



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

**Sidabro nanodalelių biosintezės optimizavimas, naudojant  
gvaizdūnės (lot. *Zinnia elegans*) ekstraktus**

Baigiamasis magistro projektas

---

**Justė Narmonaitė**

Projekto autorė

**Doc. Dr. Neringa Petrašauskienė**

Vadovė

---

**Kaunas, 2024**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

# **Sidabro nanodalelių biosintezės optimizavimas, naudojant gvaizdūnės (lot. *Zinnia elegans*) ekstraktus**

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

---

**Justė Narmontaitė**

Projekto autorė

**Doc. Dr. Neringa Petrašauskienė**

Vadovė

**Doc. Dr. Ilona Jonuškienė**

Konsultantė

**Doc. Dr. Edita Paluckienė**

Recenzentė

---

**Kaunas, 2024**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

Justė Narmontaitė

## **Sidabro nanodalelių biosintezės optimizavimas, naudojant gvaizdūnės (lot. *Zinnia elegans*) ekstraktus**

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1. baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdama(s) kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasi(s) Lietuvos Respublikos autorių teisių ir gretutinių teisių įstatymo nuostatų, Kauno technologijos universiteto (toliau – Universitetas) intelektinės nuosavybės valdymo ir perdavimo nuostatų bei Universiteto akademinės etikos kodekse nustatytų etikos reikalavimų;
2. baigiamajame projekte visi pateikti duomenys ir tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti teisėtai, nei viena šio projekto dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar elektroninių šaltinių, visos baigiamojo projekto tekste pateiktos citatos ir nuorodos yra nurodytos literatūros sąrašė;
3. įstatymų nenumatytų piniginių sumų už baigiamąjį projektą ar jo dalis niekam nesu mokėjęs (-usi);
4. suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo ar kitų asmenų teisių pažeidimo faktui, man bus taikomos akademinės nuobaudos pagal Universitete galiojančią tvarką ir būsiu pašalinta(s) iš Universiteto, o baigiamasis projektas gali būti pateiktas Akademinės etikos ir procedūrų kontrolieriaus tarnybai nagrinėjant galimą akademinės etikos pažeidimą.

Justė Narmontaitė

*Patvirtinta elektroniniu būdu*

Narmontaitė, Justė. Sidabro nanodalelių biosintezės optimizavimas, naudojant gvaizdūnės (lot. *Zinnia elegans*) ekstraktus. Magistro baigiamasis projektas / vadovė doc. dr. Neringa Petrašauskienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų krypčių grupė): Biotechnologijos, Technologijų mokslai.

Reikšminiai žodžiai: *Zinnia elegans*; sidabro nanodalelės; antibakterinis aktyvumas; žalioji biosintezė; RSDA; SEM/EDS; TEM/EDS; FTIR; UV-RŠ.

Kaunas, 2024. 63 p.

### Santrauka

Nanodalelių technologija tai mokslo sritis sujungianti fizikos, chemijos bei biologijos mokslo šakas, kuri yra žinoma nuo praėjusio šimtmečio, kuomet buvo pradėtos nagrinėti nanodalelių gavimas, savybės bei panaudojimas. Tai iki 100 nm dydžio dalelės, pasižyminčios unikaliomis cheminėmis, fizikinėmis bei biologinėmis savybėmis. Nanodalelės gali būti pritaikytos įvairiose srityse: medicinoje, kosmetikos bei maisto pramonėje, aplinkosaugoje. Šiame darbe nagrinėjamas sidabro nanodalelių biosintezės metodas yra glaudžiai susijęs su pramoninės gamybos plėtra, kurioje yra naudojamos dažnai į aplinką patenkančios kenksmingos medžiagos. Siekiant rasti naujų alternatyvių būdų išspręsti šią problemą ir mažinti toksiškų medžiagų kiekį, patenkančių į aplinką, darbe yra siūloma naudoti „žaliosios“ biosintezės metodą, panaudojant augalinį ekstraktą.

Biosintezės metodu, naudojant gvaizdūnės (lot. *Zinnia elegans*) augalinį ekstraktą, kuriame esantys biologiškai aktyvūs junginiai veikė kaip redukuojantys agentai, buvo susintetintos sidabro nanodalelės, sidabro nitrato tirpalą naudojant kaip sidabro jonų šaltinį. Atlikus ultravioletinės – regimosios šviesos spinduliuotės analizę, Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopiją, fazinės sudėties rentgeno spindulių difrakcinę analizę, morfologines savybes nusakančią skenuojančią elektroninę mikroskopijos analizę bei transmisinės elektronų mikroskopijos analizę, cheminės sudėties rentgeno spindulių energijos dispersinę spektroskopiją buvo patvirtinta, kad biosintezės metu susidarė sidabro nanodalelės. Atliktas antibakterinių savybių tyrimas parodė sidabro nanodalelių atsparumą *Escherichia coli* bei *Bacillus subtilis* patogeninėms bakterijoms.

Narmontaitė, Justė. Optimization of Silver Nanoparticle Biosynthesis Using *Zinnia Elegans* Extracts. Master's Final Degree Project / supervisor assoc. prof . dr. Neringa Petraškauskienė; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area (study field group): Biotechnology, Technological Sciences.

Keywords: *Zinnia elegans*; Silver nanoparticles; antibacterial properties; green synthesis; XRD; SEM/EDS; TEM/EDS; FTIR; UV-Vis

Kaunas, 2024. 63

### Summary

Nanoparticle technology is a field that combines physics, chemistry, and biology, and is known since the last century when the synthesis, properties, and applications of nanoparticles began to be studied. These particles, up to 100 nm in size, exhibit unique chemical, physical, and biological properties. Nanoparticles can be applied in various fields: medicine, cosmetics, food industry, and environmental protection. This paper examines the biosynthesis method of silver nanoparticles, closely related to industrial production development, which often involves with the use of harmful substances that can enter the environment. To find new alternative ways to solve this problem and reduce the amount of toxic substances entering the environment, the paper proposes using a "green" biosynthesis method involving plant extract.

In this study, silver nanoparticles were synthesized using the biosynthesis method with plant extract from *Zinnia elegans*, where biologically active compounds in the extract acted as reducing agents, and silver nitrate solution served as the silver source. Ultraviolet-visible spectroscopy, Fourier-transform infrared spectroscopy, X-ray diffraction analysis, scanning electron microscopy analysis, transmission electron microscopy analysis, and energy-dispersive X-ray spectroscopy confirmed that silver nanoparticles were formed during biosynthesis. The antibacterial properties investigation showed that the silver nanoparticles were effective against the pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*.

