

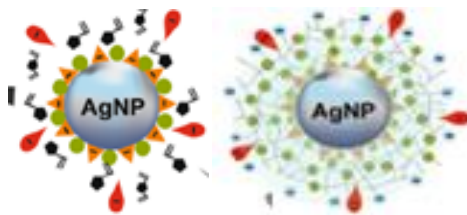


UNIVERSITATEA **POLITEHNICA** DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE CHIMIE APLICATĂ ȘI ȘTIINȚA MATERIALELOR

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

DEZVOLTAREA DE NOI BIOHIBRIZI PE BAZĂ DE NANOPARTICULE DE ARGINT ȘI EXTRACTE DIN PLANTE, UTILIZÂND CHIMIA VERDE

DEVELOPMENT OF NEW BIOHYBRIDS BASED ON SILVER NANOPARTICLES AND PLANT EXTRACTS USING GREEN CHEMISTRY



AUTOR: biolog Daniela – Valentina BEȘLIU

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC: Profesor Emerit Aurelia MEGHEA

COMISIA DE DOCTORAT

Președinte	Prof. Dr. ing. Ileana RĂU	de la	Universitatea POLITEHNICA București
Conducător de doctorat	Prof. Emerit Aurelia MEGHEA	de la	Universitatea POLITEHNICA București
Referent	Prof. Dr. ing. Nicoleta BADEA	de la	Universitatea POLITEHNICA București
Referent	Prof. Dr. Mihaela Violeta GHICA	de la	UMF „CAROL DAVILA” Bucuresti
Referent	Conf. Dr. Cristina Maria ZĂLARU	de la	Universitatea din București

București, 2022

CUPRINS

LISTA ABREVIERILOR	8
INTRODUCERE	9
PARTEA 1. CERCETARE BIBLIOGRAFICĂ.....	15
CAPITOLUL 1	
NANOPARTICULE METALICE	17
1.1. Tipuri de nanoparticule metalice și metode de sinteză a acestora	17
1.1.1. Mecanisme de formare a nanoparticulelor metalice	18
1.1.2. Condiții necesare obținerii nanoparticulelor metalice	20
1.1.3. Metode de sinteză a nanoparticulelor metalice	20
1.1.4. Exemple de metode pentru obținerea nanoparticulelor de argint prin intermediul biosintezei „verzi”	24
1.2. Hibridi pe bază de nanoparticule metalice	25
1.2.1. Tipuri de hibridi	26
1.2.2. Metode de obținere a hibridilor metalici	27
1.2.3. Metode de obținere a nanohibridilor	30
CAPITOLUL 2	
SURSE VEGETALE CU POTENȚIAL DE A FI UTILIZATE PENTRU REALIZAREA SINTEZEI NANOPARTICULELOR METALICE	31
2.1. Situația actuală a bionano sintezei prin intermediul „chimiei verzi”	31
2.2. Bioreducerea ionilor metalici prin intermediul compușilor fitochimici.....	35
2.3. Principalii factori implicați în optimizarea nano-biosintezei metalice	38
2.4. Mecanisme de acțiune antibacteriană ale nanoparticulelor metalice sintetizate prin intermediul plantelor	42
2.5. Activități biologice ale nanoparticulelor biogenerate.....	43
2.6. Metode de caracterizare a nanoparticulelor metalice	45
2.7. Surse vegetale adecvate care pot fi utilizate pentru obținerea nanoparticulelor de argint.....	46
CAPITOLUL 3	
APLICAȚII ALE NANOPARTICULELOR METALICE ȘI ALE BIOHIBRIDILOR ACESTORA	53
3.1. Aplicații biomedicale ale nanoparticulelor metalice	54
3.2. Aplicații ale nanoparticulelor metalice în domeniul mediului înconjurător (depoluarea și îmbunătățirea calității mediului înconjurător)	58
PARTEA a II-a. CONTRIBUȚII ORIGINALE	59
OBIECTIVELE CERCETĂRII	61

CAPITOLUL 4

METODE DE PREPARARE ȘI CARACTERIZARE A BIOHIBRIZILOR PE BAZĂ DE NANOPARTICULE DE ARGINT (AgNP), OBȚINUȚI PRIN METODELE ALE „CHIMIEI VERZI”	63
4.1. Metode și materiale utilizate pentru sinteza nanoparticulelor de argint (AgNPs) și a biohibridilor acestora	63
4.2. Metode de caracterizare a nanoparticulelor de argint și a biohibridilor	67
4.2.1. Metode spectrale de evidențiere a nanoparticulelor metalice	67
4.2.2. Metode de evaluare a dimensiunii, stabilității fizice și morfologiei nanoparticulelor	70
4.3. Metode de investigare a proprietăților biologice ale bio-nanocompozitelor	72

CAPITOLUL 5

OPTIMIZAREA METODEI DE SINTEZĂ A NANOPARTICULELOR DE ARGINT UTILIZÂND EXTRACTUL DIN RĂDĂCINĂ DE <i>Harpagophytum procumbens</i>	75
5.1. Obținerea extractului vegetal din rădăcină de <i>Harpagophytum procumbens</i> și a nanoparticulelor de argint	77
5.1.1. Monitorizarea prin spectroscopia de absorbție în UV-Vis a AgNPs obținute prin intermediul extractului de <i>Harpagophytum procumbens</i>	78
5.1.2. Evaluarea dimensiunii nanoparticulelor obținute	79
5.2. Estimarea activității antioxidante a nanoparticulelor realizate	80
5.3. Concluzii parțiale	81

CAPITOLUL 6

BIOSINTEZA ȘI CARACTERIZAREA NANOPARTICULELOR DE ARGINT OBȚINUTE PRIN METODELE „GREEN”	83
6.1. Obținerea extractelor vegetale din Brusture (<i>Arctium lappa</i>), Iarba Sfântului Ioan (<i>Salvia sclarea</i>), Sparanghel (<i>Asparagus officinalis</i>) și Lemnul Domnului (<i>Artemisia abrotanum</i>)	84
6.1.1 Obținerea nanoparticulelor de argint și monitorizarea spectrală prin spectroscopia de absorbție în UV-Vis	85
6.1.2. Determinarea dimensiunii AgNP prin tehnica DLS	87
6.1.3. Evaluarea stabilității fizice a nanoparticulelor AgNP	89
6.2. Evaluarea activităților biologice ale nanoparticulelor fitogene dezvoltate	89
6.2.1. Activitatea antioxidantă evaluată prin metoda chemiluminescenței	89
6.2.2. Activitatea antioxidantă evaluată prin intermediul cation-radicalilor ABTS ^{•+}	90
6.3. Determinarea activității anti-bacteriene a AgNP sintetizate ecologic	91
6.4. Concluzii parțiale	93

CAPITOLUL 7

BIOHIBRIZI PE BAZĂ DE AgNP FITOSINTETIZAȚI DIN EXTRACT DE <i>Artemisia abrotanum</i> ȘI LIPOZOMI MARCAȚI CU CLOROFILĂ A	95
7.1. Obținerea extractului vegetal de <i>Artemisia abrotanum</i>, a lipozomilor și a bio-nanohibridilor pe bază de AgNP	96

7.2. Monitorizarea spectrală a formării nanoparticulelor de argint și a biohibrizilor	96
7.3. Evaluarea dimensiunii și a stabilității fizice a biohibrizilor	98
7.3.1. Evaluarea dimensiunii biohibrizilor obținuți	98
7.3.2. Evaluarea stabilității fizice a biohibrizilor	99
7.4. Evaluarea proprietăților antioxidante	100
7.5. Concluzii parțiale	101
CAPITOLUL 8	
BIOHIBRIZI CU PROPRIETĂȚI ANTIOXIDANTE, PREPARAȚI DIN EXTRACT DE BRUSTURE (<i>Arctium lappa</i>)	103
8.1. Obținerea de biohibrizi pe bază de AgNP, lipozomi și vitamină C	104
8.2. Monitorizarea spectrală a bio-compozitelor pe bază de argint	104
8.3. Estimarea stabilității fizice a biohibrizilor	106
8.4. Determinarea proprietăților biologice	107
8.4.1. Evidențierea activității antioxidante prin metoda chemiluminescenței	107
8.5. Concluzii parțiale	108
CAPITOLUL 9	
NANOMATERIALE BIO-ACTIVE FITO-GENERATE DIN BURUIANA DE CÂMP, PĂLĂMIDĂ (<i>Cirsium arvense</i>)	109
9.1. Obținerea de nanomateriale bio-actives fitogenerate din Ciulin, Pălămidă (<i>Cirsium arvense</i>)	110
9.2. Monitorizare optică a bio-nanoparticulelor obținute pe bază de <i>Cirsium arvense</i>	111
9.3. Evaluarea stabilității materialelor acoperite cu pectină	112
9.4. Aspecte morfologice ale materialelor obținute din <i>Cirsium arvense</i>	112
9.5. Evaluarea acțiunii biologice a materialelor obținute din <i>Cirsium arvense</i>	113
9.6. Concluzii parțiale	115
CONCLUZII	117
C.1. Concluzii generale	117
C.2. Contribuții originale	123
C.3. Perspective de dezvoltare ulterioară	124
LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE ÎN DOMENIUL TEZEI DE DOCTORAT	125
BIBLIOGRAFIE	126

MULȚUMIRI

Doresc să mulțumesc din inimă, cu multă căldură și aleasă recunoștință coordonatorului meu de doctorat, doamna **Profesor Emerit Aurelia Meghea** pentru susținerea necondiționată și încrederea acordată pe tot parcursul anilor de studiu și în perioada elaborării acestei lucrări. Respectuoase și profunde mulțumiri, pentru profesionalismul de înaltă ținută academică și înțelepciunea cu care doamna profesor mi-a ghidat pașii cunoașterii în domeniul cercetării științifice, pentru sfaturile și recomandările încurajatoare oferite, cu deschidere și căldură, la fiecare etapă de aprofundare a studiilor și la finalizare tezei.

Doresc să mulțumesc plină de recunoștință doamnei **conferențiar Dr. ing. Marcela Elisabeta Pătrașcu-Bărbînta**, conferențiar în cadrul Facultății de Fizică, Departamentul de Electricitate, Fizica Solidului și Biofizică, Universitatea din București pentru susținerea permanentă, pentru sfaturile pline de prietenie și profesionalism pe care mi le-a oferit cu generozitate pe tot parcursul desfășurării activităților de cercetare experimentală și bibliografică. Mulțumesc cu recunoștință pentru exemplul de dăruire profesională oferit pe tot parcursul anilor de studiu.

Doresc să aduc alese mulțumiri și recunoștință doamnei **Profesor Dr. ing. Nicoleta Maria Badea** pentru exemplul de abnegație și dăruire față de cercetarea științifică pe care mi l-a oferit pe tot parcursul anilor de studiu, pentru profesionalismul și abordările pline de miez, pentru susținerea, încrederea și cunoștințele oferite necondiționat pe tot parcursul întregii activități de cercetare.

Și nu în ultimul rând doresc să-i mulțumesc cu recunoștință doamnei **Profesor Habil. Dr. ing. Ileana Rău**, director al Școlii Doctorale pentru susținerea, încrederea și sfaturile oferite.

Mulțumesc cu mult respect și recunoștință domnului **director Emil Cătrună**, manager al firmei BIONATURA PLANT S.R.L., firmă în cadrul căreia mi-am desfășurat activitățile profesionale zilnice, pentru înțelegerea și susținerea permanentă oferită pe tot parcursul desfășurării studiilor doctorale.

Autorul

INTRODUCERE

*„Să păstrăm tot ceea ce a fost bun în trecut,
căci atât prin trecut, cât și prin prezent
se construiește viitorul.”*
Anatole France (1844 – 1924)

Știința modernă a cunoscut și cunoaște o amplă și profundă dezvoltare în toate domeniile sale. Unul din dezideratele ultimelor două decenii este acela de a fi implementate soluții ingenioase izvorâte din cercetările științifice. Astfel că, și în domeniul bio-nanotehnologiei există o preocupare vie în privința dezvoltării de noi bio-nanotehnologii care să propună abordări inovative ce vizează îmbunătățirea tehnologiilor existente și aflarea de soluții integratoare, pentru rezolvarea diferitelor necesități existente în domenii de activitate ale științei sănătății vieții, ale mediului, ale diferitelor industrii.

Fitoterapia tradițională, prin plantele medicinale și cele aromatice, s-a dovedit de-a lungul timpului a fi o sursă importantă în obținerea unor răspunsuri fiziologice adecvate (calmarea durerii,

reducerea febrei, a inflamației, a tulburărilor digestive, etc.). Studiile și cercetările din domeniul farmacologiei realizate în ultimele decenii arată că fitoterapia reprezintă una dintre ramurile aplicative ale Farmacologiei medicamentelor vegetale, aspect menționat și în cartea intitulată sugestiv „Fitoterapie – plantele izvor de sănătate”[1].

De asemenea, sunt cunoscute și recunoscute, încă din perioada antichității, calitățile fizico-chimice și efectele biologice ale metalelor prețioase și semiprețioase (Au, Ag, Pt, Cu, Zn, etc). Dintre acestea argintul, sub diferite forme, prezintă un loc bine conturat de-a lungul istoriei, datorită calităților dovedite de agent catalizator, antimicrobian, anti-inflamator, cicatrizant.

Harry Margraf, de la Universitatea Saint Louis, S.U.A. a afirmat despre argint următoarele: „Argintul este cel mai bun luptător, din toate punctele de vedere, împotriva germenilor patogeni, pe care îl avem.”[5]. Același cercetător a publicat în 1977 un studiu [6] în care evidențiază calitățile de agent germicid cu spectru larg și de cicatrizant a unui compus pe bază de argint și zinc utilizat în tratamentul ulcerelor cutanate cronice (ulcere de gambă, acestea fiind cunoscute ca având, în mod curent, etiologie diabetică). În prezent sunt utilizate curent în practica medicală, de îngrijirea plăgilor cronice, pansamente pe bază de argint coloidal. Astfel de exemple, în care sunt evidențiate efecte benefice ale argintului coloidal utilizat singular sau în combinație cu alte preparate pot continua.

Știința modernă, prin studiile interdisciplinare (biologie, chimie, biofizică, farmacologie) realizate în ultimele decenii și coroborarea acestora cu domeniul nano contribuie la obținerea de noi bio-nanohibrizi metalici, care în funcție de caracteristicile morfo-structurale prezintă calități fizico-chimice, optice, electromagnetice, electrice, fotovoltaiice, biologice (de ex. microbiologice), superioare componentelor sale utilizate separat.

Teza de față intitulată: „Dezvoltarea de noi biohibrizi pe bază de nanoparticule de argint și extracte din plante, utilizând chimia verde,” prezintă studii ale obținerii biohibrizilor pe bază de nanoparticule de argint fitogenice, evidențierea proprietăților fizico-chimice și biologice ale acestora și sunt propuse noi plante care ar putea fi utilizate în vederea dezvoltării de formulări cu proprietăți antioxidante, protectoare, regenerante, pentru îmbunătățirea calității vieții. Astfel, în studiile realizate și prezentate în această lucrare pentru obținerea diferitelor tipuri de biohibrizi au fost realizate fito-nanoparticule de argint, utilizând extracte din diverse plante (*Salvia sclarea*, *Arctium lappa*, *Artemisia abrotanum*, *Asparagus officinalis*, *Cirsium arvense*, *Harpagophytum procumbens*), membrane biomimetice pe bază de lipozomi, iar împreună cu vitamina C și pectină extrasă din coajă de lămâie s-au obținut bio-nanohibrizi ce au în compoziție AgNPs fitogenice. Toate bio-nanosistemele obținute au fost caracterizate din punct de vedere al proprietăților fizico-chimice, morfo-structurale (UV-Vis, DLS, Potențial Zeta, SEM) și a proprietăților biologice (activitate antioxidantă, antimicrobiană). Evidențierea calităților nano-biohibrizilor a fost realizată *in vitro*.

