina de referință trebuie să avem rezultatul corespunzător datelor pe care le cunoaștem referitor la tulpina respectivă, iar în tuburile cu microorganismul testat, ultima diluție care a inhibat dezvoltarea microorganismului corespunde concentrației minime inhibitorii. Se consideră (în general) că microorganismele în cazul cărora concentrația minimă inhibitorie este de aproximativ 3 mg/mL vor fi eficient inhibate de către antibioticul respectiv și *in vivo* (concentrația minimă inhibitorie nu are aceeași valoare pentru genuri, specii sau tulpini diferite) (Figura 19).



Figura 19. Diametrul zonei de inhibare și concentrația minimă inhibitorie (CMI) pentru extractele hidroalcoolice obținute din nanomateriale în sistemul ES-AG-Ag (generare nanoparticule de argint *in situ*)

Cu excepția probei constituită din coajă de ou extract de *Aronia melanocarpa* și soluție de azotat de argint ținute în contact 24 de ore, pentru care diametrul zonei de inhibare

a creșterii *Streptococcus epidermidis* a fost, în condițiile experimentale anterior menționate, egal cu zero, toate celelalte probe au prezentat acțiune antibacteriană față de tulpinile utilizate, diferențe înregistrându-se însă atât la nivelul setului experimental cât și în raport cu fiecare dintre specii. Marea majoritate a diametrelor de inhibare a creșterii bacteriilor s-a situat în limitele a 7–9 mm (Figura 20).



Figura 20. Diametrul zonei de inhibare și concentrația minimă inhibitorie (CMI) pentru extractele hidroalcoolice obținute din nanomateriale în sistemele ESM-Ag-AG și ESM-Ag-AR (generare nanoparticule de argint *ex situ*)

Evaluarea activității bacteriostatice a nanomaterialelor supuse studiului s-a efectuat prin metoda diluțiilor în mediu lichid. Un inocul standardizat al tulpinii testate a fost însămânțat într-un gradient discontinuu de concentrații ale fiecărei probe, în tuburi cu bulion nutritiv. După termostatare adecvată, la temperaturi de 37±0,5°C, s-au citit valorile concentrației minime inhibitorii (CMI) prin observarea macroscopică a tuburilor (Figura 21).



Figura 21. Diametrul zonei de inhibare și concentrația minimă inhibitorie (CMI) pentru extractele hidroalcoolice obținute din nanomateriale în sistemul ESM-AG-Ag (generare nanoparticule de argint *in* 

situ)

Probele au fost diluate astfel încât să se obțină valori ale concentrațiilor în limitele  $35 - 3500 \mu g/mL$ . Având ca referențial valorile concentrație minime inhibitorii de minim  $0 \mu g/mL$ , extractele hidroalcoolice obținute din nanomaterialele supuse studiului s-au dovedit a fi mai eficiente față de *Streptococcus epidermidis* (8 probe) comparativ cu *Escherichia coli* (4 probe). De remarcat este și faptul că trei probe s-au dovedit a fi eficiente față de ambele tulpini (Figura 22).



Figura 22. Diametrul zonei de inhibare și concentrația minimă inhibitorie (CMI) pentru extractele hidroalcoolice obținute din nanomateriale în sistemul ES-AR-Ag (generare nanoparticule de argint *in* 

Mecanismul posibil pentru activitatea antibacteriană exercitată de nanoparticulele de argint este prezentat în Figura 23. Studiile publicate au indicat o creștere a activității antibacteriene pe măsură ce se reduce domeniul dimensional al nanoparticulelor de argint ca urmare a creșterii suprafeței specifice care interacționează cu membrana celulară. Interacțiunea dintre ionii de argint cu membranele celulare încărcate negativ conduce la o perturbare a morfologiei celulare și în final la moartea celulară. În plus nanoparticulele de argint se leagă puternic cu fosforul și sulful ce intră în componența proteinelor membranei intra și extra celulare, afectând astfel replicarea celulei, respirația și, în final durata de viață a celulei [12-15].



Figura 23. Mecanismul posibil al activității antibacteriene a AgNPs. Adaptare după [16]

În afară de aceasta, nanoparticulele de argint se pot lega și cu grupările tiol și amino ale proteinei membranare, ducând la formarea speciilor oxigenate reactive (ROS) care inhibă respirația celulară. Activitatea bactericidă notabilă a nanoparticulelor de argint poate fi atribuită totodată interacțiunii cu membrana plasmatică și cu peretele celular peptidogliconic al tulpinii bacteriene. De asemenea s-a sugerat că interacțiunea nanoparticulelor de argint cu peretele celular crește permeabilitatea membranei prin formarea de pori sau fisuri care pot provoca/contribui la moartea bacteriană.

#### SINTEZA NANOPARTICULELOR DE ARGINT ÎN NECTAR DIN FLOAREA

#### DE MUSA BASJOO

Pentru această etapă a studiului s-a urmărit potențialul nectarului din floarea de *Musa basjoo* (Figura 24) în generarea nanoparticulelor de argint.



Figura 24. Inflorescența plantei Musa basjoo. Sursa: arhiva personală

Sinteza nanoparticulelor de argint s-a realizat conform procedurii/protocolului descris în cele ce urmează:

1) a fost preparată soluție de AgNO<sub>3</sub> 10<sup>-3</sup>M din soluție stoc AgNO<sub>3</sub> 10<sup>-1</sup>N obținută din fixanal (Merck, Germania);

2) peste 5 mL de nectar din floarea de *Musa basjoo* s-au adăugat 5 mL soluție de  $AgNO_3 \ 10^{-3}M$  iar amestecul a fost menținut în condiții statice timp de 60 minute la temperatura camerei, pentru o contactare cât mai avansată a celor doi componenți;

 amestecul de sinteză a fost menținut ulterior în repaus/condiții statice timp de 24h (temperatura camerei/întuneric);

4) amestecul a fost stocat (4°C/întuneric) în vederea caracterizării/investigațiilor ulterioare.

Soluția apoasă de azotat de argint acționează ca o sursă de ioni de argint pentru sinteza nanoparticulelor de argint. Ionii de argint au fost reduși la atomi de argint prin intermediul nectarului florii de *Musa basjoo*. Spectrele UV-Vis ale nanoparticulelor de argint au fost obținute utilizând un spectrofotometru Thermo Scientific Evolution 260 BIO (aflat în laboratorul C 21 - Caracterizarea fizică și structurală a materiei - Spectroscopie FTIR, Spectroscopie Raman, Spectroscopie UV-Vis, din Institutul de Cercetare Științifică și Tehnologică Multidisciplinară al Universității Valahia din Târgoviște), în intervalul de lungimi de undă de 350-700 nm. Scanarea a fost efectuată la 1h, 3h și, respectiv, 24h.



Figura 25. Spectrul UV-Vis pentru amestecul dintre nectarul din floarea de *Musa basjoo* și soluția de azotat de argint

În Figura 25 este reprezentată suprapunerea spectrelor UV-Vis pentru amestecul dintre nectarul din floarea de *Musa basjo* și soluția de azotat de argint, unde se poate observa un maxim spectral specific nanoparticulelor de argint în zona 440-480 nm.

Pentru analiza la o oră proba inițială a fost nediluată, s-a utilizat cuvă de sticlă 10 mm și martor apă bidistilată. Pentru analiza la trei ore a fost scanată proba nediluată și s-a putut pune în evidență apariția unui maxim caracteristic nanoparticulelor de argint localizat în spectru la 450 nm/A=2,12 (la 1h) și respectiv 450,3 nm/A=2,13 (la 3h). Pentru analiza la 24 ore a fost scanată proba nediluată și s-a putut pune în evidență apariția unui maxim caracteristic nanoparticulelor de arginția unui maxim caracteristic nanoparticulelor de arginția unui maxim caracteristic nanoparticulelor de argint localizat în spectru la 439,2 nm/A=1,58 [17].

Pentru a determina grupele funcționale ale nectarului și posibila implicare a acestora în sinteza nanoparticulelor de argint, au fost efectuate analizele FTIR și Raman



Figura 26. Spectrele a) FTIR și b) Raman pentru amestecul dintre nectarul din floarea de *Musa basjoo* și soluția de azotat de argint

În Figura 26a este prezentat spectrul FTIR obținut pentru soluția de nectar din floare de *Musa basjo* și soluția de azotat de argint care prezintă maxime spectrale în zonele 3 300 cm<sup>-1</sup> (legături OH, H<sub>2</sub>O), 1 640 cm<sup>-1</sup> (posibil legături C=C, legături aromatice) și 1 100 cm<sup>-1</sup> (posibile legături C–H, C–O). Spectrul Raman este prezentat în Figura 26b și se observă maxime spectrale în zonele 422 cm<sup>-1</sup> (posibil legături C–O, C–OH), 451 cm<sup>-1</sup> (posibil legături C–O, C–OH), 518 cm<sup>-1</sup> (legături C–O), 834 cm<sup>-1</sup> (legături O–H), 1 060 cm<sup>-1</sup> (legături C–H aromatice), 1 117 cm<sup>-1</sup> (legături C–H), 1 258 cm<sup>-1</sup> (legături C–O), 1 450 cm<sup>-1</sup> (legături O–H) și 1 638 cm<sup>-1</sup> (C=C din compuși fenolici) [6-11, 17].

Amestecul de nectar din floarea de *Musa basjoo* cu AgNO<sub>3</sub>  $10^{-3}$  M a fost pipetat pe grile de cupru cu ochiuri de 400 (Ted Pella, Statele Unite ale Americii) și analizat în modul STEM. Condițiile de funcționare au fost: 10 kV tensiune de accelerare, ~16 mm distanță de lucru și vid 5.10<sup>-8</sup> Pa.

Detaliile morfologice, precum dimensiunea și forma nanoparticulelor de argint generate în nectarul din floare de *Musa basjoo*, au fost certificate prin utilizarea analizei SEM. Imaginile SEM (Figura 27) au arătat o densitate foarte mare de nanoparticule de argint. S-a observat că dezvoltarea nanostructurilor de argint este neuniformă, iar nanoparticulele au formă sferică.



Figura 27. Imagini SEM pentru nanoparticulele de argint obținute în nectarul din floarea de *Musa basjoo:* a) imagine la factor de mărire 15 000x; b) imagine la factor de mărire 110 000x

Sinteza nanoparticulelor de argint în nectarul din floare de *Musa basjoo* a fost investigată folosind spectrofotometrie UV-Vis la 430 nm, iar datele spectrale Raman, în afara caracteristicilor comune/maximelor spectrale cu soluțiile coloidale de nanoparticule de argint (maxime prezente la ~ 444, ~ 495, ~ 950 și ~ 1 014 cm<sup>-1</sup>) au prezentat o serie de aspecte

diferențiale, astfel în cazul soluției coloidale de nanoparticule de argint în nectarul din floare de *Musa basjoo* se remarcă maxime spectrale distincte localizate la ~ 1060, ~ 1260 și ~ 1 640 cm<sup>-1</sup> (în cazul nectarului de *Musa basjoo*, asociate vibrațiilor de îndoire C–H aromatice, vibrațiilor de întindere C–O asociate grupărilor alcoolilor primari și alchil-eterilor substituiți, vibrațiilor de îndoire O–H primar sau secundar, vibrațiilor de întindere C=C, vibrații de întindere asociate structurii chinonice sau cetonelor conjugate). Prezența compușilor fitochimici în cazul soluției coloidale de nanoparticule de argint în nectarul din floare de *Musa basjoo* evidențiată prin rezultatele analizelor spectrale FTIR și Raman contribuie la stabilizarea nanobiostructurilor prezente în soluție, asigurând totodată un potențial reducător și antioxidant remanent. Analiza SEM a probei a evidențiat formarea de nanoparticule sferice de argint.

## **CONTRIBUȚII ORIGINALE**

Teza de doctorat intitulată "NANOPARTICULE METALICE BIOCONJUGATE FITOSINTETIZATE CU POTENȚIALĂ ACTIVITATE ANTIBACTERIANĂ" prezintă elemente de originalitate care sunt legate de:

- prepararea unor extracte vegetale originale, provenite din sursă vegetală terapeutică autohtonă;
- investigarea complexă a profilului fitochimic al extractelor hidroalcoolice obținute din materiale vegetale autohtone, provenite din cultură ecologică;
- optimizarea condițiilor de lucru în procesele de obținere a extractelor hidroalcoolice și a nanoparticulelor;
- generarea de nanoparticule metalice de aur, argint şi platină (prin metode ecologice, economice şi rapide), în extracte vegetale (*Ribes uva-crispa*, *Sambucus nigra*, *Aronia melanocarpa*, *Prunus mahaleb*, *Malus purpurea* şi *Lavandula angustifolia*);
- caracterizarea nanoparticulor metalice de aur, argint şi platină (prin metode ecologice, economice şi rapide), în extracte vegetale (*Ribes uva-crispa, Sambucus nigra, Aronia melanocarpa, Prunus mahaleb, Malus purpurea* şi Lavandula angustifolia);
- obținerea și caracterizarea unui nanobiomaterial în sistemul extract de Saccharomyces cerevisiae, extract din plante (Ribes uva-crispa, Sambucus nigra, Aronia melanocarpa, Prunus mahaleb, Malus purpurea și Lavandula angustifolia) și soluție de azotat de argint;

- studiul microbiologic al unor nanomateriale prin care s-a dovedit acțiunea antibacteriană asupra anumitor tulpini bacteriene;
- generarea nanoparticulelor metalice de argint direct din nectar de floare de Musa basjoo.

