



Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția Mediului

ANSAMBLE NANOSTRUCTURATE PE BAZĂ DE ARGILE ANIONICE DE TIP HIDROTALCIȚI

TEZĂ DE DOCTORAT - rezumat -

Conducător științific:

Prof. Univ. Dr. Ing. Gabriela Cârjă

Doctorand:

Ing. Cristian Drancă

UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI

RECTORATUL

Către

de. 03.09 că ora. Vă facem cunoscut data alo de Consiliu a Fourtati de Inginerie mica. St. 4 va avea loc sustinerea publică a tezei de doctorat cu titlul:

ANSAMBLE NANOSTRUCTURATE PE BAZĂ DE ARGILE ANIONICE DE TIP HIDROTALCIȚI

elaborată de dl. ing. Cristian Drancă, în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

- Prof. univ. dr. ing. Ioan Mămăligă
 Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași
- Prof. univ. dr. ing. Gabriela Cârjă Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași
- Professor Kiyoshi Okada Tokyo Institute of Technology, Japan
- Prof. univ. dr. ing. Horia Iovu Universitatea Politehnica din București
- Prof. univ. dr. ing. Daniel Sutiman
 Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași

Vă trimitem rezumatul tezei de doctorat, cu rugămintea de a ne comunica în scris observațiile și aprecierile dumneavoastră. Cu acestă ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.



Secretar universitate, ing. Cristina Nagîț

duan

Presedinte

Membru

Membru

Membru

Conducător științific

Mulțumiri,

Sincere mulțumiri și deosebită recunoștință doamnei profesor dr. ing. Gabriela Carja pentru contribuția în formarea mea ca cercetător și pentru rolul avut în evoluția mea pe plan profesional și personal. Mulțumiri pentru sprijinul, îndrumarea și exigența acordate pe tot parcursul elaborării acestei lucrări.

Mulțumiri întregului colectiv de cercetare condus de doamna profesor dr. ing. Gabriela Carja: doamnei conf. dr. chim. Gabriela Ciobanu, domnului șef lucr. dr. ing. Nicolae Apostolescu, doamnei asist. dr. chim. Gabriela Apostolescu, doamnei dr. ing. Sofronia Boariu, doamnei dr. fiz. Carmen Gherasim și colegilor de doctorat pentru întreaga colaborare și sprijinul oferit, pentru atmosfera plăcută creată în laborator.

Mulțumesc tuturor cadrelor didactice ale Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, care au contribuit la formarea mea profesională.

Mulțumiri companiei S.C. Antibiotice S.A. Iași pentru sprijinul acordat în finalizarea lucrării de doctorat, doamnei microbiolog Marcela Strungariu, Șef Direcția Calitate, pentru aprobarea efectuării de studii în laboratoarele din subordine. Mulțumiri speciale doamnei biolog Diana Ștefănescu pentru ajutorul oferit și frumoasa colaborare.

Îmi manifest recunoștința față de familia mea pentru înțelegere și suport, ori de câte ori am acordat prioritate muncii profesionale. Multumesc soției pentru dragoste și susținere. Mulțumesc fiicei mele, Olivia, pentru apariția și bucuria adusă în familia noastră.

> În memoria mamei mele, Iulie 2011.

CUPRINS

INTRODUCERE	7
PARTEA I: STADIUL CUNOAȘTERII	
CAPITOLUL I. Argile anionice de tip hidrotalciți ca nanostructuri cu caracteristici	
specifice	11
I.1. Argile anionice de tip hidrotalciți: caracteristici structurale și nanotexturale	11
I.2. Materiale de tip argile anionice: studiul caracteristicilor de biocompatibilitate prin	
aplicații specifice	
CAPITOLUL II. Argile anionice de tip hidrotalciți: metode de caracterizare a	
proprietăților fizico-chimice	
II.1. Difracția de raze X, XRD	
II.2. Spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier, FTIR	33
II.3. Microscopie electronică de baleiaj, SEM	
II.4. Microscopie electronică de transmisie, TEM	
II.5. Spectroscopie de fotoelectroni cu raze X, XPS	40
II.6. Spectroscopie UV/Vis	42
CAPITOLUL III. Ansamble nanostructurate pe bază de argile anionice de tip	
hidrotalciți: fabricare, caracteristici fizico-chimice și aplicații specifice	45
III.1. Fabricarea ansamblelor nanostructurate; transformări structurale pe durata	
tratamentului termic	46
III.2. Proprietăți și aplicații specifice ale ansamblelor nanostructurate pe bază de argile	
anionice	53

PARTE A II-A: CONTRIBUȚII PROPRII

CAPITOLUL IV. Obținerea și caracterizarea ansamblelor nanostructurate pe bază de	
argile anionice de tip hidrotalciți; noi formulări compoziționale ca o funcție de mediul de	
reconstrucție a matricei de argilă	56
IV.1. Materiale și metode	56
IV.2. Proceduri și tehnici de fabricație	59
IV.3. Caracterizarea proprietăților fizico-chimice	65
IV.4. Concluzii	88
CAPITOLUL V. Proprietăți optice și fotocatalitice ale ansamblelor nanostructurate pe ba	ză
de argile anionice de tip hidrotalciți	89
V.1. Materiale și metode	89
V.2. Rezultate și discuții	90
V.3. Concluzii	95
CAPITOLUL VI. Ansamble nanostructurate pe bază de argile anionice de tip hidrotalciți	:
aplicații ca agenți antimicrobieni	96
VI.1. Testarea activității antimicrobiene in vitro	96
VI.2. Testarea activității antimicrobiene in vivo, pe șoareci	117
CAPITOLUL VII. Concluzii generale	134
ACTIVITATEA ȘTIINȚIFICĂ A DOCTORANDULUI	137
BIBLIOGRAFIE	139

În rezumatul tezei de doctorat se prezintă rezultatele cercetărilor experimentale proprii, concluziile generale și bibliografia. La redactarea rezumatului s-au păstrat aceleași notații pentru capitole, paragrafe, figuri, tabele utilizate în textul tezei de doctorat.

Introducere

În contextul mondial al obținerii de noi materiale cu aplicații multifuncționale, nanomaterialele sunt cercetate în laboratoarele din întreaga lume. Proprietățile lor specifice sunt generate de raportul suprafață/volum mare, caracteristic domeniului nano. Argilele anionice de tip hidrotalciți sau, mai general, hidroxizii dublu lamelari (LDHs), sunt caracterizate printr-o structură lamelară stratificată asemănătoare cu cea a brucitului, Mg(OH)₂, dar în care o parte din cationii bivalenți sunt înlocuiți de cationi trivalenți cu rezultat în încărcarea pozitivă a lamelelor. Stabilitatea împachetării stratificate este asigurată de anioni care leagă electrostatic lamele adiacente. Din punct de vedere al texturii lor, argilele anionice sunt formate din modele organizate de tip ansamble de nanoparticule. Nanoparticulele de argile sunt definite de forma, dimensiunea și modul lor de autoorganizare. Nanoparticulele de metale sau oxizi metalici fac parte de asemenea din clasa nanomaterialelor cu proprietăți deosebite. Din păcate stabilitatea lor redusă din cauza fenomenului de agregare reduce mult utilizarea lor.

În acest context, activitățile de cercetare al căror rezultate sunt prezentate în această teză de doctorat, au urmărit crearea de ansamble nanostructurate pe bază de argile anionice de tip hidrotalciți – nanoparticule de metale sau oxizi metalici.

Un rezultat nou și original, fața de literatura de specialitate, îl constituie obținerea și organizarea de nanoparticule de metale sau oxizi metalici folosind procesul de reconstrucție structurală a argilelor anionice. Astfel s-au obținut și studiat autoasamblări de tip nanoparticule de metale sau oxizi metalici – argile anionice LDH care combină proprietățile argilei cu cele ale nanoparticulelor de metale sau oxizi metalici. Aplicațiile acestor noi materiale ca agenți antimicrobieni și fotocatalitici au fost de asemenea studiate.

Obiectivele cercetării desfășurate în cadrul tezei de doctorat sunt:

- fabricarea ansamblelor nanostructurate de tip nanoparticule de metale sau oxizi metalici
 matrice de argile anionice de tip hidrotalciţi;
- studiul proprietăților fizico-chimice a ansamblelor nanostructurate obținute, folosind tehnici experimentale moderne de analiză, cum ar fi: XRD, XPS, TEM-SAED, SEM, FTIR, ICP, EDX;
- aplicații ale noilor ansamble de nanoparticule de metale sau oxizi metalici argile anionice de tip hidrotalciți fabricate ca materiale cu proprietăți optice și fotocatalitice și materiale cu proprietăți antimicrobiene.

Noutatea și originalitatea rezultatelor obținute rezida în:

- fabricarea noilor materiale de tip ansamble nanostructurate combină procedura de sinteză a nanoparticulelor de metale sau oxizi metalici cu autoorganizarea acestora pe suprafaţa matricei de argilă. Procedura de fabricare şi autoasamblare este ieftină şi simplă şi apare pentru prima dată descrisă în literatura de specialitate;
- cuplarea proprietăților fizico-chimice şi prin urmare obținerea de nanoarhitecturi cu proprietăți complexe prin asamblarea matricelor biocompatibile de tip argile anionice şi a nanoparticulelor de metale sau oxizi metalici;
- aplicațiile materialelor fabricate ca noi materiale cu proprietăți antimicrobiene şi fotocatalitice. Rezultatele arată că aceste noi tipuri de asamblări nanometrice au proprietăți antimicrobiene şi fotocatalitice performante.

Importanța și originalitatea rezultatelor pentru domeniul științific au facut posibilă publicarea a trei articole în reviste cotate ISI cu factori de impact ridicați și participarea la mai multe manifestări științifice internaționale.

Teza de doctorat este structurată în două părți: Partea I, Stadiul cunoașterii (3 capitole) și Partea a II-a, Contribuții proprii (3 capitole). Lucrarea mai conține capitolele: Introducere, Concluzii generale, Activitate științifică a doctorandului și Bibliografie.

Partea I, cu studiul teoretic din literatura de specialitate, cuprinde trei capitole.

Primul capitol prezintă proprietățile structurale ale argilelor anionice ca o funcție de natura și raportul dintre cationii ce alcătuiesc rețeaua lamelelor de tip brucit, de natura anionilor din zona interlamelară și de starea de hidratare a materialelor precum și proprietățile nanotexturale, descrise prin dimensiunile nanoparticulelor, cristalinitate, porozitate și suprafață specifică. Sunt relatate caracteristicile lor de biocompatibilitate prin aplicații specifice (de principii farmaceutic active și matrice stabilizatoare), aceste caracteristici fiind de interes pentru dezvoltarea de materiale antimicrobiene eficiente.

În al doilea capitol sunt prezentate tehnicile de caracterizare a proprietatilor fizico-chimice pentru ansamble nanostructurate nanoparticule de metale sau oxizi metalici – argile anionice de tip hidrotalcit. Pentru fiecare tehnică se prezintă, de asemenea, utilitatea în analiza materialelor de tip hidrotalcit, principiul de lucru, aparatura, modul de obținere și interpretare a rezultatelor.

Al treilea capitol prezintă procedurile de fabricare pentru materiale nanometrice pe bază de argile anionice de tip hidrotalciți, caracteristici specifice și domenii de aplicație pentru astfel de nanostructuri. Au fost, de asemenea, investigate, prin tehnici termoanalitice și difracție cu raze X,

transformările de fază pe durata tratamentelor termice pentru argilele de tip hidrotalcit, acestea constituind parte importantă a proceselor de sinteză a ansamblelor nanostructurate.

Partea experimentală, de contribuții proprii, este structurată în trei capitole.

În capitolul patru al tezei sunt prezentate fabricarea și caracterizarea fizico-chimică a ansamblelor nanostructurate de nanoparticule metalice sau oxizi metalici – argile anionice de tip hidrotalcit. Sunt descrise procedurile de fabricație, ca funcție de mediul de reconstrucție a matricei de argilă anionică, cu obținerea de structuri autoasamblate de nanoparticule de metale (Ag) sau oxizi metalici (TiO₂, NiO, CuO, ZnO, MgO, CeO₂) depuse pe nanoparticule de argile anionice de tip hidrotalciți (MgAlLDH, ZnAlLDH). Pentru noile formulări sintetizate sunt descrise caracteristicile: structurale, de fază și de suprafață prin analize XRD, FTIR, XPS, compoziționale prin analize ICP, EDX, texturale și morfologice prin analize TEM, SEM, adsorbție de N₂ la 77 K.