Experimentele au fost efectuate în cadrul Centrului de Cercetări pentru Protecția Mediului și Tehnologii Ecologice al Facultății de Chimie Aplicată și Știința Materialelor, Universitatea „Politehnica” din București, în laboratoarele din cadrul catedrei de Biofizică, Facultatea de Fizică, Universitatea din București și în laboratoarele din cadrul Institutului Național pentru Laseri, Plasmă și Radiații Fizice, București-Măgurele.

Lucrarea de față este structurată în două părți, însumând 9 capitole, urmate de concluziile finale și de bibliografie.

Partea I. Cercetarea bibliografică este alcătuită din 3 capitole:

❖ **Capitolul 1** intitulat *Nanoparticule metalice* prezintă informații cu privire la elementele de bază referitoare la nanoparticulele metalice – tipuri de nanoparticule metalice și metode de sinteză a acestora, metode de realizare a nano-fitosintezei folosind extracte din plante și informații

referitoare la hibridi pe bază de nanoparticule metalice – tipuri de hibridi, metode de obținere a nanohibridilor .

❖ În **Capitolul 2** intitulat *Surse vegetale cu potențial de a fi utilizate pentru realizarea sintezei nanoparticulelor metalice* sunt prezentate anumite informații referitoare la situația actuală a bio-nanosintezei metalice prin intermediul Chimiei verzi, principalii factori implicați în optimizarea nano-biosintezei metalice, mecanisme de acțiune antibacterienă a nanoparticulelor metalice sintetizate prin intermediul plantelor, activități biologice ale nanoparticulelor biogenerate, metode de caracterizare a nanoparticulelor metalice, precum și propuneri de surse vegetale adecvate ce pot fi utilizate pentru obținerea nanoparticulelor de argint.

❖ **Capitolul 3** al acestei lucrări, *Aplicații ale nanoparticulelor metalice și ale biohibridilor acestora* prezintă exemple de domenii de cercetare și de aplicare a nanotehnologiei și câteva exemple de aplicații ale bio-nanostructurilor metalice în unele domenii de activitate - bio-medical, mediul înconjurător.

Partea a II-a: Contribuții originale prezintă obiectivele cercetării, cuprinde 6 capitole, în final fiind prezentate concluziile și bibliografia lucrării.

❖ **Capitolul 4** intitulat *Metode de preparare și caracterizare a biohibridilor pe bază de nanoparticule de argint (AgNP), obținuți prin metode ale „chimiei verzi”* prezintă materialele și metodele experimentale utilizate pentru sinteza nanoparticulelor de argint și a biohibridilor, precum și metodele de caracterizare a acestora.

❖ În **Capitolul 5** este prezentată *Optimizarea metodei de sinteză a nanoparticulelor de argint utilizând extractul din rădăcina de *Harpagophytum procumbens**.

❖ În cel mai amplu capitol al acestei lucrări, **Capitolul 6** *Biosinteza și caracterizarea nanoparticulelor de argint obținute prin metode „green”* este prezentată abordarea ecologică a obținerii nanoparticulelor de argint prin intermediul a patru plante [(Brusture (*Arctium lappa*), Iarba Sfântului Ioan (*Salvia sclarea*), Sparanghel (*Asparagus officinalis*), Lemnul Domnului (*Artemisia abrotanum*))], evidențierea calităților acestora în fitogenerarea nanoparticulelor de argint, evaluarea activității antioxidante prin intermediul a două metode (chemiluminescență și ABTS) și evidențierea activității antibacteriene a AgNP fitosintetizate.

❖ **Capitolul 7** - *Biohibridi pe bază de AgNP fitosintetizați din extract de *Artemisia abrotanum* și lipozomi marcați cu clorofila A* este destinat prezentării modalității de realizare de bio-nanohibridi pe bază de AgNPs și lipozomi și evidențierea calităților antioxidante ale acestora.

❖ În **Capitolul 8** *Biohibridi cu proprietăți antioxidante preparați din extract apos de Brusture (*Arctium lappa*)*, sunt evidențiate calitățile antioxidante ale bio-nanohibridilor obținuți din AgNPs sintetizate prin intermediul extractului de *Arctium lappa*, membrane biomimetice (lipozomi) și vitamina C.

❖ **Capitolul 9** *Nanomateriale bio-active fito-generate din buruiana de câmp, Pălămidă (*Cirsium arvense*)* prezintă un sistem inovator alcătuit din componente bio-active - AgNPs fito-sintetizate din extract apos din frunze de Pălămidă (*Cirsium arvense*) și pectină din lămâie și evidențierea proprietăților antioxidante și antibacteriene ale acestora ce le pot recomanda a fi utilizate în aplicații biomedicale.

❖ Teza de doctorat se încheie cu „Concluzii” în care sunt punctate sintetic rezultatele cercetărilor, originalitatea acestora, urmate de prezentarea unor perspective de studiu în vederea obținerii de noi sisteme bio-active cu proprietăți noi sau îmbunătățirea celor deja evidențiate.

Lucrarea conține 13 tabele, 94 figuri și 222 referințe bibliografice.

Rezultatele studiilor au fost prezentate prin publicare în 5 reviste cotate ISI (factor de impact cumulativ FI = 3,104).

Cuvinte cheie: fito-nanosintează, AgNPs, membrane biomimetice, vitamina C, pectină din lămâie, bio-activități (activitate antioxidantă și antimicrobiană).

I. CONTRIBUȚII ORIGINALE

Capitolul 5

OPTIMIZAREA METODEI DE SINTEZĂ A NANOPARTICULELOR DE ARGINT UTILIZÂND EXTRACTUL DIN RĂDĂCINĂ DE *Harpagophytum procumbens*

În capitolul de față este prezentat studiul de optimizare a metodei de obținere a nanoparticulelor de argint (AgNPs) ecosintetizate prin intermediul extractului apos din pulbere din rădăcină de *Harpagophytum procumbens*, cu scopul de a fi ulterior utilizate în diferite domenii ale industriei, medicinei și farmaciei, în diferite terapii naturale/tradiționale.

Harpagophytum procumbens, fam. *Pedaliaceae*, cunoscută popular sub denumirea de Gheara-diavolului (engl. *Devil's Claw*), este o plantă târâtoare ce crește spontan în solurile nisipoase, din zonele aride colinare și submontane ale Africii de Sud (Namibia, Botswana). Numele plantei este dat de forma fructului acesteia care este oval, învelit în coajă lemnoasă ce prezintă doi spini centrali și alte două rânduri de spini mai mici (Figura 5.1A). În fitoterapia tradițională sunt utilizate rădăcina și tuberculii plantei (Figura 5.1B).

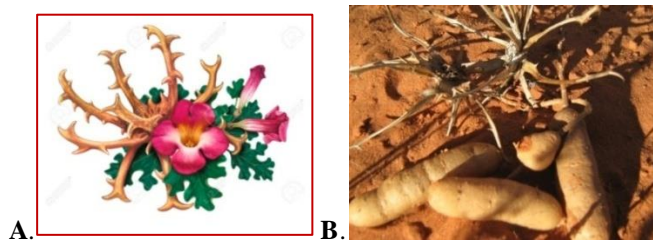


Figura 5.1 Fotografii ale plantei *Harpagophytum procumbens*: A) Floare și ghimpe [149]; B) Tuberculi ai plantei [150].

În studiile de specialitate, despre Gheara-diavolului sunt menționate efectele anti-inflamatoare [157] ale fitocompușilor activi conținuți în această plantă, cum sunt: glicozide iridoide - harpagozid (ester al acidului cinamic), harpagide [157], feniletanoide (verbascozide și izoverbascozide), fenoli și flavonoizi [158], precum și lipide, proteine, polifenoli, carbohidrați [159]. Printre alte proprietăți ale acestei plante se enumeră: activitatea antioxidantă, antimutagenică, hepatoprotectoare, hemodinamică, antimicrobiană, antitumorală [160], antialergică [157,160,161], poate fi utilizată în terapia bolilor degenerative ale sistemului osos și muscular [162], antiobezitate [163]; previne apariția osteoporozei, conferă protecție față de pierderea osoasă indusă de ovariectomie [162]; stimulează activitatea spastică uterotonică, fiind utilă în inducerea/accelerarea travaliului și expulzarea placentei femeii după naștere [163].

În studiul de față este prezentată fitogenerarea AgNPs printr-o metodă simplă, utilizând extractul din rădăcină de *Harpagophytum procumbens*. AgNPs obținute au fost caracterizate spectral, prin intermediul spectroscopiei de absorbție în UV-Vis, iar dimensiunea lor a fost estimată prin măsurători DLS. Activitatea antioxidantă a AgNPs a fost evaluată prin metoda chemiluminescenței și tehnica ABTS.

5.1 Obținerea extractului vegetal din rădăcină de *Harpagophytum procumbens*

Metoda de obținere a bio-nanoparticulelor de argint realizate cu ajutorul extractului din

Dezvoltarea de noi biohibridi pe bază de nanoparticule de argint și extracte din plante utilizând chimia verde

pulbere de rădăcină de *Harpagophytum procumbens* este prezentată în capitolul 4.

Abrevierile probelor preparate sunt prezentate în Tabelul 5.1.

Tabel 5.1. Prescurtările probelor analizate [132].

Denumire probă	Abrevierea porbei
Extract din rădăcină de <i>Harpagophytum procumbens</i>	HE
AgNP biosintetizate din rădăcină de <i>Harpagophytum</i> , raport extract:AgNO _{3(aq)} , de: 1:10 (mL/mL), după 1 oră	S1_1h
AgNP biosintetizate din rădăcină de <i>Harpagophytum</i> , raport extract:AgNO _{3(aq)} , de: 1:10 (mL/mL), după 2 ore	S1_2h
AgNP biosintetizate din rădăcină de <i>Harpagophytum</i> , raport extract: AgNO _{3(aq)} , de: 1:10 (mL/mL), după 24 ore	S1_24h
AgNP biosintetizate din rădăcină de <i>Harpagophytum</i> , raport extract: AgNO _{3(aq)} , de: 1:100 (mL/mL), după 1 oră	S2_1h
AgNP biosintetizate din rădăcină de <i>Harpagophytum</i> , raport extract: AgNO _{3(aq)} , de: 1:100 (mL/mL), după 2 ore	S2_2h
AgNP biosintetizate din rădăcină de <i>Harpagophytum</i> , raport extract: AgNO _{3(aq)} , de: 1:100 (mL/mL), după 24 ore	S2_24h
Suspensia de AgNPs (S2_24) centrifugată timp de 30 minute, la 4°C, 15000 rpm	S2_1
Proba S2_1 ultrasonată timp de 5 minute	S2_2
Proba S2_2 ultrasonată timp de 5 minute (timp total de ultrasonare = 10 min.)	S2_3

5.1.1 Monitorizarea prin spectroscopia de absorbție în UV-Vis a nanoparticulelor obținute prin intermediul extractului de *Harpagophytum procumbens*

Evidențierea capacității extractului apos din rădăcină de *Harpagophytum procumbens* de a sintetiza nanoparticule de argint a fost realizată prin intermediul spectrelor de absorbție în UV-Vis corelate cu măsurători ale dispersiei dinamice a luminii (DLS).

Figura 5.2 prezintă evoluția în timp a suspensiilor de nanoparticule metalice preparate folosind două rapoarte volumetric extract: AgNO_{3(aq)}, de: 1:10 (mL/mL) (Figura 5.2A) și 1:100 (mL/mL) (Figura 5.2B).

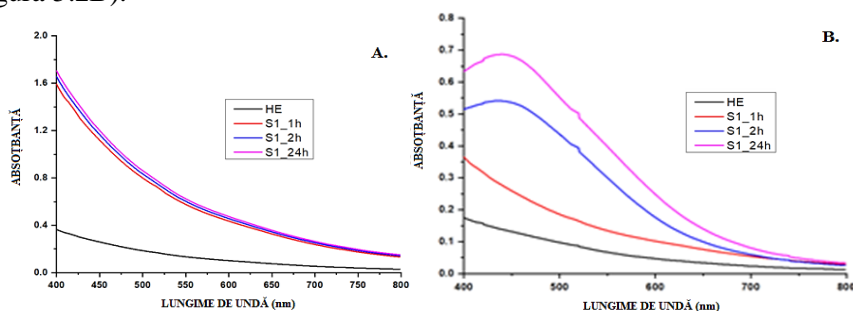


Figura 5.2. Evoluția în timp a suspensiilor de nanoparticule metalice preparate folosind un raport volumetric extract:AgNO_{3(aq)} de: A) 1:10 (mL/mL) și B) 1:100 (mL/mL) [132].

Așa cum se observă în figura 5.2B, banda SPR este bine conturată pentru raportul volumetric extract: AgNO_{3(aq)} de 1:100 (mL/mL), care s-a dovedit un raport optim pentru fitogenerarea AgNPs. În continuare, aceste nanoparticule au fost procesate și caracterizate spectral, în vederea optimizării protocolului de obținere a AgNPs.

Astfel, suspensia de AgNPs a fost centrifugată timp de 30 minute, la 4°C, 15000 rpm (Centrifugă SIGMA 12K 15); sedimentul rezultat (proba S2_1) a fost reținut și resuspendat în apă distilată (1 mL). Mai departe, proba a fost ultrasonată utilizând un sonicator cu sondă de titan (Hielsner, UP 100 H), timp de 5 minute (proba S2_2) și 10 minute (proba S2_3).

Figura 5.3 prezintă dependența benzii SPR în funcție de timpul de ultrasonare. Se observă un efect hipsocrom al benzii SPR care se deplasează spre lungimi de undă mai mici, de la 449 nm

la 441 nm după iradiere cu ultrasunete. Aceste rezultate se explică prin scăderea dimensiunii AgNPs, fapt demonstrat mai departe, prin măsurători DLS (Figura 5.4).

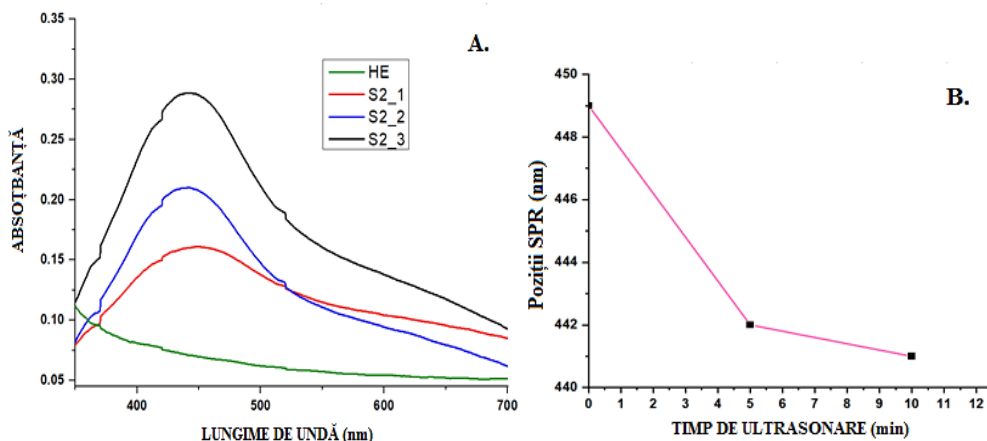


Figura 5.3. Dependența benzii SPR în funcție de timpul de ultrasunare: A) Spectrele de absorbție în UV-Vis ale probelor de AgNPs: S2_1, S2_2 și S2_3. B) Deplasarea hipsocromă a benzii SPR, în funcție de timpul de ultrasunare [132].