Acest **ultim element de originalitate** se regăsește publicat într-un articol (jurnal indexat în bazele de date internaționale), cercetările fiind, de altfel, prezentate și la o conferință internațională de prestigiu. Astfel, s-a optat ca acest **element de noutate** să fie descris comprehensiv ca o cercetare aparte, știut fiind faptul că în literatura de specialitate există doar încercări de generare a nanoparticulelor metalice în extracte din diferite părți ale plantei *Musa basjoo*, nu au fost identificate studii/cercetări referitoare la generarea nanoparticulelor direct din inflorescență de *Musa basjoo*.

# PERSPECTIVE DE DEZVOLTARE A CARIEREI

Teza de doctorat intitulată "NANOPARTICULE METALICE BIOCONJUGATE FITOSINTETIZATE CU POTENȚIALĂ ACTIVITATE ANTIBACTERIANĂ", se găsește în sfera de interes a doctorandului prin prisma pregătirii de bază (specializarea Agromontanologie), dar și a activității curente de cercetător.

Cercetările viitoare au ca scop utilizarea acestor nanomateriale în scop terapeutic (preparare de plasturi și creme, cu proprietăți antioxidante și antimicrobiene). Datorită proprietăților lor antioxidante, a activității antibacteriene, noile bio-nanostructuri de argint, aur și platină, pot fi folosite în terapia bolilor cauzate de stresul oxidativ.

În acest sens, cercetările vor continua astfel:

- Extinderea studiului asupra nanomaterialului obținut în sistemul extract de Saccharomyces cerevisiae, extract din plante (Ribes uva-crispa, Sambucus nigra, Aronia melanocarpa, Prunus mahaleb, Malus purpurea și Lavandula angustifolia) și soluție de azotat de argint în ceea ce privește testarea antimicrobiană;
- Extinderea studiului asupra nanomaterialului obținut în sistemul coajă de ou/membrană de coajă de ou, extract din plante (*Ribes uva-crispa şi Aronia melanocarpa*) și soluție de azotat de argint asupra unei game mai vaste de extracte din plante și în ceea ce privește testarea antimicrobiană;

- 3. Extinderea și aprofundarea studiului legat de generare de diferite tipuri de nanoparticule în nectar din floare de *Musa basjoo;*
- Studiul relațiilor între concentrațiile a diferiți compuşi bioactivi existenți în extractele vegetale şi factori independenți precum tipul de cultură, parte vegetativă, etc.;
- 5. Pentru viitoare studii axate pe corelațiile directe între conținutul de polifenoli, activitatea antioxidantă, activitatea antimicrobiană a extractelor vegetale luate în studiu, pentru a optimiza rezultatele, analiza chemometrică va reprezenta o nouă etapă ce va fi abordată în viitor;
- Studiul clinic privind nanomaterialele obținute, va conduce la depunerea la OSIM a cel puțin unei cereri de brevet.

#### **CONCLUZII GENERALE**

O serie de studii științifice de la nivel mondial au evidențiat faptul că, nanomaterialele au aplicații în diferite domenii, cum ar fi, domeniul biologiei, farmaceutic și medical etc. Astfel, nanotehnologia și implicit nano/biomaterialele vin cu soluții promițătoare pentru probleme majore din diferite domenii ale științei și tehnologiilor.

Nanostructurile antimicrobiene sunt cunoscute ca o armă puternică în lupta împotriva bacteriilor. Există experimente si publicatii uriase pentru fabricarea si aplicarea acestor materiale noi. Astfel, studiile de specialitate au arătat că nanoparticulele de argint sunt considerate a fi cea mai puternică nanostructură antimicrobiană. Cercetările privind nanoparticulele de argint, platină sau alte metale nobile, dezvoltă un stres oxidativ împotriva celulelor bacteriene prin eliberarea ionilor de cationi, producând specii reactive de oxigen. Spre deosebire de antibiotice, agenții oxidanți nu au un loc specific de acțiune, prin urmare, este puțin posibil ca microorganismele să devină rezistente împotriva nanoparticulelor metalice de metale nobile. Aceste nanoparticule au fost folosite într-o mare varietate de produse comerciale cu proprietăți antimicrobiene, cum ar fi vopsele, textile, sticlă, materiale plastice, pansament pentru răni, geluri antimicrobiene, implanturi, etc. Cercetări recente au demonstrat că nanoparticulele metalice (Ag, Au) distrug rezistența celulelor bacteriene împotriva antibioticelor, au efecte sinergice cu antibioticele și pot crește potența antimicrobiană a acestor medicamente. Înseamnă că antibioticele ineficiente pot fi administrate din nou dacă sunt combinate cu nanoparticule metalice. Aceste date conduc către o nouă etapă, și anume aceea de a genera nanoparticule antimicrobiene conjugate cu agenți antimicrobieni sau cu extracte vegetale cu activitate antioxidantă și antimicrobiană, deci cu un profil fitochimic remarcabil, folosite în medicina tradițională terapeutică. Fabricarea de nano-carrier funcționalizați cu metale nobile este o altă strategie în acest sens. De exemplu, cercetările recente evidențiază faptul că nanostructurile de silice mezoporoasă pot fi folosite ca matrice pentru a fi funcționalizate cu nanoparticule de metale nobile și încărcate cu agenți antimicrobieni. Dar, totuși aceste nanomateriale funcționalizate sunt de obicei sintetizate printr-un proces de sinteză în mai multe etape, folosind solventi organici si substanțe chimice toxice, ceea ce ar conduce la un risc asupra sănătății și mediului. Alegerea unor metode ecologice, low-cost, rapide de generare a nanoparticulelor a reprezentat un deziderat al acestei teze de doctorat.

De asemenea, plecând de la faptul că există o relație directă între efectele benefice terapeutice, pe care le poate avea utilizarea plantelor, a extractelor vegetale, în special din cultură ecologică, și compușii bioactivi cunoscuți sub denumirea de *"health-protective biomolecules"* (proantocianidinele, antocianinele și alte flavonoide) care posedă proprietăți antioxidante, antimicrobiene, antitumorale, antiinflamatoare), teza de doctorat își gasește elementele de originalitate, prin utilizarea ca materie primă de studiu a diferitelor plante autohtone, cultivate în sistem natural, respectiv ecologic (organic), în ideea de a găsi diferențe ale profilui fitochimic pentru plantele investigate, pentru a putea fi folosite ca sursă în generarea de nanoparticule.

În acest sens, cercetările au fost conduse spre o caracterizare complexă comparativă a extractelor hidroalcoolice obținute prin macerare, utilizând drept material biologic părți vegetative dintr-un număr mare de plante (20 de specii), selectate fiind *Ribes uva-crispa*, *Sambucus nigra*, *Aronia melanocarpa*, *Prunus mahaleb*, *Malus purpurea* și *Lavandula angustifolia*, care s-au dovedit a avea CTP, CTF și AA mai semnificative.

Teza doctorat intitulată "NANOPARTICULE de METALICE FITOSINTETIZATE POTENTIALĂ **BIOCONJUGATE** CU ACTIVITATE ANTIBACTERIANĂ" a avut ca *obiective clare*: (1) recoltarea materialului vegetal, la momentul optim și în perioada de maximă maturitate a plantei, din sursa vegetală terapeutică autohtonă, atât din mediul natural, cât și din culturi ecologice proprii, din zona geografică a județului Dâmbovița, România; (2) obținerea unor extracte hidroalcoolice naturale, din plante autohtone prin metode de extracție non-invazive (macerare); (3) determinarea profilului fitochimic al extractelor (CTF, CTP, AA), importante în vederea explorării potențialelor aplicații practice; (4) generarea de nanoparticule prin metode rapide, ecologice și cu cost scăzut; (5) caracterizarea fizico-chimică a nanomaterialelor obtinute prin diferite tehnici analitice (UV-Vis, FTIR, Raman, XRD și SEM-EDS); (6) studiu microbiologic complex asupra nanomaterialelor cu activitate antibacteriană dovedită, cu viitoare aplicații terapeutice.

Analizele fizico-chimice utilizate în teza de doctorat au fost realizate cu aparatură performantă, de înaltă sensibilitate, existentă în Institutul de Cercetare Științifică și Tehnologică Multidisciplinară din cadrul Universității Valahia din Târgoviște.

Referitor la materialul vegetal, extractele hidroalcoolice au fost obținute cu asigurarea condițiilor sterile pentru materialele utilizate și pentru mediul de lucru în ansamblul său. De asemenea, un număr de două tulpini de bacterii, din Colecția de Culturi a Institutului de Cercetare Științifică și Tehnologică din cadrul Universității Valahia din Târgoviște au fost testate cu privire la inhibarea creșterii în prezența compușilor antimicrobieni existenți în extractele hidroalcoolice obținute din materialul vegetal selectat.

Procedeul de obținere al extractelor hidroalcoolice folosit în prezenta teză de doctorat este caracterizat de următoarele avantaje: este ușor de realizat și definit (macerare la temperatura camerei), nu implică generarea de produse secundare/intermediare potențial toxice, costurile sunt minime, prin prisma unor consumuri energetice minime conform principiilor tehnologiilor "*prietenoase cu mediul*".

Extractele hidroalcoolice obținute prin macerare, au fost caracterizate prin metode fizico-chimice. Astfel, pentru extractele hidroalcoolice din diferite părți vegetative ale speciilor selectate, *Ribes uva-crispa, Sambucus nigra, Aronia melanocarpa, Prunus mahaleb, Malus purpurea și Lavandula angustifolia*, au fost determinate, conținutul total de compuși polifenolici, conținutul total de flavonoide, activitatea antioxidantă și activitatea antibacteriană. Au fost realizate teste comparative între extractele utilizate, prin spectroscopie vibrațională în IR și Raman; prin aceste investigații experimentale s-a urmărit identificarea unor modificări de structură, dar și evidențierea compușilor cu potențial bioactiv din extracte, în vederea utilizării acestor extracte pentru generarea de nanoparticule.

Caracterizarea morfologică (SEM) și fizico-chimică (FTIR, Raman) а nanomaterialelor obținute în sistemul extract de Saccharomyces cerevisiae și extracte din materiale vegetale (Ribes uva-crispa, Sambucus nigra, Aronia melanocarpa și Lavandula angustifolia) a evidențiat faptul că în cazul nanomaterialului obținut cu extract de Ribes uvacrispa nanoparticulele de argint sunt distribuite uniform atât pe suprafața extractului cât și pe celulele de Saccharomyces cerevisiae, iar în cazul nanomaterialului cu extract de Aronia melanocarpa nanoparticulele de argint sunt distribuite uniform pe suprafața celulelor de Saccharomyces cerevisiae. Datele spectroscopiei FTIR și Raman înregistrate, în afara caracteristicilor comune/maximelor spectrale cu soluțiile coloidale de nanoparticule de argint (maxime prezente la ~ 444, ~ 495, ~ 950 si ~ 1 014 cm<sup>-1</sup>), au prezentat o serie de aspecte diferențiale în cazul extractului de Ribes uva-crispa care prezintă maxime spectrale (localizate la ~ 721, ~ 854 și ~ 1 460 cm<sup>-1</sup>) atribuite vibrațiilor metilenice de catenă; vibrațiilor C-H provenite de la nucleul aromatic 1,4-disubstituit, vibrațiilor de deformare O-H coplanare și respectiv vibrațiilor de întindere C=C-C asociate nucleului aromatic și vibrațiilor de deformare metilenice din alcooli, iar în cazul extractului de Aronia melanocarpa, prezintă maxime (localizate la ~ 510, ~ 1120, ~ 1320, ~ 1460 și ~ 1 990 cm<sup>-1</sup>) spectrale atribuite vibrațiilor de deformare C-O alcoolice din alcooli primari și secundari,

vibrațiilor de întindere C–O din alcooli terțiari, vibrațiilor C–C de catenă, vibrațiilor de deformare O–H în plan, vibrațiilor de răsucire metilenice din structurile alcoolice, vibrațiilor de îndoire C–H asociate grupărilor metil –  $CH_3$ , vibrațiilor de deformare metilenice, benzilor de combinare aromatice.

În ceea ce privește nanomaterialele obținute în sistemul coajă/membrană de coajă de ou și extracte vegetale este evidențiată prezența compușilor fitochimici ce contribuie la stabilizarea nanobiostructurilor prezente, asigurând totodată un potențial reducător și antioxidant remanent, prin rezultatele analizelor spectrale FTIR și Raman. Analiza SEM nu a putut evidenția însă prezența nanoparticulelor de argint respectiv a argintului în compoziția nanomaterialelor. Acest lucru s-ar putea datora existentei nanoparticulelor înglobate în matrice și prezente într-o foarte mică măsură la suprafața acesteia. Această concluzie este susținută și prin datele analizei XRD constituite pe baza cardurilor ICDD pentru argint (ICDD-PDF 04-003-7118), oxizi de argint (AgO: ICDD-PDF 04-003-3760, Ag<sub>2</sub>O: ICDD-PDF 01-076-1393, Ag<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: ICDD-PDF 01-072-0607, Ag<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: ICDD-PDF 04-007-1371, Ag<sub>3</sub>O: ICDD-PDF 04-014-3850, Ag<sub>2</sub>O<sub>2:</sub> ICDD-PDF 04-007-1477), azotatul de argint (ICDD-PDF 01-074-4790) precum și carbonat de calciu (calcit ICDD-PDF 01-083-0577) și fosfat de aluminiu (berlinit ICDD-PDF 01-071-1041). Pentru identificarea fazelor cristaline prezente în probele de nanomateriale obținute în sistemul coajă/membrană de coajă de ou și extracte vegetale nu a putut fi confirmată prezenta argintului, explicatia ar putea fi reprezentată de un fenomen de mascare a maximelor caracteristice argintului și a compușilor acestuia de către componentul majoritar calcit (CaCO<sub>3</sub>). Astfel, maxime corespondente unor compuși ai argintului care s-ar putea forma în condițiile de sinteză (componenți minoritari/în urme), dar care au valori reduse ale intensității maximelor de difracție nu pot fi observate din cauza maximelor semnificative din matrice.