Capitolele cinci și șase prezintă aplicațiile materialelor obținute ca agenți fotocatalitici și antimicrobieni.

Astfel, capitolul cinci descrie caracteristicile optice pentru ansamble formate din nanoparticule de argint depuse pe matrice de argile anionice de tip hidrotalciți. Proprietățile fotosensibile ale ansamblului format din nanoparticule de dioxid de titan depuse pe argile de tip hidrotalcit au fost analizate prin evaluarea caracteristicilor optice și a comportamentului catalitic – în procesul de fotodegradare al fenolului. Rezultatele au arătat performanțe fotocatalitice superioare, pe mai multe runde catalitice, în comparație cu fotocatalizatorul comercial Degussa P25. Performanțele fotocatalitice excelente pot apărea din nanotextura specifică a nanocompozitului TiO_2 – argilă anionică obținut prin autoasamblare, prin îmbunătățirea capacitații de generare a perechilor electroni – găuri fotoinduse și favorizarea proprietăților de transfer de electroni la interfață.

Ultimul capitol, al părții experimentale, constă în prezentarea noilor aplicații, ca agenți antimicrobieni, pentru ansamblele nanostructurate fabricate. Sunt prezentate rezultatele studiilor antimicrobiene *in vitro*, pe culturi bacteriene (*Staphylococcus aureus, Escherichia coli*) și fungice (*Candida albicans*) și a studiilor antimicrobiene *in vivo*, pe șoareci NMRI, în care s-au folosit două modele: cel al rănilor exterioare neinfectate și respectiv, al rănilor infectate cu *Staphylococcus aureus*. Sunt prezentate caracteristici de toxicitate acută și de biocompatibilitate *in vivo* a probelor administrate, prin evaluarea țesuturilor zonelor rănite și a organelor interne și prin evoluția greutății corporale și refacerea blănii. Activitatea antimicrobiană mult mai eficientă pentru ansamblele nanometrice testate este posibilă datorită abilității matricei de argilă anionică biocompatibilă de a adsorbi microorganisme, facilitând astfel interacțiunile acestora cu nanoparticulele active de la suprafața matricei.

Concluziile generale ale studiilor experimentale si ale rezultatelor obtinute sunt prezentate în capitolul al șaptelea al tezei.

CAPITOLUL IV

Obținerea și caracterizarea ansamblelor nanostructurate pe bază de argile anionice de tip hidrotalciți; noi formulări compoziționale ca o funcție de mediul de reconstrucție a matricei de argilă

Sinteza ansamblelor nanostructurate de tip nanoparticule de metale sau oxizi metalici – argile anionice se bazează pe procesul de reconstrucție al argilelor anionice de tip hidrotalcit calcinate la temperaturi moderate. Pentru materialele fabricate sunt studiate caracteristicile fizico – chimice prin difracție cu raze X, spectroscopie în infraroșu, spectroscopie de electroni cu raze X, microscopie electronică de transmisie, spectroscopie de raze X dispersivă în energie, spectroscopie de plasmă cuplată inductiv, microscopie electronică de baleiaj, adsorbție de azot la 77 K.

IV.2.1. Sinteza ansamblelor de nanoparticule de metale sau oxizi metalici – argile anionice de tip hidrotalciți

Argilele anionice de tip hidrotalcit au fost obținute prin metoda de coprecipitare (Figura IV.1). Pentru obținerea formelor calcinate, argilele anionice de tip hidrotalcit au fost supuse tratamentelor termice, la temperaturi moderate (Figura IV.2). Ansamblelor nanostructurate de nanoparticule de argint – argile anionice de tip hidrotalciți au fost obținute pe baza procesului de reconstrucție al argilelor anionice [96]. Figura IV.3. prezintă imagini reprezentative cu obținerea ansamblelor nanostructurate de nanoparticule de argint – argile anionice de tip hidrotalciți.





Figura IV.1. Fotografie cu obținerea argilei anionice de Figura IV.2. Fotografie cu calcinarea argilelor anionice tip hidrotalcit, MgLDH, prin metoda coprecipitării soluțiilor apoase a sărurilor metalice precursoare.



Figura IV.3. Imagini cu etape de sinteză a ansamblului argint nanometric – argilă anionică substituită cu zinc (Ag/ZnLDH); (a) pregătirea soluției de Ag₂SO₄; (b) adăugarea argilei precursor calcinate, de culoare albă; (c-d) obținerea nanoparticulelor de argint în timpul reconstrucției argilei; se observă viramentul culorii de la alb (specific formei Ag⁺) la maro/negru (specific nanoparticulelor de Ag⁰).

IV.3. Caracterizarea proprietăților fizico-chimice

IV.3.1. Caracteristici structurale și de fază obținute prin analize XRD

Rezultatele XRD pentru ansamblul de nanoparticule de argint – argilă anionică de tip hidrotalcit parțial substituită cu zinc proaspăt sintetizat (notat Ag/ZnLDH) și în formă calcinată la 550 °C pentru 20 de ore (notat Ag/ZnLDH550) sunt comparate în figura IV.4 cu rezultatele obținute pentru matricea de argilă anionică parțial substituită cu zinc, în cele două forme: proaspăt sintetizată (notată ZnLDH) și calcinată la 550 °C (notată ZnLDH550).



Figura IV.4. Caracteristicile XRD pentru probele studiate. ZnLDH, matrice de argilă anionică substituită cu zinc; Ag/ZnLDH, ansamblu argint nanometric – matrice de argilă anionică substituită cu zinc; ZnLDH550, argila precursor (ZnLDH) calcinată la 550 °C pentru 20 ore; Ag/ZnLDH550, Ag/ZnLDH calcinat la 550 °C pentru 20 ore [96].

ZnLDH este cristalizat în fază de tip hidrotalcit, fără alte impurități cristaline, cu o serie de reflexii simetrice și ascuțite pentru planele bazale (00 *l*, *l* = 3,6) și reflexii largi, mai puțin intense, pentru planele nonbazale (01 *l*, *l* = 2,5,8). Celelalte reflexii pentru (110) și (113) pot fi clar distinse între $2\theta = 60^{\circ}$, indicând o dezorganizare intralamelară redusă a rețelei de argilă cu conținut de zinc.

Calcinarea la 550 °C pentru 20 ore distruge rețeaua lamelară a argilei. Reflexiile caracteristice, bine formate, în proba calcinată pot fi asimilate cu ZnO cristalin (wurtzit JCPDS nr. 36-1451), după cum este indicat de prezența peak-urilor la $2\theta = 31,9^{\circ}, 34,5^{\circ}, 36,3^{\circ}, 47,6^{\circ}, 56,8^{\circ}, 62,9^{\circ}$ și $68,2^{\circ},$ corespunzătoare reflexiilor planelor (100), (002), (101), (102), (110), (103) și respectiv (112). Faze de tip oxizi micști ZnAl sau de tip spinel nu sunt observate după calcinarea argilei ZnLDH la 550 °C.

Ansamblul nanostructurat argint – argilă anionică de tip hidrotalcit (Ag/ZnLDH) prezintă o serie de reflexii care indică caracteristicile complexe ale probei. Reflexiile marcate cu 'o' pot fi asimilate structurii de tip hidrotalcit recâștigate când argila calcinată a fost introdusă în mediul apos al Ag₂SO₄, în timp ce reflexiile marcate cu '*' pot fi asimilate cu Ag metalic (JCPDS nr. 04-0783). Reflexiile caracteristice ale ZnO pot fi încă observate, arătând că procesul de reconstrucție al argilei nu a fost complet.

Caracteristicile ansamblului argint – argilă tratat termic la 550 °C pentru 20 ore (Ag/ZnLDH550) arată că intensitatea și claritatea reflexiilor situate la unghiurile $2\theta = 37,9^{\circ}, 44,0^{\circ}$ și 63,9° (corespunzătoare reflexiilor principale ale argintului metalic) sunt accentuate; aceasta poate fi o consecință a procesului de agregare a nanoparticulelor de argint după tratament termic la 550 °C [98].

În figura IV.6 sunt prezentate distribuțiile XRD pentru argila anionică de tip hidrotalcit parțial substituită cu zinc în formele: proaspăt sintetizată, calcinată la 550 °C pentru 12 ore și reconstruită sub formă de ansamblu nanostructurat dioxid de titan – argilă anionică, la doi timpi diferiți de contact dintre $TiOSO_4$ și argila calcinată în procesul de fabricație: contact de 1 minut și, respectiv 15 minute.



Figura IV.6. Caracteristicile XRD pentru probele studiate. (a) matrice de argilă anionică substituită cu zinc (ZnLDH); (b) argilă precursor (ZnLDH) calcinată la 550 °C pentru 12 ore; (c) argilă reconstruită la un timp de contact dintre argila calcinată și TiOSO₄ de 1 minut; (d) argilă reconstruită la un timp de contact dintre argila calcinată și TiOSO₄ de 15 minute [101].

Când argila proaspăt calcinată este introdusă pentru un timp scurt (1 minut) în soluția de TiOSO₄, distribuția XRD (Figura IV.6c) rezultată îmbină reflexiile caracteristice ale argilei lamelare cu cele ale formei calcinate, aceasta indicând că procesul de reconstrucție al argilei nu este complet în acest moment. Când timpul de contact dintre argila calcinată și soluția de TiOSO₄ a fost crescut la 15 minute, distribuția XRD pentru TiO₂/ZnLDH (Figura IV.6d) prezintă două tipuri de reflexii. Peak-urile marcate cu '*' pot fi atribuite structurii de tip hidrotalcit recâstigate, în timp ce peak-urile marcate cu 'o' (la $2\theta = 25,28, 37,8, 36,3, 47,6, 56,7, 62,9$ și 68,2) sunt caracteristice reflexiilor fazei TiO₂ anatas (JCPDS nr. 21-127).

Tabelul IV.1 prezintă parametrii calculați ai celulei și distanțele libere interlamelare pentru materialele analizate. Deplasarea spre stânga a peak-ului (003) și creșterea parametrului c indică interacțiuni lamele - zonă interlamelară modificate și creșterea distanței libere interlamelare (IFS) după reconstrucția argilei.

Proprietățile structurale	pentru probele studiate.		
Probă	argilei (Å)		
	а	С	IFS ^a
ZnLDH	3,07	22,6	2,7
NiO/ZnLDH	3,09	26,7	4,1
TiO ₂ /ZnLDH	3,09	23,73	3,11

Tabel IV.1

^a Distanța liberă interlamelară (interlayer free space, IFS); IFS = $d_{003} - 4.8$ Å.

ZnLDH, matrice de argilă anionică substituită cu zinc; NiO/ZnLDH, ansamblu de oxid de nichel - matrice de argilă anionică; TiO₂/ZnLDH, ansamblu de dioxid de titan – matrice de argilă anionică.

IV.3.2. Caracteristici de suprafață obținute prin analize XPS

Figura IV.8a ilustrează spectrul XPS complet și regiunea XPS Ag3d pentru ansamblul nanostructurat Ag/ZnLDH. Spectrul general include peak-urile caracteristice pentru Zn2p_{3/2} (1022,7 eV), Al2p (73,87 eV), Ag3d și O1s cu toate energiile de legătură, având C1s (284,8 eV) ca referință. Pentru regiunea Ag3d, peak-urile Ag3d_{3/2} și Ag3d_{5/2} apar la energiile de legătură de 373,12 eV și respectiv 367,17 eV. Aceste valori ale energiilor de legătură sunt foarte similare cu cele raportate pentru argint în compusul Ag/ZnO [104]; mediul electronic complex de la suprafața heterostructurii Ag – Zn arată interacțiuni electronice puternice între argint și zinc [105]. Peak-ul O1s (figura IV.8a) poate fi despărțit în două.



Energie de legătură (eV)

Primul peak (O₁), cu energie de legătură mai joasă (egală cu 529,4 eV, 529,7 eV și 530,1 eV pentru Ag/ZnLDH, ZnLDH și respectiv, ZnLDH550) este asociat cu oxigenul din rețea legat de cationii metalici, în timp ce al doilea peak (O_{II}), cu energie de legătură mai mare, de aproximativ 531,4 eV, cel mai probabil aparține oxigenului de suprafață, constând în principal din speciile de oxigen ale grupărilor hidroxil [106].

Prezența relativă a acestor două specii (calculată ca procente de suprafață a peak-urilor O_I și O_{II} în suprafața totală a peak-ului O1s) este prezentată în tabelul IV.2. Contribuția legăturii dintre oxigen și cationii rețelei crește comparativ cu cea a legăturii de oxigen aparținând grupărilor hidroxil de suprafață în ordinea: ZnLDH < ZnLDH550 < Ag/ZnLDH.