## Turinys

<b>Lentelių sąrašas .....</b>	<b>8</b>
<b>Paveikslų sąrašas .....</b>	<b>9</b>
<b>Santrumpų ir terminų sąrašas .....</b>	<b>11</b>
<b>Įvadas.....</b>	<b>12</b>
<b>1. Literatūros apžvalga .....</b>	<b>13</b>
1.1. Astrinių (lot. <i>Asteraceae</i> ) šeima .....	13
1.1.1. Gvaizdūnės (lot. <i>Zinnia</i> ) gentis .....	13
1.2. Nanodalelės .....	16
1.2.1. Nanodalelių morfologija.....	16
1.2.2. Nanodalelių sintezės metodai .....	17
1.2.3. Parametrai, lemiantys nanodalelių formavimąsi .....	22
1.2.4. Nanodalelių charakterizavimas .....	22
1.2.5. Nanodalelių savybės .....	23
1.2.6. Nanodalelių panaudojimas ir ekonominė apžvalga.....	24
1.3. Sidabro nanodalelės.....	25
1.3.1. Sidabro nanodalelių biosintezės .....	25
1.3.2. Sidabro nanodalelių savybės ir pritaikymas .....	26
1.4. Lietratūros apžvalgos apibendrinimas .....	26
<b>2. Medžiagos ir tyrimų metodai .....</b>	<b>28</b>
2.1. Prietaisai ir priemonės .....	28
2.2. Medžiagos ir reagentai .....	28
2.3. Metodai.....	29
2.3.1. <i>Zinnia elegans</i> žiedų, lapų, bei stiebų žaliavos paruošimas .....	29
2.3.2. Antioksidacinių savybių tyrimai.....	29
2.3.3. Bendros fenolinių junginių koncentracijos nustatymas Fiolino – Kiokalto metodu .....	31
2.3.4. Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos nustatymas <i>Zinnia elegans</i> augalinėje žaliavoje .....	31
2.3.5. Flavonoidų nustatymas <i>Zinnia elegans</i> augaliniuose ekstraktuose .....	32
2.3.6. Sidabro nanodalelių biosintezė, naudojant <i>Zinnia elegans</i> .....	32
2.3.7. Antibakterinis aktyvumas.....	33
2.3.8. Sidabro nanodalelių ultravioletinės – regimosios šviesos spinduliuotės analizė .....	33
2.3.9. Sidabro nanodalelių Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija.....	33
2.3.10. Sidabro nanodalelių Rentgeno spinduliuotės difrakcijos analizė.....	34
2.3.11. Sidabro nanodalelių skenuojančios elektroninės mikroskopijos ir transmisinės elektroninės mikroskopijos analizė .....	34
2.3.12. Sidabro nanodalelių elementinės sudėties Rentgeno spinduliuotės energijos dispersijos spektroskopijos tyrimai .....	35
<b>3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....</b>	<b>36</b>
3.1. <i>Zinnia elegans</i> ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas .....	36
3.1.1. Redukcinių (antioksidacinių) savybių nustatymas <i>Zinnia elegans</i> augaliniuose ekstraktuose . .....	36

3.1.2. Antioksidacinis aktyvumas <i>Zinnia elegans</i> augaliniuose ekstraktuose, naudojant FRAP metodą .....	37
3.1.3. Antioksidacinis aktyvumas <i>Zinnia elegans</i> augaliniuose ekstraktuose, naudojant DPPH metodą .....	38
3.2. Biologiškai aktyvių junginių koncentracijos nustatymas .....	38
3.2.1. Bendros fenolinių junginių koncentracijos nustatymas Folino – Kiokalto metodu .....	38
3.2.2. Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos nustatymas <i>Zinnia elegans</i> auglinėje žaliavoje ..	39
3.2.3. Flavonoidų nustatymas <i>Zinnia elegans</i> augaliniuose ekstraktuose .....	40
3.3. Antibakterinis aktyvumas .....	41
3.3.1. Antibakterinis aktyvumas, naudojant <i>Escherichia coli</i> bakterijas .....	42
3.3.2. Antibakterinis aktyvumas naudojant <i>Bacillus subtilis</i> bakterijas .....	42
3.4. Sidabro nanodalelių biosintezė naudojant <i>Zinnia elegans</i> augalinius ekstraktus ir jų savybių įvertinimas .....	43
3.4.1. Ultravioletinės – Regimosios šviesos spinduliuotės analizė .....	45
3.4.2. Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija .....	46
3.4.3. Rentgeno spindulių difrakcinė analizė .....	47
3.4.4. Skenuojanti elektroninė mikroskopija .....	48
3.4.5. Rentgeno spindulių energijos dispersinė spektroskopija .....	48
3.4.6. Transmisinė elektronų mikroskopijos analizė .....	50
3.5. Sidabro nanodalelių antibakterinės savybės .....	51
3.5.1. Sidabro nanodalelių antibakterinis aktyvumas naudojant gramneigiamas <i>Escherichia coli</i> bakterijas .....	51
3.5.2. Sidabro nanodalelių antibakterinis aktyvumas naudojant gramteigiamas <i>Bacillus subtilis</i> bakterijas .....	52
<b>4. Rekomendacijų dalis .....</b>	<b>54</b>
<b>Išvados .....</b>	<b>56</b>
<b>Literatūros sąrašas .....</b>	<b>57</b>

## Lentelių sąrašas

<b>1.1 lentelė.</b> Mikroorganizmai, naudojami metalų nanodalelių biosintezėje [45].....	20
<b>1.2 lentelė.</b> Augalai, naudojami nanodalelių biosintezėje [45] .....	21
<b>3.1 lentelė.</b> Sidabro nanodalelių išeišgos, naudojant skirtingus augalinio ekstrakto ir AgNO <sub>3</sub> santykius .....	44
<b>3.2 lentelė.</b> Ag ND kristalitų dydžiai, tarplokštuminiai atstumai ir kristalinės gardelės parametrai	47
<b>3.3 lentelė.</b> EDS tyrimo cheminė elementų sudėtis.....	49
<b>4.1 lentelė.</b> Principinėje aparatūrinėje schemoje pavaizduoti medžiagų žymėjimai ir jų pavadinimai .....	55
<b>4.2 lentelė.</b> Principinėje aparatūrinėje schemoje pavaizduoti įrangos žymėjimai ir jų pavadinimai	55



## Paveikslų sąrašas

<b>1.1 pav.</b> Zinnia rūšys. a – <i>Zinnia acerosa</i> , b – <i>Zinnia angustifolia</i> , c – <i>Zinnia elegans</i> , d – <i>Zinnia haageana</i> .....	14
<b>1.2 pav.</b> Nanodalelių formos .....	16
<b>1.3 pav.</b> (A) - "iš apačios į viršų" (ang. " <i>bottom-up</i> ") sintezės metodo schema, (B) – „iš viršaus į apačią“ (ang. „ <i>top-down</i> “) sintezės metodo schema [22].....	17
<b>1.4 pav.</b> Redukcijos reakcijos mechanizmas AgND sintezėje [45] .....	20
<b>1.5 pav.</b> Sidabro nanodalelių biosintezės reakcijos, naudojant augalo ekstraktą schema [69] .....	25
<b>2.1 pav.</b> Sidabro nanodalelių biosintezės schema .....	32
<b>2.2 pav.</b> Antibakterinio aktyvumo slopinimo zonos įvertinimas .....	33
<b>2.3 pav.</b> Skenuojantis elektroninis mikroskopas (SEM) Zeiss EVO MA10.....	35
<b>2.4 pav.</b> Transmisinis elektronų mikroskopas TECNAI G2 F20 X-TWIN .....	35
<b>3.1 pav.</b> <i>Zinnia elegans</i> žiedų, lapų, stiebų ekstraktų redukcinės savybės .....	36
<b>3.2 pav.</b> FeSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O kalibracinė kreivė .....	37
<b>3.3 pav.</b> <i>Zinnia elegans</i> žiedų, lapų, stiebų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas, pagal FRAP metodą .....	37
<b>3.4 pav.</b> <i>Zinnia elegans</i> žiedų, lapų, stiebų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas, pagal DPPH metodą .....	38
<b>3.5 pav.</b> Tanino kalibracinė kreivė .....	39
<b>3.6 pav.</b> Fenolinių junginių koncentracija <i>Zinnia elegans</i> žiedų, lapų bei stiebų ekstraktuose .....	39
<b>3.7 pav.</b> Fenolinių rūgščių koncentracija <i>Zinnia elegans</i> augaliniuose ekstraktuose .....	40
<b>3.8 pav.</b> Kvercetino kalibracinė kreivė .....	41
<b>3.9 pav.</b> Flavonoidų (kvercetino) koncentracija <i>Zinnia elegans</i> augaliniuose ekstraktuose.....	41
<b>3.10 pav.</b> Antibakterinio aktyvumo įvertinimas, naudojant <i>Escherichia coli</i> bakterijas. Gvaizdūnės (lot. <i>Zinnia elegans</i> ) augaliniai ekstraktai: A – žiedų, B – lapų, C – stiebų, D – kontrolinis <i>E. coli</i> mėginys.....	42
<b>3.11 pav.</b> Antibakterinio aktyvumo įvertinimas, naudojant <i>Bacillus subtilis</i> bakterijas. Gvaizdūnės (lot. <i>Zinnia elegans</i> ) augaliniai ekstraktai: A – žiedų, B – lapų, C – stiebų, D – kontrolinis <i>Bacillus subtilis</i> mėginys .....	43
<b>3.12 pav.</b> Sidabro nanodalelių biosintezės, naudojant gvaizdūnės augalinius ekstraktus, mėginiai: viršuje – augaliniai ekstraktai sintezės pradžioje, apačioje – augaliniai ekstraktai po 24 val. sintezės. ....	44
<b>3.13 pav.</b> Sidabro nanodalelių UV absorbcijos spektras.....	45
<b>3.14 pav.</b> AgND, susidariusių naudojant gvaizdūnės žiedų ekstraktą, FT-IR spektrograma.....	46
<b>3.15 pav.</b> AgND, gautų naudojant gvaizdūnės žiedų ekstraktą, difraktograma.....	47
<b>3.16 pav.</b> AgND, susidariusių naudojant gvaizdūnės žiedų ekstraktą, SEM nuotraukos, esant skirtingiems didinimams: a) – x 5000, b) – x1000. ....	48
<b>3.17 pav.</b> AgND, susidariusių naudojant gvaizdūnės žiedų ekstraktą, EDS spektras (atliekant SEM analizę).....	49
<b>3.18 pav.</b> AgND, susidariusių naudojant gvaizdūnės žiedų ekstraktą, EDS spektras (atliekant TEM analizę).....	50
<b>3.19 pav.</b> AgND, susidariusių naudojant gvaizdūnės žiedų ekstraktą, TEM nuotraukos, esant skirtingiems didinimams: a) – 50 nm, b) – 100 nm.....	51
<b>3.20 pav.</b> Antibakterinės savybės naudojant <i>Escherichia coli</i> bakterijas, tiriant AgND koloidinius tirpalus .....	52