Activitatea antibacteriană a nanomaterialelor obținute s-a determinat pe baza observării și cuantificării creșterii unor tulpini de bacterii, aduse în contact cu agenții cu potențial antibacterian. Evidențierea activității antibacteriene a probelor, coroborată cu activitatea antioxidantă a extractelor vegetale generatoare de nanoparticule, a furnizat baza științifică pentru viitoare cercetări și aplicații ale nanostructurilor sintetizate.

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

[1] A. Goffeau, B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J.
D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E. J. Louis, H. W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen,
H. Tettelin, S. G. Oliver (1996), Life with 6000 genes, *Science*, 274(5287):563–547.

[2] V. Wood, K. M. Rutherford, A. Ivens, M. A. Rajandream, B. Barrell (2001), A reannotation of the *Saccharomyces cerevisiae* genome, *Comparative and Functional Genomics*, 2(3):143–154.

[3] A. M. Lopez Sobaler, A. Aparicio Vizuete, R. M. Ortega (2017), Role of the egg in the diet of athletes and physically active people, *Nutricion Hospitalaria*, 34(4):31–35.

[4] J. E. Kim, W. W. Campbell (2018), Dietary Cholesterol Contained in Whole Eggs Is Not Well Absorbed and Does Not Acutely Affect Plasma Total Cholesterol Concentration in Men and Women: Results from 2 Randomized Controlled Crossover Studies, *Nutrients*, 10(9):1272.

[5] H. W. Windhorst, B. Grabkowsky, A. Wilke (2015), *Atlas of the Global Egg Industry*, International Egg Commission: London, UK, pp. 6-21.

[6] R.A. Meyers (2000), Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach, J. Coates, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, pp. 10815-10837.
[7] A. Rauf, T. Ahmad, A. Khan, Maryam, G. Uddin, B. Ahmad, Y. N. Mabkhot, S.

Bawazeer, N. Riaz, B. K. Malikovna, Z. M. Almarhoon, A. Al-Harrasib (2021), Green synthesis and biomedicinal applications of silver and gold nanoparticles functionalized with methanolic extract of *Mentha longifolia*, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 49(1):194-203.

[8] M. Kgatshe, O.S. Aremu, L. Katata-Seru, R. Gopane (2019), Characterization and Antibacterial Activity of Biosynthesized Silver Nanoparticles Using the Ethanolic Extract of Pelargonium sidoides DC, *Journal of Nanomaterials*, 2019:1-10.

[9] R. N. Oliveira, M. C. Mancini, F. C. S. de Oliveira, T. M. Passos, B. Quilty, R. M. da Silva Moreira Thiré, G. B. McGuinness (2016), FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing, *Matéria*, 21(3):767–779.

[10] H. Schulz, M. Baranska (2007), Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy, *Vibrational Spectroscopy*, 43:13–25.

[11] G. Yang, Q. Wang, C. Liu, X. Wang, S. Fan, W. Huang (2018), Rapid and visual detection of the main chemical compositions in maize seeds based on Raman hyperspectral
imaging, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 200:186– 194.

[12] C. Vanlaveni, S. Lallianrawna, A. Biswas, M. Selvaraj, B. Changmai, S. L. Rokhum (2021), Green synthesis of silver nanoparticles using plant extracts and their antimicrobial activities: a review of recent literature, *RSC Advances*, 11:2804–2837.

[13] H. Deng, D. McShan, Y. Zhang, S. S. Sinha, Z. Arslan, P. C. Ray, H. Yu (2016), Mechanistic Study of the Synergistic Antibacterial Activity of Combined Silver Nanoparticles and Common Antibiotics, *Environmental Science & Technology*, 50(16):8840-8848.

[14] F. Kang, P. J. Alvarez, D. Zhu (2014), Microbial extracellular polymeric substances reduce Ag<sup>+</sup> to silver nanoparticles and antagonize bactericidal activity, *Environmental Science & Technology*, 48(1):316-322.

[15] H. Xu, F. Qu, H. Xu, W. Lai, Y. A. Wang, Z. P. Aguilar, H. Wei (2011), Role of reactive oxygen species in the antibacterial mechanism of silver nanoparticles on Escherichia coli O157:H7, *BioMetals*, 25(1):45-53.

[16] I. Sondi, B. Salopek-Sondi (2004), Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria, *Journal of Colloid and Interface Science*, 275(1):177-182.

[17] N. M. Stirbescu, R. M. Ion, S. Teodorescu, L. Olteanu, I. D. Dulama, I. A. Bucurica,
R. M. Stirbescu (2019), Banana flower nectar –mediated synthesis of silver nanoparticles, *Bulletin of the Transilvania University of Braşov, Series I: Engineering Sciences*, 12(61):55-64.

[18] B. D. Fahlman (2011), Materials Chemistry, Springer, Dordrecht, pp. 351-386.

[19] V. Chandrasekhar (2005), *Inorganic and Organometallic Polymers*, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1-82.

[20] E. J. Barbero (2017), *Introduction to Composite Materials Design*, CRC Press, pp. 1-83.

[21] S. Todoroki (2014), Fiber Fuse, Springer, Tokyo, pp. 1-25.

[22] S. A. Kolesnikov, G. E. Mostovoi (2012), High-temperature treatment of carbon-carbon composite materials. Communication 1. Thermal stabilization of two-dimensionally reinforced carbon-carbon composite material object properties, *Refractories and Industrial Ceramics*, 53(2):123-129.

[23] S. A. Kolesnikov, G. E. Mostovoi, S. V. Vasilchenko (2012), High-temperature treatment of carbon-carbon composite materials. Communication 2. Thermal stabilization of

two-dimensionally reinforced carbon-carbon composite material object geometry, *Refractories and Industrial Ceramics*, 53(3):185-192.

[24] F.M. Christensen, A. Brinch, J. Kjølholt, P.D. Mines, N. Schumacher, T.H. Jørgensen, R.M. Hummelshøj (2015), *Nano-enabled environmental products and tech-nologies – opportunities and drawbacks*, Environmental project no. 1803. Danish EPA.

[25] European Commission. Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial. (2011/969/EU).

[26] International Organization for Standardisation (ISO). ISO/TS 80004-1:2010 Nanotechnologies – Vocabulary – Part 1: Core terms. NB! Disse definitioner er yderligere elaboreret i ISO/TS 80004-2 til ISO/TS 80004-13.

[27] PAS 71:2011, Nanoparticles. Vocabulary. British Standards Institution: London, United Kingdom, 2011.

[28] M.A. Sørensen, F. Ingerslev, K. Bom, C. Lassen, F. Christensen, M. Warming (2015), *Survey of products with nanosized pigments*, Environmental project no. 1638. Danish EPA.

[29] N. Ambiga (2018), Selection and creation of nano particles using artificial intelligence, *International Journal of Management, IT & Engineering*, 8(9):211-223.

[30] E. Abbasi, S. F. Aval, A. Akbarzadeh, M. Milani, H. T. Nasrabadi, S. W. Joo, Y. Hanifehpour, K. Nejati-Koshki, R. Pashaei-Asl (2014), Dendrimers: synthesis, applications, and properties, *Nanoscale Research Letters*, 9(1):247-257.

[31] U. J. Chigbo, A. E. Ugochukwu, D. F. John (2017), Dendrimers: A novel tool for drug delivery and targeting, *Universal Journal of Pharmaceutical Research*, 2(3):34-40.

[32] S. Rewar, C. Singh, P. Rewar (2015), Dendrimers as carriers and its application in therapy, *International Journal of Analytical, Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 4(3):3-19.

[33] I. J. Majoros, C. R. Williams, D. A. Tomalia, J. R. Baker Jr. (2008), New Dendrimers: Synthesis and Characterization of Popam–Pamam Hybrid Dendrimers, *Macromolecules*, 41(22):8372–8379.

[34] M. M. Ulaszewska, M. D. Hernando, A. Ucles, R. Rosal, A. Rodriguez, E. Garcia-Calvo, A. R. Fernandez-Alba (2012), Chemical and Ecotoxicological Assessment of Dendrimers in the Aquatic Environment, *Comprehensive Analytical Chemistry*, 59:197-233.

[35] E. R. Gillies, J. M. J. Fréchet (2005), Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery, *Drug Discovery Today*, 10(1):35-43.

[36] S. Drabu, S. Khatri, S. Babu (2010), Dendrimers: Nanopharmaceuticals for Drug Delivery, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 1(2):464-471.

[37] A. Santos, F. Veiga, A. Figueiras (2020), Dendrimers as Pharmaceutical Excipients: Synthesis, Properties, Toxicity and Biomedical Applications, *Materials*, 13(65):1-31.

[38] B. Ziemba, G. Matuszko, M. Bryszewska, B. Klajnert (2012), Influence of dendrimers on red blood cells, *Cellular & molecular biology letters*, 7:21-35.

[39] H. Yuan, Q. Ma, L. Ye, G. Piao (2016), The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products, *Molecules*, 21(5):559-577.

[40] C. Elvira, A. Gallardo, J. Roman, A. Cifuentes (2005), Covalent Polymer-Drug Conjugates, *Molecules*, 10(1):114-125.

[41] K. Greish (2010), Enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting, *Methods in molecular biology*, 624:25-37.

[42] S. Balurkar, R. S. Pentewar, M. Bhange, P. Bhosle, A. Jadhav (2015), Dendrimers: a novel approach for drug delivery, *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 5(09).
[43] Y. Zhang, T. R. Nayak, H. Hong, W. Cai (2013), Biomedical Applications of Zinc Oxide Nanomaterials, *Current Molecular Medicine*, 13(10):1633-1645.

[44] J. Jeevanandam, A. Barhoum, Y. S. Chan, A. Dufresne, M. K Danquah (2018), Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 9:1050–1074.

[45] C. Y. Tai, C. Tai, M. Chang, H. Liu (2007), Synthesis of Magnesium Hydroxide and Oxide Nanoparticles Using a Spinning Disk Reactor, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 46(17):5536–41.

[46] N. Kumar, S. Kumbhat (2016), *Essentials in Nanoscience and Nanotechnology*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, U.S.A., pp. 189–236.

[47] R. K. Jha, P. K. Jha, K. Chaudhury, S. V.S. Rana, S. K. Guha (2014), An emerging interface between life science and nanotechnology: present status and prospects of reproductive healthcare aided by nano-biotechnology, *Nano Reviews*, 5:22762-22781.

[48] H. E. Schaefer (2010), *Nanoscience The Science of the Small in Physics, Engineering, Chemistry, Biology and Medicine*, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 99-165.

[49] F. Klaessig, M. Marrapese, S. Abe (2011), Current Perspectives in Nanotechnology Terminology and Nomenclature în *Nanotechnology Standards*, Springer, New York, NY, pp. 21-52.



MINISTRY OF EDUCATION "VALAHIA" UNIVERSITY OF TARGOVISTE IOSUD – DOCTORAL SCHOOL OF ENGINEERING SCIENCES FUNDAMENTAL FIELD: ENGINEERING SCIENCES FIELD: MATERIALS ENGINEERING

# **PHD THESIS SUMMARY:**

# "PHYTOSYNTHESIZED BIOCONJUGATED METALLIC NANOPARTICLES WITH POTENTIAL ANTIBACTERIAL ACTIVITY"

**PHD SUPERVISOR:** 

**Professor Rodica-Mariana ION** 

**DOCTORAL STUDENT:** 

**Eng. Nicolae-Mihail STIRBESCU** 

Targoviste 2022

## CONTENT

SUMMARY	1
ACKNOWLEDGMENTS	2
INTRODUCTION	6
CHAPTER I GENERAL NOTIONS ABOUT MATERIALS	9
1.1. CLASSIFICATION OF MATERIALS	10
1.2. CLASSIFICATION OF NANOMATERIALS	15
1.3. PROPERTIES OF NANOMATERIALS	22
1.3.1. Mechanical properties	22
1.3.2. Optical properties	27
1.3.3. Magnetic properties	29
1.3.4. Thermal properties	30
1.3.5. Electrical properties	32
CHAPTER II GENERAL PROCEDURES FOR THE SYNTHESIS OF	33
NANOMATERIALS	
2.1. BOTTOM-UP METHODS USED FOR THE SYNTHESIS OF	33
NANOMATERIALS	26
2.2. TOP-DOWN METHODS USED FOR THE SYNTHESIS OF NANOMATERIALS	36
2.3. SYNTHESIS OF METALLIC NANOPARTICLES	36
2.3.1. Chemical methods	36
2.3.2. Physical methods	39
2.3.3. Biological methods	41
CHAPTER III CHARACTERIZATION OF NANOMATERIALS	52
3.1. ANALYTICAL TECHNIQUES FOR NANOMATERIALS CHARACTERIZATION	52
3.2. APPLICATIONS OF NOBLE METALS NANOMATERIALS	56
3.2.1. Applications of silver nanoparticles	56
3.2.2. Applications of gold nanoparticles	60
3.2.3. Applications of platinum nanoparticles	61
3.3. TOXICITY OF NOBLE METALS NANOMATERIALS	64
3.3.1. Toxicity of silver nanoparticles	64
3.3.2. Toxicity of gold nanoparticles	65
3.3.3. Toxicity of platinum nanoparticles	67
CHAPTER IV ANALYTICAL EQUIPMENTS USED IN THE STUDY OF	70
MATERIALS	
4.1. FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROMETER (FTIR)	70
4.2. RAMAN SPECTROMETER	72