5.1.2 Evaluarea dimensiunii nanoparticulelor obținute

Ca urmare a procedeele aplicate, se constată faptul că dimensiunea AgNPs scade drastic după 5 minute de iradiere, de la 240 (proba S2_1) la 79 nm (proba S2_2). De asemenea, indicele de polidispersie, PdI, variază ușor de la 0.4 la 0.38. După încă 5 minute de ultrasunare, PdI crește, atingând valoarea de 0.47, indicând prezența mai multor populații de nanoparticule, iar diametrul mediu al acestor NPs crește până la valoarea de 82 nm. Prin urmare, putem concluziona că timpul optim de ultrasunare este de 5 min; depășirea acestui timp producând efecte nesemnificative.

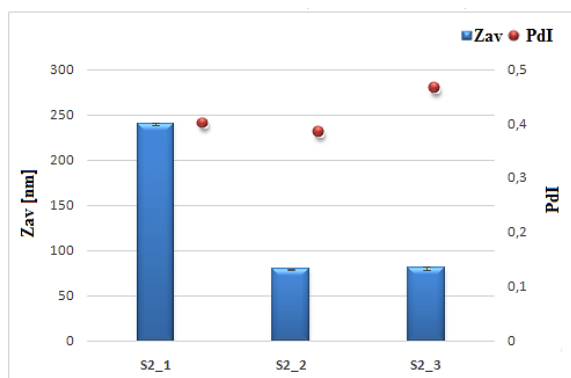


Figura 5.4. Dimensiunile probelor S2, obținute prin măsurători DLS [132].

5.2 Estimarea activității antioxidante a nanoparticulelor realizate

Influența dimensiunii AgNPs asupra proprietății antioxidante a fost studiată comparativ prin două metode: metoda chemiluminescenței și metoda ABTS. Metoda de evidențiere a chemiluminescenței evaluează capacitatea de captare a radicalilor de viață scurtă, de ex. speciile reactive ale oxigenului (SRO), iar metoda ABTS evaluează capacitatea de captare a radicalului de viață lungă ABTS^{•+}.

Probele de AgNPs având dimensiuni cuprinse între 79 - 220 nm au prezentat o activitate antioxidantă bună de captare a radicalilor SRO cuprinsă între 68,5 - 75,5% comparativ cu extractul de *Harpagophytum procumbens* (60%). Această activitate antioxidantă amplificată, în cazul probei S2_2, manifestată asupra SRO din sistemul chemiluminescent (figura 5.5), poate fi: efectul sinergic

produs de structurile complexe ale principalilor compuși bioactivi din extractul de *Harpagophytum procumbens* și efectul de nanodimensiune, care conduce la generarea/crearea mai multor centri de reacție pentru captarea radicalilor liberi [164].

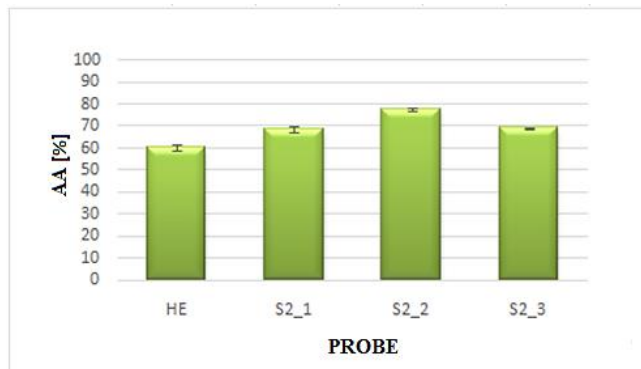


Figura 5.5. Evaluarea activității antioxidante prin metoda chemiluminescenței [132].

O capacitate antioxidantă moderată de captare a radicalului $ABTS^{*+}$ a fost semnalată în cazul nanoparticulelor de Ag sintetizate prin intermediul extractului din rădăcină de *Harpagophytum procumbens*, (Inh = 18,3%), însă mai accentuată comparativ cu cea a extractului nativ (Inh = 12,5%) (Figura 5.6). Dimensiunea AgNPs influențează capacitatea de captare a radicalului ABTS, astfel variind între 13,9 – 18,3%, cea mai bună valoare obținându-se pentru AgNPs ce prezintă dimensiunea de 79 nm (proba S2_2).

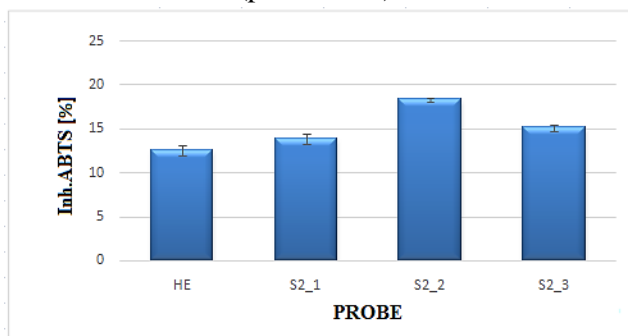


Figura 5.6. Evaluarea activității antioxidante prin metoda ABTS [132].

5.3 Concluzii parțiale

Studiul prezintă optimizarea protocolului de obținere a unor nanoparticule de argint fitosintetizate cu ajutorul unui extract apos din rădăcină de *Harpagophytum procumbens*, pentru aplicații în scop bio-medical. Dintre eșantioanele preparate cu diferite concentrații de extract de plantă și soluție de $AgNO_3$ 1 mM s-a dovedit mai eficient raportul Extract: $AgNO_{3(aq, 1\text{ mM})} = 1:100$ (mL/mL).

Evoluția în timp a formării AgNPs a fost monitorizată prin banda SPR din domeniul vizibil, a cărei deplasare hipsocromă a fost corelată cu scăderea dimensiunii nanoparticulelor, așa cum s-a confirmat prin măsurătorile DLS.

Nanoparticulele de Ag prezintă o capacitate de captare a radicalilor de viață scurtă de 73 % și a radicalilor de viață lungă ABTS de 18,3 %, evidențiind că aducerea la scară nanometrică conduce la o amplificare a proprietăților antioxidante.

Capitolul 6

BIOSINTEZA ȘI CARACTERIZAREA NANOPARTICULELOR DE ARGINT OBTINUTE PRIN METODE ”GREEN”

În acest capitol este prezentată contribuția originală adusă în dezvoltarea de noi nanosisteme antioxidante și antibacteriene, bazate pe AgNPs fito-generate din extracte apoase din părți aeriene din diferite plante: Brusture (*Arctium lappa*), (Figura 6.1A), Iarba Sfântului Ioan (*Salvia sclarea*), (Figura 6.1B), Sparanghel (*Asparagus officinalis*), (Figura 6.1C), Lemnul Domnului (*Artemisia abrotanum*), (Figura 6.1D) cu perspective de aplicare în scopuri bio-medicale.



Figura 6.1. Fotografii personale ale plantelor utilizate în acest studiu:

- A.** Brusture (*Arctium lappa*); **B.** Iarba Sfântului Ioan (*Salvia sclarea*); **C.** Sparanghel (*Asparagus officinalis*); **D.** Lemnul Domnului (*Artemisia abrotanum*).

AgNPs sintetizate în acest studiu au fost caracterizate spectral prin intermediul spectroscopiei de absorbție în UV-Vis, măsurători DLS, iar stabilitatea lor fizică a fost estimată prin determinări ale potențialului Zeta. Proprietățile antioxidante au fost testate prin două metode: tehnica chemiluminescenței și testul ABTS⁺. Eficacitatea antibacteriană a AgNPs biogenice dezvoltate a fost evaluată împotriva agentului patogen uman *Escherichia coli* ATCC 8738.

6.1. Obținerea extractelor vegetale din Brusture (*Arctium lappa*), Iarba Sfântului Ioan (*Salvia sclarea*), Sparanghel (*Asparagus officinalis*) și Lemnul Domnului (*Artemisia abrotanum*)

Biosinteza „verde” a nanoparticulelor de argint (AgNPs) a fost realizată prin intermediul extractului apos obținut din plantele luate în studiu: *Arctium lappa*, *Salvia sclarea*, *Asparagus officinalis*, *Artemisia abrotanum*.

Abrevierile probelor preparate sunt prezentate în Tabelul 6.1.

Tabel 6.1. Prescurtările probelor analizate [131].

Probă	Abrevierea probei
Iarba Sfântului Ioan (<i>Salvia sclarea</i>)	ISI
AgNPs biosintetizate din salvie	AgNP-ISI
Brusture (<i>Arctium lappa</i>)	Br
AgNPs biosintetizate din brusture	AgNP-Br
Lemnul Domnului (<i>Artemisia abrotanum</i>)	LD
AgNPs biosintetizate din Lemnul Domnului	AgNP-LD
Sparanghel (<i>Asparagus officinalis</i>)	Asp
AgNPs biosintetizate din sparanghel	AgNP-Asp

6.1.1. Obținerea nanoparticulelor de argint și monitorizarea spectrală prin spectroscopia de absorbție în UV-Vis

Prin intermediul spectrelor de absorbție în UV-Vis corelate cu măsurători ale DLS, a fost pusă în evidență capacitatea extractelor apoase de *Asparagus officinalis*, *Artemisia abrotanum*, *Arctium lappa*, *Salvia sclarea* de a sintetiza nanoparticule de argint.

Toate cele patru tipuri de plante studiate, deși de slabă intensitate, se pot observa benzile specifice rezonanței plasmonilor de suprafață (SPR) a nanoparticulelor de argint în zona 450 – 480 nm. Aceste benzi sunt mult mai bine evidențiate dacă se analizează poziția și intensitatea benzilor doar pe domeniul vizibil. Într-adevăr, în Figura 6.3 sunt prezentate detaliile punerii în evidență a sintezei nanoparticulelor de argint preparate prin intermediul extractelor naturale de plante: *Salvia sclarea*, *Arctium lappa*, *Artemisia abrotanum*, respectiv *Asparagus officinalis*, (Figurile 6.3. A,B,C,D). Acestea confirmă formarea nanoparticulelor de argint [174, 175]. Se evidențiază banda SPR puternică apărută la 452, 438, 467 și 454 nm pentru AgNP-ISI, AgNP-Br, AgNP-LD și AgNP-Asp.

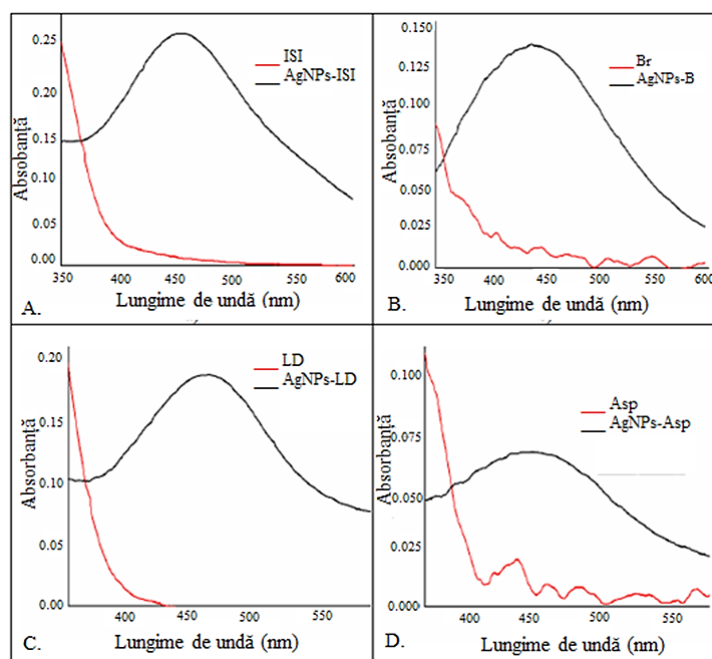


Figura 6.3. Banda SPR a AgNPs sintetizate „verde” utilizând extractul din: **A.** *Salvia sclarea* (AgNPs-ISI); **B.** *Arctium lappa* (AgNPs-Br); **C.** *Artemisia abrotanum* (AgNPs-LD); **E.** *Asparagus officinalis* (AgNPs-Asp) [131].

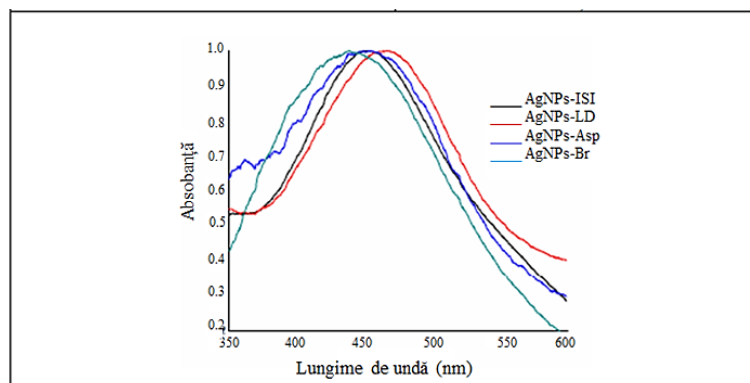


Figura 6.4. Comparația benzilor SPR ale spectrelor nominalizate pentru toate probele (AgNPs-ISI = banda neagră; AgNPs-LD = banda roșie; AgNPs-Asp = banda albastră; AgNPs-Br = banda verde-turcoaz) [131].

Figura 6.4 ilustrează o comparație a spectrelor normalizate la maximul benzilor SPR pentru toate probele, evidențiindu-se o strânsă corelație a lățimii benzilor cu dimensiunea particulelor și de distribuția după dimensiune a acestora.

Astfel, se poate observa (Figura 6.4) că, nanoparticulele AgNPs-LD (roșu) și AgNPs-ISI (negru) prezintă benzile SPR cele mai înguste, urmate de AgNPs-Asp (albastru) și AgNPs-Br (verde-turcoaz). Este de așteptat ca mărimea medie a nanoparticulelor sintetizate să crească în funcție de mărimea benzii SPR după cum urmează: mărimea (AgNPs-LD) < mărimea (AgNPs-ISI) < mărimea (AgNPs-Asp) ~ mărimea (AgNPs-Br).

Aceste ipoteze au fost confirmate în continuare prin măsurători DLS (Figura 6.6) care indică dimensiunea la nano-scară a AgNPs preparate. Diametrele medii ale celor patru tipuri de nanoparticule au prezentat următoarele valori: 51,05 nm (AgNPs - LD), 74,52 nm (AgNPs-ISI), 122,3 nm (AgNPs-Asp) și 123,6 nm (AgNPs-Br), ceea ce este în perfectă concordanță cu ordinea dimensiunilor prevăzută din spectrele electronice ale benzii SPR.

6.1.2. Determinarea dimensiunii AgNPs prin tehnica DLS

Din Figura 6.6 se constată că mărimea AgNPs obținute prin sinteza „verde” variază în funcție de extractul de plantă utilizat în biosinteză. Astfel, nanoparticulele de argint sintetizate în prezența extractului de *Salvia sclarea* (AgNPs-ISI) au un diametru mediu de $Z_{av} = 75$ nm și un coeficient de polidispersie (PdI) de 0,23; pentru extractul de *Arctium lappa* (AgNPs-Br), se obține un diametru mediu de $Z_{av} = 125$ nm și un coeficient de polidispersie de 0,37; în cazul extractului de *Artemisia abrotanum* (AgNPs-LD), nanoparticulele de argint prezintă un diametru mediu de $Z_{av} = 51$ nm și un coeficient de polidispersie de 0,132, iar în prezența extractului de *Asparagus officinalis* (AgNPs-Asp), se obțin nanoparticule un diametru mediu de $Z_{av} = 121$ nm, PdI = 0,37.