<b>3.21 pav.</b> Antibakterinis aktyvumo tyrimas, naudojant <i>Escherichia coli</i> bakterijas, tiriant koloidinius AgND tirpalus. Naudojami gvaizdūnės: A – žiedų, B – lapų, C – stiebų AgND koloidiniai tirpalai	52
<b>3.22 pav.</b> Antibakterinis aktyvumo tyrimas, naudojant <i>Bacillus subtilis</i> bakterijas, tiriant koloidinius AgND tirpalus. Naudojami gvaizdūnės: A – žiedų, B – lapų, C – stiebų AgND koloidiniai tirpalai	53
<b>3.23 pav.</b> Antibakterinės savybės naudojant <i>Bacillus subtilis</i> bakterijas, tiriant AgND koloidinius tirpalus .....	53
<b>4.1 pav.</b> Sidabro nanodalelių gamybos principinė aparatūrinė schema .....	54

## Santrumpų ir terminų sąrašas

### Santrumpos:

AgND – sidabro nanodalelės

DMSO – dimetilsulfoksidas

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas

EDS – Rentgeno spindulių energijos dispersinė spektroskopija

FT-IR – Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija

G– – gramneigiamos bakterijos

G+ – gramteigiamos bakterijos

NADH – Nikotinamido adenino dinukleotidas

RSDA – Rentgeno spindulių difrakcinė analizė

SEM – skenuojanti elektroninė mikroskopija

TEM – transmisinė elektroninė mikroskopija

TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazinas

UV–RŠ – ultravioletiniai – regimosios šviesos spinduliai

## Įvadas

Nanotechnologija – tarpdisciplininė mokslo sritis, kurios tikslas – sukurti nanodaleles, panaudojant įvairius sintezės būdus – biologiniais, cheminiais ar fizikiniais metodais [1]. Nanodalelių, kurios yra sintetinės cheminiu ar fizikiniu būdu, grynumo laipsnis yra labai aukštas, taip pat gaunamos vienodos formos ir dydžio dalelės. Tačiau šie metodai dažnai naudoja didelius kiekius toksiškų ir brangių medžiagų. Siekiant išspręsti šią problemą, taikomas biologinis nanodalelių sintezės metodas, dar vadinamas žaliaja biosinteze. Sidabro nanodalelės – tai unikaliomis fizikinėmis bei cheminėmis savybėmis pasižyminčios itin mažos – iki 100 nm skersmens – tauriojo metalo dalelės. Didžiausią įtaką sidabro nanodalelių savybėms turi šių dalelių dydis bei forma [2]. Keičiant gamybos proceso parametrus, galima modifikuoti nanodalelių morfologines savybes (dydį, formą), o taip pat susidariusių nanodalelių savybes. Platus sidabro nanodalelių panaudojimas remiasi šių dalelių antibakteriniu, priešgrybeliniu bei antivirusiniu aktyvumu.

Šiuo metu itin dažnai iškyla aplinkos taršos ir klimato kaitos problematika, kelianti grėsmę visai gyvajai gamtai. Dėl šios problemos dėmesys sutelkiamas į pramoninės gamybos sektorių, kuris naudoja didelius energijos, žaliavų ir įvairių cheminių medžiagų kiekius. Gamybos proceso metu susidariusios atliekos ar šalutiniai produktai gali būti netinkamai utilizuojami, todėl dažnu atveju šios medžiagos patenka į gamtą. Šios problemos sprendimui yra naudojami įvairūs gamybos proceso optimizavimo būdai. Sidabro nanodalelių gamybos metu, naudojant fizikinius bei cheminius būdus yra sunaudojamas itin didelis energijos bei toksiškų kiekis. Siekiant išvengti šių sąnaudų bei sumažinti gamybos kaštus, itin reikšminga sidabro nanodalelių biosintezė, kurios metu yra naudojami augaliniai ekstraktai, todėl sumažinamas toksiškų medžiagų kiekis gamyboje. Biosintezės proceso metu nėra naudojamos tokios toksiškos medžiagos, kaip įvairūs stabilizatoriai, tirpikliai, procesas nereikalauja didelių energijos sąnaudų, nesusidaro gyvajai aplinkai kenksmingi šalutiniai produktai. Atsižvelgiant į aplinkosauginius ir žiedinės ekonomikos aspektus, sidabro nanodalelių sintezei buvo pasirinktas biosintezės metodas, naudojant augalinius ekstraktus.

**Darbo tikslas** – naudojant gvaizdūnės (lot. *Zinnia elegans*) ekstraktus susintetinti sidabro nanodaleles biosintezės metodu ir ištirti susidariusių nanodalelių savybes.

### Darbo uždaviniai:

1. paruošti gvaizdūnės žiedų, lapų bei stiebų ekstraktus;
2. įvertinti gvaizdūnės žiedų, lapų bei stiebų ekstraktų antioksidacinį ir antibakterinį aktyvumą *Escherichia coli* ir *Bacillus subtilis* bakterijoms;
3. susintetinti sidabro nanodaleles, panaudojant gvaizdūnės žiedų, lapų bei stiebų ekstraktus;
4. atlikti susintetintų sidabro nanodalelių tyrimus:
  - a) ultravioletinės – regimosios šviesos spinduliuotės (UV-RŠ) analizę;
  - b) Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių (FT-IR) spektroskopiją;
  - c) Rentgeno spindulių difrakcinę analizę (RSDA) (fazinė sudėtis);
  - d) skenuojančią elektroninę mikroskopiją (SEM) (morfologinės savybės);
  - e) transmissinę elektroninę mikroskopiją (TEM) (morfologinės savybės);
  - f) Rentgeno spindulių energijos dispersinę spektroskopiją (EDS) (cheminės sudėties nustatymas).
5. įvertinti koloidinio sidabro nanodalelių tirpalo antibakterinį poveikį *Escherichia coli* ir *Bacillus subtilis* bakterijoms.