A 3 LIV-VIS SPECTROPHOTOMETER	73	
4.5. UV-VIS SPECTROPHOTOMETER 4.4. OPTICAL MICROSCOPY AND SCANNING ELECTRON MICROSCOPY		
4.4. OPTICAL MICROSCOPT AND SCANNING ELECTRON MICROSCOPT 4.5. Y DAY DIFEDACTOMETED (YDD)		
4.3. A-KAT DIFFRACTOMETER (ARD) CHARTER V MATERIAL CUSER IN THE STURM		
CHAPTER V MATERIALS USED IN THE STUDY	1)	
5.1. TECHNIQUES FOR SEPARATION OF ACTIVE PRINCIPLES	80	
5.2. DESCRIPTION OF MATERIALS USED IN STUDY	81	
5.2.1. Plants	81	
5.2.2. Fungi (Saccharomyces cerevisiae)	89	
5.2.3. Chicken egg	91	
CHAPTER VI PRELIMINARY TESTS FOR GENERATION OF NANOPARTICLES OF NOBLE METALS (GOLD, SILVER AND PLATINUM) IN PLANT FXTRACTS	93	
6.1  DETERMINATION OF TOTAL FLAVONOID CONTENT	93	
6.2 DETERMINATION OF TOTAL PLAVONOID CONTENT	94	
6.3 DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY	96	
6.4 OBTAINING DECUDSODS USED IN SYNTHESIS	97	
6.4.1 Obtaining plant extracts	97	
6.4.2. Obtaining solutions of silver nitrate, tetrachloroauric acid and hexachloroplatinic acid	98	
6.5. GENERATION OF GOLD, SILVER AND PLATINUM NANOPARTICLES WITH PLANT EXTRACTS	98	
6.6. TESTS TO CONFIRM THE GENERATION OF NANOPARTICLES OF NOBLE METALS (Au, Ag and Pt) WITH HYDRO-METHANOLIC VEGETAL EXTRACTS	100	
6.6.1. Results of the UV-Vis analysis	100	
6.6.2. Results of FTIR and Raman analyses	106	
CHAPTER VII SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF	118	
NANOBIOMATERIALS IN THE Saccharomyces cerevisiae EXTRACT SYSTEM		
AND PLANT EXTRACTS		
7.1. SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF SILVER NANOPARTICLES GENERATED IN Saccharomyces cerevisiae EXTRACT	119	
7.1.1. Obtaining the precursors used in the synthesis	119	
7.1.2. Synthesis and characterization of silver nanoparticles generated in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> extract	119	
7.2. SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF NANOMATERIALS OBTAINED IN THE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EXTRACT, PLANT EXTRACTS AND AgNO <sub>3</sub> SOLUTION (10 <sup>-3</sup> M) SYSTEM	121	
7.2.1. Characterization of the nanomaterial obtained in the system <i>Saccharomyces cerevisiae</i> extract, <i>Ribes uva-crispa</i> fruit extract, and AgNO <sub>3</sub> solution ( $10^{-3}$ M)	123	
7.2.2. Characterization of the nanomaterial obtained in the system <i>Saccharomyces cerevisiae</i> extract, <i>Sambucus nigra</i> extract and AgNO <sub>3</sub> solution (10 <sup>-3</sup> M)	126	
7.2.3. Characterization of the nanomaterial obtained in the system <i>Saccharomyces cerevisiae</i> extract, <i>Aronia melanocarpa</i> extract and AgNO <sub>3</sub> solution ( $10^{-3}$ M)	128	
7.2.4. Characterization of the nanomaterial obtained in the system <i>Saccharomyces cerevisiae</i> extract, <i>Lavandula angustifolia</i> extract and AgNO <sub>3</sub> solution (10 <sup>-3</sup> M)	130	

#### 134 OF CHAPTER VIII **SYNTHESIS** AND **CHARACTERIZATION** NANOBIOMATERIALS BASED ON EGGSHELL/MEMBRANE AND PLANT **EXTRACTS**

8.1. SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF NANOMATERIALS WITH MATRIX CONSISTING OF EGGSHELL AND EGGSHELL MEMBRANE FUNCTIONALIZED WITH SILVER NANOPARTICLES OBTAINED WITH RIBES UVA-CRISPA AND ARONIA MELANOCARPA EXTRACTS 142 8.1.1. Obtaining the precursors used in the synthesis 8.1.2. Synthesis (in situ) and characterization of nanomaterials with matrix 145 consisting of eggshell and eggshell membrane functionalized with silver nanoparticles obtained with Ribes uva-crispa extract 8.1.3. Synthesis (*in situ*) and characterization of nanomaterials with eggshell matrix 160 and eggshell membrane respectively functionalized with silver nanoparticles obtained with Aronia melanocarpa extract 8.1.4. Synthesis (ex situ) and characterization of nanomaterial with matrix 172 consisting of eggshell membrane functionalized with silver nanoparticles obtained with Aronia melanocarpa extract **8.2 ANTIBACTERIAL ACTIVITY** 183 185 8.2.1 Microorganisms tested 186 8.2.2 Work procedure 187 8.2.3 Test methods used in the analysis 8.2.4 Antibacterial activity of nanomaterials obtained in the ES/ESM system, Ribes 189 uva-crispa/Aronia melanocarpa extracts and silver nitrate solution 8.2.5 Minimum inhibitory concentration (MIC) 193 199 **CHAPTER IX ORIGINAL CONTRIBUTIONS** 200 9.1.1. SYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES IN NECTAR FROM Musa basioo FLOWER 9.1.2 CHARACTERIZATION OF SILVER NANOPARTICLES GENERATED IN 200 NECTAR FROM Musa basjoo FLOWER 9.2 PROSPECTS FOR CAREER DEVELOPMENT 204 205 **GENERAL CONCLUSIONS** 209 **BIBLIOGRAPHY** 240 **TABLES LIST** 

FIGURES LIST	243

142

#### Thanks

I want to thank everyone who has been with me on this doctoral journey, in which I have developed, both as a person and as a researcher.

In particular, I want to thank Mrs. Professor Rodica Mariana Ion from the Valahia University of Targoviste, Faculty of Materials and Mechanical Engineering, Doctoral School of Engineering Sciences, Materials Engineering Field, who coordinated me throughout my doctoral studies.

I send my sincere thanks to Professor Eng. Lavinia Buruleanu for the support provided in carrying out the microbiological analyses, as well as Professor Eng. Cristiana Rădulescu, Director of the Institute of Multidisciplinary Research for Science and Technology (ICSTM), Valahia University of Targoviste, for the professional support offered all these years.

I am also grateful to the members of the guidance committee, Professor Cornel Marin, Professor Tanța Setnescu and Professor Eng. Lavinia Buruleanu, for the assistance and support given during the doctoral studies, for the advice and scientific explanations.

I would like to thank to my colleagues from the Institute of Multidisciplinary Research for Science and Technology for the unconditional support given in the research activity. I remain deeply grateful to my colleagues from ICSTM, especially to colleagues Senior Researcher Dr. Ioana Daniela Dulamă, Senior Researcher Dr. Eng. Cristina Mihaela Nicolescu, Senior Researcher Dr. Anca Irina Gheboianu, Senior Researcher Dr. Eng. Radu Lucian Olteanu and Scientific Researcher Dr. Sofia Teodorescu.

I thank to my family for moral support, for understanding my passion for plants, nature and for all the given support.

Author

#### INTRODUCTION

Materials are important to mankind because of the benefits that can be obtained from tuning their properties. Materials science is a broad field and can be considered as an interdisciplinary field, including the study of the structure and properties of any material, the creation of new types of materials, and the manipulation of a material's properties to suit the needs of a specific application. The technology of the 21<sup>st</sup> Century requires the miniaturization of devices, while their final performance is considerably improved. Nanomaterials have gained importance in technological advancements due to their improved properties.

Nanoparticles belong to the category of advanced materials frequently used in today's science and technology due to their wide range of applicability. The biosynthesis of metal or metal oxide nanoparticles (using plants, fungi, bacteria, algae, etc.), with the desired morphology (shape, size, and crystalline nature) represents ecological ideas presented under the name of "green chemistry" being one of the aims of the research current.

The doctoral thesis entitled "PHYTOSYNTHESIZED BIOCONJUGATED METALLIC NANOPARTICLES WITH POTENTIAL ANTIBACTERIAL ACTIVITY" falls within the field of Materials Engineering, within the Doctoral School of Engineering Sciences, having as its main objective the study of nanomaterials obtained from different types of biological samples.

The doctoral thesis contains **250** pages, **35** tables, **144** figures and **561** bibliographic references, being structured in two parts (theoretical and experimental sections).

The general objective of the doctoral thesis consisted in the production, characterization and testing of nanomaterials based on plant extracts, through environmentally friendly methods. The plant materials used in the study were chosen following a thorough research of the specialized literature regarding the bioactive compounds (flavonoids, terpenoids, proteins, enzymes, pigments, etc.) that are good to the human health, acting as antioxidants to protect it.

**The purpose** of the doctoral thesis consisted in the development of methods for obtaining environmentally friendly nanomaterials. The plant extracts used in this PhD thesis were characterized by spectroscopic methods (UV-Vis, FTIR and Raman). In this sense, plant material harvested by the author was used, at the optimal time and in the period of maximum maturity of the plant, from the geographical area of Dambovita County, and being processed

fresh or dry. The nanomaterials obtained with the help of these plant extracts were also characterized by different analytical techniques (UV-Vis, FTIR, Raman, XRD and SEM-EDS) and their antibacterial activity was assessed. The bioactive compounds present in plant materials are responsible for the bioreduction of silver (from  $Ag^+$  to  $Ag^0$ ), gold (from  $Au^{3+}$  to  $Au^0$ ) and platinum (from  $Pt^{4+}$  to  $Pt^0$ ) ions, as well as for the stabilization of gold, silver, and platinum.

A series of worldwide scientific studies have highlighted the fact that metallic nanoparticles have applications in various fields, such as biology, pharmacy, and medicine, etc.; so, this work represents a complement to world research, highlighting the special properties of nanomaterials obtained using plant extracts (especially from native therapeutic plant), both from spontaneous flora and ecological crops, which promote regenerative agriculture.

Novelty elements of the doctoral thesis are related to:

- 1. The preparation of new plant extracts with therapeutic properties.
- 2. The complex investigations of the phytochemical profile of hydroalcoholic extracts obtained by autochthonous plant materials (from ecological crops).
- 3. The optimization of working conditions in the processes of obtaining hydroalcoholic extracts and nanoparticles.
- 4. The synthesis of metallic nanoparticles (gold, silver, and platinum) through ecological, economical, and fast methods, in plant extracts (*Ribes uva-crispa, Sambucus nigra, Aronia melanocarpa, Prunus mahaleb, Malus purpurea,* and *Lavandula angustifolia*).
- 5. The characterization of nanoparticles (gold, silver, and platinum).
- 6. The synthesis and characterization of the nanobiomaterial obtained in the system: *Saccharomyces cerevisiae* extract, plant extract (*Ribes uva-crispa, Sambucus nigra, Aronia melanocarpa, Prunus mahaleb, Malus purpurea* and *Lavandula angustifolia*) and silver nitrate solution.
- 7. The synthesis and characterization of the nanobiomaterial obtained in the system: eggshell/eggshell membrane, plant extract (*Ribes uva-crispa* and *Aronia melanocarpa*) and silver nitrate solution.
- 8. The microbiological study of some nanomaterials through which the antibacterial activity was proven.
- 9. The silver nanoparticles generated directly from *Musa basjoo* inflorescence.

Future research aims to use these nanomaterials for therapeutic purposes: preparation of patches and creams with antioxidant/antimicrobial properties. Due to their

antioxidant properties, the new silver and gold bio-nanostructures can be used in the therapy of diseases caused by oxidative stress.

#### The structure of the doctoral thesis

The doctoral thesis entitled "PHYTOSYNTHETIC BIOCONJUGATED METALLIC NANOPARTICLES WITH POTENTIAL ANTIBACTERIAL ACTIVITY" is structured in two parts: *Literature study* and *Experimental section*, totaling 9 chapters.

**Part 1 – The literature study** includes four chapters that present the state-of-the-art in the field of nanomaterials and a series of theoretical aspects related to the analytical techniques used to fulfill the objectives of this doctoral thesis (advantages and disadvantages, equipment, and applications).

**Part 2 – The experimental section** is structured in five chapters as follows: **Chapter V** presents the description of the autochthonous plant materials used in the study; the next three chapters are related to the original contributions made in the field of nanomaterials. Thus, in **Chapter VI** the preliminary tests for the generation of noble metal nanoparticles in the selected autochthonous plant extracts are presented. **Chapter VII** followed the *in-situ* synthesis and characterization of nanomaterials obtained from the *Saccharomyces cerevisiae* and plant extracts system. In **Chapter VIII** followed the synthesis and characterization of nanomaterials based on eggshell and plant extracts system. *In-situ* and *ex-situ* synthesis of nanomaterials based on eggshell / eggshell membrane and plant extracts were performed and the antimicrobial activity was assessed. **Chapter IX** briefly presents the author's original contribution on field of Materials Engineering. Each chapter ends with conclusions, in which the most important and original elements are summarized.

At the end of the doctoral thesis, the **General Conclusions** of the doctoral thesis are presented, from which it follows that the aim and objectives have been fulfilled. **Original Contributions** and **Prospects for further development** are highlighted for a unified understanding of the entire scientific research. The doctoral thesis also includes the list of **References**.