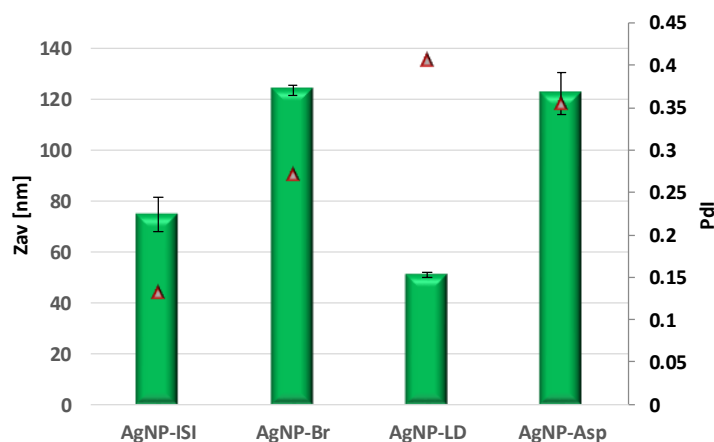


Figura 6.6. Determinarea mărimii nanoparticulelor de argint obținute pe bază de *Salvia sclarea* (AgNPs-ISI), *Arctium lappa* (AgNPs-Br), *Artemisia abrotanum* (AgNPs-LD), *Asparagus officinalis* (AgNPs-Asp), analizate cu tehnica DLS [131].

Se observă că nanoparticulele AgNPs-LD au prezentat cel mai mic indice de polidispersitate (PdI = 0,132).

6.1.3. Evaluarea stabilității fizice a AgNPs

Stabilitatea fizică a nanoparticulelor de argint fito-generate a fost evaluată în termeni de potențial Zeta (ζ), un parametru strâns legat de sarcina de suprafață a particulelor.

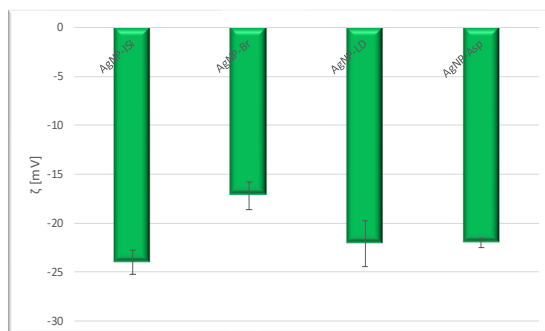


Figura 6.7. Variația stabilității fizice a AgNPs biosintetizate pe bază de *S. sclarea* (AgNPs-ISI), *A. lappa* (AgNPs-Br), *A. abrotanum* (AgNPs-LD), *A. officinalis* (AgNPs-Asp), evaluate în termeni de potențial Zeta [mV], [131].

După cum rezultă din Figura 6.7 toate probele (AgNPs-ISI, AgNPs-Br, AgNPs-LD, AgNPs-Asp) au prezentat valori negative ale sarcinii de suprafață; AgNPs-Br a prezentat o stabilitate moderată ($\xi = -17,20 \pm 1,42$ mV), comparativ cu celelalte probe, care au o stabilitate bună, asigurată de forțele de respingere dintre particule: ξ (AgNPs-ISI) = $-24,00 \pm 1,20$ mV; ξ (AgNPs-LD) = $-22,10 \pm 2,33$ mV; ξ (AgNPs-Asp) = $-22,00 \pm 0,50$ mV.

6.2. Evaluarea activităților biologice ale nanoparticulelor fitogene dezvoltate

Potențialul antioxidant al eșantioanelor obținute a fost determinat *in vitro* prin două tipuri de analize: tehnica chemiluminescenței și metoda ABTS (așa cum este descris în capitolul 4).

6.2.1 Activitatea antioxidantă evaluată prin metoda chemiluminescenței

Toate eșantioanele preparate au prezentat proprietăți antioxidante semnificative. Mai mult, nanoparticulele de argint fito-preparate au prezentat o capacitate mai mare de captare a radicalilor liberi, comparativ cu extractele naturale de la care provin. Studiile anterioare au evidențiat un comportament similar al AgNPs fitogene comparativ cu precursorii lor: extracte vegetale [174, 176, 177].

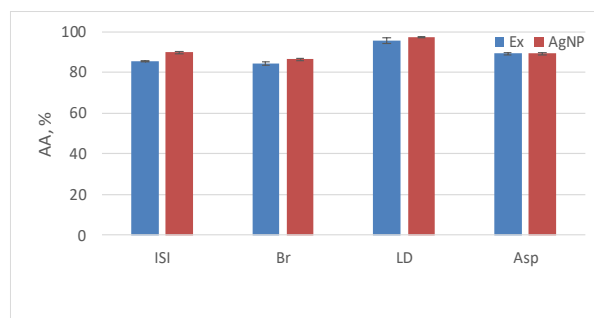


Figura 6.8. Activitatea antioxidantă (evaluată prin tehnica chemiluminescenței) a nanoparticulelor de argint și extractelor vegetale precursore: *Salvia sclarea*, *Arctium lappa*, *Artemisia abrotanum*, *Asparagus officinalis* (Datele sunt prezentate ca medie \pm SD), [131].

Rezultatele chemiluminescenței (Figura 6.8) au evidențiat o capacitate ridicată de captare a radicalilor liberi de viață scurtă, în următoarea secvență: AgNPs-LD > AgNPs-ISI > AgNPs-Asp > AgNPs-Br.

6.2.2. Activitatea antioxidantă evaluată prin intermediul cation-radicalului ABTS^{•+}

Metoda ABTS^{•+} (Figura 6.9) a evidențiat faptul că inhibarea cation-radicalilor ABTS a fost cuprinsă între 3,74 și 11,84% pentru extractele naturale. AgNPs fito-generate au prezentat o mai bună capacitate de a inhiba ABTS^{•+}, cu valori ale captării ABTS^{•+} cuprinse între 32,44 și 61,26%.

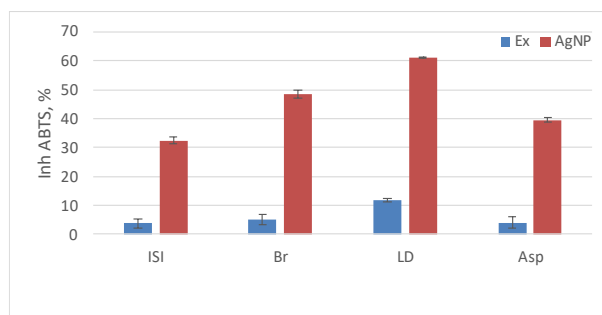


Figura 6.9. Activitatea antioxidantă (evaluată prin metoda ABTS) a AgNPs fitosintetizate din extractele apoase: *Salvia sclarea* (ISI), *Arctium lappa* (Br), *Artemisia abrotanum* (LD), *Asparagus officinalius* (Asp) (Datele sunt prezentate ca medie \pm SD), [131].

Se poate conchide ca extractul de Lemnul Domnului (LD) și AgNPs fitosintetizate din acest extract (AgNPs-LD) s-au dovedit a fi cele mai eficiente sisteme antioxidante, prezentând capacități remarcabile de reducere atât a radicalilor liberi de viață scurtă (AA = 95,53% pentru LD și 97,39% pentru AgNPs-LD), cât și pe cei de viață lungă (11,84% pentru LD și 61,26% pentru AgNPs-LD). Aceste bioactivități pot fi atribuite prezenței amestecurilor de substanțe fitochimice, antioxidante din compoziția materialelor vegetale, bogate în fenoli, flavonoide, terpenoizi sau lignani.

6.3. Determinarea activității anti-bacteriene a AgNPs sintetizate ecologic

Activitatea antibacteriană a AgNPs fito-sintetizate a fost evaluată față de bacteria Gram negativă *Escherichia coli* (*E. coli*), un agent patogen comun în microflora normală a tractului intestinal al oamenilor, adesea folosit ca indicator la contaminarea fecală [178]. Potența antibacteriană a nanoparticulelor de argint obținute a fost estimată în ceea ce privește zona de inhibare. În Figura 6.10 sunt prezentate imaginile plăcilor Petri în care se observă prezența haloului zonei de inhibare (ZOI) bacteriană.

Testele realizate au indicat o bună activitate antibacteriană. Figura 6.11 prezintă diametrele ZOI (în mm) realizate de AgNPs față de *Escherichia coli* ATCC 8738. Astfel, valoarea $ZOI_{AgNPs-ISI} = 20,67 \pm 3,05$ mm, $ZOI_{AgNPs-Br} = 21,67 \pm 2,08$ mm, $ZOI_{AgNPs-LD} = 23,33 \pm 2,09$ mm, $ZOI_{AgNPs-Asp} = 25,33 \pm 1,52$ mm. Aceste rezultate au indicat că toate AgNPs preparate au un efect semnificativ asupra inhibării *E. coli*, cel mai puternic fiind cel prezentat de AgNPs-Asp.

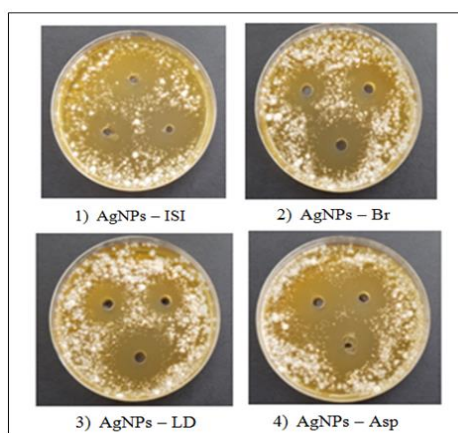


Figura 6.10. Fotografiiile plăcilor Petri ce evidențiază activitatea antibacteriană a AgNPs: *Salvia sclarea* (AgNPs-ISI), *Arctium lappa* (AgNPs-Br), *Artemisia abrotanum* (AgNPS-LD), *Asparagus officinalius* (AgNPs-Asp), [131].

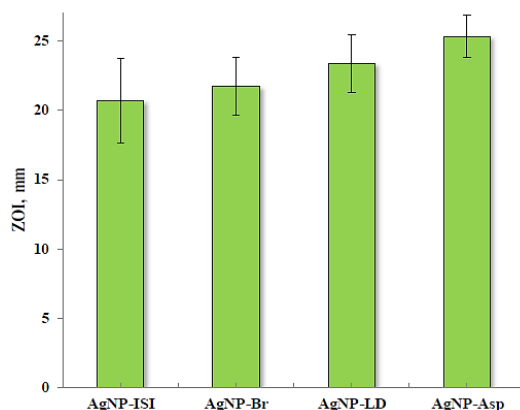


Figura 6.11. Compararea activității antibacteriene a AgNPs studiate: *Salvia sclarea* (AgNPs-ISI), *Arctium lappa* (AgNPs-Br), *Artemisia abrotanum* (AgNPs-LD), *Asparagus officinalis* (AgNPs-Asp), [131].

A acțiunea antibacteriană a nanoparticulelor biogenice de argint obținute ar putea fi atribuită unei serii de evenimente precum:

i) contactul fizic direct al AgNPs cu suprafața celulei bacteriene, ceea ce duce la deteriorarea peretelui celular și apoi la deteriorarea membranei celulare, conducând la eliberarea conținutului celulei bacteriene;

ii) pătrunderea AgNPs în interiorul celulei bacteriene producând disfuncția membranei și în cele din urmă moartea acesteia [179].

6.4. Concluzii parțiale

Acest studiu a descris fitosinteza și caracterizarea biofizică a nanoparticulelor de argint generate din extracte naturale de Iarba Sfântului Ioan (*Salvia sclarea*), Brusture (*Arctium lappa*), Lemnul Domnului (*Artemisia abrotanum*) și Sparanghel (*Asparagus officinalis*). Capacitatea acestor plante de a bio-reduce ionii de argint a fost monitorizată de spectrele de absorbție în UV-Vis, acestea au evidențiat benzi spectrale specifice AgNPs dezvoltate; au apărut benzi SPR puternice între 438 și 467 nm, confirmând fitosinteza AgNPs. Lățimile benzii SPR sunt în strânsă legătură cu dimensiunea particulelor, fapt demonstrat de măsurătorile DLS care au demonstrat și formarea particulelor la scală nanometrică cu diametre medii cuprinse între 51 și 123,6 nm.

Nanoparticulele de argint biogene dezvoltate în acest studiu au demonstrat o bună stabilitate fizică și o capacitate mare de a capta radicalii liberi pe termen scurt și lung. Cele mai mici nanoparticule de argint, AgNP-LD (sintetizate „verde” din Lemnul Domnului), cu o dimensiune medie de $51,05 \pm 0,99$, acestea prezentând și cea mai mare capacitate de a elimina durată de viață scurtă (AA = 97,39%) și, de asemenea, durată de viață lungă (Inh ABTS•+ = 61,26%) radicali liberi.

De menționat, efectul antibacterian impresionant al AgNP-urilor biogenerate din *Asparagus* (AgNP-As), prezentând un diametru ZOI de $25,33 \pm 1,52$ mm împotriva bacteriei *Escherichia coli*.

Rezultatele noastre sunt încurajatoare, nanoparticulele fitogenice de argint dezvoltate s-au dovedit a fi materiale promițătoare pentru eliminarea bacteriilor și a radicalilor liberi de scurtă durată și lungă durată care decurg din stresul oxidativ. Mai mult, acest studiu are un mare impact economic, de mediu și medical, deoarece ierburile și deșeurile alimentare ar putea fi transformate în nanoparticule metalice „verzi” cu valoare biomedicală ridicată.

Capitolul 7

BIOHIBRIZI PE BAZĂ DE AgNPs FITOSINTETIZAȚI DIN EXTRACT DE *ARTEMISIA ABROTANUM* ȘI LIPOZOMI MARCAȚI CU CLOROFILĂ A

În acest capitol sunt prezentate contribuțiile originale privind *design-ul* „verde” al compozitelor antioxidante bazate pe lipozomi (membrane biomimetice) și nanoparticule de argint (AgNPs), fitogenerate [135]. Bistraturile lipidice artificiale au fost marcate cu o porfirină naturală – clorofila *a* (Chl*a*), care a fost utilizată ca marker spectral pentru monitorizarea formării biocompozitelor. Această bioporfirină a fost folosită cu succes în studii anterioare [184, 185] ca senzor spectral pentru monitorizarea acțiunii diferiților agenți asupra membranelor biomimetice, la nivel molecular.

În acest studiu au fost preparate trei tipuri de biohibridi, care conțin membrane lipidice bio-inspirate și conținut diferit de AgNPs generat din extract apos din planta Lemnul Domnului. După cunoștința noastră, acesta este primul raport despre sinteza „verde” a AgNPs și a compozitelor bazate pe cristale lichide biomimetice și nanoparticule fitogene de argint generate din extractul apos de *Artemisia abrotanum*. Materialele obținute au fost caracterizate prin diferite tehnici spectrale: spectroscopie de absorbție în UV-Vis, fluorescență, măsurători DLS și de potențial Zeta. Materialele obținute, bio-nanohibridii au prezentat proprietăți antioxidante estimate prin metoda chemiluminescenței.

7.1. Obținerea extractului vegetal de *Artemisia abrotanum*, a lipozomilor și a bio-nanohibridilor pe bază de AgNPs

Bio-nanohibridii pe bază de AgNP au fost obținuți prin intermediul extractului vegetal de *Artemisia abrotanum*, membranelor lipidice biomimetice (MLV) și Clorofilei *a* (Chl *a*) conform unor proceduri prezentate la Capitolul 4.

În Tabelul 7.1 sunt prezentate abrevierile eșantioanelor obținute.

Tabelul 7.1. Prescurtările eșantioanelor obținute [135].