Tał Ca	Tabel IV.2 Caracteristici de suprafață descrise prin analize XPS, pentru probele studiate.							
Probă		O1s (suprafața peak-ului din suprafața totală)		Raport atomic la suprafață (%)				
		OI	O _{II}	O/Zn	O/Ag	O/Al		
	ZnLDH	32,9	67,0	4,76	-	7,52		
	ZnLDH550	42,8	57,1	3,34	-	4,79		
	Ag/ZnLDH	62,0	37,9	4,43	25,68	6,59		
	TiO ₂ /ZnLDH	45,2	54,1	-	-	-		

ZnLDH, matrice de argilă anionică substituită cu zinc; ZnLDH550, argila precursor (ZnLDH) calcinată la 550 °C pentru 20 ore; Ag/ZnLDH, ansamblu de argint nanometric – matrice de argilă anionică; TiO₂/ZnLDH, ansamblu de argint nanometric – matrice de argilă anionică.

IV.3.3. Caracteristici de suprafață obținute prin analize TEM-SAED, SEM și adsorbție de N₂ la 77 K.

Analizele TEM oferă o imagine de aproape a trăsăturilor morfologice. Rezultatele analizelor TEM pentru argint nanometric – argilă anionică de tip hidrotalcit parțial substituită cu zinc (notată Ag/ZnLDH) și pentru matricea de argilă anionică parțial substituită cu zinc calcinată la 550 °C (notată ZnLDH550) sunt prezentate în figura IV.10.



Figura IV.10. Imagini ale microscopiei electronice de transmisie cu distribuția electronilor difractați pentru aria selectată (SAED) inclusă. (a) Argila precursor calcinată la 550 (ZnLDH550); (b) ansamblu de argint nanometric – matrice de argilă anionică (Ag/ZnLDH) [96].

Imaginile TEM pentru argila calcinată ZnLDH550 (Figura IV.10a) indică particule plate, cu suprafețe curate. Pentru structura nanostructurată argint – argilă, imaginea TEM (Figura IV.10b) arată că nanoparticulele de argint (diametru mediu de 7 nm) sunt depuse pe nanoparticulele mai mari de argilă anionică de tip hidrotalcit substituită cu zinc. Distribuția electronilor difractați pentru aria selectată (SAED, selected area electron diffraction) în cazul Ag/ZnLDH (Figura IV.10b) arată o gamă de inele de difracție complexă în care planele (111), (200), (220) și (311) pentru argint metalic pot fi identificate [110,111].

Imaginea SEM (Figura IV.11) pentru ansamblul nanostructurat Ag/ZnLDH prezintă nanoparticule hexagoanle plate, aproximativ uniforme ca mărime, cu dimensiuni medii de 85 nm, foarte subțiri. Imaginea SEM mărită confirmă că nanoparticule de argint bine definite sunt dispersate pe particulele mai mari de argilă.



Figura IV.11. Fotografii FESEM pentru ansamblu de argint nanometric – matrice de argilă anionică (Ag/ZnLDH).

Rezultatele analizelor TEM și FESEM pentru ansamblul nanostructurat oxid de nichel nanometric – argilă anionică de tip hidrotalcit (NiO/ZnLDH) sunt prezentate în figura IV.12a – c.

Imaginea prin analiză TEM pentru ZnLDH (Figura IV.12a) arată faptul că nanoparticulele mari de argilă anionică de tip hidrotalcit, sunt definite de un diametru mediu de aproximativ 90 nm; prezintă suprafață curată, fără asperități. Fotografiile pentru NiO/ZnLDH (Figura IV.12b,c) evidențiază după reconstrucția structurală a argilei, ansamble aglomerate de nanoparticule hexagonale plate de argilă pe care sunt depuse nanoparticule mult mai mici, bine definite. Diametrul mediu al lor este de aproximativ 7 nm.



Figura. IV.12. (a) Imagine TEM reprezentativă pentru matricea de argilă anionică substituită cu zinc (ZnLDH);
(b) Imagine TEM reprezentativă pentru ansamblu de NiO nanometric/matrice de argilă anionică substituită cu zinc (NiO/ZnLDH);
(c) Fotografie SEM pentru NiO/ZnLDH [100].

Imaginile prin analize TEM și SEM reprezentative pentru ansamblul nanostructurat dioxid de titan nanometric – argilă anionică de tip hidrotalcit și pentru matrice de argilă anionică precursor sunt prezentate în figura IV.13.

Imaginea prin analiză TEM pentru argila anionică substituită cu zinc, (Figura IV.13b) prezintă particule plate, tipice pentru argile de tip hidrotalciți, cu suprafață curată. Mărimea medie a nanoparticulelor de ZnLDH este de aproximativ 80 nm. Imaginea de difracție electronică pentru aria selectată corespunzătoare (SAED) prezintă două inele difuze, caracteristice pentru ZnLDH.

În schimb, pentru TiO₂/ZnLDH imaginea TEM (Figura IV.13a) arată că, după procesul de reconstrucție al argilei în TiOSO₄, nanoparticule mici, definite de un diametru mediu de aproximativ 7 nm, sunt bine dispersate pe nanoparticulele mai mari de argilă. Imaginea de difracție electronică

(SAED) pentru TiO₂/ZnLDH prezintă o structură mult mai complexă în care inelele de difracție pentru faza TiO₂ – anatas nanocristalină pot fi identificate [112].



Figura IV.13. (a) Imagine TEM reprezentativă cu distribuția electronilor difractați pentru aria selectată (SAED) inclusă pentru ansamblu de TiO₂ nanometric – matrice de argilă anionică substituită cu zinc (TiO₂/ZnLDH); (b) Imagine TEM reprezentativă cu distribuția electronilor difractați pentru aria selectată (SAED) inclusă pentru matricea de argilă anionică substituită cu zinc (ZnLDH); (c) Fotografie FESEM pentru TiO₂/ZnLDH [101].

Imaginea prin analiză SEM pentru TiO₂/ZnLDH (Figura IV.13c) arată o structură stratificată, de tip "house-of-cards" (casă de cărți), care este specifică argilelor de tip hidrotalcit [113]. Imaginea prin analiză SEM mărită indică faptul că particulele de argilă sunt în domeniu nanometric (aproximativ 100 nm) și puternic interconectate.

Rezultatele prin microscopie electronică de transmisie (TEM) și de baleiaj (SEM) dezvăluie creșterea și dezvoltarea de nanoparticule de metale (Ag) sau oxizi metalici (NiO, TiO₂) puternic dispersate pe nanoparticulele de matrice de argilă de tip hidrotalcit, cu obținerea de structuri autoasamblate nanometrice. Atât argilele anionice de tip hidrotalcit, cât și nanostructurile obținute pe bază de argile anionice de tip hidrotalcit sunt formate din ansamble de nanoparticule a căror dimensiune și aranjament geometric pot fi modelate prin sinteză. Nanotextura ansamblelor obținute dă naștere la proprietăți mezoporoase.

Valorile caracterisiticile texturale pentru ansamble nanometrice pe bază de argile anionice de tip hidrotalciți sintetizate sunt prezentate în tabelul IV.3.

roprietăți <u>t</u>	prietăți texturale pentru probele studiate.							
	Probă	S_{BET} (m ² /g)	$d_{p}(nm)$					
			Ī					
-	ZnLDH	79	38					
	ZnLDH550	134	29					
	Ag/ZnLDH	55	19					
	TiO ₂ /ZnLDH	52	29					

Tabel IV.3 Proprietăți texturale pentru probele

 S_{BET} , suprafață specifică Brunauer – Emmett – Teller; d_p diametru mediu al porilor; ZnLDH, matrice de argilă anionică substituită cu zinc; ZnLDH550, argila precursor (ZnLDH) calcinată la 550 °C pentru 20 ore; Ag/ZnLDH, ansamblu de argint nanometric – matrice de argilă anionică de tip hidrotalcit; TiO₂/ZnLDH, ansamblu de dioxid de titan nanometric – matrice de argilă anionică de tip hidrotalcit.

IV.3.4. Proprietăți de compoziție obținute prin analize EDX și ICP.

Compoziția locală elementară a probelor a fost studiată prin microanaliză EDX. Figura IV.15 prezintă distribuțiile caracteristice pentru ansamblele nanostructurate NiO/ZnLDH și TiO₂/ZnLDH.



Figura IV.15. Distribuțiile prin analize EDX caracteristice pentru ansamblele: (a) oxid de nichel nanometric – matrice de argilă anionică substituită cu zinc (NiO/ZnLDH) [100]; (b) dioxid de titan nanometric – matrice de argilă anionică substituită cu zinc (TiO₂/ZnLDH) [101].

Distribuția prin analiză EDX pentru ansamblul nanostructurat NiO/ZnLDH arată peak-uri majore asimilate cu **Ni**, Zn, O și Al, în timp ce semnalul pentru Cu provine de la echipamentul TEM – EDX. Raportul atomic prin analiză EDX găsit pentru Ni/Zn este de aproximativ 0,67. Această valoare este în concordanță cu rezultatele analizei chimice prin ICP.

Distribuția prin analiză EDX pentru ansamblul nanostructurat TiO₂/ZnLDH prezintă în acest caz peak-uri majore asimilate cu **Ti**, Zn, O și Al. Raportul atomic prin analiză EDX pentru Ti/Zn este de aproximativ 0,7.

Informații despre compoziția chimică a probelor sunt prezentate și în tabelul IV.4.

Tabel VI.4	ŀ								
Compoziți	Compoziție chimică prin analize EDX și XPS pentru probele studiate.								
Probă		Zn:Al	Atom	ı%,	Probă	Ator	n%,	Probă	Ag
			ED	Х		ED	ЭX		%,
			Ni	Zn	_	Ti	Zn	-	ICP
ZnLD	H	2,0:1,0	-	79	ZnLDH	-	34,3	ZnLDH	-
NiO/Z	InLDH	2,0:1,0	28,7	134	TiO ₂ /ZnLDH	11,1	15,7	Ag/ZnLDH	8,72 ^a
			$(27,1)^{a}$			$(9,7)^{a}$			

^a Obținut prin spectroscopie ICP. ZnLDH, matrice de argilă anionică substituită cu zinc; NiO/ZnLDH, ansamblu de oxid de nichel nanometric – matrice de argilă anionică; TiO₂/ZnLDH, ansamblu de dioxid de titan nanometric – matrice de argilă anionică; Ag/ZnLDH, ansamblu de argint nanometric – matrice de argilă anionică.

Rapoartele atomice Zn/Al pentru probele studiate, determinate prin spectroscopie ICP, coincid cu cele din soluțiile apoase ale sărurilor din startul sintezei, la care se adaugă erorile experimentale.

IV.3.5. Natura anionilor zonei interlamelare studiată prin spectroscopie FTIR

Analiza spectroscopică FTIR este capabilă să ofere informații despre natura anionilor din zonele interlamelare ale argilelor.

În figura IV.16 sunt prezentate rezultatele spectroscopiei FTIR pentru structurile lamelare Ag/ZnLDH şi ZnLDH.

Peak-urile de absorbție largi în regiunea 2800 – 3600 cm⁻¹ și 1560 cm⁻¹ sunt atribuite modului de întindere simetric O-H și modurilor de deformare a hidroxizilor metalici din lamele sau a moleculelor de apă interlamelare. Banda corespunzătoare modului de deformare δ_{OH} apare între 1644 – 1648 cm⁻¹ și poate fi atribuită apei interlamelare sorbite. Intensitatea ultimelor două benzi depinde de tipul anionului prezent în zona interlamelară și de cantitatea de apă. Principalele benzi de adsorbție datorate anionilor interstrat apar în regiunea 1000 – 1800 cm⁻¹. Anionul carbonat, care este cel mai comun ion interlamelar, este identificat prin trei benzi de absorbție în domeniu IR, ce apar în structura de tip hidrotalcit la 1370- 1383 cm⁻¹ atribută modului de vibrație v₃ [106], la 850 – 880 cm⁻¹ atribuită modului de vibrație v₂ și la 670 – 690 cm⁻¹ atribuită modului de vibrație v₄. Uneori apare o bandă caracteristică la 1350 – 1400 cm⁻¹ datorată scăderii simetriei carbonatului sau creșterii dezordinei interstratale. Scăderea simetriei carbonatului activează de asemenea vibrația acestuia în jurul valorii de 1050 cm⁻¹.