The dissemination of the scientific research presented in the doctoral thesis have been and will be the subject of publications in prestigious international journals (indexed in Web of Science – Clarivate Analytics), patent applications and communications at international conferences.

#### PERSONAL CONTRIBUTION

#### MATERIALS USED IN THE STUDY

The present study had as main material various plants from the spontaneous flora of the southern region of Romania. For this purpose, 20 species of plants were collected/ harvested personally in 2016. Some of them were washed and dried in optimal conditions (closed and ventilated spaces, protected from sunlight, at ~20°C), but others were used fresh, shortly after harvesting.

#### 1. Plants

From all 20 plant samples collected and brought to the laboratory under optimal conditions, following preliminary analyzes to establish the active principles, six plants were selected (Figure 1): *Ribes uva-crispa* (fruit), *Sambucus nigra* (fruit), *Aronia melanocarpa* (fruit), *Malus purpurea* (fruit), *Prunus mahaleb* (fruit) and *Lavandula angustifolia* (flowers). A sample of *Musa basjoo* nectar (flower nectar) was also investigated.

These six plants were selected due to the fact that are parts of the own author crop, which is a controlled ("bio") culture. In the following, the selected plants are presented.



Ribes uva-crispa



Sambucus nigra



Aronia melanocarpa



Lavandula angustifolia



*Malus purpurea* Figure 1. Plants selected for study



Prunus mahaleb

#### 2. Fungi (Saccharomyces cerevisiae)

*Saccharomyces cerevisiae* is a unicellular fungus, with a nuclear genomic DNA organized into 16 chromosomes [1]. Its genome was completely sequenced by Goffeau et al. in 1996 [1] and found to contain approximately 6000 genes, of which 5570 are predicted to be protein-coding genes.

Saccharomyces cerevisiae is a model organism, a valuable tool for all aspects of basic research. Unlike other model organisms such as *Escherichia coli* or *Caenorhabditis elegans*, it is the most valuable species for a variety of industrial applications [2].

#### 3. Chicken egg

Some recent research has highlighted the beneficial role of chicken eggs for consumption, especially for active people [3]. Egg consumption is nutritionally essential, ensuring essential lipids, proteins, vitamins, minerals, and trace elements, while providing a moderate source of calories (about 140 kcal/100 g), a high culinary potential and a low economic cost [4]. It should be noted that neither the eggshell nor its membranes are usually eaten, although eggshell membranes are edible. Average consumption of eggs/person/year in the world ranges from 62 (India) to over 358 (Mexico) and it is even lower in African countries (36 eggs/person/year). The chicken eggs consumed in our daily diet are not fertilized and are produced by hens raised specifically around the world for human consumption [5].

Along with plants, *Saccharomyces cerevisiae* is used in many branches of industry, this is the reason for introducing it in the present study. Also, the chicken egg was included in the study because it is part of the daily diet, and the eggshell, which contains many nutrients, is most often considered as waste.

# PRELIMINARY TESTS FOR THE SYNTHESIS OF NOBLE METALS (GOLD, SILVER, AND PLATINUM) NANOPARTICLES IN PLANT EXTRACTS

For the first part of the study, after a rigorous analysis of the specialized literature, 20 plant samples were analyzed. The results of the phytochemical parameters analysis are presented in Figure 2.



Figure 2. The results of the phytochemical parameters of the plants under study.

For the synthesis of gold, silver, and platinum nanoparticles, the procedure was as follows:

a) 2 mL of silver nitrate solution  $(10^{-3} \text{ M})$  was added to 5 mL of plant extract. The obtained mixture was kept on the Bioblock Scientific ultrasonic bath for 30 minutes at a

temperature of 40°C, then moved to Memmert oven for one hour at a temperature of 60°C. The synthesis mixture was kept overnight, in the dark, at room temperature.

b) 2 mL of tetrachloroauric acid solution  $(10^{-3} \text{ M})$  was added to 5 mL of plant extract. The obtained mixture was kept on the Bioblock Scientific ultrasonic bath for 30 minutes at a temperature of 40°C, then moved to Memmert oven for one hour at a temperature of 60°C. The synthesis mixture was kept overnight, in the dark, at room temperature.

c) 2 mL of hexachloroplatinic acid (10<sup>-3</sup> M) was added to 5 mL of plant extract. The obtained mixture was kept on the Bioblock Scientific ultrasonic bath for 30 minutes at a temperature of 40°C, then moved to Memmert oven for one hour at a temperature of 60°C. The synthesis mixture was kept overnight, in the dark, at room temperature.

UV-Vis analysis was performed using the JASCO V-570 spectrophotometer (UV-Vis-NIR) from Analytical Instruments, with a double beam system, with a single monochromator in the wavelength range 190-2500 nm, whose source of light is a halogen lamp in the wavelength range 330-2500 nm, with a resolution of 0.5 nm.

For the *Malus purpurea* fruit extract mixed with silver nitrate solution, UV-Vis analysis was performed at 1 h, 3 h, 6 h, and 24 h respectively, after preparation in order to establish the nanoparticles synthesis.

Figure 3 shows the overlap of the UV-Vis spectra for the mixture of the hydroalcoholic extract of *Malus purpurea* fruit and the silver nitrate solution. The specific peak of silver nanoparticles can be observed in the 440-480 nm area and the maximum signal was achieved after 24 h when the synthesis process was stabilized.



Figure 3. UV-Vis spectrum for the mixture of hydroalcoholic extract of *Malus purpurea* fruit and silver nitrate solution.

In order to highlight the synthesis of platinum nanoparticles from the mixture of *Malus purpurea* extract with hexachloroplatinic acid solution, UV-Vis analysis was performed 1h, 3h, and 24 hours after preparation.

Figure 4 shows the overlap of the UV-Vis spectra for the mixture between the hydroalcoholic extract of *Malus purpurea* fruit and the hexachloroplatinic acid solution. A maximum of spectral signal, specific to platinum nanoparticles can be observed in the 270-290 nm area which becomes more pronounced as the time value increases.



Figure 4. UV-Vis spectrum for the mixture of the hydroalcoholic extract of *Malus purpurea* fruit and hexachloroplatinic acid solution.

For the analysis at 60 minutes, the initial sample consisting of hydroalcoholic extract from *Malus purpurea* fruit and hexachloroplatinic acid solution (10<sup>-3</sup>M) in a ratio of 1:1; this mixture was diluted with ultrapure water in a ratio of 1:20 (1 mL solution diluted with 20 mL ultrapure water); 10 mm quartz cuvette and ultrapure water blank were used. This sample was subsequently scanned at 180 minutes and 24 hours.

In order to highlight the synthesis of gold nanoparticles from the mixture of *Malus purpurea* fruit extract with tetrachloroauric acid solution, UV-Vis analysis was performed 60 minutes, 180 minutes and 24 hours after preparation.

Figure 5 shows the overlap of the UV-Vis spectra for the mixture between the hydroalcoholic extract of *Malus purpurea* fruits and the tetrachloroauric acid solution. A spectral maximum specific to platinum nanoparticles can be observed in the 560-580 nm area located in the spectrum at 556.5 nm/A=2.58 (at 60 minutes) and respectively 557.2 nm/A=2.85 (at 180 minutes) which becomes more pronounced as the time value increases.



Figure 5. UV-Vis spectrum for the mixture of the hydroalcoholic extract of *Malus purpurea* fruit and tetrachloroauric acid solution.

For the analysis at 60 minutes, the initial sample consisting of hydroalcoholic extract from *Malus purpurea* fruit and tetrachloroauric acid solution (10<sup>-3</sup>M) in a ratio of 1:1 was diluted with ultrapure water in a ratio of 1:4 (1 mL solution diluted with 4 mL ultrapure water); 10 mm quartz cuvette and ultrapure water blank were used. This sample was subsequently scanned at 180 minutes and 24 hours.

To carry out the FTIR analysis, the ATR accessory with a diamond crystal was used, on which a drop of the mixture to be analyzed was placed, and for the Raman analysis, the liquid cell was used.



Figure 6. FTIR spectra for colloidal solutions of silver (blue), gold (red) and platinum (green) nanoparticles based on *Aronia melanocarpa* fruit extract



Figure 7. Raman spectra for colloidal solutions of silver (blue), gold (red) and platinum (green) nanoparticles based on *Aronia melanocarpa* fruit extract

The FTIR spectra recorded (Figure 6) for the colloidal solutions of silver nanoparticles obtained using the investigated extracts revealed the presence of some spectral maxima that can be associated/attributed to the presence of phytochemical compounds in the plant extract/extracts: ~3300 cm<sup>-1</sup> attributed to OH groups associated with polyphenolic compounds and the extraction solvent, ~1640 cm<sup>-1</sup> associated with aromatic C=C stretching vibrations, carbonyl groups, ~1410 cm<sup>-1</sup> in-plane bending vibrations of the vinyl C–H bond, vibrations of bending of phenolic OH groups or tertiary alcohols, ~1110 cm<sup>-1</sup> aromatic C–H in-plane bending vibrations, C–O stretching vibrations associated with secondary alcohols and cyclic ethers, ~1020 cm<sup>-1</sup> aromatic O–H in-plane bending vibrations, CO stretching vibrations, R(Aryl)CHOH. The Raman spectral data (Figure 7), complementary to the FTIR spectral data, also highlighting a series of peaks common to the investigated colloidal solutions:

~444 cm<sup>-1</sup> C–O deformation vibrations associated with primary alcohols, in-plane bending vibrations of the aromatic C–OH bond, ~495 cm<sup>-1</sup> in-plane bending vibrations of the C–O group associated with secondary alcohols, ~950 cm<sup>-1</sup> vinyl and aromatic C–H bending vibrations, ~1014 cm<sup>-1</sup> in-plane bending vibrations aromatic C–H, alcoholic CCO stretching vibrations.

In the case of colloidal solutions of gold and platinum nanoparticles, the FTIR spectra revealed (similar to those recorded for silver nanoparticles) spectral maxima associated with the presence of phytochemical compounds from plant extracts, located at  $\sim$ 3300 cm<sup>-1</sup>,  $\sim$ 1640 cm<sup>-1</sup>,  $\sim$ 1110 cm<sup>-1</sup>, and  $\sim$ 1020 cm<sup>-1</sup>, respectively. The Raman spectral data, apart from the common features/spectral maxima with the silver nanoparticle colloidal solutions (maxima present at ~444, ~495, ~950, and ~1014 cm<sup>-1</sup>) showed a number of differential aspects depending on the synthesis precursors (vegetable raw material and ionic solution respectively); thus, in the case of colloidal solutions of gold nanoparticles, distinct spectral maxima located at ~721, ~854, and ~1460 cm<sup>-1</sup> can be noted (in the case of *Ribes*) uva-crispa extract, associated with chain methylene vibrations, C-H vibrations originating from to the 1.4-disubstituted aromatic nucleus, the coplanar O-H bending vibrations and respectively the C=C-C stretching vibrations associated with the aromatic nucleus and methylene bending vibrations in alcohols, ~510, ~1120, ~1320, ~1460, and ~1990 cm<sup>-1</sup> (in the case of Aronia melanocarpa extract, associated with the alcoholic C-O deformation vibrations of primary and secondary alcohols, the C–O stretching vibrations of tertiary alcohols, the C–C chain vibrations, O–H in-plane deformation vibrations, methylene twisting vibrations in alcoholic structures, C–H bending vibrations associated with methyl –  $CH_3$  groups, methylene deformation vibrations, aromatic combination bands.

The presence of phytochemical compounds in the colloidal solutions of synthesized metallic nanoparticles (silver, gold, and platinum), highlighted by the results of FTIR and Raman spectral analyses, contributes to the stabilization of the nanobiostructures present in the solution, ensuring at the same time a reducing and antioxidant residual potential [6-11].

# SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF NANOBIOMATERIALS IN THE SYSTEM Saccharomyces cerevisiae AND PLANT EXTRACTS

In this study stage, the silver nanoparticles were synthesized using *Saccharomyces cerevisiae* extract as a matrix. For the colloidal solutions of silver nanoparticles based on *Saccharomyces cerevisiae* extract, imaging tests were performed by optical microscopy as well as SEM-EDS analysis (Figures 8-9). In the SEM image obtained of the nanomaterial obtained in the system *Saccharomyces cerevisiae* extract, *Ribes uva-crispa* extract and AgNO<sub>3</sub> solution shown in Figure 8 (made at an acceleration voltage of 30 kV and working distance of 16 mm, at a magnification factor of 4 500x), it can be seen that formed silver nanoparticles cover approximately 0.6% of the surface of *Saccharomyces cerevisiae* cells.





Figure 8. SEM image for the nanomaterial obtained in the system *Saccharomyces cerevisiae* extract, *Ribes uva-crispa* extract and AgNO3 solution

Figure 9. EDS spectrum for the nanomaterial obtained in the system *Saccharomyces cerevisiae* extract, *Ribes uva-crispa* extract and AgNO<sub>3</sub> solution

Silver nanoparticles agglomerated and perfectly separated from *Saccharomyces cerevisia*e cells were also observed (Figure 11); the silver nanoparticles content in the agglomeration being approximately 15.25 wt.%.



Figure 10. a) Image obtained by SEM analysis for the agglomeration of silver nanoparticles and b) Distribution map of silver in the analyzed nanoparticle agglomeration

The SEM image (Figure 10a) of the silver nanoparticles agglomeration obtained in the system *Saccharomyces cerevisiae* extract, *Ribes uva-crispa* extract and AgNO<sub>3</sub> solution were achieved at 30 kV accelerating voltage and 16 mm working distance, at a magnification factor of 60,000x.