## 1. Literatūros apžvalga

### 1.1. Astrinių (lot. *Asteraceae*) šeima

Astriniai (lot. *Asteraceae*) augalai, dar vadinami graižaziedžiais, priklauso magnolijūnų šeimai. Tai viena iš didžiausių augalų šeimų, kuri apima apie 1600 gentis ir 24000 rūšių įvairių gėlių, krūmų ir medžių. Lietuvoje aptinkama 189 astrinių augalų rūšių, iš kurių kelios įrašytos į Lietuvos raudonąją knygą. Šių augalų žiedai būna susitelkę į graižus – kompleksinius žiedus, sudarytus iš kelių ar net kelių šimtų mažų žiedelių. Dažniausiai astrinių šeimos augalai yra naudojami kaip vaistiniai, dekoratyviniai, maistiniai ir dažiniai augalai [3].

Astrinių augalų žiedai dažnai pasižymi ryškiomis spalvomis. Šie augalai gali tapti reikšmingu spalvų šaltiniu tiek sodo kraštovaizdžio formavime, tiek gėlių kompozicijų dekoracijose. Be to, šių augalų žiedai, lapai ir stiebai dažnai turi naudingų savybių, tokių kaip antioksidacinis, antivirusinis, antimikrobinis aktyvumas ar priešuždegiminis poveikis, todėl jie yra vertinami ne tik kaip dekoratyvinės, bet ir kaip funkcinės augalų dalys [4]. Ekonominiu požiūriu, astrinių augalų panaudojimas įvairių ekstraktų bei vaistinių preparatų gamyboje, Jungtinėse Amerikos Valstijose 2017 metais rinką papildė net keliais šimtais milijardų dolerių [5].

Daugelis astrinių augalų yra naudingi biologiniam įvairovės palaikymui ir ekosistemų funkcijoms. Jie gali būti svarbūs maisto šaltiniai vabzdžiams, bitėms ir kitiems augalėdžiams organizmams. Atsižvelgiant į jų gebėjimą prisitaikyti prie įvairių aplinkos sąlygų ir efektyviai plisti, astriniai augalai sudaro reikšmingą ekologinį ir biologinį komponentą daugelyje ekosistemų.

#### 1.1.1. Gvaizdūnės (lot. *Zinnia*) gentis

Tai astrinių augalų šeimos gentis, kurios dekoratyvinis panaudojimas nulėmė jos paplitimą visame pasaulyje. Žinoma apie 20 žolinių ir pusiau krūminių, vienmečių ar daugiamečių augalų gvaizdūnės genties rūšių. Natūraliai gamtoje gvaizdūnės galima rasti pietų ir centrinėje Amerikoje. Dėl ryškiaspalvių augalo žiedų, gvaizdūnė dažnai naudojama kaip dekoratyvinis augalas, tačiau pastaraisiais metais mokslininkai susidomėjo šio augalo antrinių metabolitų identifikavimu ir pritaikymu medicinoje. Kai kurios *Zinnia* genties rūšys buvo iširtos dėl galimo biologinio poveikio – priešgrybelinio, antioksidacinio, antibakterinio, antivirusinio, antimaliarinio, citotoksinio bei insekticidinio poveikių [6, 7]. Dažniausiai sutinkamos gvaizdūnės (lot. *Zinnia*) genties rūšys: dykumos gvaizdūnė (lot. *Zinnia acerosa*), siauralapė gvaizdūnė (lot. *Zinnia angustifolia*), puikioji gvaizdūnė (lot. *Zinnia elegans*) bei paprastoji gvaizdūnė (lot. *Zinnia haageana*) (žr. 1.1 pav.).



**1.1 pav.** Zinnia rūšys. a – *Zinnia acerosa*, b – *Zinnia angustifolia*, c – *Zinnia elegans*, d – *Zinnia haageana*

#### **1.1.1.1. Puikioji gvaizdūnė (lot. *Zinnia elegans*)**

Labiausiai kultivuojamas ir žinomas šios rūšies augalas – puikioji gvaizdūnė. Europoje paplitęs 1790 metais, kai išpopuliarėjo kaip dekoratyvinis sodo augalas [8]. *Zinnia elegans* – vienmetis žolinis dekoratyvinis augalas. Augalo aukštis gali siekti iki 90 cm, o žiedų skersmuo – nuo 5 cm iki 7 cm. Žiedų spalvų spektras itin platus – žiedai gali būti raudonos, rožinės, violetinės, žalios, geltonos, bronzinės ar oranžinės spalvos. Taip pat žiedai gali būti dryžuoti, dėmėti ar net kelių spalvų. Gvaizdūnės geriausiai auga šiltose ir sausose vietose, vandeniui bei orui pralaidžiose dirvose. Žydėjimas prasideda nuo liepos mėnesio ir tęsiasi iki pirmųjų šalnų [9].

#### **1.1.1.2. Puikiosios gvaizdūnės (lot. *Zinnia elegans*) savybės**

Pasak atliktų tyrimų, puikioji gvaizdūnė pasižymi net įvairiomis biologinėmis savybėmis: priešgrybeliniu aktyvumu, antibakteriniu aktyvumu, antioksidaciniu aktyvumu, insekticidiniu aktyvumu bei moliuskocidiniu aktyvumu [10]. Puikioji gvaizdūnė pasižymi ir fitoramediacinėmis savybėmis – gebėjimu absorbuoti sunkiuosius metalus, kurie kaupiasi ūgliuose (stiebuose, lapuose ir pumpuruose) [11]. Kadangi puikioji gvaizdūnė yra plačiai paplitusi pasaulyje, lengvai prieinama ir greitai auga, tai gali būti optimalus pasirinkimas toksinų ar sunkiųjų metalų, tokių kaip švinas, chromas, gyvsidabris ir kadmis iš dirvožemio ar aplinkos pašalinimui [12, 13].

### 1.1.1.3. Puikiosios gvaizdūnės (lot. *Zinnia elegans*) cheminė sudėtis

Nors daugiausia dėmesio skiriama gvaizdūnės dekoratyviniam panaudojimui, dėl turimų antrinių metabolitinių medžiagų, šis augalas gali būti naudojamas ir gydymo tikslams. Atlikti tyrimai atskleidė net kelias natūralių junginių klases, rastas įvairiose augalo dalyse – flavonoidai, saponinai, steroidai, glikozidai ir polifenoliai [8].

**Flavonoidai** – tai aromatiniai heterocikliniai organiniai junginiai, kurių sudėtyje, skirtingose pirano žiedo pozicijose, yra prisijungusios fenolinės ar polifenolinės grupės. Dažniausiai flavonoidai randami įvairiose augalo dalyse, sėklose, daržovėse ar vaisiuose. Tai augaliniai pigmentai, pasižymintys oranžine, geltona, violetine ar rausva spalvomis. Šiuo metu yra identifikuota daugiau nei dešimt tūkstančių skirtingų flavonoidinių junginių. Skirtingose augalų dalyse esantys fitocheminiai junginiai pasižymi biologiniu aktyvumu bei gydomosiomis savybėmis, todėl flavonoidai gali būti pritaikomi medicinoje. Šie polifenoliai yra plačiai naudojami kaip priešvėžiniai, antimikrobiniai, antivirusiniai bei antioksidaciniai agentai. Gali būti naudojami odos priežiūros priemonėse, kosmetikoje, ar natūralių dažų gamyboje [14, 15].