Figura IV.16. Spectrul în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR) pentru probele studiate. ZnLDH, matrice de argilă anionică substituită cu zinc; Ag/ZnLDH, ansamblu de nanoparticule de argint – matrice de argilă anionică substituită cu zinc; ZnLDH550, argila precursor (ZnLDH) calcinată la 550 °C pentru 20 ore [100].

Pentru Ag/ZnLDH, o nouă bandă este observată la 1122 cm⁻¹ asimilată modului de vibrație v₃ al SO_4^{2-} și, ca o consecință, prezența sulfatului poate fi recunoscută în zona interlamelară a argilei anionice reconstruite. În regiunea cu lungimi de undă joase (<1000 cm⁻¹), sunt observate modurile de vibrație a lamelelor de tip hidrotalcit ca M – O (550, 590 și 840 cm⁻¹) și O – M – O (430 cm⁻¹) [105]. Pentru argila proaspăt calcinată (ZnLDH550), vibrațiile caracteristice în regiunea 1370 – 1560 cm⁻¹ aproape dispar, demonstrând faptul că anionii interlamelari au fost îndepărtați prin calcinare.

Caracteristicile structurale, compoziționale, texturale și de suprafață evidențiază faptul că procesul de reconstrucție a argilei de tip hidrotalcit conduce la o formulare autoasamblată ce îmbină proprietățile structurale și de suprafață ale nanoparticulelor depuse cu proprietățile complexe ale argilei anionice de tip hidrotalcit.

CAPITOLUL V Proprietăți optice și fotocatalitice a ansamblelor nanostructurate pe bază de argile anionice de tip hidrotalciți

Proprietățile optice pentru ansamblele formate din nanoparticule de argint depuse pe matrice de argile anionice de tip hidrotalcit (notate Ag/ZnAlLDH și Ag/MgAlLDH) și proprietățile optice și fotocatalitice în degradarea fenolului pentru ansamblul nanostructurat dioxid de titan depuse pe matrice de argilă anionică de tip hidrotalcit (notat TiO₂/ZnLDH) au fost studiate prin analize UV/vis.

V.1. Materiale și metode

Spectrele de absorbție UV/vis au fost înregistrate pe un domeniu de 190 – 900 nm cu o viteză de scanare de 200 nm/minut folosind un spectrofotometru Jasco V550 cu două canale optice. Probele au fost preparate prin imobilizarea pulberii între sticla de cuarț și un suport din policlorură de vinil. Fotodegradarea fenolului a fost realizată prin utilizarea unei soluții de 0,425 mmol/l în apă distilată. În patru probe de 250 ml soluție au fost adăugate câte 0,5 g TiO₂/ZnLDH. Temperatura a fost menținută la 298 K și soluțiile au fost agitate în vasul de reacție timp de 40 minute cu scopul atingerii echilibrului de adsorbție. Soluțiile au fost iradiate cu lumină UV pentru 1 – 5 ore folosind o lampă UV Pen-Ray Power Supply (UVP Products), cu $\lambda = 254$ nm și intensitate de 4400 mW/cm², plasată într-un tub de quarț imersat în soluție. După timpi de iradiație definiți, 20 ml din soluție au fost filtrați pentru îndepărtarea catalizatorului. Catalizatorul recuperat a fost reutilizat pentru a doua și a treia rundă catalitică, utilizând condițiile experimentale de la prima rundă. Fotoeficiența catalizatorului a fost monitorizată prin analize spectroscopice UV/vis urmărindu-se absorbanța (*A*) la 269 nm caracteristică fenolului (cu *A* = *A*₀ la timpul de iradiere *t* = 0). Asumând un mecanism de fotodegradare similar pentru toate materialele, rezultatele sunt exprimate ca variație a raportului *A*/*A*₀ în funcție de timp.

V.2. Rezultate și discuții

V.2.1. Proprietăți optice ale ansamblelor de nanoparticule de argint – matrice de argile anionice de tip hidrotalciți

Figura V.1 prezintă caracteristicile absorbției optice în regiunea UV/vis pentru argile de tip hidrotalcit diferite compozițional (MgAlLDH și ZnAlLDH) în formele proaspăt sintetizate, calcinate la 550 °C și reconstruite sub formă de ansamble nanometrice argint – argile anionice.



Figura V.1. Spectre de absorbție în domeniul UV/vis pentru: (a) argilă anionică de tip hidrotalcit în formele proaspăt sintetizată (MgAlLDH), calcinată la 550 °C (MgAlLDH 823 K) și reconstruită cu formarea ansamblului nanostructurat (Ag/MgAlLDH); (b) argilă anionică substituită cu zinc în formele proaspăt sintetizată (ZnAlLDH), calcinată la 550 °C (ZnAlLDH 823 K) și reconstruită cu formarea ansamblului nanostructurat (Ag/ZnAlLDH) [123].

Se observă o diferență evidentă între profilul optic al probelor cu conținut de Ag în structură (Ag/MgAlLDH și Ag/ZnAlLDH) comparativ cu argilele precursor, care nu prezintă peak-uri de absorbție. Privitor la formele de argilă calcinate la 550 °C, argila anionică cu conținut de Mg (notată MgAlLDH 823 K), nu prezintă peak de absorbție, în timp ce, forma calcinată a argilei anionice parțial substituite cu zinc (notată ZnAlLDH 823 K), prezintă o bandă de absorbție centrată la 300 nm, ce poate fi asimilată nanoparticulelor de ZnO formate pe suprafața argilei anionice în urma tratamentului termic la 550 °C [116].

Prin observarea domeniului spectral corespunzător lungimilor de undă mari ($\lambda = 300$ nm), profilele optice pentru ansamblele nanometrice Ag/MgAlLDH și Ag/ZnAlLDH prezintă peak-uri de absorbție largi și asimetrice cu $\lambda_{max} = 415$ nm, care pot fi corelate cu rezonanța plasmonică de suprafață (surface plasmon resonance, SPR) a electronilor din banda de conducție a nanoparticulelor de argint. Forma și poziția benzii SPR este în concordanță cu rezultatele publicate în literatură pentru nanoparticule de argint [97,117-119]. Poziția benzii SPR este sensibilă la variația mărimii particulelor, interacțiunilor și transferului de sarcină al acestora cu mediul, indicelui de reflexie al mediului, etc. [120,121]. Formarea nanoparticulelor de Ag pe matricele de argile anionice de tip hidrotalcit este de asemenea indicată de viramentul de la incolor la maro pe durata sintezei ansamblelor (a se vedea capitoul IV, figura IV.3), datorită reducerii Ag⁺la Ag⁰.

Pe lângă SPR clar vizibil, pentru ansamblele cu argint, pot fi identificate în domeniu UV două benzi de tranziție: prima, situată la lungime de undă de aproximativ 257 nm, poate fi asimilată cu Ag^0 și a doua, de tranziție, mult mai redusă, (un umăr), situată între 200 și 230 nm, poate fi asimilată formei Ag^+ [122] demostrând astfel că majoritatea ionilor Ag^+ au fost reduși la Ag^0 în procesul de reconstrucție a argilei anionice în prezența luminii ($Ag_2O \xrightarrow{h\nu} Ag$).

V.2.2. Proprietăți optice și fotocatalitice ale ansamblului nanostructurat TiO₂/ZnLDH

Figura V.2 arată spectrul pentru argilele anionice substituite cu zinc, ZnLDH, în formele proaspăt sintetizată și reconstruită. După cum se observă, proprietățile optice sunt complet modificate după reconstrucția în soluția apoasă de TiOSO₄. ZnLDH prezintă absorbanță foarte scăzută în regiunea UV. Pentru ansamblul TiO₂/ZnLDH, absorbanța crește puternic în regiunea UV, arătând caracteristici optice similare cu cele raportate pentru nanoparticule de TiO₂ depuse pe zeoliți [124].



Figura V.2. Spectre de absorbție în domeniul UV/vis. ZnLDH, matrice de argilă anionică substituită cu zinc; TiO₂/ZnLDH, ansamblu oxid de titan nanometric – matrice de argilă anionică substituită cu zinc [101].

Contribuția cumulată a caracteristicilor optice și trăsăturilor texturale este capabilă să dea naștere la proprietăți fotocatalitice pentru nanostructuri autoasamblate oxid de titan – ZnLDH. Fenolul este un poluant comun găsit în apa uzată rezultată din industria oțelului, petrochimică, materialelor plastice și fibrelor sintetice. Performanțele fotocatalitice ale TiO₂/ZnLDH au fost studiate în procesul fotodegradării fenolului. Dispariția poluantului ca funcție de timp a fost urmărită prin analiza UV a probelor preluate la diferite intervale de timp din soluția iradiată. Evoluția temporală a modificărilor spectrului UV ce au avut loc pe durata degradării fenolului pe TiO₂/ZnLDH este prezentată în figura V.3a, în timp ce scăderea raportului A/A_0 ca funcție a timpului de iradiere este prezentată în figura V.3b. Rezultatele arată că banda de absorbție principală a fenolului, situată la 269 nm, scade gradual pe durata degradării fotoasistate. Eficiența de degradare a ansamblului TiO₂ – ZnLDH atinge 50% după 100 minute și 85% după 240 minute. Pe de altă parte, eficiența de degradare a argilei ZnLDH atinge doar 27% după 240 minute. Comportamentul fotocatalitic al Degussa P25 a fost de asemenea măsurat ca referință pentru TiO₂/ZnLDH (Tabel V.1).



Figura V.3. (a) Evoluția temporală a modificărilor în spectrul UV ce au loc pe durata fotodegradării fenolului pe fotocatalizatorul de TiO₂/ZnLDH. (b) Degradarea fenolului sub lumină UV utilizând fotocatalizatorii (○) ZnLDH şi (△) TiO₂/ZnLDH [101].

Sunt observate performanțe catalitice similare pentru TiO₂/ZnLDH și P25 pe durata primei runde catalitice. Pe durata rundei a doua și a treia, TiO₂/ZnLDH prezintă activitate fotocatalitică superioară în comparație cu Degussa P25. Pe durata celei de-a doua runde, după 240 minute, eficiența fotodegradării atinge 75% pentru TiO₂/ZnLDH și scade la 63% pentru Degussa P25, în timp ce pe durata celei de-a treia runde valorile corespunzătoare scad la 67% și respectiv 43%. Aceste rezultate

sunt în concordanță cu cele raportate recent de Yang și colab. [125], evidențiind eficiența fotocatalitică superioară pentru TiO₂ nanometric atașat de o matrice mezoporoasă.

		A/A_0				
	TiO ₂ /	ZnLDH	Deg	gussa P25		
N	60 minute	240 minute	60 minute	240 minute		
1	0,54	0,13	0,52	0,16		
2	0,59	0,25	0,71	0,37		
3	0,67	0,34	0,79	0,57		

Tabel V.I			
Performanța fotodegradării	pentru catalizatorii testat	ți în funcție de număr	ul de utilizări $(N)^{a}$

^a Timpul de reacție = 60 și 240 minute.

CAPITOLUL VI

m 1 1 1 7 1

Ansamble nanostructurate pe bază de argile anionice de tip hidrotalciți: aplicații ca agenți antimicrobieni

A fost evaluată activitatea antimicrobiană *in vitro* pe bacterii gram – pozitive, gram – negative și fungi, pentru ansamble nanostructurate de tip metal (Ag) și oxizi metalici (CuO, ZnO, MgO, CeO₂) – argile anionice de tip hidrotalcit diferite compozițional; pentru ansamblul argint nanometric – argilă anionică substituită cu zinc (Ag/ZnLDH) au fost efectuate teste de toxicitate acută dermică și orală și a fost evaluată activitatea antimicrobiană *în vivo*, pe șoareci, folosind modelul rănilor neinfectate și modelul rănilor infectate.

VI.1. Testarea activității antimicrobiene in vitro

Ansamble de nanoparticule de argint – argile anionice substituite cu zinc (Ag/ZnLDH)

Într-un prim studiu, activitatea antibacteriană a ansamblului argint nanometric – matrice de argilă anionică substituită cu zinc (Ag/ZnLDH) a fost testată pe *Sthaphylococcus aureus (S. aureus)* ATCC 6538, 10⁸ ufc/ml, folosind metoda difuzimetrică. S-a urmărit evoluția zonelor de inhibiție pe durata a 48 de incubare la 37 °C (Figura VI.1).

După 24 de ore de incubare, cilindrii în care a fost suspendat Ag/ZnLDH (cilindrii orientați pe orizontală în figura VI.1a), sunt înconjurați de zone de inhibiție mari, cu diametrul de 20 mm, sugerând capacitate antibacteriană excelentă pentru proba studiată. În comparație, argila precursor ZnLDH (cilindrii orientați pe verticală în figura VI.1a) nu a prezentat activitate antibacteriană (lipsa zonelor de

inhibiție).