Table 1. Result of EDS analysis for agglomeration of silver nanoparticles in the nanomaterial obtained inthe system Saccharomyces cerevisiae extract, Ribes uva-crispa extract and AgNO3

Element	wt% $\pm$ % S.D.
С	26.92±0.61
Ν	1.58±0.54
0	11.14±0.46
Al	2.24±0.06
Si	0.16±0.03
Р	0.13±0.02
Cu	42.58±0.22
Ag	15.25±0.16





Figure 11. a) EDS spectrum; b) Distribution maps of chemical elements presented in the analyzed nanoparticle agglomeration.

In this stage of the research, nanomaterials obtained in the system: *Saccharomyces cerevisiae* extract, plant extracts (*Ribes uva-crispa, Sambucus nigra, Aronia melanocarpa* and *Lavandula angustifolia*) and AgNO<sub>3</sub> (10<sup>-3</sup>M) were synthesized. It was resulted that in the case of the nanomaterials obtained with *Ribes uva-crispa* extract, the silver nanoparticles are uniformly distributed on the surface of the extract and on the cells of *Saccharomyces cerevisiae*. In the case of the nanomaterial obtained with *Sambucus nigra* extract, it can be concluded that the silver nanoparticles were incorporated into the *Saccharomyces cerevisiae* cells, and in the case of the nanomaterials with *Aronia melanocarpa* and *Lavandula angustifolia* extracts, the silver nanoparticles are uniformly distributed on the surface of the nanomaterials with *Aronia melanocarpa* and *Lavandula angustifolia* extracts, the silver nanoparticles are uniformly distributed on the surface of the nanomaterials with *Aronia melanocarpa* and *Lavandula angustifolia* extracts, the silver nanoparticles are uniformly distributed on the surface of the nanomaterials with *Aronia melanocarpa* and *Lavandula angustifolia* extracts, the silver nanoparticles are uniformly distributed on the surface of the

### SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF NANOBIOMATERIALS BASED ON EGGSHELL/MEMBRANE AND PLANT EXTRACTS

For this study stage, silver nanoparticles were synthesized using eggshell as matrix, respectively eggshell membrane, and plant extracts. To obtain the plant extract, the maceration method was used at a mixing ratio of dry plant material and hydroalcoholic solvent of 1:10 (g/mL), as can be seen in Figure 12:



Figure 12. Scheme for obtaining plant extracts used in the synthesis of nanomaterials with eggshell matrix/eggshell membrane

First, the biological material – the egg – was successively externally washed with ultrapure water and acetone. To separate the eggshell from the membrane, a 1M hydrochloric acid solution was used for immersion of biological material for 5 minutes. After the separation of the two components, they were washed with ultrapure water, dried for 24 h at 40°C, milled and separated granulometrically (sieve 0.25 mm) and stored at room temperature for further investigations (Figure 13). For the synthesis of the investigated nanomaterials, the granulometric fraction with d < 0.25 mm was used for both shell and shell membrane.



Figure 13. Scheme of obtaining the eggshell/eggshell membrane matrix.

The synthesis procedure of eggshell/eggshell membrane nanomaterials functionalized with silver nanoparticles obtained with extracts of *Ribes uva-crispa* and *Aronia melanocarpa* is shown schematically in Figure 14.



Figure 14. Synthesis scheme of nanomaterials with eggshell matrix/eggshell membrane functionalized with silver nanoparticles obtained with extracts of *Ribes uva-crispa* and *Aronia melanocarpa*.

Monitoring the synthesis of silver nanoparticles in the system eggshell/eggshell membrane-*Ribes uva-crispa* extract/*Aronia melano*carpa extract – silver nitrate solution, through the UV-Vis analysis shown in Figure 15, indicates the presence of nanoparticles in the supernatant. The SEM analysis was able to highlight the presence of silver nanoparticles (Figure 16), respectively silver in the composition of the nanomaterials for the sample consisting of eggshell and silver nitrate solution, which is also evident from the EDS spectrum shown in Figure 17. The FTIR spectra could not clearly highlight the presence of silver nanoparticles or silver in the composition of nanomaterials. The XRD analysis was done in order to identify the crystalline phases present in the samples, but it could not confirm the presence of silver, as can be seen from the diffractogram shown in Figure 18. The explanation could be represented by a phenomenon of masking of the maxima characteristic of silver and its compounds by the main component. Thus, maxima corresponding to some silver compounds that could form in the synthesis conditions (minority/trace components), but which have low values of the intensity of the diffraction maxima cannot be observed because of the significant maxima in the matrix.



Figure 15. UV-Vis spectrum for the nanomaterial obtained in the ES-AG-Ag-144h system



Figure 17. EDS spectrum for the nanomaterial obtained in the ES-Ag system

#### ANTIBACTERIAL ACTIVITY

In order to assess the antibacterial activity of the nanomaterials obtained in the system eggshell/eggshell membrane – *Ribes uva-crispa* extract/*Aronia melanocarpa* extract – silver nitrate solution, the microorganisms *Escherichia coli* and *Streptococcus epidermidis* were used.

The methods consisted of the determination of the inhibition zone and the determination of the minimum inhibitory concentration. To determine the inhibition zone, it was prepared a standardized turbidimetric inoculum and it was inoculated 1 mL of the inoculum under aseptic conditions, shake to homogenize and keep the sample incubated for 16-20 h at 35-37°C and the blank was kept for the same period in the refrigerator.

In the inoculated tubes with the reference strain, we must have the result corresponding to the data we know about the respective strain, and in the tubes with the tested microorganism, the last dilution that inhibited the development of the microorganism



Figure 16. SEM image for the nanomaterial obtained in the ES-Ag system



Figure 18. XRD diffractogram for the nanomaterial obtained in the ES-Ag system

corresponds to the minimum inhibitory concentration. In general, it is considered that the microorganisms in which the minimum inhibitory concentration is approximately 3 mg/mL will be effectively inhibited by the respective antibiotic also *in-vivo* (the minimum inhibitory concentration does not have the same value for different genera, species, or strains) (Figure 19).



Figure 19. Inhibition zone diameter and minimum inhibitory concentration (MIC) for hydroalcoholic extracts obtained from nanomaterials in the ES-AG-Ag system (generation of silver nanoparticles *in situ*)

With the exception of the sample consisting of eggshell, *Aronia melanocarpa* extract and silver nitrate solution, kept in contact for 24 hours, for which the diameter of the inhibition zone of the growth of *Streptococcus epidermidis* was (under the previously mentioned experimental conditions) equal to zero. The other samples showed antibacterial activity against the strains used, but differences were recorded both at the level of the experimental set and in relation to each of the species. Most bacterial growth inhibition diameters were in the range of 7-9 mm (Figure 20).



Figure 20. Inhibition zone diameter and minimum inhibitory concentration (MIC) for hydroalcoholic extracts obtained from nanomaterials in ESM-Ag-AG and ESM-Ag-AR systems (ex situ silver nanoparticle generation)

The evaluation of the bacteriostatic activity of the nanomaterials was carried out by the method of dilutions in liquid medium. A standardized inoculum of the test strain was seeded in a discontinuous concentration gradient of each sample in tubes with nutrient broth. After proper thermosetting, at temperatures of  $37\pm0.5^{\circ}$ C, the minimum inhibitory concentration (MIC) values were read by macroscopic observation of the tubes (Figure 21).



Figure 21. Inhibition zone diameter and minimum inhibitory concentration (MIC) for hydroalcoholic extracts obtained from nanomaterials in the ESM-AG-Ag system (generation of silver nanoparticles *in-situ*)

The samples were diluted to obtain concentration values in the range of  $35-3500 \ \mu\text{g/mL}$ . Taking the minimum inhibitory as reference for minimum concentration values (0  $\mu$ g/mL), the hydroalcoholic extracts obtained with nanomaterials proved to be more effective against *Streptococcus epidermidis* (8 samples) compared to *Escherichia coli* (4 samples). It is also worth noting that three samples proved to be effective against both strains (Figure 22).



Figure 22. Inhibition zone diameter and minimum inhibitory concentration (MIC) for hydroalcoholic extracts obtained from nanomaterials in the ES-AR-Ag system (generation of silver nanoparticles in situ)

The possible mechanism for the antibacterial activity of silver nanoparticles is shown in Figure 23. Previous published studies have indicated an increase of antibacterial activity with the decrease of the silver nanoparticles size, because of the increase of the specific surface which interacts with the cell membrane. The interaction of silver ions with negatively charged cell membranes leads to a disruption of cell morphology and ultimately to cell death. In addition, silver nanoparticles bind strongly with phosphorus and sulfur that are part of intra- and extra-cellular membrane proteins, thus affecting cell replication, respiration and, ultimately, cell lifespan [12-15].



Figure 23. Possible mechanism of antibacterial activity of AgNPs. Adaptation from [16]

In addition, silver nanoparticles can also bind to the thiol and amino groups of the membrane protein, leading to the formation of reactive oxygen species (ROS) that inhibit cellular respiration. The remarkable bactericidal activity of silver nanoparticles can also be attributed to the interaction with the plasma membrane and the peptidoglycan cell wall of the bacterial strain. It has also been suggested that the interaction of silver nanoparticles with the cell wall increases membrane permeability through the formation of pores or fissures that may cause/contribute to bacterial death.

### SYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES IN NECTAR FROM *MUSA* BASJOO FLOWER

For this stage of the study, the potential of *Musa basjoo* flower nectar (Figure 24) in the generation of silver nanoparticles was investigated.



Figure 24. Musa basjoo plant inflorescence. Source: personal archive

The synthesis of silver nanoparticles was carried out according to the procedure/protocol described below:

1) 10<sup>-3</sup>M AgNO<sub>3</sub> solution was prepared from 10<sup>-1</sup>N AgNO<sub>3</sub> stock solution obtained from silver nitrate fixanal (Merck, Germany).

2) Over 5 mL of *Musa basjoo* flower nectar, 5 mL of  $10^{-3}$  M AgNO<sub>3</sub> solution was added, and the mixture was kept under static conditions for 60 minutes at room temperature, for the most advanced contact of the two components.

3) The synthesis mixture was subsequently kept at rest/static conditions for 24 h (room temperature/darkness).

4) After the synthesis process was finished, the mixture was stored (4°C/dark) for further characterization/investigations.

The aqueous solution of silver nitrate acts as a source of silver ions for the synthesis of silver nanoparticles. Silver ions were reduced to silver atoms by means of *Musa basjoo* flower nectar. The UV-Vis spectra of silver nanoparticles were obtained using a Thermo Scientific Evolution 260 BIO spectrophotometer (located in laboratory C 21 - Physical and structural characterization of matter - FTIR Spectroscopy, Raman Spectroscopy, UV-Vis Spectroscopy, from the Institute of Multidisciplinary Research for Science and Technology - Valahia University in Targoviste), in the wavelength range of 350-700 nm. Scanning was performed at 1 h, 3 h, and 24 h, respectively.



Figure 25. UV-Vis spectrum for the mixture of Musa basjoo flower nectar and silver nitrate solution

In Figure 25 is presented the overlap of the UV-Vis spectra for the mixture of the nectar of the *Musa basjo* flower with the silver nitrate solution. The spectral maximum specific to silver nanoparticles can be observed in the 440-480 nm area. For the analysis at one hour, the initial sample was undiluted, a 10 mm glass cuvette and ultrapure water were used as a blank. For the three-hour analysis, the undiluted sample was scanned, and it was possible to highlight the appearance of a maximum characteristic of silver nanoparticles located in the spectrum at 450 nm/A=2.12 (at 1 h) and 450.3 nm/A=2, 13 (at 3 h), respectively. For the analysis at 24 hours, the undiluted sample was scanned, and it was possible to highlight the appearance of a maximum characteristic of silver nanoparticles located in the spectrum at 439.2 nm/A=1.58 [17].

To determine the functional groups of the nectar and their possible involvement in the synthesis of silver nanoparticles, FTIR and Raman spectroscopy were performed.



Figure 26. a) FTIR and b) Raman spectra for the mixture of *Musa basjoo* flower nectar and silver nitrate solution

Figure 26a shows the FTIR spectrum obtained for the *Musa basjoo* flower nectar solution and the silver nitrate solution showing spectral maxima in the areas: 3300 cm<sup>-1</sup> attributed to OH, H<sub>2</sub>O bonds, 1640 cm<sup>-1</sup> possible C=C bonds, aromatic bonds and 1100 cm<sup>-1</sup> possible C–H, C–O bonds. The Raman spectrum is presented in Figure 26b and spectral maxima were observed in the areas: 422 cm<sup>-1</sup> possible C–O, C–OH bonds, 451 cm<sup>-1</sup> possible C–O, C–OH bonds, 518 cm<sup>-1</sup> C–O bonds, 834 cm<sup>-1</sup> O–H bonds, 1060 cm<sup>-1</sup> aromatic C–H bonds, 1117 cm<sup>-1</sup> C–H bonds, 1258 cm<sup>-1</sup> C–O bonds, 1450 cm<sup>-1</sup> O–H bonds, and 1638 cm<sup>-1</sup> C=C of phenolic compounds [6-11, 17].

The mixture of *Musa basjoo* flower nectar with  $10^{-3}$ M AgNO<sub>3</sub> was pipetted onto 400 mesh copper grids (Ted Pella, United States of America) and analyzed in STEM mode. Operating conditions were: 10 kV accelerating voltage, ~16 mm working distance and  $5 \cdot 10^{-8}$  Pa vacuum.