**Saponinai** – glikozidiniai junginiai, natūraliai gamtoje randami įvairiuose augaluose. Šių struktūrą sudaro sapogeninas, t.y. triterpenas ar steroidas, bei angliavandenis, pavyzdžiui, gliukozė, galaktozė ar fruktozė. Tai antriniai metabolitai vyraujantys triterpenoidų forma. Šiuo metu yra žinoma 60 išgrynintų ir išanalizuotų skirtingų triterpenoidų. Pastarieji yra išgaunami iš įvairių augalo dalių – sėklų, žiedų, lapų bei šaknų. Dėl savo putojimą sukeliančios savybės, saponinai yra naudojami įvairių ploviklių ir muilų gamyboje. Tai natūrali paviršiaus aktyvi medžiaga (PAM), kuri susidaro dėl hidrofiliinės angliavandensio liekanos prisijungusios prie triterpeno ar hidrofobinio steroido dalies [16]. Saponinų panaudojimas maisto bei farmacijos pramonėse tapo alternatyva sintetinėms ar gyvūninės kilmės emulsikliams, stabilizuojančioms bei putojimą sukeliančioms medžiagoms. Taip pat saponinai pasižymi itin svarbiomis biologinėmis savybėmis – antioksidacija, priešuždegiminiu aktyvumu, bei yra siejami su augalų antibakterinėmis savybėmis [17].

**Glikozidai** – augaluose randami antrinių metabolitų junginiai, kurie atlieka net keletą funkcijų: reguliuoja augimo procesą, apsaugo augalą nuo įvairių patogenų ar žolėdžių bei veikia kaip inhibitorius aplinkui augantiems augalams (alelopatija). Glikozidus sudaro dvi dalys – glikonas ir aglikonas. Glikonas – tai cukrų turinti glikozido dalis, o aglikonas – necukrinė dalis. Glikozidinių ryšių nutraukimas gali būti atliekamas panaudojant fermentus ar rūgštis. Glikozidų sintezė iš augalinės žaliavos yra galima, naudojant glikoziltransferazes – fermentus, kurie sukuria glikozidinius ryšius. Glikoziltransferazės katalizuoja sacharidų fragmentų perkėlimą iš aktyvuoto nukleotido cukraus į nukleofilinę glikozilo akceptoriaus molekulę. Dažniausiai glikono dalį sudaro gliukozė, todėl susidarę glikozidai yra vadinami gliukozidais [18].

Keletas glikozidų yra naudojami gydymo tikslams, tačiau kita dalis šių antrinių metabolitų taip pat pasižymi farmakologiniu aktyvumu – priešuždegiminėmis, nuskausminimo, antibakterinėmis, antivirusinėmis bei priešvėžinėmis savybėmis, todėl tai sudaro galimybes medicinoje panaudoti platesnį spektrą glikozidinių junginių [19].

**Polifenoliai** – tai antriniai metabolitai, kurie atlieka apsauginę funkciją, apsaugodami augalą nuo ultravioletinės spinduliuotės bei patogenų sukeliamų pažeidimų. Šiuo metu yra žinoma daugiau nei 8000 polifenolinių junginių, išskirtų iš augalinės žaliavos. Polifenolių struktūrą sudaro aromatiniai

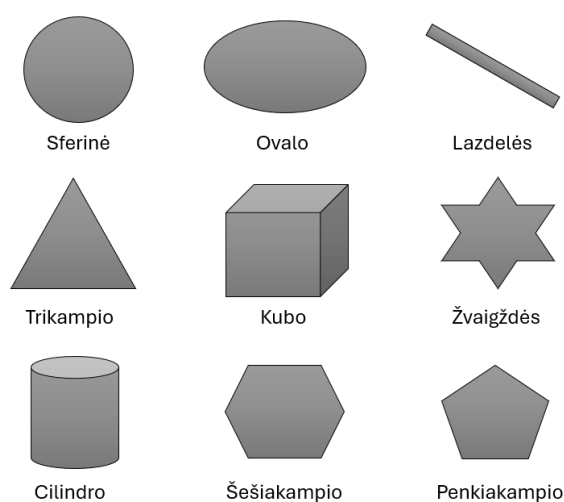
žiedai, prisijungę vieną ar daugiau hidroksilo grupių. Šių junginių klasifikaciją sudaro trys pagrindinės grupės: fenolinės rūgštys (hidroksibenzenkarboksirūgštis, hidroksicinamono rūgštys), flavonoidai (flavonoliai, flavonai, flavanoliai, flavanonai, izoflavonai bei antocianinai) bei ne flavonoidiniai junginiai (stilbenai, lignanai). Pastaruoju metu mokslininkų dėmesį patraukė polifenilinių junginių antioksidacinės savybės bei pritaikymas medicinoje, užkertant kelią įvairioms ligoms, kaip diabetas, vėžys, osteoporozė, neurodegeneracinėms, širdies ir kraujagyslių ligoms [20]. Polifenoliai – natūraliai gamtoje randami junginiai, dažniausiai randami įvairiuose augaluose, vaisiuose bei daržovėse. Nustatyta, jog maždaug 100 gramų vynuogių, obuolių, vyšnių, kriaušių ir įvairių uogų sudėtyje galima rasti nuo 200 iki 300 mg polifenolinių junginių. Taip pat apie 100 mg polifenolių galima rasti ir puodelyje arbatos ar kavos bei taurėje raudono vyno [21].

## 1.2. Nanodalelės

Nanodalelių gavimas, savybės bei panaudojimas buvo pradėtos nagrinėti jau nuo praeito šimtmečio, kuomet atsirado nanodalelių technologija [22]. Tarptautinė standartų organizacija (ang. International Organization of Standardization – ISO) nanodaleles apibūdina kaip, itin mažas daleles, kurių diametras neviršija 100 nm. [23]. Nanodalelės yra gaunamos dirbtiniu būdu arba gali būti randamos gamtoje. Skirstymas gali būti pagal labai įvairius požymius – formą, dydį, savybes bei cheminę kilmę. Pagal kilmę, nanodalelės gali būti skirstomos į organines bei neorganines. Organinės kilmės nanodalelėms priskiriamos polimerinės dalelės bei dendrimerai, neorganinėms nanodalelėms – įvairūs metalai, kvantiniai taškai bei fulerenai. Priklausomai nuo nanodalelių panaudojimo srities, dalelės taip pat gali būti vertinamos pagal sandarą, kietumą, puslaidininkines savybes. Šie kriterijai leidžia klasifikuoti dalelių panaudojimo sritis kaip mokslinius tyrimus, diagnostiką arba terapiją.

### 1.2.1. Nanodalelių morfologija

Gavimo būdas bei aplinkos sąlygos labiausiai lemia gaunamų nanodalelių formą bei dydį, todėl keičiant šiuos parametrus galima susintetinti įvairaus dydžio bei formos nanodaleles. Dažniausiai išgaunamos šios formos nanodalelės: sferos, ovalo, lazdelės, trikampio, kubo, žvaigždės, cilindro, šešiakampio ar penkiakampio (žr. 1.2 pav.) [24]. Keičiant dalelių morfologines savybes, galima keisti jų chemines, fizikines bei biologines savybes, kurios praplečia nanodalelių pritaikymą skirtingose pramonės bei medicinos srityse ar moksliniuose tyrimuose.