Figura VI.1. Evoluția zonelor de inhibiție a *S. aureus* pentru ansamblul argint nanometric – argilă anionică substituită cu zinc după (a) 24 ore și (b) 48 ore de incubare.

Până la finalul experimentului (48 ore de incubare) a avut loc dezvoltarea bacteriei pe mediu nutritiv (se observă nuanțarea zonelor neinhibate și accentuarea halourilor din jurul zonelor de inhibiție, figura VI.1b), dar cu menținerea zonelor de inhibiție de 20 mm pentru probele cu argint (Ag/ZnLDH) ceea ce sugerează abilitatea materialului de manifestare a acțiunii antibacteriene pe perioade lungi de timp.

Alt experiment antibacterian *in vitro* (metoda reducerii numărului de colonii viabile) a arătat că ansamblul Ag/ZnLDH distruge în proporție de 100% coloniile de *S. aureus* și *E. coli*. Astfel, în plăci cu mediu nutritiv topit au fost omogenizate 0,5 g probă Ag/ZnLDH. Plăcile au fost inoculate cu 200 ufc/ml *E. coli* ATCC 8739 și respectiv 200 ufc/ml *S. aureus* ATCC 6538 și incubate timp de 24 de ore la 37 °C. Pentru control au fost incubate în aceleași condiții plăci cu mediu nutritiv inoculat cu 200 ufc/ml bacterii, dar fără pulbere Ag/ZnLDH. După incubare s-au numărat coloniile viabile și s-a calculat eficiența bactericidă. Imagini cu reducerea coloniilor de *E. coli* sunt prezentate în figura VI.2.

Din imagini reiese clar că pentru probele cu ansamblu nanostructurat, coloniile bacteriene de *E. coli* (Figura VI.2) și *S. aureus* sunt reduse (a avut loc dispariția punctelor care reprezintă unități formatoare de colonii, ufc, observate în plăcile de control) de la 200 la 0 ufc/ml. Prin urmare, pentru 0,5 g proba Ag/ZnLDH, eficiența bactericidă este de 100%.



Figura VI.2. Fotografii arătând reducerea coloniilor bacteriene de *E. coli* de la (a) 200 ufc/ml pentru 0,0 g Ag/ZnLDH la (b) 0 ufc/ml pentru 0,50 g Ag/ZnLDH.

Ansamble de nanoparticule de argint – argile anionice de tip hidrotalciți (Ag/MgLDH)

Activitatea antimicrobiană pentru ansamblul nanostructurat Ag/MgLDH a fost testată calitativ prin metoda difuzimetrică pe bacteriile *E. coli* ATCC 8739 și *S. aureus* ATCC 6538 și pe fungul *Candida albicans* (*C. albicans*) ATCC 10231 ca funcție de parametrul variabil *x*. Mai precis, *x* reprezintă perioada de timp trecută de la sinteza probelor Ag/MgLDH și până în momentul testării antimicrobiene. Rezultatele sunt prezentate în tabelul VI.3 și figura VI.4.

Tabel VI.3

Mărimea zonelor de inhibiție a *E. coli, S. aureus* și *C. albicans* pentru ansamblul argint nanometric – argilă anionică de tip hidrotalcit (Ag/MgLDH) ca funcție de x. x este parametru variabil și reprezintă perioada de timp de la sinteza probelor: 1, 30 și respectiv 60 zile.

Microorganisme	Diametrele zonelor de inhibiție, mm		
	x = 1zi	x = 30 zile	x = 60 zile
<i>E. coli</i> ATCC 8739, 10 ⁶ ufc/ml	19,1	20,3	19
<i>S. aureus</i> ATCC 6538, 10 ⁶ ufc/ml	22,2	23,5	23
<i>C. albicans</i> ATCC 10231, 10 ⁸ ufc/ml	18	14,6	12,8

În figura VI.4 se observă zone mari de inhibiție. Ținând cont de concentrația foarte mare a inocuului microbian (de ordinul 10⁶ respectiv, 10⁸ ufc/ml), care nu se găsește în realitate decât în condiții de laborator, Ag/MgLDH posedă activitate antimicrobiană excelentă față de microorganismele

testate. Faptul că probele prezintă activitate bactericidă și fungicidă excelentă și la 60 zile de la sinteză sugerează capacitatea extraordinară de stabilizare a nanoparticulelor de argint biologic, active pe perioade lungi de timp, de către matricea de argilă anionică de tip hidrotalcit. Comportarea diferită a celor trei microorganisme față de agentul antimicrobian poate fi explicată prin diferențele structurale ale celulelor microbiene.



Figura VI.4. Fotografii cu evoluția zonelor de inhibiție a bacteriilor *E. coli* (E.C.) și *S. aureus* (S.A.) și fungului *C. albicans* (C.A.) pentru ansamblul argint nanometric – argilă de tip hidrotalcit (Ag/MgLDH) ca funcție de *x. x* este parametru variabil și reprezintă perioada de timp de la sinteza probelor: 1, 30 și respectiv 60 zile.

Ansamble de nanoparticule de argint – argile anionice de tip hidrotalcit parțial substituite cu cupru (Ag/CuLDH)

Activitatea antimicrobiană pentru ansamblul nanostructurat Ag/CuLDH cu parametrul variabil *x* de la 1 la 60 de zile a fost testată calitativ prin metoda difuzimetrică pe *E. coli* ATCC 8739, *S. aureus* ATCC 6538 și *C. albicans* ATCC 10231, într-un studiu similar celui pentru proba Ag/MgLDH. Rezultatele sunt prezentate în tabelul VI.5.

Tabel VI.5

Mărimea zonelor de inhibiție a *E. coli, S. aureus* și *C. albicans* pentru ansamblul de nanoparticule de argint – argilă anionică substituită cu cupru (Ag/CuLDH) ca funcție de *x. x* este parametru variabil și reprezintă perioada de timp de la sinteza probelor: 1, 30 și respectiv 60 zile.

Microorganisme	Diametrele zonelor de inhibiție, mm		
	x = 1 zi	x = 30 zile	x = 60 zile
<i>E. coli</i> ATCC 8739, 10 ⁶ ufc/ml	18,2	14	11,5
<i>S. aureus</i> ATCC 6538, 10 ⁶ ufc/ml	14	13,8	11,8
C. albicans ATCC 10231, 10 ⁸ ufc/ml	Z.S.	Z.S.	Z.S.

Z.S., zona subletală.

Pentru *E. coli* și *S. aureus* cu x = 1 zi de la sinteza ansamblului Ag/CuLDH s-au obținut zone de inhibiție largi (18,2 mm și 14 mm pentru *E. coli*, respectiv *S. aureus*), sugerând bună susceptibilitate a bacteriilor, comparativ cu fungul *C. albicans*, pentru care s-au obținut doar zone subletale.

VI.1.2.2. Testarea activității antimicrobiene a ansamblelor de nanoparticule de oxid de cupru – argile anionice de tip hidrotalciți

Efectele antimicrobiene sub forma zonelor de inhibiție a *E. coli*, *S. aureus* și *C. albicans* de nanoparticule cu oxid de cupru depuse pe matrice de argile anionice diferite compozițional (CuO/MgLDH, CuO/ZnLDH și CuO/CuLDH) sunt prezentate în tabelul VI.7.

După 24 ore de incubare, diametrele zonelor de inhibiție sunt afectate de tipul de microorganism. În contrast, compoziția diferită a matricelor de argilă anionică are o influență mai restrânsă asupra activității antimicrobiene.

Tabel VI.7

Mărimea zonelor de inhibiție, în mm, a *E. coli*, *S. aureus* și *C. albicans* pentru ansamble oxid de cupru nanometric – argile anionice de tip hidrotalcit diferite compozițional.

Microorganisme	Diametrele zonelor de inhibiție, mm		
	CuO/MgLDH	CuO/ZnLDH	CuO/CuLDH
<i>E. coli</i> ATCC 8739, 10 ⁶ ufc/ml	12	15,2	20
<i>S. aureus</i> ATCC 6538, 10 ⁶ ufc/ml	11,5	13,2	10
C. albicans ATCC 10231, 10 ⁸ ufc/ml	0	0	0

Imagini reprezentative sunt prezentate în figura VI.8.



Figura VI.8. Imagini reprezentative cu zonele de inhibiție a bacteriilor *E. coli* (E.C.) și *S. aureus* (S.A.) pentru ansamble oxid de cupru nanometric – argile anionice de tip hidrotalcit diferite compozițional.

Comparația între studii biologice diferite nu este întotdeauna concludentă din cauza variației factorilor critici (pregătirea mediilor nutritive, concentrația inițială de microorganism, factori de mediu, erori umane etc). O comparație mult mai obiectivă a activității antimicrobiene a două tipuri de agenți o constituie utilizarea plăcilor comune. Prin urmare, în figura VI.9 sunt prezentate activitățile antibacteriene comparate pentru ansamblele Ag/MgLDH și CuO/MgLDH pe două concentrații inițiale diferite de *S. aureus* ATCC 6538: 10⁶ și respectiv 10⁸ ufc/ml. Rezultatele sunt cumulate în tabelul VI.9.

Experimentul a arătat activitatea antibacteriană mult superioară a ansamblelor Ag/MgLDH pentru care, atât la 10⁶ ufc/ml, cât și la 10⁸ ufc/ml *S. aureus* s-au obținut zone de inhibiție cu aproximativ 90% mai mari decât pentru nanoparticulele de cupru depuse pe același tip de argilă (19,5 mm față de 10,5 mm pentru 10⁶ ufc/ml bacterie și respectiv 16,5 mm față de 9 mm pentru 10⁸ ufc/ml bacterie). Argila precursor, MgLDH, nu prezintă activitate antibacteriană.



Figura VI.9. Comparație între zonele de inhibiție pentru ansamblele argint nanometric – argilă de tip hidrotalcit (Ag/MgLDH), oxid de cupru nanometric – argilă de tip hidrotalcit (CuO/MgLDH) și matrice de argilă de tip hidrotalcit precursor (MgLDH) pe *S. aureus* 10⁶ și respectiv 10⁸ ufc/ml.

VI.1.2.3. Testarea activității antimicrobiene a ansamblelor de nanoparticule de oxid de zinc – argile anionice de tip hidrotalciți

Au fost investigate proprietățile antimicrobiene pentru ansamble oxid de zinc nanometric – argile anionice de tip hidrotalcit diferite compozițional folosind microorganismele test *E. coli*, *S. aureus* și *C. albicans*. Ansamblul ZnO/ZnLDH a fost testat pe aceleași microorganisme în funcție de parametrul variabil *x*. Informații cantitative au fost obținute prin determinarea valorilor concentrațiilor minime bactericidă și inhibitorie.

Pentru probele proaspăt sintetizate (x = 1 zi) s-au obținut zone de inhibiție mari, sugerând bună susceptibilitate a celor trei microorganisme la agent, de 14,5 mm pe *E. coli*, 13 mm pe *S. aureus* și respectiv 14 mm pe *C. albicans*. La testarea probelor atât la 30 zile cât și la 60 zile de la sinteză, contrar așteptărilor, zonele de inhibiție au crescut de la 14,5 mm pentru x = 1zi la 15 mm pentru x = 30 zile și până la 18 mm pentru x = 60 zile pe *E. coli*, de la 13 mm pentru x = 1 zi la 14,2 mm pentru x = 30 zile și până la 17 mm pentru x = 60 zile pe *S. aureus* și respectiv de la 14 mm pentru x = 1 zi la 22 mm pentru x = 30 zile și până la 24,4 mm pentru x = 60 zile pe *C. albicans*, deci o îmbunătățire a activității antimicrobiene, în special a celei fungicide.

Tabel VI.11

Mărimea zonelor de inhibiție a *E. coli, S. aureus* și *C. albicans* pentru ansamblul oxid de zinc nanometric – argilă anionică substituită cu zinc (ZnO/ZnLDH) ca funcție de *x. x* este parametru variabil și reprezintă perioada de timp de la sinteza probelor: 1, 30 și respectiv 60 zile.

Microorganisme		Diametrele zonelor de inhibiție, mm			
		x = 1 zi	x = 30 zile	x = 60 zile	
<i>E. coli</i> ATCC 8739, 10 ⁶ ufc/ml		14,5	15	18	
S. aureus ATCC 6538, 10 ⁶ ufc/ml		13	14,2	17	
C. albicans ATCC 10231, 10 ⁸ ufc	/ml	14	22	24,4	
1 zi E.C.	1	zi S.A.	1 zi C.A.		
30 zile E.C.	30	zile S.A.	30 zile C.A.		
60 zile E.C.	60	zile S.A.	60 zile C.A.		