PROBĂ	COD
Extract apos de <i>Artemisia abrotanum</i>	Ex
AgNPs fitogenerate din <i>Artemisia abrotanum</i>	AgNPs
MLVs de Chl <i>a</i> -Lecitină (lipozomi)	MLV
Tampon salin fosfat pH 7,4	PBS
MLV: PBS (29: 1, V / V)	MLV1
MLV: PBS (5: 1, V / V)	MLV2
MLV: PBS (1: 1, V / V)	MLV3
PBS: AgNPs (29: 1, V / V)	MG1
PBS: AgNPs (5: 1, V / V)	MG2
PBS: AgNPs (1: 1, V / V)	MG3
MLV: AgNPs (29: 1, V / V) biohibridi	BH1
MLV: AgNPs (5: 1, V / V) biohibridi	BH2
MLV: AgNPs (1: 1, V / V) biohibridi	BH3

7.2. Monitorizarea spectrală a formării nanoparticulelor de argint și a biohibridilor

a. Caracterizarea spectrală a eșantioanelor obținute

Sinteza biocompozitelor lipo-nanoargint a fost pusă în evidență prin intermediul spectroscopiei de absorbție în UV-Vis (figura 7.1) și prin spectre de emisie a fluorescenței (Figura

7.2).

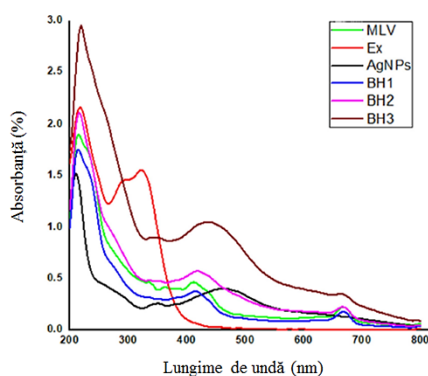


Figura 7.1. Spectrele de absorbție în UV-Vis ale eșantioanelor* luate în studiu [135].

*Măsurătorile eșantioanelor au fost realizate în triplicat.

În Figura 7.1, în cazul probei AgNPs, se remarcă prezența unei benzi de intensitate medie la 464 nm, datorită rezonanței plasmonului de suprafață (SPR) a nanoparticulelor de argint, în timp ce spectrul dat de extractul de *A. abrotanum* (Ex) nu prezintă absorbție în această zonă. Extractul de *A. abrotanum* prezintă două maxime în intervalul 200 și 350 nm, benzi specifice compușilor aromatici și flavonoidelor.

De asemenea, pentru eșantioanele marcate cu clorofilă se remarcă amprenta spectrală a fluoroforului Chl a, prin banda de la 668 nm pentru MLV și pentru BH1, iar pentru eșantioanele BH2 și BH3 se constată o ușoară deplasare hipsocromă, la 667 și, respectiv, 663 nm. Se observă că în cazul probelor BH3 modificarea poziției și intensității benzii este mai accentuată, datorită cantității mai mari de AgNPs utilizate (53,5 μg / mL). Se poate concluziona că rezultatele obținute sugerează prezența în cadrul biosistemelor hibride BH3 a unor interacțiuni puternice între nanoparticulele de argint fitosintetizate și straturile lipidice biomimetice, susținute de prezența structurilor realizate între Chl a și AgNPs.

7.3 Evaluarea dimensiunii și a stabilității fizice a biohibridilor

7.3.1 Evaluarea dimensiunii biohibridilor obținuți

Evaluarea dimensiunii biohibridilor obținuți a fost realizată prin DLS. Așa cum se observă în Figura 7.3, AgNPs prezintă un diametru mediu de 51 nm în timp ce veziculele multilamulare MLV prezintă un diametru mediu mult mai mare, de 370 nm.

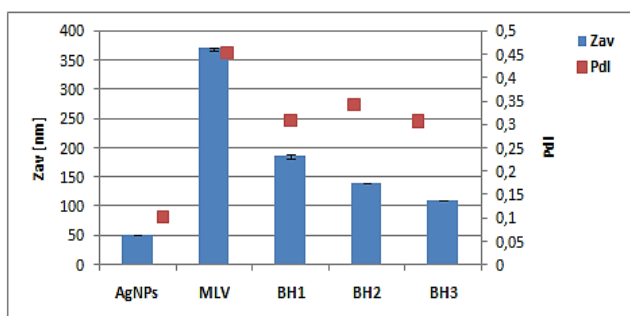


Figura 7.3. Analiza dimensională DLS a nanoparticulelor de AgNPs și a biohibridilor [135].

În urma încorporării AgNPs prin intermediul ultrasunetelor în MLVs s-a realizat o reorganizare a membranelor biomimetice, având ca rezultat trei nanocompozite lipo-nanoargint, cu următoarele dimensiuni:

- BH1: Z_{av} = 185 nm pentru C_{AgNPs} = 3,57 μg / mL,

Dezvoltarea de noi biohibridi pe bază de nanoparticule de argint și extracte din plante utilizând chimia verde

- BH2: $Z_{av} = 139$ nm pentru $C_{AgNPs} = 17,83$ $\mu\text{g} / \text{mL}$,
- BH3: $Z_{av} = 109$ nm pentru $C_{AgNPs} = 53,5$ $\mu\text{g} / \text{mL}$.

Aceasta secvență descrescătoare a dimensiunii nanoparticulelor ca urmare a creșterii proporției de AgNPs, confirmă încorporarea acestora în structurile lipozomale.

7.3.2 Evaluarea stabilității fizice a biohibridilor

Prin intermediul măsurării potențialului Zeta (ZP, mV), a fost evaluată stabilitatea fizică a compozitelor și ale componentelor acestora. Valorile potențialului Zeta furnizează informații referitoare la mobilitatea electroforetică a particulelor din câmpul electric aplicat probelor supuse analizei. Potențialul Zeta reprezintă un indicator al mărimii interacțiunilor dintre particule; valoarea acestuia fiind în legătură directă cu sarcina electrică a particulelor. Rezultatele determinărilor sunt prezentate în Figura 7.5. Se constată că toate probele studiate sunt încărcate negativ, particulele tind să se respingă reciproc asigurând astfel stabilitatea sistemului coloidal.

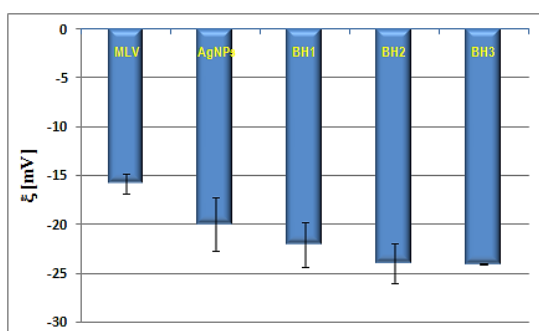


Figura 7.5. Evaluarea comparativă a stabilității fizice (Zeta potențial, mV) a biohibridilor (BH1, BH2, BH3) obținuți versus lipozomi (MLV) și AgNPs [135].

În Figura 7.5 se poate observa creșterea stabilității fizice a nanoparticulelor de argint biosintetizate o dată cu încorporarea acestora în sistemele biomimetice. Valorile potențialului Zeta prezintă o ușoară creștere odată cu creșterea conținutului de AgNPs: $ZP_{AgNPs} = -20$ [mV]; $ZP_{BH1} = -22,1$ [mV]; $ZP_{BH2} = -24$ [mV] și $ZP_{BH3} = -24,1$ [mV].

7.4. Evaluarea proprietăților antioxidante

Evaluarea activității antioxidante a biohibridilor lipo-nanoargint a fost realizată utilizând tehnica chemiluminescenței. În Figura 7.6 sunt prezentate rezultatele determinărilor privind activitatea antioxidantă a biocompozitelor obținute și a componentelor acestora.

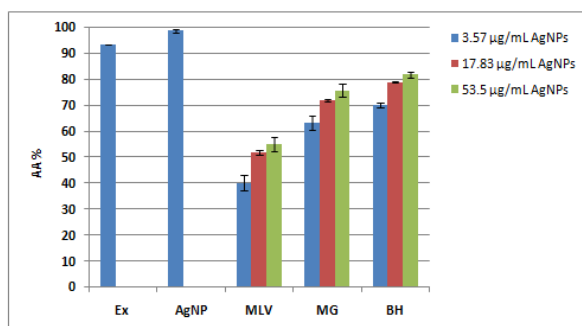


Figura 7.6. Activitatea antioxidantă a biocompozitelor obținute și a componentelor acestora [135].

Se constată că extractul apos de *Artemisia abrotanum* prezintă o puternică activitate antioxidantă (AA = 93,24 %), aceasta datorită conținutului ridicat de polifenoli, flavonoide (glicozilați și agliconi), flavonoli, derivați hidroxicinamici, artemisin prezenți în plantă [171], însă

AgNPs fitogenerate prin intermediul plantei *Artemisia abrotanum* au prezentat activitate antioxidantă amplificată (AA = 98,63%). Deoarece structurile lipozomale simple (MLV) au prezentat o activitate antioxidantă relativ scăzută (AA între 40 și 50 %), aceasta a contribuit la diminuarea activității antioxidante a AgNPs biosintetizate. Astfel, se constată că biohibrizii (BH) obținuți au prezentat o activitate antioxidantă intermediară (AA între 70 și 82%), în timp ce suspensiile diluate ale AgNPs (MG), au prezentat un nivel mediu bun (AA de 63,24 și 75,75%).

Din rezultatele obținute, s-a constatat că activitatea antioxidantă a biohibrizilor a crescut o dată cu conținutul de AgNPs.

7.5. Concluzii parțiale

1. S-a realizat obținerea de biohibrizi pe bază AgNPs și lipozomi.
2. Dimensiunea AgNPs obținute a fost în medie de 51 nm, iar biohibrizii obținuți au prezentat un diametru mediu de 370 nm și stabilitate fizică bună ($ZP_{AgNPs} = -20$ mV, $ZP_{BH1} = -2,1$ mV, $ZP_{BH2} = -24$ mV și $ZP_{BH3} = -24,1$ mV), în funcție de proporția de AgNPs. La o concentrație de 53,5 $\mu\text{g/mL}$ AgNPs biohibrizii (BH3) au prezentat o stabilitate fizică bună $ZP = -24,1$ mV, cea mai mică dimensiune $Z_{av} = 109$ nm și o activitate antioxidantă ridicată (AA = 82%).
3. Biocompozitele generate din extractul apos din *A. abrotanum* prezintă proprietăți antioxidante ridicate (AA = 70-82%).

Capitolul 8

BIOHIBRIZI CU PROPRIETĂȚI ANTIOXIDANTE PREPARAȚI DIN EXTRACT APOS DE BRUSTURE (*Arctium lappa*)

În acest capitol al tezei de doctorat este prezentată o strategie „verde” de jos în sus (engl. *botton-up*) pentru realizarea sistemelor de eliberare de antioxidanți pe bază de vitamină C, membrane biomimetice (lipozomi) și nanoparticule de argint fitogenerate prin intermediul extractului de Brusture (*Arctium lappa*). Brusturele (Figura 5.A) este o plantă uzuală, cunoscută și utilizată pe scară largă în tratamentul hepatitei, aterosclerozei, hipertensiunii arteriale, a bolilor geriatrice, datorită conținutului polifenolic cu proprietăți antioxidante [187]. Această plantă sălbatică a fost aleasă datorită bio-activităților sale valoroase și eficacității terapeutice, precum și din motive economice, ținând cont că brusturele este una dintre cele mai răspândite plante din România.

Activitatea antioxidantă a compozitelor bio-dezvoltate în studiul de față a fost estimată prin testul de chemiluminescență, test rapid de evaluare a capacității de a capta radicalii liberi de viață scurtă [195, 196]. Noutatea studiului nostru constă în încorporarea AgNPs fitogenerați din brusture în lipozomi cu vitamina C, care le crește acestora bioactivitatea și stabilitatea. Biocompozitele dezvoltate pot servi ca „elemente de construcție” pentru dezvoltarea de noi materiale bio-active cu un potențial ridicat de aplicabilitate în domeniul bio-medical. Vitamina C sau acidul ascorbic este o moleculă antioxidantă care împiedică și elimină formarea speciilor reactive de oxigen [197], în timp ce încorporarea sa în lipozomi îmbunătățește semnificativ proprietățile și aplicațiile lor [198]. Biocompozitele pe bază de argint dezvoltate în studiul de față, au fost caracterizate prin spectroscopie de absorbție în UV-Vis și DLS; stabilitatea lor fizică a fost estimată prin măsurarea potențialului Zeta, iar proprietățile antioxidante prin tehnica chemiluminescenței. Prezența nanoparticulelor de argint și a vitaminei C în biocompozite a fost demonstrată prin spectre de absorbție în UV-Vis.

8.1. Obținerea de biohibrizi pe bază de AgNPs, lipozomi și vitamină C

În acest studiu au fost concepute pentru prima dată compozite biohibride, formate din lipozomi, vitamina C și AgNPs sintetizate din extract apos de brusture, cu două rapoarte de AgNPs: lipozomi. Biocompozitele au fost preparate prin iradiere cu ultrasunete (15 minute cu pauze, pe baie cu ultrasunete Elmasonic S60H) dintr-un amestec conținând AgNPs (nS) obținute din brusture și lipozomi (L sau LC) într-un raport volumetric de 1 : 1 și 2 : 1, rezultând 4 tipuri de compozite: nSL1, nSL2, nSLC1 și nSLC2 (Tabel 8.1).

Este cunoscut că lipozomii conferă stabilitate și protecție componentelor din biocompozite: AgNPs și vitamina C. Marsanasco și colab. au evidențiat rolul protector al lipozomilor ca vehicule pentru vitaminele E și C [199].

Tabel 8.1 Abrevierile eșantioanelor obținute [138].

PROBĂ	COD
Extract de Brusture	BE
Nanoparticule de argint (AgNPs) fitogenerate din frunze de brusture	nS
Lecitină din soia MLVs	L
Lecitină din soia – vitamina C	LC
Biohibrizi Lipozomi AgNPs (1:1, v/v)	nSL1
Biohibrizi Lipozomi/AgNPs (1:2, v/v)	nSL2
Biohibrizi Lipozomi – vitamina C/AgNPs (1:1, v/v)	nSLC1
Biohibrizi Lipozomi – vitamina C/AgNPs (1:2, v/v)	nSLC2

În studiile anterioare realizate de Bărbînta-Pătrașcu și colab., au fost prezentate imagini TEM care au arătat că nanoparticulele de argint sunt acoperite cu lipozomi [178] și ar putea fi localizate atât în mediul inter-vezicular, cât și în structurile multilamelare veziculare [200].

8.2. Monitorizarea spectrală a compozitelor pe bază de argint

Spectroscopia de absorbție în UV-Vis și măsurători DLS au fost utilizate pentru a demonstra formarea nanoparticulelor de argint și a sistemelor compozite pe bază de argint.

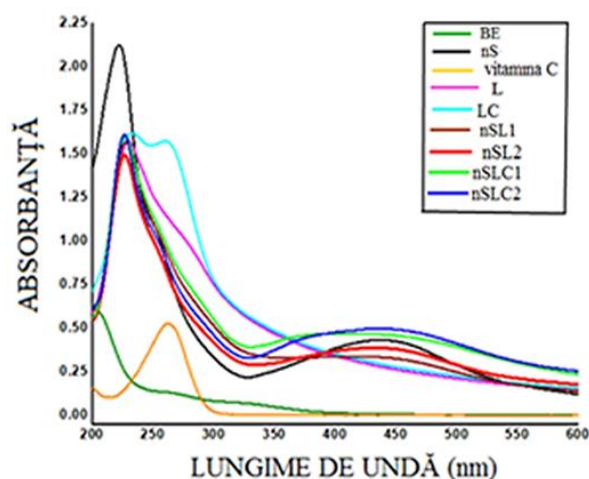


Figura 8.1. Compararea spectrelor de absorbție în UV-Vis ale eșantioanelor obținute [138].