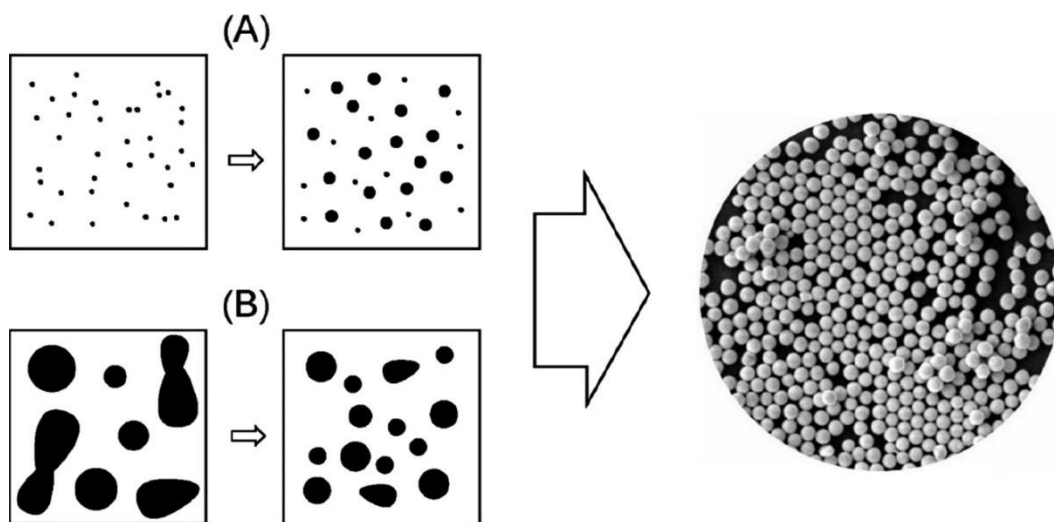
1.2 pav. Nanodalelių formos



## 1.2.2. Nanodalelių sintezės metodai

Nanotechnologijų tyrinėjimai, besivystantys greitu tempu, jau pristatė įvairaus pobūdžio sintetinių nanodalelių spektrą. Didžioji dalis šių dalelių yra sintetinės dirbtiniu būdu, tačiau nanodalelės gali būti randamos ir natūralioje gamtoje. Nano dydžio dalelių galima rasti įvairiuose neorganinės kilmės pelenuose, suodžiuose, ore ar šuliniuose esančiose mineralinėse ar sieros dalelėse. Taip pat kai kurias nanodaleles gamina įvairios bakterijos ar mielės. Natūraliai susidaranti nanodalelės pasižymi kompleksine sandara bei skirtingomis cheminėmis, biologinėmis ir fizikinėmis savybėmis. Geležies(III) oksido ir silicio dioksido nanodalelės dominuoja gamtoje kaip dažniausiai pasitaikančios nanodalelės [25].

Skirtingos nanodalelių savybės, dydis, forma bei mažas grynumo laipsnis trukdo šias, natūraliai susidaranti daleles, panaudoti pramonėje ar laboratoriniuose tyrimuose. Šiaip problemai spręsti yra naudojamos „iš viršaus į apačią“ (ang. „*Top-down*“) bei „iš apačios į viršų“ (ang. „*Bottom-up*“) būdu sintetinės dalelės, kurios pasižymi vienoda struktūra, vienodomis savybėmis ir dideliu grynumo laipsniu.



1.3 pav. (A) - „iš apačios į viršų“ (ang. „*bottom-up*“) sintezės metodo schema, (B) – „iš viršaus į apačią“ (ang. „*top-down*“) sintezės metodo schema [22]

### 1.2.2.1. „Iš viršaus į apačią“ (ang. „*Top-down*“) sintezės metodai

Fizikiniai nanodalelių sintetinio metodai yra vadinami „iš viršaus į apačią“ (ang. „*Top-down*“). Šiais būdais sintetinės dalelės yra gaunamos smulkinant didesnius fragmentus iki nano dydžio dalelių (žiūrėti 1.3 pav.). Pagrindiniai fizikiniai metodai nanodalelių gamyboje [26]:

1. Mechaninis smulkinimas;
2. Elektrinis verpimas;
3. Lazerinė abliacija;
4. Elektronų sprogdinimas;
5. Apdorojimas ultragarsu.

*Mechaninis smulkinimas arba malimas* – procesas, kurio metu didesnio mastelio medžiaga yra susmulkinama į mažesnius fragmentus ar daleles. Procesu metu yra naudojami įvairūs malūnai, dažniausiai rutuliniai bei plaktukiniai malūnai. Pagrindiniai metodo privalumai – sumažintas atliekų

išmetimas į aplinką, kontroliuojamas degradacijos procesas, susijęs su temperatūra, taip pat atliekų perdirbimas bei nesimaišančių tarpusavyje medžiagų suderinimas [27].

*Elektrinis verpimas* – tai pluošto verpimo technologija, kurios metu, veikiant elektrostatinėms jėgoms, iš polimerinio tirpalo yra verpiamos ilgos, dažnai net kelių kilometrų ilgio, medžiagos gijos, kurių diametras siekia nuo kelių nanometrų iki mikronų. [28].

*Lazerinės abliacijos* sintezės metu nanodalelės yra gaunamos iš medžiagą (kietos ar skystos būsenos) nukreipiant intensyvią lazerio srovę, kuri dėl didelio spinduliavimo intensyvumo ir energijos kiekio šildo medžiagą. Įkaitinta medžiaga išgaruoja arba sublimuoja, todėl susidaro nanodalelės. Šiuo metodu galima sintetinti įvairias nanodaleles – metalų, anglies nanodaleles, oksidų kompozitus [29].

*Elektronų sprogdinimas* – metodas, kurio metu plona metalinė viela yra veikiamą didelės srovės impulsu, kuris sukelia sprogimą, garavimą bei jonizaciją. Metalas išgaruoja, jonizuojasi, plečiasi ir atvėsta reaguodamas su šalia esančiomis dujomis ar skysta terpe. Kondensuoti garai galiausiai sudaro nanodaleles [30].

*Apdorojimas ultragarsu* – vienas svarbiausių etapų nanofluidų sintezėje. Tirpalas, susidedantis iš skystos terpės ir nano dydžio dalelių, pirmiausia yra išmaišomas ant magnetinės maišyklės. Ultragarso apdorojimas atliekamas ultragarsu, ultragarso vibratoriumi ar mechaniniu homogenizatoriumi [31].

#### **1.2.2.2. „Iš apačios į viršų“ (ang. „Bottom-up“) sintezės metodai**

„Bottom-up“ nanodalelių sintetinimas apima cheminius ir biologinius metodus. Šie metodai yra grindžiami atomų ar jų grupių susijungimas į nanodaleles (žiūrėti 1.3 pav.) [32]. Nanodalelių gamybos būdai:

1. Cheminis nusodinimas garais;
2. Zolių – gelio metodas;
3. Nuosėdų sudarymas tirpale;
4. Inertinių dujų kondensacija;
5. Hidroterminė sintezė;
6. „Žalioji“ biosintezė.

*Cheminis nusodinimas garais* – procesas, kai cheminės reakcijos metu, vykstančios ant šildomo paviršiaus, iš dujų fazės yra nusodinama kietą medžiagą. Gaunamos plonos plėvelės, miltelių ar kristalo pavidalo medžiagą. Keičiant proceso sąlygas, įskaitant substrato medžiagą, temperatūrą, reakcijos dujų sudėtį, slėgį ir kt., galima gauti skirtingų biologinių, cheminių ar fizikinių savybių medžiagas [33].

*Zolių – gelio metodas* plačiai naudojamas aukštos kokybės metalo oksidų nanodalelių gamyboje. Skysta fazė yra paverčiama zoliu, o galiausiai šis pereina į tinklo struktūrą, kuri dar vadinama geliu. Pradiniai tirpalai, naudojami nanodalelių sintezei šiuo metodu, dažniausiai yra metalų alkoksidai. Susidariusių dalelių dydis gali būti keičiamas kontroliuojant tirpalo koncentraciją, temperatūrą ar pH vertę [26, 31].