Morphological details, such as the size and shape of silver nanoparticles generated in *Musa basjoo* flower nectar, were certified by using SEM analysis. SEM images (Figure 27) showed a very high density of silver nanoparticles. It was observed that the development of silver nanostructures is uneven, and the nanoparticles are spherical in shape.



Figure 27. SEM images for the silver nanoparticles obtained in the nectar of the *Musa basjoo* flower: a) image at a magnification factor of 15,000x; b) image at magnification factor 110,000x

The synthesis of silver nanoparticles in *Musa basjoo* flower nectar was investigated using UV-Vis spectrophotometry at 430 nm, and Raman spectral data, apart from common features/spectral maxima with colloidal solutions of silver nanoparticles (maxima present at ~444, ~495, ~950, and ~1014 cm<sup>-1</sup>) presented a series of differential aspects, thus in the case of the colloidal solution of silver nanoparticles in the nectar of *Musa basjoo* flower distinct

spectral maxima located at ~1060, ~1260, and ~1640 cm<sup>-1</sup> (in the case of *Musa basjoo* nectar, associated with aromatic C–H bending vibrations, C–O stretching vibrations associated with groups of primary alcohols and substituted alkyl-ethers, primary or secondary O–H bending vibrations, vibrations of C=C stretching, stretching vibrations associated with the quinone structure or conjugated ketones). The presence of phytochemical compounds in the case of the colloidal solution of silver nanoparticles in the nectar of the *Musa basjoo* flower highlighted by the results of the FTIR and Raman spectral analyzes contributes to the stabilization of the nanobiostructures present in the solution, ensuring at the same time a residual reducing and antioxidant potential. SEM analysis of the sample revealed the formation of spherical silver nanoparticles.

### **ORIGINAL CONTRIBUTIONS**

The doctoral thesis entitled "PHYTOSYNTHESIZED BIOCONJUGATED METALLIC NANOPARTICLES WITH POTENTIAL ANTIBACTERIAL ACTIVITY" presents elements of originality that are related to:

- 1. The preparation of plant extracts sampling from local therapeutic plant source.
- 2. The complex investigation of the phytochemical profile of hydroalcoholic extracts obtained from autochthonous plant materials, sampled from ecological culture/crop.
- 3. The optimization of working conditions in the processes of obtaining hydroalcoholic extracts and nanoparticles synthesis.
- 4. The synthesis of metallic nanoparticles (gold, silver, and platinum) through ecological, economical and fast methods, using plant extracts (*Ribes uva-crispa, Sambucus nigra, Aronia melanocarpa, Prunus mahaleb, Malus purpurea* and *Lavandula angustifolia*).
- 5. The characterization of synthesized metallic nanoparticles (gold, silver and platinum).
- 6. The synthesis and characterization of the nanobiomaterial obtained in the system: Saccharomyces cerevisiae extract, plant extract (Ribes uva-crispa, Sambucus nigra, Aronia melanocarpa, Prunus mahaleb, Malus purpurea and Lavandula angustifolia) and silver nitrate solution.
- 7. The microbiological study of some nanomaterials through which the antibacterial activity was proven.
- 8. The silver nanoparticles generated directly from *Musa basjoo* inflorescence.

The **last element of originality** was published in article (journal indexed in International Databases) [17], and other research was also presented at a prestigious international conference. Thus, it was decided that this **element of novelty** should be comprehensively described as separate research, knowing that in the specialized literature there are only attempts to generate metallic nanoparticles in extracts from different parts of the *Musa basjoo* plant; other studies were not identified on the generation of nanoparticles directly from *Musa basjoo* inflorescence.

### **PROSPECTS FOR CAREER DEVELOPMENT**

The doctoral thesis entitled "PHYTOSYNTHESIZED BIOCONJUGATED METALLIC NANOPARTICLES WITH POTENTIAL ANTIBACTERIAL ACTIVITY" was realized in the interest field of the doctoral student related to the basic training (Agromontanology specialization) and the current activity as a scientific researcher.

Future research aims to use these nanomaterials for therapeutic purposes (preparation of patches and creams with antioxidant/antimicrobial properties). Due to their antioxidant properties, antibacterial activity, the new bio-nanostructures of silver, gold and platinum can be used in the therapy of diseases caused by oxidative stress.

In this sense, the research will continue as follows:

- 1. Extending the study of the nanomaterial obtained in the system *Saccharomyces cerevisiae* extract, plant extract (*Ribes uva-crispa, Sambucus nigra, Aronia melanocarpa, Prunus mahaleb, Malus purpurea,* and *Lavandula angustifolia*) and silver nitrate solution in terms of antimicrobial testing.
- 2. Extending the study on the nanomaterial obtained in the system eggshell/eggshell membrane, plant extract (*Ribes uva-crispa* and *Aronia melanocarpa*) and silver nitrate solution to a wider range of plant extracts and in what concerns antimicrobial activity.
- 3. Extending and deepening the study related to the generation of different types of nanoparticles in *Musa basjoo* flower nectar.
- 4. The study of the relationships between the concentration of bioactive compounds present in plant extracts and independent factors such as the type of culture, vegetative part, etc.
- 5. For future studies focused on the direct correlations between polyphenol content, antioxidant and/or antimicrobial activity of plant extracts taken in the study, in order to

optimize the results, the chemometric analysis will represent a new stage that will be addressed in the future.

 The clinical study on the obtained nanomaterials will lead to the submission of at least one patent application to Romanian State Office for Inventions and Trademarks (OSIM).

#### **GENERAL CONCLUSIONS**

A series of scientific studies worldwide have highlighted the fact that nanomaterials have applications in different fields, such as biology, pharmacy, medicine, etc. Thus, nanotechnology (nano/biomaterials) come with promising solutions for major problems in various fields of science and technology.

Antimicrobial nanostructures are known as a powerful weapon in the fight against bacteria. There are huge experiments and publications on the synthesis and application of these new materials. Thus, specialized studies have shown that silver nanoparticles are the most powerful antimicrobial nanostructure. Research on nanoparticles of silver, platinum, or other noble metals, develops an oxidative stress against bacterial cells by releasing cation ions, producing reactive oxygen species. Unlike antibiotics, oxidizing agents do not have a specific site of action, therefore it is unlikely that microorganisms will become resistant against noble metal nanoparticles. These nanoparticles have been used in a wide variety of commercial products with antimicrobial properties, such as paints, textiles, glass, plastics, wound dressings, antimicrobial gels, implants, etc. Recent research shown that metallic nanoparticles (i.e., Ag and Au) destroy the resistance of bacterial cells against antibiotics, have synergistic effects with antibiotics, and can increase the antimicrobial activity of these drugs. It means ineffective antibiotics can be re-administered if combined with metal nanoparticles. These data lead to a new stage, namely, to generate antimicrobial nanoparticles conjugated with antimicrobial agents or with plant extracts with antioxidant and antimicrobial activity, thus with a remarkable phytochemical profile, used in therapeutic medicine. Fabrication of nano-carriers functionalized with noble metals is another strategy in this regard. For example, recent research highlights that mesoporous silica nanostructures can be used as a matrix to be functionalized with noble metallic nanoparticles and loaded with antimicrobial agents. But these functionalized nanomaterials are still usually synthesized through a multi-step process using organic solvents and toxic chemicals, which would lead to

health and environmental risk. The choice of ecological, low-cost, fast methods of nanoparticle synthesis was a goal of this doctoral thesis.

Also, starting from the fact that it is a direct relationship between the benefic/therapeutic effects of the plants, plant extracts, especially from ecological culture, and the bioactive compounds known as "health-protective biomolecules" (proanthocyanidins, anthocyanins, and other flavonoids) that possess antioxidant, antimicrobial, antitumor, anti-inflammatory properties, the doctoral thesis finds its elements of originality, by using as a raw material of the study of different autochthonous plants, cultivated in natural environment, respectively ecological (organic) system, together with the idea of finding differences in the phytochemical profile for the investigated plants, so that they can be used as a source in the nanoparticles synthesis.

In this sense, the research aims a complex comparative characterization of the hydroalcoholic extracts obtained by maceration, using as biological material the vegetative parts from many plants (20 species), selected being *Ribes uva-crispa*, *Sambucus nigra*, *Aronia melanocarpa*, *Prunus mahaleb*, *Malus purpurea*, and *Lavandula angustifolia*, which were found to have more significant total polyphenols content (TPC), total flavonoids content (TFC), and antioxidant activity (AA).

The doctoral thesis entitled "PHYTOSYNTHETIC BIOCONJUGATED NANOPARTICLES METALLIC WITH POTENTIAL ANTIBACTERIAL **ACTIVITY**" had as clear objectives: (1) the harvesting of plant material, at the optimal time and during the plant's maximum maturity, from local therapeutic plant source (spontaneous flora or ecological crops), from the geographical area of Dambovita County, Romania; (2) obtaining natural hydroalcoholic extracts from native plants through non-invasive extraction methods (maceration); (3) determining the phytochemical profile of the extracts (TPC, TFC, and AA) is important to explore potential practical applications; (4) nanoparticles synthesis by rapid, environmentally friendly and low-cost methods; (5) physico-chemical characterization of nanomaterials obtained by different analytical techniques (UV-Vis, FTIR, Raman, XRD, and SEM-EDS); (6) complex microbiological study on nanomaterials with proven antibacterial activity with future therapeutic applications.

The physico-chemical analyzes used in the doctoral thesis were carried out with high-performance, high-sensitivity equipment, existing in the Institute of Multidisciplinary Research for Science and Technology within the Valahia University of Targoviste.

Regarding the plant material, the hydroalcoholic extracts were obtained with the assurance of sterility conditions for used materials and work environment. Also, two strains
of bacteria from the culture collection of the Institute of Multidisciplinary Research for Science and Technology were tested for growth inhibition in the presence of antimicrobial compounds present in the hydroalcoholic extracts.

The procedure for obtaining the hydroalcoholic extracts used in this doctoral thesis is characterized by the following advantages: it is easy to perform and define (maceration at room temperature), it does not involve the generation of potentially toxic byproducts/intermediaries, the costs are minimal, in terms of consumption minimum energy according to the principles of "environmentally friendly" technologies.

The hydroalcoholic extracts obtained by maceration were characterized by physicochemical methods. Thus, for the hydroalcoholic extracts from different vegetative parts of the selected species (*Ribes uva-crispa, Sambucus nigra, Aronia melanocarpa, Prunus mahaleb, Malus purpurea,* and *Lavandula angustifolia*) the total content of polyphenolic compounds, the total content of flavonoids, and the antioxidant activity as well as the antibacterial activity. Comparative tests were carried out by vibrational spectroscopy in IR and Raman; through these experimental investigations, some structural changes was identified, also compounds with bioactive potential were highlighted, in order to use these extracts for the nanoparticles synthesis.

The morphological (SEM) and physico-chemical (FTIR, Raman) characterization of the nanomaterials obtained in the system extract of Saccharomyces cerevisiae and plant extracts (Ribes uva-crispa, Sambucus nigra, Aronia melanocarpa and Lavandula angustifolia) highlighted the fact that in the case of the nanomaterial obtained with Ribes uvacrispa extract, the silver nanoparticles are uniformly distributed both on the surface of the extract and on the Saccharomyces cerevisiae cells, and in the case of the nanomaterial with Aronia melanocarpa extract, the silver nanoparticles are uniformly distributed on the surface of the Saccharomyces cerevisiae cells. The recorded FTIR and Raman spectroscopy data, apart from the common features/spectral maxima with the silver nanoparticle colloidal solutions (maxima present at ~444, ~495, ~950, and ~1014 cm<sup>-1</sup>), showed a number of differential aspects in the case of Ribes uva-crispa extract showing spectral maxima (located at ~721, ~854, and ~1460 cm<sup>-1</sup>) attributed to methylene chain vibrations; C–H vibrations originating from the 1,4-disubstituted aromatic nucleus, coplanar O-H deformation vibrations and respectively C=C-C stretching vibrations associated with the aromatic nucleus and methylene deformation vibrations from alcohols, and in the case of Aronia melanocarpa extract, shows spectral maxima (located at ~510, ~1120, ~1320, ~1460, and ~1990 cm<sup>-1</sup>)

attributed to alcoholic C–O bending vibrations from primary and secondary alcohols, C–O stretching vibrations from tertiary alcohols, chain C–C vibrations, O–H in-plane deformation vibrations of C–H bending associated with methyl –CH<sub>3</sub> groups, methylene deformation vibrations, aromatic combination bands.

Regarding the nanomaterials obtained in the system of eggshell shell/eggshell membrane and plant extracts, the presence of phytochemical compounds that contribute to the stabilization of the present nanobiostructures, ensuring (at the same time) a reducing and residual antioxidant potential. However, the SEM analysis could not highlight the presence of silver nanoparticles or silver in the composition of the nanomaterials. This could be because of the existence of nanoparticles embedded in the matrix and present to a very small extent on its surface. This conclusion is also supported by XRD analysis data based on ICDD cards for silver (ICDD-PDF 04-003-7118), silver oxides (AgO: ICDD-PDF 04-003-3760, Ag<sub>2</sub>O: ICDD-PDF 01-076 -1393, Ag<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: ICDD-PDF 01-072-0607, Ag<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: ICDD-PDF 04-007-1371, Ag<sub>3</sub>O: ICDD-PDF 04-014-3850, Ag<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: ICDD-PDF 04-007-1477), silver nitrate (ICDD-PDF 01-074-4790) as well as calcium carbonate (calcite ICDD-PDF 01-083-0577) and aluminum phosphate (berlinite ICDD-PDF 01-071-1041). For the identification of the crystalline phases present in the nanomaterials samples obtained in the system of eggshell/eggshell membrane and vegetable extracts, the presence of silver could not be confirmed, the explanation could be represented by a phenomenon of masking the maxima characteristic of silver and its compounds by the majority component calcite ( $CaCO_3$ ). Thus, the peak corresponding to some silver compounds that could form in the synthesis conditions (minority/trace components), but which have low values of the intensity of the diffractogram, cannot be observed because of the main compounds in the matrix.