Spectrul de absorbție în UV-Vis a AgNPs „verde” sintetizate din frunzele de *Arctium lappa* (proba nS din Figura 8.1) a prezentat o bandă SPR intensă, situată la lungimea de undă de 437 nm,

inexistentă la extractul de plantă BE, care apare după adăugarea extractului de brusture în soluție de AgNO_3 1 mM, demonstrând astfel biosinteza nanoparticulelor de argint.

Banda caracteristică vitaminei C situată la 263 nm a fost deplasată hipsocrom, la 259 nm, în spectrul de absorbție al lipozomilor care au încorporat vitamina C, (LC).

Prezența vitaminei C și a AgNPs în compozitele biohibride pe bază de lipozomi a fost demonstrată prin prezența „amprentelor spectrale” în spectrele de absorbție UV-Vis, precum și prin „modificările” acestor amprente spectrale.

Astfel, amprenta spectrală a AgNPs în biocompozitele pe bază de argint a fost deplasată hipsocromă, de la 437 nm (pentru nS) la 409 nm pentru nSL1, 431 nm pentru nSL2, 417,5 nm pentru nSLC1 și 435 nm pentru nSLC2, confirmând astfel sinteza biohibridilor. Aceste modificări în poziția și intensitatea benzilor de absorbție SPR sunt mai pronunțate pentru eșantioanele nSL1 și nSLC1, cu lipozomi : AgNPs în raport de 1: 1 (v / v) în comparație cu eșantioanele cu raport 1: 2 (v / v). Pe de altă parte, s-a putut observa că spectrele de absorbție ale compozitelor care conțin acid ascorbic prezintă o ușoară deplasare către regiunea spectrală UV. Acest comportament diferit ar putea fi explicat printr-o organizare structurală diferită a biocompozitelor încărcate cu vitamina C.

Diametrul mediu al nanoparticulelor estimat prin măsurători DLS (Figura 8.2) a variat între 103 și 194,5nm. Dintre toate biocompozitele dezvoltate, cele care conțin Brusture – nanoparticule de argint și membrane bioinspirate încărcate cu vitamina C (1: 1, v / v) au prezentat cea mai mică dimensiune, cu un diametru mediu de $103 \text{ nm} \pm 4,25$.

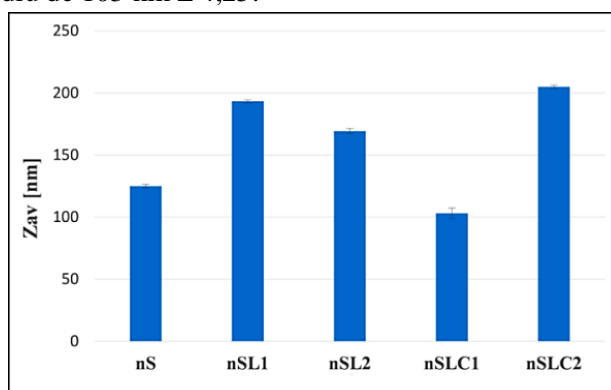


Figura 8.2. Valorile dimensiunii medii ale nano-biocompozitelor pe bază de argint [138].

8.3. Estimarea stabilității fizice a biohibridilor

Stabilitatea fizică a biohibridilor a fost estimată în termeni de potențial Zeta (ZP), pe baza mobilității electroforetice. Valoarea ZP este legată de sarcina electrică de la suprafața a particulelor.

Toate eșantioanele au prezentat o sarcină de suprafață negativă, ceea ce induce forțe repulsive între particule, asigurând stabilitate pe termen scurt pentru nanostructurile de argint ZP (nS) = -17 mV și lipozomi (ZP (L)) = -20,45 mV și o bună stabilitate pentru celelalte probe. Probele încărcate cu acid ascorbic au valori ZP mai negative, indicând o mai mare stabilitate (Figura 8.3).

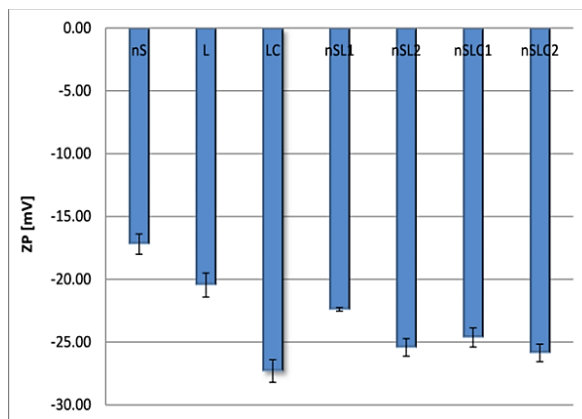


Figura 8.3. Valorile potențialului Zeta ale biocompozitelor preparate și ale componentelor acestora [138].

Astfel, adăugarea vitaminei C în formularea lipozomală a determinat o stabilitate mai bună în comparație cu lipozomii singuri: $ZP(LC) = -27,3$ mV; $ZP(L) = -20,45$ mV). De asemenea, adăugarea de vitamina C a condus la creșterea potențialului Zeta de la $|-22,4|$ [mV], la $|-24,63|$ [mV] pentru sistemele care conțin AgNPs și lipozomi într-un raport de 1:1 (v / v) și de la $|-25,43|$ [mV] până la $|-25,85|$ [mV] pentru sistemele care conțin AgNP și lipozomi într-un raport de 2:1(v / v). Combinarea membranelor biomimetice cu nanoparticule de argint generate din brusture (nS) a asigurat o îmbunătățire a stabilității fizice a nS. Aceste rezultate sunt în acord cu cercetări anterioare [173, 178].

8.4 Determinarea proprietăților biologice

8.4.1 Evidențierea activității antioxidante prin metoda chemiluminescenței

Proprietățile antioxidante ale eșantioanelor au fost verificate prin tehnica chemiluminescenței. Valorile activității antioxidante *in vitro* (AA%) au fost realizate în triplicat. Rezultatele determinărilor sunt prezentate în Figura 8.4.

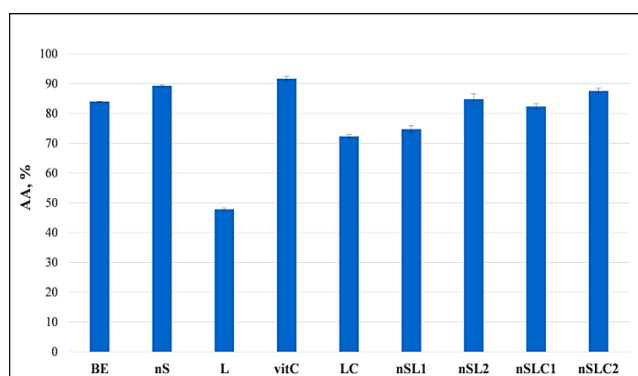


Figura 8.4. Activitatea antioxidantă a bio-nanosistemelor pe bază de argint obținute din extract de frunze de *A. lappa* [138].

Nanoparticulele de argint sintetizate „verde”, nS, au prezentat o valoare ridicată a activității antioxidante de 89,3% în comparație cu extractul vegetal singur (83%), această amplificare fiind determinată de dimensiunea la nano-scală a nanoparticulelor metalice, care oferă o creștere a suprafeței totale, oferind multe centre de reacție pentru captarea radicalilor liberi [173]. Această îmbunătățire a valorii AA% a fost evidențiată și în studiile anterioare [173, 178].

În schimb, formulările lipozomale cu vitamina C au arătat o valoare AA% ceva mai redusă, de 72,3%, dar mai mare decât cea a lipozomilor singuri (AA% = 47,8%).

Dezvoltarea de noi biohibridi pe bază de nanoparticule de argint și extracte din plante utilizând chimia verde

Prezența acidului ascorbic a dat naștere la sisteme biohibride cu activități antioxidante îmbunătățite (83% pentru nSLC1 și 88% pentru nSLC2) în comparație cu lipozomii fără vitamina C (75% pentru nSL1 și 85% pentru nSL2).

Chiar și în urma diluării de 1-5 sau 2 ori în veziculele lipidice, nanoparticulele de argint bio-generate din brusture au prezentat o activitate antioxidantă ridicată. Totodată, valorile AA% ale biohibridilor pe bază de argint conținând vitamina C, dezvoltate în acest studiu, sunt mai mari decât pentru biocompozite nanoargint/lecitină obținute din *Geranium* (72%, [194]) și salvie (86,5%, [175]).

Potențialul antioxidant al nanoparticulelor generate din brusture este conferit de prezența biocomponenților antioxidanți existenți în compoziția frunzelor acestei plante, derivați ai flavonei, cum sunt: rutin, quercetina, luteolina, crocinul și cianina și acizii polifenol carboxilici, cum sunt, acidul clorogenic și cafeic [187, 201].

8.5. Concluzii parțiale

Membranele celulare artificiale și nanoparticulele fitogenice de argint generate din extractul apos de *Arctium lappa* au fost utilizate pentru proiectarea „de jos în sus” a sistemelor biogenice antioxidante cu și fără vitamina C.

Spectrele de absorbție UV-Vis au demonstrat formarea nanoparticulelor de argint generate din brusture și a compozitelor lor cu membrane lipidice bio-inspirate încărcate sau nu cu acid ascorbic.

Tehnica DLS a demonstrat dimensiunea nano-scalară a sistemelor biohibride dezvoltate pe bază de argint.

Deplasările amprentelor spectrale ale nanoparticulelor de argint sintetizate „verde” și vitaminei C în spectrele de absorbție UV-Vis ale biocompozitelor pe bază de lipozomi au dovedit prezența AgNPs și a vitaminei C în biohibridii obținuți.

Adăugarea de vitamina C în biocompozite a îmbunătățit proprietățile materialelor obținute. Astfel, sistemele pe bază de nanoparticule de argint care conțin vitamina C sunt mai stabile decât sistemele încărcate cu argint fără vitamina C, astfel încât sistemele biohibride care conțin vitamina C au prezentat o stabilitate fizică sporită în comparație cu sistemele fără vitamina C (creșterea a fost de 33,5% pentru preparatul numai cu lipozomi, 10% pentru biocompozite cu raport lipozomi: AgNPs de 1: 1, v/v și 1,7% pentru biocompozite cu raport lipozomi: AgNPs de 1: 2, v/v). În plus, inserarea vitaminei C în compozitele pe bază de argint obținute din brusture a îmbunătățit semnificativ eficiența antioxidantă a acestor compozite.

Componentele lipozomale ale biocompozitelor dezvoltate în studiul nostru au asigurat o îmbunătățire a stabilității nanoparticulelor de argint sintetizate „verde”.

Aceste materiale dezvoltate ar putea fi aplicate în domeniul biomedical dermatologic prin reducerea acțiunii radicalilor liberi la nivelul epidermei și ca adjuvanți în tratamentul bolilor asociate stresului oxidativ.

Capitolul 9

NANOMATERIALE BIO-ACTIVE FITO-GENERATE DIN BURUIANA DE CÂMP, PĂLĂMIDĂ (*Cirsium arvense*)

Nevoia de a proiecta noi strategii „verzi” pentru aplicații biomedicale și biofotonice a generat o largă deschidere către domeniul tehnologiilor emergente în ultimele decenii [189, 192, 202, 203, 204].

Acest studiu prezintă un concept inovator de materiale bio-actieve care conțin pectină din lămâie și nanoparticule de argint (AgNPs) fito-sintetizate din extracte apoase naturale de frunze de Pălămidă (*Cirsium arvense*). Această alegere este motivată de recunoașterea proprietăților plantei, a pectinei și a AgNPs, în tratamentul multor boli, în cele cu rezistență la antibiotice, atunci când multe antibiotice sintetice disponibile în comerț devin mai puțin eficiente împotriva diverselor boli umane [205].

Cirsium arvense (Figura 9.1) cunoscută și sub numele de ciulin este o plantă medicinală, erbacee perenă, din familia *Asteracea*, adesea găsită ca buruieni nocive în pajiști și zone riverane [206]. Este răspândită în Europa și în unele zone din Africa de Nord și Asia sub formă de colonii [207].

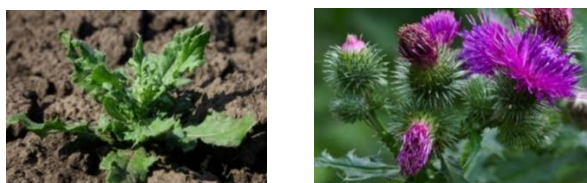


Figura 9.1. Fotografii ale plantei Pălămidă (*Cirsium arvense*) [208].

În medicina populară, aplicațiile terapeutice ale pălămidei, includ tratamentul ulcerului peptic, metroragiei, sifilisului, leucemiei, diabetului, infecțiilor oculare, afecțiunilor pielii, gonoreei, tuberculozei și ale unor afecțiuni bucale [206]. Diferitele utilizări medicale atribuite speciilor de *C. arvense* îi determină pe cercetători să obțină extracte și compuși (metaboliți secundari bioactivi și uleiuri esențiale) din această plantă. Astfel, potențialul terapeutic semnificativ al *Cirsium arvense* se bazează pe conținutul ridicat de compuși flavonoizi, de linarină (5,7-dihidroxi-4-metoxiflavon, 7-O- (0- α -L-rhamnopiranozil- β -D-glucopiranozid) din frunze, 3-O-metil kaempferol, luteolin, apigenin, cosmozin și acid acacetin 7- β -D-glucopiranozid uronic din flori [202].

Pectina, extrasă din coajă de lămâie, este un polizaharid eterogen cu diferite activități biologice. Utilizarea și valorificarea coajilor de citrice a făcut obiectul diferitelor cercetări ca sursă potențială de antioxidanți naturali și compuși fenolici. S-a raportat că pectina a scăzut nivelul lipidelor din sânge și statutul peroxidativ, și a prezentat activități antioxidante în toxicitatea renală indusă de octilfenol [213]. Proprietățile antibacteriene surprinzătoare (*in vitro*) ale pectinei, au fost raportate pentru prima dată de cercetătorii ruși la sfârșitul anilor 1990. Cu toate acestea, concluziile au rămas aproape ignorate până în a doua decadă a anilor 2000, când o serie de studii au început să raporteze noi cercetări pe bază de pectină, substanță cu activitate bactericidă ridicată [214].

9.1 Obținerea de nanomateriale bio-actieve fito-generate din ciulin, Pălămidă (*Cirsium arvense*)

Principalele etape pentru bio-proiectarea materialelor pe bază de frunze de Pălămidă (ciulin) sunt următoarele:

- i) Prepararea extractului de ciulin.
- ii) Prepararea, fito-mediată, a materialelor pe bază de argint.

Prezentarea detaliată a celor două etape de obținere a fito-nanoparticulelor de argint pe bază de frunze de ciulin face parte integrantă din Capitolul 4.

Tabelul 9.1 conține prezentarea sumară a codurilor prescurtate ale eșantioanelor dezvoltate în acest studiu.

Tabel 9.1. Prescurtările eșantioanelor elaborate în acest studiu [133].

Proble dezvoltate în acest studiu	Cod
Extract din frunze de ciulin	TST
Nanoparticule de argint fito-generate din extractul de ciulin	TST-AgNPs
Pectină izolată din cojile de lămâie	LP
Biohibridi pe bază de pectină de lămâie și de ciulin AgNPs	TST-AgNPs-LP

9.2 Monitorizare optică a bio-nanoparticulelor obținute pe bază de *Cirsium arvense*

După cum se poate constata în Figura 9.2 sunt prezente următoarele benzi de absorbție: între 206–219 nm - benzi atribuite carbohidraților și/sau legăturilor peptidice din proteine; între 256–282 nm - benzi atribuite resturilor de aminoacizi aromatici ale proteinelor și, de asemenea, carbohidraților [191, 215]; benzile între 315–327 nm atribuite flavonoidelor [216].