*Nuosėdų sudarymo tirpale* (ang. *coprecipitation*) metu tirpalas yra prisotintas tam tikra medžiaga, vykdoma nukleacija bei augimas. Tai vienas svarbiausių proceso etapų, kurios metu susidaro daug

mažų dalelių. Po nukleacijos ir Osvaldo augimo seka aglomeracijos procesas, po kurio reikalingas filtravimas bei kalcinavimas. Šiuo metodu gaunamos mikro ir nano dydžio dalelės [34, 35].

*Inertinių dujų kondensacija* arba *molekulinė kondensacija* – procesas, plačiai naudojamas įvairių nanodalelių didelio kiekio gamyboje. Inertinių dujų aplinkoje – argono arba helio – dideliame vakuume yra garinami metalai. Garinimo metu, metalo atomai praranda dalį kinetinės energijos dėl susidūrimų su dujų molekulėmis, todėl šios kondensuojasi į mažas daleles. Susikondensavusios dalelės jungiasi į nanokristalus [36, 37].

*Hidroterminės sintezės* metodas yra naudojamas sintetinti nanodaleles, pasižyminčias magnetinėmis ir laidumo savybėmis. Sintezės metu naudojamas platus temperatūrų diapazonas – nuo aplinkos temperatūros iki itin aukštos temperatūros [38, 39]. Pagrindinis šio metodo trūkumas – susidariusios dalelės nėra stabilios.

### **1.2.2.3. „Žalioji“ biosintezė**

Sparčiai augant nanodalelių poreikiui ir pritaikymui įvairiose srityse, yra ieškoma naujų, aplinkai saugių ir nebrangių, būdų įvairių nanodalelių sintezei. Nanodalelių sintezė, naudojant tokius bioaktyvius agentus, kaip augalinės medžiagos, mikrobai, įvairios biologinės atliekos, yra vadinama „žalioji“ arba biologine nanodalelių sinteze [40]. Biosintezė pasižymi tuo, kad nesusidaro toksiški ar kenksmingi šalutiniai produktai, procesas yra nebrangus, susidaro stabilios nanodalelės, greitas procesas, lengva didinti gamybos mastelį [41].

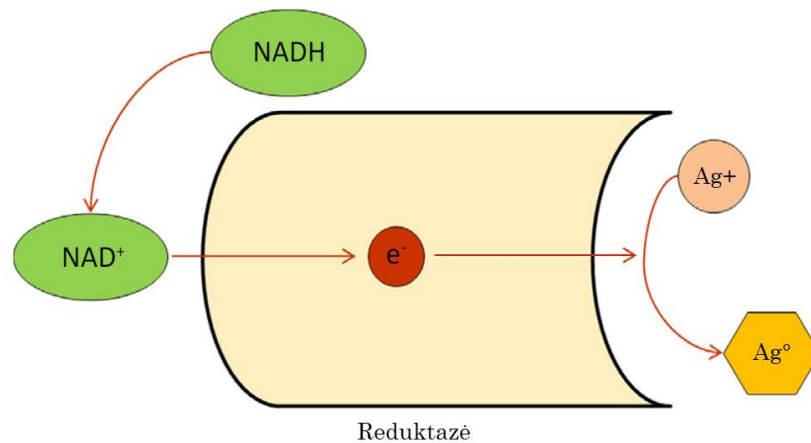
Metalų nanodalelių biosintezės metodas yra skirstomas į du tipus: biosorbiciją, kurios metu metalų jonai susijungia su tam tikromis grupėmis, esančiomis ląstelės sienelėje bei bioredukcija, kuomet vyksta metalų jonų redukcija ir šie yra stabilizuojami naudojant mikroorganizmus [42].

Pagrindiniai biosintezės objektai yra mikroskopiniai grybai, bakterijos bei augalai. Nanodalelių sintezė, naudojant biologines medžiagas, užtikrina aplinkai saugų, netoksišką metodą, kuriuo suformuojamos įvairaus dydžio, formos bei skirtingų fizikocheminių savybių dalelės [43]. Šiuo metodu dažniausiai yra sintetinamos įvairių metalų – aukso (Au), sidabro (Ag), platinos (Pt), paladžio (Pd), vario (Cu), geležies (Fe) – bei cinko oksido (ZnO) ar seleno (Se) nanodalelės.

### **Nanodalelių biosintezė naudojant mikroorganizmus.**

Bakterijos pasižymi viena svarbiausių savybių nanodalelių sintezėje – geba redukuoti metalų jonus. Kai kurios bakterijų rūšys net įgijo tam tikrą mechanizmą, kuris apsaugo bakterijas nuo sunkiųjų metalų toksiškumo bei didelių metalo jonų koncentracijų sukkelto streso (pavyzdžiui, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*) [44]. Žinoma, jog bakterijos geba gaminti neorganinės kilmės produktus ląstelės viduje arba išorėje.

*Nanodalelių biosintezė vykstanti ląstelės išorėje*: mikroorganizmų ląstelių išorėje esantis reduktazės fermentas sutraukia metalo jonus iki nanoskalės diapazono. Nuo NADH priklausomas reduktazės fermentas atlieka metalo jonų biologinį redukavimą į nanodaleles. Reduktazės fermento elektronai gaunami iš NADH, kuris vėliau virsta NAD<sup>+</sup>. Metalo jonų redukcijos metu taip pat vyksta ir fermento oksidacija. Buvo pastebėta, jog biologinę redukciją gali sukelti nuo nitratų priklausoma reduktazė (žr. 1.4 pav.) [22].



**1.4 pav.** Redukcijos reakcijos mechanizmas AgND sintezėje [45]

*Nanodalelių biosintezė vykstanti ląstelės viduje* apima tris pagrindinius procesus: gaudymas, bioredukcija ir ribojimas. Mikroorganizmų ląstelių sienelėse yra daug polisacharidų bei baltymų, kurie veikia kaip aktyvūs metalų jonų surišėjai. Tačiau ne visi mikroorganizmai gali sintetinti metalo ir metalo oksido nanodaleles. Jonai, keliantys didelį pavojų mikroorganizmams, yra sunkiųjų metalų jonai, kurie, dėl elektrostatinės sąveikos, prisitvirtina prie ląstelės sienelės. Metalų jonai prisijungia prie ląstelės sienelėse esančių karboksilatų grupių (cisteinas, polipeptidai) bei tam tikrų fermentų, turinčių neigiamą krūvį [26, 46]

Metalo nanodalelių biosintezėi atlikti galima pasirinkti iš plataus spektro mikroorganizmų, kurie individualiai turi savo privalumų ir trūkumų. Pagrindinis skirtumas yra sintezės vieta, vykstančios reakcijos tipas (žr. 1.1 lentelę), sintezės parametrai – temperatūra bei sintezės trukmė. Norint tinkamai pasirinkti mikroorganizmą svarbu atkreipti dėmesį į mikroorganizmo atsparumą tam tikriems metalams [45].