The antibacterial activity of the obtained nanomaterials was determined based on the observation and quantification of the growth of some strains of bacteria, brought into contact with agents with antibacterial potential. The highlighting of the antibacterial activity of the samples, in conjunction with the antioxidant activity of the nanoparticle-generating plant extracts, provided the scientific basis for future research and applications of the synthesized nanostructures.

## **SELECTIVE BIBLIOGRAPHY**

[1] A. Goffeau, B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E. J. Louis, H. W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin, S. G. Oliver (1996), Life with 6000 genes, *Science*, 274(5287):563–547.

[2] V. Wood, K. M. Rutherford, A. Ivens, M. A. Rajandream, B. Barrell (2001), A reannotation of the *Saccharomyces cerevisiae* genome, *Comparative and Functional Genomics*, 2(3):143–154.

[3] A. M. Lopez Sobaler, A. Aparicio Vizuete, R. M. Ortega (2017), Role of the egg in the diet of athletes and physically active people, *Nutricion Hospitalaria*, 34(4):31–35.

[4] J. E. Kim, W. W. Campbell (2018), Dietary Cholesterol Contained in Whole Eggs Is Not Well Absorbed and Does Not Acutely Affect Plasma Total Cholesterol Concentration in Men and Women: Results from 2 Randomized Controlled Crossover Studies, *Nutrients*, 10(9):1272.

[5] H. W. Windhorst, B. Grabkowsky, A. Wilke (2015), *Atlas of the Global Egg Industry*, International Egg Commission: London, UK, pp. 6-21.

[6] R.A. Meyers (2000), Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach, J. Coates, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, pp. 10815-10837.
[7] A. Rauf, T. Ahmad, A. Khan, Maryam, G. Uddin, B. Ahmad, Y. N. Mabkhot, S. Bawazeer, N. Riaz, B. K. Malikovna, Z. M. Almarhoon, A. Al-Harrasib (2021), Green synthesis and biomedicinal applications of silver and gold nanoparticles functionalized with methanolic extract of *Mentha longifolia*, *Artificial Cells*, *Nanomedicine*, *and Biotechnology*, 49(1):194-203.

[8] M. Kgatshe, O.S. Aremu, L. Katata-Seru, R. Gopane (2019), Characterization and Antibacterial Activity of Biosynthesized Silver Nanoparticles Using the Ethanolic Extract of Pelargonium sidoides DC, *Journal of Nanomaterials*, 2019:1-10.

[9] R. N. Oliveira, M. C. Mancini, F. C. S. de Oliveira, T. M. Passos, B. Quilty, R. M. da Silva Moreira Thiré, G. B. McGuinness (2016), FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing, *Matéria*, 21(3):767–779.

[10] H. Schulz, M. Baranska (2007), Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy, *Vibrational Spectroscopy*, 43:13–25.

[11] G. Yang, Q. Wang, C. Liu, X. Wang, S. Fan, W. Huang (2018), Rapid and visual detection of the main chemical compositions in maize seeds based on Raman hyperspectral imaging, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 200:186–194.

[12] C. Vanlaveni, S. Lallianrawna, A. Biswas, M. Selvaraj, B. Changmai, S. L. Rokhum (2021), Green synthesis of silver nanoparticles using plant extracts and their antimicrobial activities: a review of recent literature, *RSC Advances*, 11:2804–2837.

[13] H. Deng, D. McShan, Y. Zhang, S. S. Sinha, Z. Arslan, P. C. Ray, H. Yu (2016), Mechanistic Study of the Synergistic Antibacterial Activity of Combined Silver Nanoparticles and Common Antibiotics, *Environmental Science & Technology*, 50(16):8840-8848.

[14] F. Kang, P. J. Alvarez, D. Zhu (2014), Microbial extracellular polymeric substances reduce Ag<sup>+</sup> to silver nanoparticles and antagonize bactericidal activity, *Environmental Science & Technology*, 48(1):316-322.

[15] H. Xu, F. Qu, H. Xu, W. Lai, Y. A. Wang, Z. P. Aguilar, H. Wei (2011), Role of reactive oxygen species in the antibacterial mechanism of silver nanoparticles on Escherichia coli O157:H7, *BioMetals*, 25(1):45-53.

[16] I. Sondi, B. Salopek-Sondi (2004), Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria, *Journal of Colloid and Interface Science*, 275(1):177-182.

[17] N. M. Stirbescu, R. M. Ion, S. Teodorescu, L. Olteanu, I. D. Dulama, I. A. Bucurica,
R. M. Stirbescu (2019), Banana flower nectar –mediated synthesis of silver nanoparticles, *Bulletin of the Transilvania University of Braşov, Series I: Engineering Sciences*, 12(61):55-64.

[18] B. D. Fahlman (2011), Materials Chemistry, Springer, Dordrecht, pp. 351-386.

[19] V. Chandrasekhar (2005), *Inorganic and Organometallic Polymers*, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1-82.

[20] E. J. Barbero (2017), *Introduction to Composite Materials Design*, CRC Press, pp. 1-83.

[21] S. Todoroki (2014), Fiber Fuse, Springer, Tokyo, pp. 1-25.

[22] S. A. Kolesnikov, G. E. Mostovoi (2012), High-temperature treatment of carbon-carbon composite materials. Communication 1. Thermal stabilization of two-dimensionally reinforced carbon-carbon composite material object properties, *Refractories and Industrial Ceramics*, 53(2):123-129.

[23] S. A. Kolesnikov, G. E. Mostovoi, S. V. Vasilchenko (2012), High-temperature treatment of carbon-carbon composite materials. Communication 2. Thermal stabilization of two-dimensionally reinforced carbon-carbon composite material object geometry, *Refractories and Industrial Ceramics*, 53(3):185-192.

[24] F.M. Christensen, A. Brinch, J. Kjølholt, P.D. Mines, N. Schumacher, T.H. Jørgensen, R.M. Hummelshøj (2015), *Nano-enabled environmental products and tech-nologies – opportunities and drawbacks*, Environmental project no. 1803. Danish EPA.

[25] European Commission. Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial. (2011/969/EU).

[26] International Organization for Standardisation (ISO). ISO/TS 80004-1:2010 Nanotechnologies – Vocabulary – Part 1: Core terms. NB! Disse definitioner er yderligere elaboreret i ISO/TS 80004-2 til ISO/TS 80004-13.

[27] PAS 71:2011, Nanoparticles. Vocabulary. British Standards Institution: London, United Kingdom, 2011.

[28] M.A. Sørensen, F. Ingerslev, K. Bom, C. Lassen, F. Christensen, M. Warming (2015), *Survey of products with nanosized pigments*, Environmental project no. 1638. Danish EPA.

[29] N. Ambiga (2018), Selection and creation of nano particles using artificial intelligence, *International Journal of Management, IT & Engineering*, 8(9):211-223.

[30] E. Abbasi, S. F. Aval, A. Akbarzadeh, M. Milani, H. T. Nasrabadi, S. W. Joo, Y. Hanifehpour, K. Nejati-Koshki, R. Pashaei-Asl (2014), Dendrimers: synthesis, applications, and properties, *Nanoscale Research Letters*, 9(1):247-257.

[31] U. J. Chigbo, A. E. Ugochukwu, D. F. John (2017), Dendrimers: A novel tool for drug delivery and targeting, *Universal Journal of Pharmaceutical Research*, 2(3):34-40.

[32] S. Rewar, C. Singh, P. Rewar (2015), Dendrimers as carriers and its application in therapy, *International Journal of Analytical, Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 4(3):3-19.

[33] I. J. Majoros, C. R. Williams, D. A. Tomalia, J. R. Baker Jr. (2008), New Dendrimers: Synthesis and Characterization of Popam–Pamam Hybrid Dendrimers, *Macromolecules*, 41(22):8372–8379.

[34] M. M. Ulaszewska, M. D. Hernando, A. Ucles, R. Rosal, A. Rodriguez, E. Garcia-Calvo, A. R. Fernandez-Alba (2012), Chemical and Ecotoxicological Assessment of Dendrimers in the Aquatic Environment, *Comprehensive Analytical Chemistry*, 59:197-233.

[35] E. R. Gillies, J. M. J. Fréchet (2005), Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery, *Drug Discovery Today*, 10(1):35-43.

[36] S. Drabu, S. Khatri, S. Babu (2010), Dendrimers: Nanopharmaceuticals for Drug Delivery, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 1(2):464-471.

[37] A. Santos, F. Veiga, A. Figueiras (2020), Dendrimers as Pharmaceutical Excipients: Synthesis, Properties, Toxicity and Biomedical Applications, *Materials*, 13(65):1-31.

[38] B. Ziemba, G. Matuszko, M. Bryszewska, B. Klajnert (2012), Influence of dendrimers on red blood cells, *Cellular & molecular biology letters*, 7:21-35.

[39] H. Yuan, Q. Ma, L. Ye, G. Piao (2016), The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products, *Molecules*, 21(5):559-577.

[40] C. Elvira, A. Gallardo, J. Roman, A. Cifuentes (2005), Covalent Polymer-Drug Conjugates, *Molecules*, 10(1):114-125.

[41] K. Greish (2010), Enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting, *Methods in molecular biology*, 624:25-37.

[42] S. Balurkar, R. S. Pentewar, M. Bhange, P. Bhosle, A. Jadhav (2015), Dendrimers: a novel approach for drug delivery, *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 5(09).
[43] Y. Zhang, T. R. Nayak, H. Hong, W. Cai (2013), Biomedical Applications of Zinc Oxide Nanomaterials, *Current Molecular Medicine*, 13(10):1633-1645.

[44] J. Jeevanandam, A. Barhoum, Y. S. Chan, A. Dufresne, M. K Danquah (2018), Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 9:1050–1074.

[45] C. Y. Tai, C. Tai, M. Chang, H. Liu (2007), Synthesis of Magnesium Hydroxide and Oxide Nanoparticles Using a Spinning Disk Reactor, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 46(17):5536–41.

[46] N. Kumar, S. Kumbhat (2016), *Essentials in Nanoscience and Nanotechnology*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, U.S.A., pp. 189–236.

[47] R. K. Jha, P. K. Jha, K. Chaudhury, S. V.S. Rana, S. K. Guha (2014), An emerging interface between life science and nanotechnology: present status and prospects of reproductive healthcare aided by nano-biotechnology, *Nano Reviews*, 5:22762-22781.

[48] H. E. Schaefer (2010), *Nanoscience The Science of the Small in Physics, Engineering, Chemistry, Biology and Medicine*, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 99-165.

[49] F. Klaessig, M. Marrapese, S. Abe (2011), Current Perspectives in Nanotechnology Terminology and Nomenclature în *Nanotechnology Standards*, Springer, New York, NY, pp. 21-52. [50] W. G. Kreylinga, M. Semmler-Behnkea, Q. Chaudhry (2010), A complementary definition of nanomaterial, *Nano Today*, 5:165—168.

[51] B. P. Niranjan Reddy, B. Gupta, R. N. Gacche (2009), An Arsenal for 21st Century Noxious Diseases: Carbon Nanomaterials, *International Journal of Nanotechnology and Applications*, 3(2):61-76.

[52] M. M. Shokrieh, R. Rafiee (2010), A review of the mechanical properties of isolated carbon nanotubes and carbon nanotube composites, *Mechanics of Composite Materials*, 46(2):229-252.

[53] R. Sundaram, T. Yamada, K. Hata, A. Sekiguchi (2017), Electrical performance of lightweight CNT-Cu composite wires impacted by surface and internal Cu spatial distribution, *Scientific Reports*, 7:9267.

[54] A. Masotti, A. Caporali (2013), Preparation of Magnetic Carbon Nanotubes (Mag-CNTs) for Biomedical and Biotechnological Applications, *International Journal of Molecular Sciences*, 14:24619-24642.

[55] V. I. Klimov (2007), Spectral and dynamical properties of multiexcitons in semiconductor nanocrystals, *Annual Review of Physical Chemistry*, 58:635-67.

[56] W. C. W. Chan, D. J. Maxwell, X. Gao, R. E. Bailey, M. Han, S. Nie (2002), Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging, *Analytical biotechnology*, 13(1):40-6.

[57] D. Bera, L. Qian, T. K. Tseng, P. H. Holloway (2010), Quantum Dots and Their Multimodal Applications: A Review, *Materials*, 3:2260-2345.

[58] A. Valizadeh, H. Mikaeili, M. Samiei, S. M. Farkhani, N. Zarghami, M. Kouhi, A. Akbarzadeh, S. Davaran (2012), Quantum dots: synthesis, bioapplications, and toxicity, *Nanoscale Research Letters*, 7:480.

[59] H. Mattoussi, G. Palui, H. B. Na (2012), Luminescent quantum dots as platforms for probing in vitro and in vivo biological processes, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(2):138-66.

[60] P. Pierobon, G. Cappello (2012), Quantum dots to tail single bio-molecules inside living cells, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(2):167-78.

[61] T. J. Deerinck (2008), The application of fluorescent quantum dots to confocal, multiphoton, and electron microscopic imaging, *Toxicologic Pathology*, 36(1):112-6.

[62] Y. Ghasemi, P. Peymani, S. Afifi (2009), Quantum dot: magic nanoparticle for imaging, detection and targeting, *Acta BioMedica*, 80:156-165.