Figura VI.10. Fotografii cu evoluția zonelor de inhibiție a microorganismelor *E. coli* (E.C.), *S. aureus* (S.A.) și *C. albicans* (C.A.) pentru ansamblul oxid de zinc nanometric – argilă anionică substituită cu zinc (ZnO/ZnLDH) ca funcție de *x. x* este parametru variabil și reprezintă perioada de timp de la sinteza probelor: 1, 30 și respectiv 60 zile.

Îmbunătățirea activității antimicrobiene o dată cu trecerea timpului de la sinteză pentru ansamblele ZnO/ZnLDH se datorează unor mecanisme fotocatalitice, probabil prin producerea de specii puternic oxidative, ca O^{2-} , H_2O_2 sau $\cdot OH$, extrem de toxice pentru microorganisme. Cu cât perioada de păstrare a probelor este mai lungă, cu atât sunt mai multe șanse pentru ansamblul ZnO/ZnLDH de a produce o cantitate mai mare de specii reactive. Rezultate similare privind îmbunătățirea activității antimicrobiene simultan cu trecerea timpului de la sinteză pentru nanoparticule de oxid de zinc au fost raportate de Zhang și colab. [133].

În figura VI.11 sunt cumulate rezultatele efectelor antimicrobiene prin mărimea zonelor de inhibiție pentru ansamblele studiate: Ag/ZnLDH, Ag/MgLDH, Ag/CuLDH, CuO/ZnLDH și ZnO/ZnLDH, în funcție de parametrul variabil *x* (*x* reprezintă perioada de timp de la sinteza probelor).



Figura VI.11. Diametrele zonelor de inhibiție a *E. coli*, *S. aureus* și *C. albicans* pentru materialele studiate ca funcție de *x. x* este parametru variabil și reprezintă perioada de timp de la sinteză și până la testarea probelor. Ag/ZnLDH, argint nanometric – argilă anionică substituită cu zinc; Ag/MgLDH, argint nanometric – argilă de tip hidrotalcit; Ag/CuLDH, argint nanometric – argilă anionică substituită cu cupru; CuO/ZnLDH, oxid de cupru nanometric – argilă anionică substituită cu zinc; ZnO/ZnLDH, oxid de zinc nanometric – argilă anionică substituită cu zinc.

Caracter bactericid excelent pentru probele proaspăt sintetizate (x = 1 zi) s-a obținut pentru ansamblele Ag/ZnLDH și Ag/MgLDH, cu aproximativ 25% mai mare decât pentru Ag/CuLDH, CuO/ZnLDH și ZnO/ZnLDH. Caracter fungicid pentru ansamblele proaspăt sintetizate au prezentat doar Ag/MgLDH și ZnO/ZnLDH. Dacă ne raportăm la parametrul variabil x, se observă comportamentul diferit pentru ansamblul ZnO/ZnLDH. Astfel, dacă zonele de inhibiție au scăzut ușor pentru ansamblele de argint (Ag/CuLDH, Ag/MgLDH, Ag/ZnLDH) și drastic, până la inactivare, pentru ansamblele de cupru (CuO/ZnLDH) simultan cu trecerea timpului de la sinteza probelor, în cazul ansamblelor de zinc (ZnO/ZnLDH) zonele de inhibiție au crescut cu 30% pentru bacterii și cu 70% pentru fungul *C. albicans*, pentru probele cu x = 60 zile de la sinteză.

VI.2. Testarea activității antimicrobiene in vivo, pe șoareci

Pentru ansamblul argint nanometric – argilă anionică substituită cu zinc (Ag/ZnLDH) au fost evaluate pe șoareci toxicitatea acută dermică și orală și activitatea antimicrobiană, folosind două modele: modelul rănilor infectate și modelul rănilor neinfectate.

VI.2.2. Testarea activității antimicrobiene in vivo: modelul rănilor infectate

Pentru a confirma activitatea antimicrobiană demonstrată *in vitro* pentru ansamblul argint nanometric – argilă anionică substituită cu zinc (Ag/ZnLDH), în studiul următor a fost evaluat efectul antimicrobian *in vivo* folosind șoareci NMRI infectați cu *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 de concentrații diferite.

VI.2.2.1. Materiale și metode

Infectare, tratament și evaluare

Şoarecii au fost anesteziați prin administrare intraperitoneală de ketamină, 0,5 ml/kg greutate corporală. De pe o zonă de aproximativ 4 cm² din regiunea dorsală toracică a fost îndepărtat părul, sterilizat cu etanol și efectuat o rană circulară cu diametrul aproximativ 0,3 cm, cu îndepărtarea dermei. Şoarecii au fost imediat injectați sub rană cu 50 µl suspensie *S. aureus* 10⁴ ufc/ml. Peste rană a fost aplicat pansament steril. Şoarecii au fost puși în cuști individuale și au fost împărțiți în două grupe de studiu. Primul grup, de control, nu a primit tratament. Al doilea grup a fost tratat local, la o oră de la infectare, cu 1g/kg ansamblu Ag/ZnLDH. Toți șoarecii au avut acces la hrană și apă *ad libitum*. La 24 de ore de la infectare șoarecii din ambele grupuri de studiu au fost eutanasiați și țesuturile rănite, inclusiv zonele imediat înconjurătoare au fost prelevate. Probele prelevate au fost introduse în eprubete cu mediu nutritiv lichid pe bază de cazeină și soia. După omogenizare, suspensiile cu mediu nutritiv și

ţesut au fost diluate folosind același tip de mediu nutritiv lichid. 50 μl din fiecare suspensie obținută au fost cultivați pe durata nopții pe plăci cu mediu nutritiv agarizat pentru evaluare microbiană. Figura VI.13 prezintă imagini cu etapele de lucru.

Testul antimicrobian *in vivo* pe șoareci a fost repetat, în aceleași condiții, singura diferență pentru noul studiu constituindu-o infectarea cu *S. aureus* de concentrație mult mai mare, și anume 10⁷ ufc/ml. Suspensiile cu țesut prelevat au fost diluate și evaluate microbiologic în aceeași manieră.

Statistică

Testul Student (t) a fost aplicat pentru compararea grupurilor. Diferențe au fost considerate semnificative statistic pentru un nivel al probabilității (P) mai mic de 0,01.



Figura VI.13. Fotografii reprezentative pentru etapele de lucru în evaluarea *in vivo* a activității antimicrobiene pentru ansamblul argint nanometric – argilă anionică substituită cu zinc (Ag/ZnLDH). (1) șoarece infectat cu *S. aureus* sub rană; (2) eprubetă cu mediu nutritiv lichid în care a fost imersată porțiunea de țesut infectată prelevată de la șoarece; (3) evaluare microbiană pe placă a conținutului eprubetei.

VI.2.2.2. Rezultate și discuții

Coloniile de *S. aureus* recuperate de la cele două experimente sunt prezentate în tabelul VI.12. și figura VI.14. Rezultatele sunt date ca valori medii ale coloniilor recuperate de la fiecare grup de studiu.

Rezultatele *in vivo* pentru *S. aureus* arată o descreștere de aproximativ 2 log a coloniilor viabile în urma tratării șoarecilor cu Ag/ZnLDH. În experimentul 1, șoarecii de control, care au fost infectați cu 10^4 ufc/ml S. *aureus* sub rană și nu au primit tratament, la evaluarea microbiană pe placă s-a obținut un număr de colonii similar cu cel inoculat inițial (1,05 x 10^4 ufc/ml). În cazul șoarecilor inoculați inițial cu aceeași concentrație de bacterie sub rană (10^4 ufc/ml), dar care au primit ca tratament pulbere Ag/ZnLDH, în urma evaluării microbiene s-au numărat 1,3 x 10^2 ufc/ml colonii de *S. aureus*, deci o reducere de aproximativ 2 log ca urmare a susceptibilității bacteriei la ansamblul Ag/ZnLDH. Diferențele sunt statistic semnificative cu *P* < 0,05. În experimentul 2, rezultatele obținute sunt relativ asemănătoare. Pentru șoarecii de control care au fost inoculați sub rană cu 10^7 ufc/ml *S. aureus* și nu au primit tratament, în urma evaluării pe placă s-a obținut o concentrație similară cu cea inoculată inițial (aproximativ 10^7 ufc/ml) în timp ce pentru șoarecii inoculați inițial cu 10^7 ufc/ml și care au primit tratament Ag/ZnLDH, în urma evaluării microbiene s-a numărat o concentrație de 2,4 x 10^5 ufc/ml. Diferența este statistic semnificativă cu *P* < 0,001.

Tabel VI.12

Activitatea *in vivo* a ansamblului argint nanometric – argilă anionică substituită cu zinc (Ag/ZnLDH) folosind șoareci cu răni inoculate cu *S. aureus*. Rezultatele sunt date ca valori medii ale coloniilor recuperate de la șoareci după 24 de ore de la infectare. Studiul a fost realizat prin două experimente: Experiment 1, inoculare inițială cu 10^4 ufc/ml și Experiment 2, inoculare inițială cu 10^7 ufc/ml.

	Microorganisme recuperate (ufc/ml)				
Grup	Experiment 1	Experiment 2			
Control	$1,05 \ge 10^4$	>107			
Ag/ZnLDH	$1,30 \ge 10^2$	$2,4 \ge 10^5$			



Figura VI.14. Reducerea numărului de colonii viabile de *S. aureus* la tratarea șoarecilor NMRI cu ansamblu argint nanometric – argilă anionică substituită cu zinc (Ag/ZnLDH). La 24 de ore de la inoculare sub rană cu *S. aureus* 10⁴ ufc/ml (Experiment 1) și *S. aureus* 10⁷ ufc/ml (Experiment 2), șoarecii de control, care nu au primit tratament (bare de culoare albastră) și șoarecii care au primit tratament local Ag/ZnLDH (bare de culoare roșie) au fost eutanasiați și țesuturile rănite au fost prelevate și evaluate microbian pe plăci. **P* < 0,05; ** *P* < 0.001. Barele de eroare reprezintă mediile ± eroarea standard. Figura VI.15 prezintă imagini sugestive, pentru ambele experimente, cu reducerea numărului de colonii viabile pentru șoriceii infectați sub rană cu *S. aureus* la tratarea cu pulbere Ag/ZnLDH.



Figura VI.15. Plăci care arată reducerea numărului de colonii viabile de *S. aureus* după tratarea șoarecilor NMRI cu ansamblu argint nanometric – argilă anionică substituită cu zinc (Ag/ZnLDH). Probele prelevate de la șoareci au fost diluate de 1/10 ori. Placa din stânga este atribuită șoarecelui de control, care în urma inoculării sub rană cu *S. aureus* 10⁴ ufc/ml, nu a primit tratament. Placa din dreapta este atribuită șoarecelui care, în urma inoculării cu *S. aureus* 10⁴ ufc/ml, a primit tratament local Ag/ZnLDH.

VI.2.3. Testarea activității antimicrobiene in vivo: modelul rănilor neinfectate

Efectul administrării locale și orale a pulberii de ansamblu argint nanometric – argilă anionică substituită cu zinc (Ag/ZnLDH), prin prevenirea infecției și favorizarea vindecării rănilor externe, a fost investigat pe șoareci NMRI. Contracția și perioada de epitelizare a rănilor tratate cu Ag/ZnLDH au fost comparate cu rănile tratate cu Baneocin, pulbere antimicrobiană cutanată din comerț (Sandoz, lot 460755, cu conținut de batracină de zinc 25.000 UI și neomicină 500.000 UI). Biocompatibilitatea *in vivo* a ansamblului Ag/ZnLDH a fost evaluată prin examinări patologice și microscopice și prin evoluția greutății corporale.