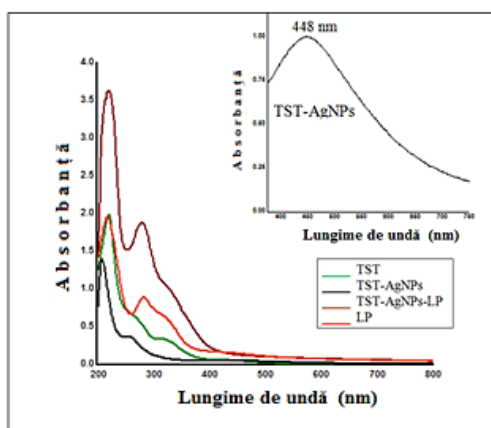


Figura 9.2. Spectrele de absorbție ale eșantioanelor obținute; Inserare: bandă SPR ale AgNPs obținute din *Cirsium arvense* [133].

Sinteza mediată de *Cirsium arvense* a AgNPs a fost demonstrată în primul rând prin apariția unei singure benzi SPR situată la 448 nm, așa cum se arată în inserția din Figura 9.2. Banda SPR prezentată este caracteristică pentru nanoparticulele de argint în formă sferică [217, 219].

9.3. Evaluarea stabilității materialelor acoperite cu pectină

Nanoparticulele pe bază de argint au sarcină negativă la suprafață, cuantificată prin măsurători ale potențialelor Zeta (Tabelul 9.2).

Tabelul 9.2. Valorile potențialului Zeta, Dimensiunea medie și Indicele de polidispersitate ale materialelor care conțin AgNPs obținute din *Cirsium arvense* [133].

Probe	ZP (mV)	Z _{av} (nm)	PdI
TST-AgNPs	-23.15±0.65	151.7±7.10	0.298±0.07
TST-AgNPs-LP	-11.03±0.33	276.7±11.42	0.401±0.08

(Rezultatele sunt raportate pe baza mediei ± SD.)

Astfel, TST-AgNPs obținute din *C. arvense* neacoperite au prezentat o stabilitate fizică moderată ($ZP_{TST-AgNPs} = -23,15$ mV) asigurată de forțele repulsive dintre particulele de argint purtătoare de grupări funcționale încărcate negativ (cum ar fi carboxilatul provenit din proteine, aminoacizi) aparținând agenților de acoperire de pe suprafața TST-AgNPs, așa cum s-a dovedit prin spectrele în UV-Vis (Figura 9.2).

După adăugarea pectinei la TST-AgNPs, valorile potențialului Zeta s-au deplasat către valori mai mici ($ZP_{TST-AgNPs-LP} = -11,03$ mV), deoarece moleculele mari de polizaharidă din pectină tind să se adsoarbă pe suprafața compozitului TST-AgNPs prin intermediul grupărilor $-COO^-$ și $-OH$, scăzând astfel valoarea ZP, fără a afecta însă proprietățile de stabilizare a bio-nanohibridului [163, 218].

9.4. Aspectele morfologice ale materialelor obținute din *Cirsium arvense*

Aspectele referitoare la dimensiunea și morfologia materialelor obținute din ciulin au fost monitorizate prin analize DLS și SEM.

Rezultatele DLS (Tabelul 9.2.) au relevat diametrul mediu de 151,7 nm pentru TST-AgNPs și de 276,7 pentru TST-AgNPs-LP. După adăugarea de pectină la AgNPs obținute din ciulin, dimensiunile au crescut și, de asemenea, indicele de polidispersitate (PdI) a crescut de la 0,298 la 0,401.

Micrografiile SEM ale nanoparticulelor „verzi” dezvoltate sunt prezentate în Figura 9.3. Imaginile corespund AgNPs obținute din ciulini, care nu sunt acoperite (figura 9.3a) și, respectiv, acoperite cu pectină (Figura 9.3b).

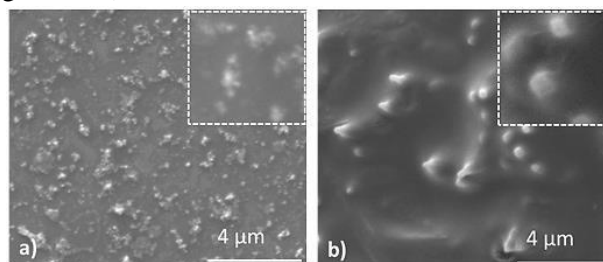


Figura 9.3. Imagini SEM ale AgNPs: **a)** obținute din ciulin (TST-AgNPs) și **b)** obținute din ciulin și AgNPs, acoperite cu pectină (TST-AgNPs-LP). Pe imaginile SEM de $2 \times 2 \mu m^2$ este inserată imaginea mostrei mărite [133].

Se poate observa că TST-AgNPs au prezentat particule mici cu diametre ~ 60 nm, care sunt organizate în grupuri de formă neregulată cu dimensiuni cuprinse între 200 și 400 nm. Cu toate acestea, când s-a adăugat pectină, particulele devin mai mari, cu diametre cuprinse între 200 și 400 nm și o formă mai rotundă.

Imaginile SEM sunt în acord cu rezultatele DLS și spectrele de absorbție în UV-Vis. Diferența dintre dimensiunile particulelor obținute prin măsurători DLS și SEM, ar putea fi explicată prin faptul că DLS oferă un diametru hidrodinamic mediu, dat de diametrul particulei + grosimea stratului dublu, care este ceva mai mare decât diametrul fizic al particulelor [219].

9.5. Evaluarea acțiunii biologice a materialelor obținute din *Cirsium arvense*

Profilul antioxidant al materialelor dezvoltate pe bază de *C. arvense* este ilustrat în Figura 9.4.

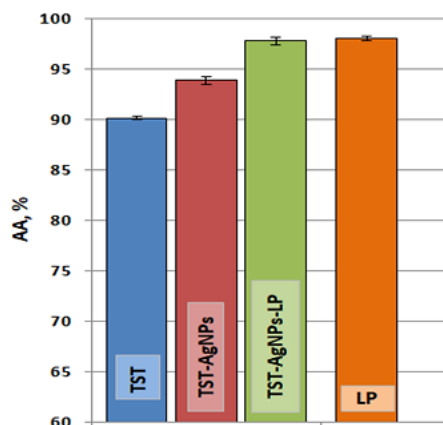


Figura 9.4. Activitatea antioxidantă a materialelor pe bază de *Cirsium arvense* și a biocomponentelor acestora (Datele sunt prezentate ca valori medii \pm SD) [133].

TST-AgNPs au prezentat proprietăți antioxidante puternice (AA = 93,85 %) în comparație cu extractul vegetal, TST (AA = 90,10 %), acest comportament generat de fito nanoparticulele de argint fiind demonstrat de studii anterioare [164, 169, 176]. Adăugarea de pectină a dus la formarea de biohibridi (TST-AgNPs-LP) cu activitate antioxidantă superioară (AA = 97,75%).

Rezultatele obținute la testul de susceptibilitate antimicrobiană a materialului *Cirsium arvense*-nanoargint (TST-AgNPs-LP) pe microorganism au arătat MBC de 100 μ g/mL împotriva bacteriei *Escherichia coli*. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 9.3.

Tabel 9.3. Sensibilitatea antimicrobiană a microorganismului *E. coli*, la biohibridul pe bază de pectină [133].

Concentrație probă (TST-AgNPs-LP μ g/mL), MBC-uri	<i>Escherichia coli</i>											
	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.195
TST-AgNPs-LP	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Cheie: R - rezistent; S - Susceptibil / Sensibilitate

Activitatea anti-bacteriană a eșantioanelor obținute din *C. arvense* a fost evaluată printr-o metodă cu plăci Petri utilizată curent, prezentată în Capitolul 4.

Aceste rezultate oferă o indicație asupra comportamentului compozitului obținut bioargint-nanohibrid (TST-AgNPs-LP) ce a manifestat un efect antibacterian suficient de bun.

De remarcat este faptul că, în eșantioanele fără AgNPs, s-a observat o creștere mai accentuată a microorganismului *Escherichia coli* (> 550 CFU / mL față de <90 CFU/mL pentru proba tratată).

De asemenea, în Tabelul 9.4 sunt prezentate și rezultatele sensibilității nanoparticulelor de argint, valoarea Z, la o concentrație de 100 μ g/mL de nanoparticule de argint. Acestea au fost calculate cu ecuația specifică prezentată în Capitolul 4.

Tabelul 9.4. Unitățile formatoare de colonii ale *E. coli*, raportul bactericid și constanta de sensibilitate (Z) pentru eșantioanele obținute din *Cirsium arvense*[133].

Cod probe	CFU, <i>E. coli</i>	Raportul bactericid (%)	Z (mL/ μ g)
TST	656 \pm 3.2	NBR	NBR
TST-AgNPs	97 \pm 2.1	85	0.01911
TST-AgNPs-LP	85 \pm 3.5	87	0.0204

* NBR - Fără raport bactericid

Capacitatea antioxidantă puternică și acțiunea anti-bacteriană a biohibridilor TST-AgNPs-LP ar putea fi atribuite compoziției acestora, care include: moleculele existente în extractul din frunzele de ciulin, *Cirsium* - nanoargint și moleculele existente în pectina de lămâie. Mai mult decât atât, pectina este un polizaharid cu proprietăți antioxidante și anti-bacteriene [190, 191, 220], care facilitează adeziunea la membrana bacteriană, determinând modificări structurale și îmbunătățind astfel, efectul agenților anti-bacterieni datorită acțiunii de promovare a eliberării acestora [163, 221-222].

9.6. Concluzii parțiale

1. Extractul vegetal din frunze de *Cirsium arvense* a fost utilizat pentru dezvoltarea „verde” a nanomaterialelor pe bază de AgNPs acoperite sau nu cu pectină de lămâie, cu proprietăți amplificate.

2. Așa cum au fost prezentate în investigațiile SEM, nanoparticulele de argint obținute sunt relativ mici, cu diametre sub 100 nm, în timp ce, după adăugarea pectinei, se produce o mărire a dimensiunii nanoparticulelor, acestea având diametre de peste 100 nm.

3. Rezultatele au arătat că nanomaterialele bio-active, fito-generate din frunze de *Cirsium arvense*, conțin ingrediente active împotriva bacteriei *E. coli*. Rezultatele obținute la testul de sensibilitate anti-bacteriană ale biocompusului *Cirsium* – nanoargint, prezintă activitate anti-bacteriană împotriva *Escherichia coli*, la o concentrație de 100 μg / mL.

4. S-a constatat că nanomaterialele bio-active fito-generate din frunze de ciulin (*Cirsium arvense*) au un potențial amplificat de eliminare a radicalilor liberi de viață scurtă, având valori ridicate ale activității antioxidante (90-98%).

5. Rezultatele noastre sunt promițătoare, biomaterialele obținute ar putea fi utilizate în aplicații biomedicale, ca agenți anti-bacterieni sau antioxidanți. Pe de altă parte, spectrele de absorbție în UV-Vis au arătat că materialele dezvoltate din *Cirsium arvense* absorb radiația din domeniul vizibil, deci pot fi buni candidați pentru aplicații biofotonice.

II. CONCLUZII

C.1 CONCLUZII GENERALE

Obiectivele lucrării au fost concretizate prin obținerea de rezultate originale ca urmare a cercetărilor realizate și prezentate sintetic în continuare.

- ✓ Studierea a 15 de plante, din flora autohtonă și internațională, din punct de vedere al caracteristicilor generale, al prezenței unor constituenți fitochimici și al efectelor acestora, menționate în literatura de specialitate. Dintre plantele studiate un număr de 6 (*Salvia sclarea*, *Arctium lappa*, *Artemisia abrotanum*, *Asparagus officinalis*, *Cirsium arvense*, *Harpagophytum procumbens*) au fost selectate pentru fito-generarea nanoparticulelor de argint și obținerea de bio-nanocompozite și bio-nanohibridi pe baza acestor AgNPs.
- ✓ S-a analizat capacitatea tuturor plantelor luate în studiu, de a sintetiza nanoparticule de argint, constatându-se un raport volumetric optim, extract vegetal: $\text{AgNO}_3 (\text{aq}, 1 \text{ mM}) = 1:100 (\text{mL/mL})$.
- ✓ Au fost realizate următoarele nano-sisteme: 12 suspensii de fito-generate prin intermediul celor 6 plante utilizate; 3 tipuri de bio-nanohibridi (BH1, BH2, BH3) alcătuiți din membrane lipidice biomimetice (MLV), marcate cu clorofilă *a* (Chl*a*) și nanoparticule de argint fito-sintetizate prin intermediul extractului vegetal de *Artemisia abrotanum*; 4 tipuri de bio-nanohibridi (nSL1, nSL2, nSLC1, nSLC2) formați din lipozomi, vitamina C și nanoparticule de argint fitogenic din extract apos de *Arctium lappa* și bio-nanohibridi pe bază de pectină de lămâie și nanoparticule de argint fitogenerate din extract apos de *Cirsium arvense* (TST-AgNPs-LP).

- ✓ Realizarea, analizarea unui număr total de 37 eșantioane, care în funcție de tipul acestora, au fost caracterizate prin: tehnici spectrale utilizând spectroscopia de absorbție în UV-Vis, fluorescență, prin măsurători ale dispersiei dinamice a lumini (DLS), urmate de monitorizarea dimensiunii și a morfologiei nanomaterialelor prin analize SEM și evaluarea stabilității fizice a fito-nanoparticulelor de argint, a bio-nanocompozitelor și a bio-nanohibridilor obținuți, evaluarea activității antioxidante prin metoda chemiluminescenței și prin metoda ABTS, evaluarea activității antimicrobiene/antibacteriene (calitativă și cantitativă) față de microorganismul *Escherichia coli* a produselor realizate.
- ✓ Fito-nanosistemele obținute au prezentat bandă de rezonanță plasmonică de suprafață (SPR) specifică sintezei nanoparticulelor de argint, localizată la 438 nm pentru nanoparticulele de argint fitosintetizate prin intermediul extractului de *Arctium lappa* (AgNPs-Br) și banda SPR pentru AgNPs fito-generate prin intermediul extractului de *Artemisia abrotanum* (AgNPs-LD) situată la 467 nm; celelalte preparate realizate au prezentat bandă SPR la 448 nm pentru AgNPs-TST, 449 nm pentru AgNPs-He, 452 nm pentru AgNPs – ISI și 454 nm pentru AgNPs-Asp. Bio-nanohibridii obținuți au prezentat bandă SPR specifică, în funcție de biocompușii prezenți în structura lor.
- ✓ Bio-nanohibridii obținuți prin intermediul extractului de *Artemisia abrotanum*, alcătuiți din membrane biomimetice lipozomale (MLV) marcate cu clorofila *a* (Chl a) și AgNPs (BH1, BH2, BH3) au prezentat amprenta spectrală caracteristică bioporfirinei Chl a la 668 nm, 667 nm, respectiv 663 nm.
- ✓ Dintre toate cele 6 plante studiate pentru fitogenerarea AgNPs, de remarcat este faptul că, prin intermediul extractului de Lemnul Domnului au fost fito-sintetizate AgNPs cu cel mai mic diametru mediu ($Z_{av} = 51$ nm), iar prin intermediul extractului vegetal de Pălămidă au fost fito-sintetizate AgNPs cu cel mai mare diametru mediu ($Z_{av} = 151,7$).
- ✓ Pentru fitosintezele nanoparticulelor de argint aplicarea procedurii de ultrasonare determină micșorarea diametrului mediu al acestora.
- ✓ AgNPs obținute prin intermediul extractelor de plantă *Salvia sclarea*, *Arctium lappa*, *Artemisia abrotanum*, *Asparagus officinalis* au prezentat o bună stabilitate fizică, cu valori între: ξ (AgNP-Asp) = $-22,00 \pm 0,50$ mV și ξ (AgNP-ISI) = $-24,00 \pm 1,20$ mV și o stabilitate fizică moderată $\xi = -17,20 \pm 1,42$ mV, pentru AgNPs fitosintetizate prin intermediul extractului de *A. lappa*.
- ✓ Toate AgNPs fitosintetizate prin intermediul extractelor vegetale, care au fost selectate pentru aceste cercetări au prezentat o activitate antioxidantă mai ridicată față de cea a extractului vegetal singur.
- ✓ Studiile realizate și prezentate în această lucrare au evidențiat aspecte distincte, specifice fiecărei plante și a produselor obținute:
 - Rezultatele obținute în caracterizarea AgNPs fitogenerate din extract de *Artemisia abrotanum* și a bio-nanocompozitelor (AgNPs fitogenerate din frunze de *Cirsium arvense* și pectină din lămâie), ne fac să credem că acestea ar putea fi utilizate cu succes în formulări fitoterapeutice destinate reducerii tulburărilor date de prezența radicalilor liberi, a stresului oxidativ cotidian și/sau organic, al xenobioticelor și cosmetice cu tropism dermic.
 - Datorită proprietăților constatate, bio-nanohibridii obținuți din AgNPs fitogenerate din extract de *A. abrotanum* și membrane biomimetice lipozomale (MLV), credem că ar putea fi înglobați noi formulări de tip transportor cu proprietăți protectoare, antioxidante.
 - Activitate antibacteriană față *E.coli* a AgNPs fitosintetizate din *Asparagus officinalis* și a bio-nanohibridii formați din AgNPs-TST și pectină din lămâie, recarată în aceste studii, ne face să credem că acestea ar putea fi utile în rețete de produse destinate prevenirii

infecțiilor microbiene specific, în ameliorarea unor afecțiuni uro-genitale, în produse de îngrijirea pielii.