VI.2.3.1. Materiale și metode

Efectuare rană și administrare tratament

Şoarecii au fost anesteziați prin administrare intraperitoneală de ketamină, 0,5 ml/kg greutate corporală. De pe o zonă de aproximativ 4 cm² din regiunea dorsală toracică a fost îndepărtat părul, sterilizat cu etanol și efectuat o rană circulară cu diametrul aproximativ 0,6 cm, cu îndepărtarea dermei. Ziua efectuării rănii a fost considerată ziua 1. Şoarecii au fost puși în cuști individuale și au fost împărțiți în patru grupe de studiu. Primul grup, de control, nu a primit niciun tratament. Al doilea grup,

standard, a fost tratat o singură dată pe zi cu Baneocin pulbere cutanată. Al treilea grup, test, a primit tratament prin aplicare locală, o singură dată pe zi până la vindecare, de Ag/ZnLDH pulbere. Al patrulea grup, de testare, a fost tratat prin administrare orală, o singură dată pe zi până la vindecare cu 1g/kg greutate corporală șoarece pulbere Ag/ZnLDH omogenizată în hrană. Observații privind procentul de închidere a rănilor au fost preluate în zilele 1, 3 și în fiecare zi alternantă până la finalul studiului (Ziua 19). Au fost notate informații privind mărimea cicatricei, prezența sau absența crustei, refacerea blănii. În a 5-a zi de la efectuarea rănilor au fost prelevate porțiuni din țesutul rănit din grupurile de control, standard și testare dermică pentru evaluare histopatologică.

Biocompatibilitate

Modificări ale greutății corporale pentru cele 4 grupuri de studiu au fost înregistrate la fiecare 3 zile, începând din ziua efectuării rănilor. Analize microscopice privind modificări histopatologice au fost realizate pe porțiuni mici din ficat și splină prelevate de la grupurile de control și testare orală în a 13-a zi de la efectuarea rănilor.

VI.2.3.2. Rezultate și discuții

Rezultatele activității de vindecare a rănilor sunt prezentate în tabelul VI.13 și figurile VI.17 – VI.21. Valorile prezentate în tabel reprezintă procentul de închidere a rănilor la 3, 5, 9, 13, 17, 19 zile pentru grupurile de control (care nu a primit tratament), standard (tratament local, o dată pe zi cu Baneocin, pulbere cutanată) și grupurile test (tratament cu Ag/ZnLDH local, pe rană, o singură dată pe zi și respectiv oral, 1g/kg o singură dată pe zi).

Aplicarea nanoparticulelor de Ag/ZnLDH direct pe rană accelerează vindecarea rănilor și nu prezintă efecte toxice discernabile. S-a observat astfel că abilitatea de vindecare a rănilor animalelor tratate cu Ag/ZnLDH pulbere aplicată local este semnificativ mai mare comparativ cu grupurile de control (P < 0,001) și standard (P < 0,01). Perioada de epitelizare completă (100% închidere a rănilor) a fost de 17 zile pentru animalele tratate local cu Ag/ZnLDH, 19 zile pentru animalele tratate oral cu Ag/ZnLDH, în timp ce pentru grupurile de control și standard s-au obținut până în ziua a 19-a de la efectuarea rănilor (ultima zi de studiu) un grad de închidere a rănilor de 84,23%, respectiv 92,74%.

Grup	Ziua 3	Ziua 5	Ziua 9	Ziua 13	Ziua 17	Ziua 19			
	Procente medii ale contracțiilor rănilor \pm SEM ^a								
Control	10,84±0,41	12,43±0,97	26,69±1,82	71,22±1,09	79,45±1,36	84,23±1,40			
Standard	30,44±1,13	44,47±0,95	60,36±1,39	79,73±0,96	87,53±0,87	92,74±0,87			
Ag/ZnLDH	35,4	54,08±1,23°°	75,01±1,78°°	87,0±0,74**°°	100	-			
local	±1,9**°								
Ag/ZnLDH	$3,22\pm1,82$	4,53±1,72	17,74±2,66	79,51±3,11	91,0±0,8*°	100			
oral									

Efectul ansamblului argint nanometric – argilă anionică substituită cu zinc (Ag/ZnLDH) aplicat local și oral în vindecarea rănilor șoarecilor.

Datele sunt analizate prin testul Student t.

^aSEM, eroarea standard a mediei.

Tabel VI.13

* Diferit semnificativ față de grupul de control, P < 0.01.

** Diferit semnificativ față de grupul de control, P < 0,001.

° Diferit semnificativ față de grupul standard, P < 0.05.

°° Diferit semnificativ față de grupul standard, P < 0,01.

Figurile VI.18 – VI.21 prezintă fotografii reprezentative pentru șoarecii din cele patru grupuri de studiu: grupul de control, care nu a primit tratament (Figura VI.18), grupul standard, tratat cu Baneocin, pulbere cutanată (Figura VI.19) și cele două grupuri de testare tratate cu Ag/ZnLDH administrată local (Figura VI.20) și oral (Figura VI.21).



Figura VI.18. Șoarece din grupul de control. Rana a format crustă și vindecarea a fost întârziată. Nu a fost vindecat complet în 19 zile.



Figura VI.19. Șoarece din grupul standard care a fost tratat local o singură dată pe zi cu Baneocin pulbere cutanată. Rana nu a fost vindecată complet în 19 zile.



Figura VI.20. Şoarece tratat local o singură dată pe zi cu ansamblu argint nanometric – argilă anionică (Ag/ZnLDH). Pulberea antimicrobiană nu a permis infectarea rănii. Rana a fost vindecată complet în 17 zile.



Figura VI.21. Șoarece tratat o singură dată pe zi prin administrare orală de 1g/kg ansamblu argint nanometric – argilă anionică (Ag/ZnLDH). Rana a fost vindecată complet în 19 zile.

Figura VI.22 prezintă imagini prin microscopie electronică de baleiaj, SEM, reprezentative pentru porțiuni din țesuturile lezate, prelevate în a 5-a zi de studiu de la grupurile de control, standard și testare orală.



VI.22. Imagini SEM prin secțiunea țesutului rănit (a) șoarece din grupul de control, care nu a primit tratament;
(b) șoarece din grupul standard, care a primit ca tratament Baneocin pulbere cutanată; (c) șoarece din grupul de testare care a fost tratat cu Ag/ZnLDH local.

Studiile histopatologice asupra leziunii rănite prezintă țesutul cu structura cea mai compactă și cu conținut de fibrocolagen bine format pentru grupul de testare orală cu Ag/ZnLDH, comparativ cu grupurile standard și de control.

Pentru șoarecii din grupul de testare locală cu Ag/ZnLDH s-a observat un efect secundar interesant. Administrarea de pulbere Ag/ZnLDH direct pe rană duce la intensificarea refacerii blănii în zona afectată (Figura VI.23).



Figura VI.23. Efect de favorizare a refacerii blănii prin aplicare locală, zilnică de Ag/ZnLDH.

În tabelul VI.14 și figura VI.24 sunt prezentate evoluția greutății corporale a șoarecilor pe durata studiului pentru cele patru grupuri de lucru: control, standard, testare locală și testare orală. Pierderea în greutate reprezintă un parametru de identificare a toxicității agentului de tratare. Diferențele statistice între grupuri au fost determinate prin testul Student *t*.

Tabel VI.14

Evoluția greutății corporale pe durata studiului pentru cele patru grupuri de testare: control, care nu a primit tratament; standard, care a fost tratat zilnic cu Baneocin pulbere cutanată; Ag/ZnLDH local, care a fost tratat local zilnic cu Ag/ZnLDH; Ag/ZnLDH oral, care a fost tratat zilnic cu 1g/kg Ag/ZnLDH administrat oral.

U	, 0	,					
Grup	Ziua 1	Ziua 4	Ziua 10	Ziua 13	Ziua 16	Ziua 19	
	Valori medii ale greutăților corporale ± SEM ^a						
Control	25,08±1,07	25,84±0,83	28,15±0,75	28,50±0,83	27,85±0,96	28,79±0,83	
Standard	25,20±1,35	24,86±0,91	26,57±1,37	$27,45\pm1,26$	27,57±1,59	29,41±1,97	
Ag/ZnLDH local	$26,0 \pm 1,58$	26,27±1,21	27,70±2,02	29,51±2,23	$29,08\pm 2,50$	$30,56\pm 2,51$	
Ag/ZnLDH oral	25,75±1,53	$25,94{\pm}2,0$	28,10±2,87	28,60±1,96	29,51±1,90	30,84±1,71	

Datele sunt analizate prin testul Student t.

^aSEM, eroarea standard a mediei.

Creșterea în greutate a fost aproximativ similară pentru toate grupurile de studiu, cu valori la finalul studiului mai mari cu 3,71 g pentru grupul de control, cu 4,21 g pentru grupul standard, cu 4,56 g pentru grupul de testare locală și respectiv cu 5,09 g pentru grupul de testare orală, față de greutățile corporale din prima zi de studiu. Diferențele sunt statistic nesemnificative. Creșterea în greutate pe

măsura trecerii zilelor se înscrie în datele tehnice prezente pentru șoareci NMRI, fapt ce sugerează absența efectelor toxice ale administrării de pulbere Ag/ZnLDH.



Figura VI.24. Evoluția greutății corporale pe durata studiului pentru cele patru grupuri de testare: control, care nu a primit tratament; standard, care a fost tratat zilnic cu Baneocin pulbere cutanată; Ag/ZnLDH local, care a fost tratat local zilnic cu Ag/ZnLDH; Ag/ZnLDH oral, care a fost tratat zilnic cu 1g/kg Ag/ZnLDH administrat oral.

Examinarea patologică nu a arătat leziuni ale organelor interne ficatului și splinei pentru grupul care a primit pulbere Ag/ZnLDH pe cale orală sunt normale prin comparație cu grupul de control, atât prin examinare superficială, vizuală, cât și prin microscopie electronică, fapt ce sugerează absența efectelor toxice pentru grupul care a primit oral 1g/kg ansamblu argint nanometric – argilă anionică substituită cu zinc (Ag/ZnLDH). Sunt necesare însă investigații suplimentare, ca determinarea parametrilor biochimici, studii de inflamare a celulelor, folosind doze diferite și căi de administrare diferite.

Aceste descoperiri sugerează că sistemul Ag/ZnLDH poate constitui un agent excelent de tratare a rănilor cutanate, prevenind infecția și favorizând vindecarea.

CAPITOLUL VII CONCLUZII GENERALE

Cercetarea desfășurată în cadrul tezei de doctorat a avut ca obiective principale fabricarea, studiul caracteristicilor fizico-chimice și testarea ansamblelor de nanoparticule de metale și oxizi metalici depuse pe argile anionice de tip hidrotalcit ca noi agenți antimicrobieni și cicatrizanți și ca materiale cu activități optice și fotocatalitice îmbunătățite.

Rezultatele obținute în studiul de degradare fotoasistată a fenolului de ansamble de oxid de titan nanometric – argile anionice de tip hidrotalcit au arătat performanțe fotocatalitice superioare, pe mai multe runde catalitice, în comparație cu fotocatalizatorul comercial Degussa P25.

Rezultatele studiilor experimentale *in vitro* au arătat activitate bactericidă excelentă, chiar și la durate de timp lungi de la sinteză, pentru nanoparticulele de argint nanometrice depuse pe argile de tip hidrotalcit, superioară nanoparticulelor de argint libere, nestabilizate. Studiile *in vivo*, de vindecare a rănilor șoarecilor NMRI infectate și neinfectate au arătat că ansamblul biocompatibil argint nanometric – argilă anionică poate constitui un agent excelent de tratare, superior pulberii cutanate Baneocin, prevenind infecția și favorizând epitelizarea.

Deoarece au fost evidențiate mai multe concluzii particulare, acestea sunt redate în cele ce urmează.

Au fost fabricate ansamble nanostructurate complexe de tip metale şi/sau oxizi metalici depuşi pe argile de tip hidrotalcit folosind autoasamblarea obţinută pe baza proprietăţii de reconstrucţie a argilei de tip hidrotalcit; aceste materiale reprezintând formulari compoziţionale noi, lucru dovedit prin publicarea rezultatelor în reviste cu indici de impact (scor relativ de influență) ridicaţi.

Ansamblele nanostructurate fabricate au fost studiate folosind tehnici de caracterizare fizicochimică moderne (XRD, XPS, EDX, TEM, SEM, FTIR) care pun în evidență faptul că aceste materiale s-au obținut prin autoasamblarea și autoorganizarea componenților nanometrici.

Proprietățile fotosensibile pentru ansamblele Ag/MgLDH, Ag/ZnLDH și TiO₂/ZnLDH au fost demonstrate prin evaluarea caracteristicilor optice. Rezultatele arată că aceste noi tipuri de asamblări nanometrice au proprietăți optice performante.

Performanțele fotocatalitice superioare demonstrate de TiO₂/ZnLDH comparativ cu Degussa P25 pentru degradarea fenolului pot apărea din suprafețele specifice mari și proprietățile mezoporoase ale argilei care pot îmbunătăți abilitatea de generare a perechilor electroni – găuri fotoinduse în centrii activi și a proprietățile de transfer de electroni la interfața semiconductorului TiO₂/ZnLDH.

A fost demonstrat caracterul antimicrobian pentru ansamble nanostructurate formate din nanoparticule de argint, oxid de cupru, oxid de zinc, oxid de ceriu și respectiv oxid de magneziu depuse pe argile anionice de tip hidrotalcit diferite compozițional, folosind bacterii gram – pozitive, gram – negative și fungi.

Pentru probele proaspăt sintetizate, testele au arătat cea mai bună activitate antimicrobiană pentru ansamblele Ag/MgLDH și Ag/ZnLDH.

Activitatea bactericidă a fost superioară activității fungicide; diferențele în compoziția matricelor au avut efect asupra activității antimicrobiene, Ag/CuLDH prezentând activitate redusă comparativ cu Ag/MgLDH și Ag/ZnLDH.

Pentru ansamblele nanometrice proaspăt sintetizate de oxid de cupru depuse pe argile anionice de tip hidrotalcit, testele antimicrobiene au arătat activitate bactericidă bună, dar inferioară ansamblelor cu argint; activitatea fungicidă poate fi considerată neglijabilă.

Pentru ansamblele nanometrice de oxid de zinc depuse pe argile anionice de tip hidrotalcit, cea mai bună activitate antimicrobiană a fost demonstrată de probele testate la 60 zile de la sinteză. Îmbunătățirea activităților antimicrobiene, în special cea fungicidă, pe măsura trecerii timpului de la sinteză considerăm că sunt cauzate de proprietățile fotocatalitice atribuite sistemului ZnO/ZnLDH.

Testele antimicrobiene efectuate integrează nanotehnologia și microbiologia, ducând la progrese în formularea unor noi tipuri de agenți antimicrobieni.

Studiile de toxicitate acută dermică și orală pe șoareci NMRI au arătat că ansamblul Ag/ZnLDH este netoxic, fiind clasificat conform GHS (Sistemului Global Armonizat de Clasificare și Etichetare a Chimicalelor) în clasa 5/neclasificat.

Studiul pe șoareci NMRI de vindecare a rănilor infectate cu *S. aureus* a arătat o descreștere de aproximativ 2 log a coloniilor viabile în urma tratării șoarecilor cu Ag/ZnLDH, demonstrând astfel efect antiinfecțios *in vivo*.

Studiul pe șoareci NMRI de vindecare a rănilor neinfectate a arătat capacitatea extraordinară de epitelizare pentru ansamblul Ag/ZnLDH, administrat atât local cât și oral, superioară pulberii antiinfecțioase din comerț (Baneocin, pulbere cutanată).

Studiile de biocompatibilitate *in vivo* au arătat absența modificărilor histopatologice, efect de intensificare în refacerea țesuturilor lezate și refacerea blănii, creșterea normală în greutate a șoarecilor care au fost tratați cu pulbere Ag/ZnLDH.

Ambele studii (*in vitro* și *in vivo*) au demonstrat că Ag/ZnLDH este un agent antimicrobian foarte eficient pe *S. aureus*.

Rezultatele sugerează că sistemul Ag/ZnLDH poate constitui un agent excelent de tratare a rănilor cutanate, prevenind infecția și favorizând vindecarea rănilor.

ACTIVITATEA ȘTIINȚIFICĂ A DOCTORANDULUI

Articole publicate în reviste cotate ISI:

- Gabriela Carja, Yoshikazu Kameshima, Akira Nakajima, <u>Cristian Dranca</u>, Kiyoshi Okada, *Nanosized silver–anionic clay matrix as nanostructured ensembles with antimicrobial activity*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2009, 34 (6), 534-539. Factor de impact 2010: 3,787.
- Gabriela Carja, Akira Nakajima, <u>Cristian Dranca</u>, Kiyoshi Okada, Nanoparticles of nickel oxide: growth and organization on zinc-substituted anionic clay matrix by one-pot route at room temperature. Journal of Nanoparticle Research, 2010, 12 (8), 3049-3056. Factor de impact 2010: 3,250
- Gabriela Carja, Akira Nakajima, Sofronia Dranca, <u>Cristian Dranca</u>, Kiyoshi Okada, *TiO₂/ZnLDH as a Self-Assembled Nanocomposite with Photoresponsive Properties*. The Journal of Physical Chemistry C, 2010, 114, 14722 – 14728. Factor de impact 2010: 4,520

Articole publicate în reviste recunoscute CNCSIS:

<u>Cristian Dranca</u>, Gabriela Carja, Sofronia Dranca, *The optical features of silver – layered double hydroxides nanostructured ensembles studied by UV-Vis spectroscopy*. Buletinul Institutului Politehnic din Iasi, Secția Chimie și Inginerie Chimică, 2010, Tomul LVI (LX), Fasc. 2, 201-208, ISSN: 0254 – 7104.

Participări la școli de vară internaționale pentru doctoranzi:

1. <u>Cristian Dranca</u>, Sofronia Dranca, Gabriela Carja, *Drug delivery system based on hydrotalcites-like anionic clays with magnetic properties*. Plant Bioinformatics, Systems and Synthetic Biology, Summer School, 27-31 iulie 2009, University of Nottingham, UK.

Comunicări prezentate la manifestări științifice internaționale:

- Sofronia Dranca, Gabriela Carja, Gabriela Lehutu, <u>Cristian Dranca</u>, *Tailoring the antibiotic release from anionic clays matrices*. The 6th international edition of: Romanian Conference on Advanced Materials ROCAM 2009, 25 28 august 2009, Braşov, Romania.
- Gabriela Carja, Akira Nakajima, Gabriela Ciobanu, <u>Cristian Dranca</u>, Nanoparticles of ZnO on Mg - Al layered double hydroxide matrix as nanostructured ensembles with antimicrobial properties. European Materials Research Society E-MRS 2010 Spring Meeting: Functional Biointerfaces, Strasbourg, France.
- Gabriela Carja, Laura Dartu, Gabriela Ciobanu, <u>Cristian Dranca</u>, Ag/ZnLDH and Ag/MgLDH as nanostructured assemblies for antimicrobial coating. 3rd International Conference on Nanostructures SElf-Assembly NanoSEA C 2010, 28 June - 2 July 2010 Cassis, French Riviera.
- Gabriela Carja, <u>Cristian Dranca</u>, Akira Nakajima, *Nanostructured assembly of TiO₂/FeLDH as* visible – light active photocatalyst. 3rd International Conference on Advanced Nano Materials ANM 12-15 September 2010 - Agadir, Morocco.
- Gabriela Carja, Akira Nakajima, <u>Cristian Dranca</u>, Kiyoshi Okada, *CuO/LDHs and Ag/LDHs as Nanostructured Assemblies with Antimicrobial Properties*. 18th Annual International Conference on Composites/Nano Engineering (ICCE 18) July 4-10, 2010, Anchorage, Alaska, USA.

Bibliografie selectivă

- [42] Khan, A.I. Lu, L. Norquist, A.J. O'Hare, D. 2001. Intercalation and controlled release of pharmaceutically compound from a layered double hydroxide. Chem. Commun. 2342-2343.
- [43] Ambrogi, V. Fardella, G. Grandolini, G. Perioli, L. 2001. Intercalation compounds of hydrotalcitelike anionic clays with anti-inflammatory agents - I. Intercalation and in vitro release of ibuprofen. Int. J. Pharm. 220: 23–32.
- [44] Li, B. He, J. Evans, D.G. Duan, X. 2004. Inorganic layered double hydroxide as a drug delivery system-intercalation and in vitro release of fenbufen. Appl. Clay Sci. 27: 199-207.
- [46] Berber, M.R. Minagawa, K. Katoh, M. Mori, T. Tanaka, M. 2008. Nanocomposites of 2arylpropionic acid drugs based on Mg–Al layered double hydroxide for dissolution Enhancement. Eur. J. Pharm. Sci. 35: 354–360.
- [68] Cota, I. Ramirez, E. Francisco, M. Geraldine, L. Chebout, R. Tichit, D. 2010. Alkaline-earthdoped mixed oxides obtained from LDH nanocomposites as highly basic catalysts. Catal. Today, 152: 115–118.
- [69] Chebout, R. Tichit, D. Geraldine, L. Barama, A. Coq, B. Cota, I., Ramirez Rangel, E. Medina, F. 2010. New basic catalysts obtained from layered double hydroxides nanocomposites. Solid State Sci. 12: 1013-1017.
- [80] Carja, G. Niiyama, H. 2005. From the organized nanoparticles of copper and vanadium containing LDHs to the small nanoparticles of mixtures of mixed oxides: A simple route. Mater. Lett. 59: 3078 – 3080.
- [82] Vágvölgyi, V. Palmer, S.J. Kristóf, J. Frost, R.L. Horváth, E. 2008. Mechanism for hydrotalcite decomposition: A controlled rate thermal analysis study. J. Colloid Interface Sci. 318: 302–308.
- [97] Braconnier, B. Paez, C. Lambert, S. Alie, C. Henrist, C. Poelman, D. Pirard, J.-P. Cloots, R. Heinrichs, B. 2009. Ag- and SiO₂ –dopped porous TiO₂ with enhanced thermal stability. Micropor. Mesopor. Mater. 122: 247-254.
- [98] Dawn, A. Mukherjee, P. Nandi, A.K. 2007. Preparation of size-controlled, highly populated, stable, and nearly monodispersed Ag nanoparticles in an organic medium from a simple interfacial redox process using a conducting polymer. Langmuir 23: 5231–5237.
- [99] Perez Ramirez, J. Guido, M. Kaptejin, F. Moulijn, J. 2001. In situ investigation of the thermal decomposition of Co-Al hydrotalcite in different atmospheres. J. Mater. Chem. 11, 821-830.

- [100] Carja, G. Nakajima, A. Dranca, C. Okada, K. 2010. Nanoparticles of nickel oxide: growth and organization on zinc-substituted anionic clay matrix by one-pot route at room temperature. J. Nanopart. Res.12: 3049-3056.
- [101] Carja, G. Nakajima, A. Dranca, S. Dranca, C. Okada, K. 2010. TiO₂/ZnLDH as a self-assembled nanocomposite with photoresponsive properties. J. Phys. Chem.C, 114: 14722 – 14728.
- [128] Yoon, K.-Y. Byeon, J.H. Park, J.-H. Hwang, J. 2007. Susceptibility constants of Escherichia coli and Bacillus subtilis to copper nanoparticles. Sci. Total Environ. 373: 572-575.
- [129] Kim, J.S. Kuk, E. Yu, K.N. Kim, J.-H. Park, S.J. Lee, H.J. Kim, S.H. Park, Y.K. Park, Y.H. Hwang, C.-Y. Kim, Y.-K. Lee, Y.-S. Jeong, D.H. Cho, M.-H. 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine 3: 95-101.
- [130] Malachová, K. Praus, P. Pavlíčkova, Z. Turicová, M. 2009. Activity of antibacterial compounds immobilised on montmorillonite. Appl. Clay Sci. 43: 364–368.
- [131] Tien, D.-C. Tseng, K.-H. Liao, C.-Y. Tsung, T.-T. 2008. Colloidal silver fabrication using the spark discharge system and its antimicrobial effect on Staphylococcus aureus. Med. Eng. Phys. 30: 948-952.
- [132] Perelshtein, I. Applerot, G. Perkas, N. Wehrschuetz-Sigl, E. Hasmann, A. Guebitz, G. Gedanken,A. 2009. CuO-cotton nanocomposite: Formation, morphology, and antibacterial activity. Surf.Coat. Technol. 204: 54-57.
- [133] Zhang, L. Ding, Y. Povey, M. York, D. 2008. ZnO nanofluids-A potential antibacterial agent. Prog. Nat. Sci. 18: 939-944.
- [134] Li, L.-H. Deng, J.-C. Deng, H.-R. Liu, Z.-L. Xin, L. 2010. Synthesis and characterization of chitosan/ZnO nanoparticle composite membranes. Carbohydr. Res. 345: 994-998.
- [135] Kumar, A. Pandey, A.K. Singh, S.S. Shanker, R. Dhawan, A. 2011. Cellular uptake and mutagenic potential of metal oxide nanoparticles in bacterial cells. Chemosphere, doi:10.1016/j.chemosphere.2011.01.025.
- [141] Kim, Y.S. Kim, J.S. Cho, H.S. Rha, D.S. Kim, J.M. Park, J.D. Choi, B.S. Lim, R. Chang, H.K. Chung, Y.H. Kwon, I.H. Jeong, J. Han, B.S. Yu, I.J. 2008. Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. Inhal. Toxicol. 20: 575-583.