- AgNPs-Br au prezentat o bună activitate antioxidantă, peste 80%, față de radicalii liberi de viață scurtă și peste 45% față de radicalii liberi de viață lungă, ceea ce ne sugerează că nanoparticulele obținute ar determina importante efecte antioxidante în tulburări generate de stresul oxidativ cum sunt cele din afecțiunile neoplazice, inflamatorii, bacteriene, afecțiuni dermatologice, geriatrie.
- Nanoformulările AgNPs-Brusture–lipozomi–vitamina C, datorită proprietăților constatate, credem că ar putea fi utilizate în formulări ce vizează: reducerea proceselor inflamatorii, protecția și buna funcționare a celulei hepatice, reducerea tulburărilor date de stresul oxidativ; ar putea fi utile în realizarea de noi formulări nanostructurate, cu elemente hidro și liopofile (vitamina A, E, D ș.a.). destinate reconstrucției dermului, a epidermei.

Aspectele de noutate în domeniul cercetării ce se desprind din această lucrare sunt date de nanoformulările noi realizate din AgNPs fitogenerate, lipozomi, vitamina C și pectină, precum și de avantajele date de proprietățile bio-nanohibridilor obținuți.

C.2 CONTRIBUȚII ORIGINALE

Contribuțiile originale aduse prin studiile de cercetare, prezentate în teza de doctorat cu titlul: „**Dezvoltarea de noi biohibridi pe bază de nanoparticule de argint și extracte din plante utilizând chimia verde**” pot fi sintetizate astfel:

- Extinderea paletei plantelor ce pot fi utilizate în fitosinteza nanoparticulelor de argint și evidențierea calităților fiecărei plante utilizate în acest sens, menționându-se faptul că în literatura de specialitate nu au fost întâlnite studii de utilizare a celor 6 plante selectate pentru fito-nanosinteza particulelor de argint și încorporarea ulterioară a acestora în bio-nanohibridi formați din membrane biomimetice, vitamina C, pectină.
- Evidențierea faptului că fiecare plantă luată în studiu, prezintă capacități diferite de sinteză a AgNPs de diferite dimensiuni și grade de stabilitate.
- Valorificarea materialelor vegetale și a extractelor vegetale în domeniul nanotehnologiei pentru obținerea de noi bio-nanohibridi, constituiți din AgNPs fitogenerate, membrane biomimetice, vitamina C și pectină, cu proprietăți antioxidante și antibacteriene dovedite, reprezintă o noutate în domeniul bio-nanotehnologiei.
- Obținerea de fito-nanocompozite și bio-nanohibridi cu proprietăți antioxidante mult îmbunătățite față de constituenții nanoformulărilor luați separat.
- Utilizarea extractelor vegetale în sinteza nanoparticulelor de argint a dus la obținerea de produse noi cu proprietăți antibacteriene crescute față de microorganismul *Escherichia coli*.
- Se constată dezvoltarea proprietăților antimicrobiene la nanoformulările obținute prin intermediul fito-extractelor, proprietăți care nu se regăsesc a fi prezente la extractul vegetal.

C.3 PERSPECTIVE DE DEZVOLTARE ULTERIOARĂ

Perspectivile dezvoltării ulterioare pot fi rezumate astfel:

- Aprofundarea cercetărilor realizate prin continuarea de determinări specifice, utilizarea spectroscopie în UV-Vis, FT-IR, a microscopiei (TEM, SEM, AFM), determinări ale unor activități biologice (anti-inflamatoare, anticancerigene, antitumorale, etc.) în scopul evidențierii și altor proprietăți specifice bio-nanohibridilor dezvoltați sau similari.

- Realizarea de noi formulări bio-nanohibride pe bază de sisteme bio-active ce ar putea fi formate din AgNPs, AuNPs fito-nanosintetizate, compuși polizaharidici de tipul pectinei, vitamine (A, C, D, E), structuri proteice, acizi nucleici, urmărindu-se dezvoltarea și evidențierea de proprietăți terapeutice, bio-medicale noi (antioxidante, anti-inflamatoare, antitumorale, anticancerigene, cicatrizante, anti-îmbătrânire, etc.) sau îmbunătățirea celor deja cunoscute.
- Evidențierea bio-nanohibridilor lipidici obținuți, ca transportori pentru diferite substanțe cu rol terapeutic sau ca membrane ori filme subțiri pentru aplicații în dispozitive optoelectronice sau biofotonice.
- Dezvoltarea de noi produse (cosmetice, fito-medicale, suplimente alimentare) în compoziția cărora să se regăsească unele dintre bio-nanostructurile realizate prin aceste cercetări, produse ce își propun să contribuie la: îmbunătățirea pe căi naturale a funcționării sistemului imunitar, prevenirea apariției diferitelor disfuncții ale organismului, menținerea integrității dermului și al epidermei, reducerea tulburărilor date de coli bacilli și, în special de *Eschericia coli*, și al celor date și de alți agenți patogeni, tonifierea funcțiilor organismului și îmbunătățirea stării generale a acestuia.

ANEXE

A. LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE ÎN DOMENIUL TEZEI DE DOCTORAT

1. M. E. Barbinta-Patrascu, N. Badea, C. Ungureanu, **D. Besliu**, S. Antohe, Bioactive phyto-nanosilver particles “green” synthesized from Clary Sage, Burdock, Southernwood and Asparagus, *Rom. Rep. Phys.* 72(3), 606, **2020**; WOS:000562620700017; **IF = 2.147/ 2019**
 2. **D. Besliu**, M. E. Barbinta-Patrascu, N. Badea, I. Rau, A. Meghea, Lipo-nanosilver composites biogenerated using *Artemisia abrotanum L.* aqueous extract, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 694(1),40-48, **2020**; DOI: 10.1080/15421406.2020.1723895; WOS:000531061100004; **IF = 0.512/ 2019**
 3. M. E. Barbinta-Patrascu, **D. Besliu**, A. Meghea, Antioxidant silver-based biogenic systems generated from *Arctium lappa* leaves, *Revista de Chimie*, Volume: 71, Year: 2020, Issue: 4, <https://doi.org/10.37358/RC.20.4.8049>
 4. M. E. Barbinta-Patrascu, C. Ungureanu, **D. Beșliu**, A. Lazea-Stoyanova, L. Iosif, Bio-active nanomaterials phyto-generated from weed herb *Cirsium arvense*, *Optoelectronics and Advanced Materials-Rapid Communications* 14(7-10), 2020;**IF = 0.445/2019**
 5. **D. V. Beșliu**, Aurelia Meghea, Optimization of the silver nanoparticle synthesis method using *Harpagophytum procumbens* root extract, *U.P.B. Sci. Bull.*, 2021 (acceptat)
- FACTOR DE IMPACT CUMULAT: 2,147 + 0,512 + 0,445 = 3,104**

B. LISTA COMUNICARILOR IN PERIOADA DE STAGIULUI DE DOCTORAT

1. **D. Besliu**, M. E. Barbinta-Patrascu, N. Badea, I. Rau, A. Meghea, „Lipo-nanosilver composites biogenerated using *Artemisia abrotanum L.* aqueous extract”, *15th International Conference on Frontiers of Polymers and Advanced Materials (ICFPAM 2019)*, Penang, Malaysia, 17th – 21st June 2019.

Rezumatul tezei cuprinde capitolele 5-9 de contribuții originale. Numerotarea capitolelor, subcapitolelor și a tabelelor corespunde cu cea din teză. Sunt prezentate referințele bibliografice semnificative.

BIBLOGRAFIE SELECTIVĂ

- [1] D. Dobrescu, Ed. Universitară, București, 2015, ISBN 978-606-28-0201-1.
- [4] D.L. Gravens, H.W. Margraf, H.R. Butcher Jr, W.F. Ballinger, *Surgery*, 1973 Jan; 73(1):122-7.
- [7] R.E. Clark, H.W. Margraf, *Arch Surg.*, 1974, 109(2), 159-62.
- [18] P. Li, L. Sen, W. Yu, Z. Yu, G.Z. Han, *Eng. Aspacts*, 2017, 520, 26-31.
- [19] H. Gao, H. Yang, C. Wang, *Results in Physics*, 2017, 7, 3130–3136.
- [131] M.E. Barbinta-Patrascu, N. Badea, C. Ungureanu, **D. Besliu**, S. Antohe, *Romanian Reports in Physics*, 2020, 72, 606.
- [132] **D.V. Beșliu**, A. Meghea, *U.P.B. Sci. Bull.*, 2021 (acceptat)
- [133] M. E. Barbinta-Patrascu, C. Ungureanu, **D. Besliu**, A. Lazea-Stoyanova, L. Iosif, *Optoelectronics and Advanced Materials – Rapid Communications*, 2020, 14, 9-10, 459 – 465.
- [134] P. Ruano, L. L. Delgado, S. Picco, L. Villegas, F. Tonelli, M. E. A. Merlo, J. Rigau, D. Diaz, M. Masuelli, M. A. Masuelli (Ed.), p. 1-44, *Intech Open Book Series, Biochemistry vol. 6*, ed.M. Blumenberg, London, UK, 2020.
- [135] **D. Beșliu**, M.E. Barbinta-Patrascu, N. Badea, I. Rau, A. Meghea. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 2019, 1, 694.
- [137] M.E. Barbinta-Patrascu, C. Ungureanu, S. M. Iordache, A. M. Iordache, I. R. Bunghez, M. Ghiurea, N. Badea, R. C. Fierascu, *I. Mat. Sci. Eng. C*, 39, 2014, 177–185.
- [138] M.E. Barbinta-Patrascu, **D. Besliu**, A. Meghea. *Rev.Chim.*, 71(4), 2020, 111-118.
- [143] B. Berne, R. Pecora, Dover Publications Inc., Mineola, New York, (2000).
- [144] D. Jauregui-Gomez, O.M. Bermejo-Gallardo, E.D. Moreno-Medrano, M.G. Perez-Garcia, I. Ceja, V. Soto, F. Carvajal-Ramos, A. Gutierrez-Becerra, *Nanomater. Nanotechno.* 7, 2017, pp 1-6
- [157] D. Dorin, M. Gilca, L. Gaman, A. Vlad, L. Iosif, I.Stoian, O. Lupescu, *Nutrients*, **9**, 2017, 1-18.
- [164] M.E. Barbinta-Patrascu, C. Ungureanu, N. Badea, M. Bacalum, A.Lazea-Stoyanova, I. Zgura, C.Negrila, M. Enculescu, C. Burnei, *Coatings*, 10, 2020, 659.
- [167] M. Russell, T. Zedayko, C. Saliou, S. Tucker-Samaras, *J. Invest. Dermatol.* 131, 2011, 92.
- [179] M.E. Barbinta-Patrascu, N. Badea, M. Bacalum, C. Ungureanu, I. R. Suica-Bunghez, S. M. Iordache, C. Pirvu, I. Zgura, V. A. Maraloiu, *Mat. Sci. Eng. C* **101**, 120–137 (2019).
- [180] A. G. Ponce, R. Fritz, C. Del Valle, S. I. Roura, *LWT-Food Sci. Technol.* **36**(7), 679–684 (2003)
- [181] G. Serrano, P. Almodéver, J.M. Serrano, J. Milara, A. Torrens, I. Expósito, *J. Cortijo, Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*, 8, 2015, 591-599.
- [182] M.E. Barbinta-Patrascu, L. Tugulea, A. Meghea, *Rev. Chim.*, 60 (4), 2009, 337-341.
- [183] T. Stefanescu, C. Manole, C. Parvu, M.E. Barbinta-Patrascu, L. Tugulea, *Optoelectron. Adv. Mat.*, 4 (1), 2010, 33-38.
- [184] Barbinta-Patrascu, M. E., Badea, N., Iordache, S. M., Petrović, S. M., & Rau, I., *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 655, 2017, 87.
- [189] M.E. Barbinta-Patrascu, N. Badea, M. Bacalum, S. Antohe, *Rom.Rep.Phys.*, 72(1), 2020, 601.
- [192] M.E. Barbinta-Patrascu, N. Badea, M. Constantin, C. Ungureanu, C. Nichita, S.M. Iordache, A. Vlad, S. Antohe, *Rom. J. Phys.*, 63(5-6), 2018, 702.
- [193] M. Proks, F. Borcan, A. Cheveresan, I. Pinzaru, B.A. Guta, D. Coricovac, V. Paunescu, V. Lazureanu, *Mater. Plast.*, 55(4), 2018, 696-699.
- [196] M. Voicescu, C.L. Nistor, A. Meghea, *Lumin.*, 157, 2015, 243-248.
- [197] S.J. Padayatty, A. Katz, Y. Wang, P. Eck, O. Kwon, J.H. Lee, S. Chen, C. Corpe, A. Dutta, S.K. Dutta, M. Levine, *J. Am. Coll. Nutr.*, 22(1), 2003, 18-35.
- [198] L. Maione-Silva, E.G De Castro, T.L. Nascimento, E.R. Cintra, L.C. Moreira, B.A.S. Cintra, M.C. Valadares, E.M. Lima, *Sci. Rep.*, 9, 2019, 522
- [199] M. Marsanasco, A.L. Márquez, J.R. Wagner, S.D.V. Alonso, N.S. Chiaramoni, *Food Res. Int.*, 44, 2011, 3039-3046.
- [200] I. Castangia, F. Marongiu, M.L. Manca, R. Pompei, F. Angius, A. Ardu, A.M. Fadda, M. Manconi, G. Ennas, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 97, 2017, 62–69.
- [219] D. Chicea, *Optoelectron. Adv. Mater. – Rapid Commun.* **4**(9), 1310 (2010).
- [221] P. Pallavicini, C.R. Arciola, F. Bertoglio, S. Curtosi, G. Dacarro, A. D'Agostino, F. Ferrari, D. Merli, C. Milanese, S. Rossi, A. Taglietti, M. Tenci, L. Visai, *J. Colloid Interface Sci.* 498, 271 (2017).
- [222] K. Hileuskaya, A. Ladutska, V. Kulikouskaya, A. Kraskouski, G. Novik, I. Kozerozhets, A. Kozlovskiy, V. Agabekov, *Colloids Surf. A* 585, 124141 (2020).