**1.1 lentelė.** Mikroorganizmai, naudojami metalų nanodalelių biosintezėje [45]

Organizmo pavadinimas	Sintetinamos nanodalelės	Sintezės vieta	Vykstanti reakcija
<i>Thermomonospora sp.</i>	Au	Ląstelės išorėje	Redukcija
<i>Rhodococcus sp.</i>	Au	Ląstelės viduje	Redukcija
<i>Escherichia coli</i>	Pd, Pt	Ląstelės išorėje	Redukcija
<i>Rhodopseudomonas capsulata</i>	Au	Ląstelės išorėje	Redukcija
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Au	Ląstelės išorėje	Redukcija
<i>Delftia acidovorans</i>	Au	Ląstelės išorėje	Redukcija
<i>Bacillus licheniformis</i>	Ag	Ląstelės viduje	Redukcija

### 1.1 lentelės tęsinys

<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Pd	Ląstelės išorėje	Redukcija
<i>Bacillus sp</i>	Ag	Ląstelės viduje	Redukcija
<i>Klebsiella pneumonia</i>	Ag	Ląstelės išorėje	Redukcija
<i>Escherichia coli</i>	Ag	Ląstelės išorėje	Redukcija
<i>Lactobacillus sp.</i>	Ag	Ląstelės išorėje	Biosorbicija ir redukcija
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Ag	Ląstelės išorėje	Biosorbicija ir redukcija
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Ag	Ląstelės išorėje	Redukcija
<i>Verticillium sp.</i>	Au	Ląstelės viduje	Redukcija

### Nanodalelių biosintezė naudojant augalus.

Augalų ekstraktų gebėjimas redukuoti metalų jonus žinomas nuo ankstyvo dvidešimtojo amžiaus. Dėl proceso paprastumo, pastaruosius trisdešimt metų, metalų druskų redukcijai į metalų nanodaleles, yra naudojami augalai, jų dalys ar ekstraktai [47]. Augalų ekstraktai nanodalelių sintezėje veikia kaip redukcijos bei stabilizavimo agentai. Susintetintų nanodalelių charakteristikos priklauso nuo pasirinkto naudoti augalinio ekstrakto (žr. 1.2 lentelę). Taip yra dėl augaliniame ekstrakto esančių įvairių organinių redukcinių agentų bei jų koncentracijos. Dažniausiai sintezę sudaro vandeninio augalo ekstrakto sumaišymas su vandeniniu metalo druskų tirpalu. Redukcijos reakcija vyksta kambario temperatūroje ir trunka nuo kelių minučių iki keliolikos valandų [48].

### 1.2 lentelė. Augalai, naudojami nanodalelių biosintezėje [45]

Augalo pavadinimas	Gaminamos nanodalelės	Sintezės vieta	Vykstanti reakcija
<i>Coriolus versicolor</i>	Ag	Ląstelės viduje ir išorėje	Redukcija
<i>Aspergillus flavus</i>	Ag	Ląstelės išorėje	Redukcija
<i>Jatropha curcas latex</i>	Ag	Ląstelės išorėje	Redukcija
<i>Acalypha indica leaf extract</i>	Ag	Ląstelės išorėje	Redukcija
<i>Medicago sativa seed exudate</i>	Ag	Ląstelės išorėje	Redukcija
<i>Cymbopogon flexuosus extract</i>	Au	Ląstelės išorėje	Redukcija
<i>Live Alfalfa plants</i>	Au	Ląstelės viduje	-

## 1.2 lentelės tęsinys

<i>Magnolia kobus leaf broth</i>	Ag	Ląstelės išorėje	Redukcija
----------------------------------	----	------------------	-----------

Apibendrinus visus nanodalelių sintezės būdus – fizikinius, cheminius ir biologinius – galima teigti, kad vertinant sintezės sudėtingumą, naudojamą įrangą ir medžiagas, biologinis sintezės metodas yra pranašiausias. Biosintezės būdu gaminamos nanodalelės yra stabilios, vienodos formos, keičiant biologinius objektus (mikroorganizmus ar augalus), galima išgauti skirtingų savybių nanodaleles. Taip pat procesas yra draugiškas aplinkai, nesusidaro toksiški šalutiniai produktai. Lyginant nanodalelių biosintezę naudojant mikroorganizmus bei augalų ekstraktus, pranašumą turi augaliniai ekstraktai. Pagrindiniai skirtumai – sintezės proceso aplinkos (terpės) sąlygos, prieinamumas, nereikia papildomo nanodalelių atskyrimo nuo ląstelių etapo bei didesnis atsparumas didesnei metalo koncentracijai. Taip pat nanodalelių gamybos mastą biosintezės metodu yra lengva padidinti, nes sintezė vyksta tik vienu pagrindiniu etapu.

### 1.2.3. Parametrai, lemiantys nanodalelių formavimąsi

Metalo nanodalelių biosintezės metu yra kontroliuojami keli parametrai, nuo kurių priklauso nanodalelių susidarymas bei savybės. Šiuos parametrus sudaro: tirpalo terpė, reagentų koncentracijos, sintezės trukmė ir temperatūra [49].

**Tirpalo terpė.** Ši vertė atlieka svarbų vaidmenį nanodalelių formavimosi metu. Atlikti tyrimai rodo, jog skirtingos reakcijos terpės pH vertės formuoja skirtingų formų ir dydžio nanodaleles. Pastebėta, jog didesnio dydžio dalelės susidaro žemesnio pH aplinkoje [50, 51].

**Reagentų koncentracijos.** Biomolekulių koncentracijos esančios augaliniuose ekstraktuose lemia nanodalelių susidarymą. Tyrimai rodo, jog didesnės koncentracijos augalinis ekstraktas, naudojamas sidabro nanodalelių biosintezėje, gali pakeisti nanodalelių formą iš trikampio į sferinę formą [52].

**Reakcijos laikas.** Atliekant biosintezės reakciją skirtinga proceso trukme, buvo pastebėta, jog kuo ilgiau vyksta redukcijos reakcija, tuo didesnio dydžio dalelės yra suformuojamos [53, 54]. Priklausomai nuo pasirinkto naudoti augalo ekstrakto, priklauso reakcijos trukmė, todėl procesas gali trukti nuo kelių minučių iki keliolikos valandų.

**Reakcijos temperatūra.** Nors jau žinoma, kad temperatūra yra vienas pagrindinių biosintezės proceso parametru, tačiau nuo temperatūros taip pat priklauso ir susidaranti nanodalelių dydis, forma, išeiga [55, 56].

### 1.2.4. Nanodalelių charakterizavimas

Pagrindiniai du parametrai, kurie charakterizuoja nanodaleles yra forma ir dydis. Taip pat galima nustatyti dalelių dydžio pasiskirstymą, agregacijos laipsnį, paviršiaus krūvį, plotą bei cheminę sudėtį. Dalelių dydis, pasiskirstymas bei organiniai ligandai, esantys dalelių paviršiuje, gali daryti įtaką tam tikroms dalelių savybėms bei jų panaudojimui [57]. Nanodalelių struktūrai nustatyti yra naudojama: Rentgeno spinduliuotės difrakcinė analizė (RSDA), Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija (FT-IR), ultravioletinės – regimosios šviesos spinduliuotės (UV-RŠ) analizė, skenuojanti elektroninė mikroskopijos analizė (SEM) bei transmisinė elektronų mikroskopijos analizė (TEM), rentgeno spindulių energijos dispersinė spektroskopija (EDS) [22].

*Rentgeno spinduliuotės difrakcinė* analizė nusako struktūrinės nanodalelių savybes. Šis tyrimas suteikia informaciją apie dalelių kristališkumą ir fazę [58]. Iš Rentgeno spinduliuotės difrakcinės analizės duomenų galima nustatyti medžiagos fazinę sudėtį, apskaičiuoti kristalinių struktūrų parametrus, įvertinti kristalų dydį, orientaciją.

*Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija* yra naudojama mėginių sudėties nustatymui bei junginių identifikavimui. FT-IR yra vertingas metodas nanodalelių analizei dėl gebėjimo identifikuoti ir charakterizuoti cheminę medžiagos sudėtį bei struktūrą. Naudojant FT-IR spektroskopiją, galima gauti informacijos apie molekulinės vibracijas, o tai suteikia galimybę įvertinti medžiagos funkcines grupes.

*Ultravioletinės – regimosios šviesos spinduliuotės* analizė matuoja šviesos intensyvumą, atsispindintį nuo matuojamos medžiagos, kurį palygina su šviesos intensyvumu, atsispindinčio nuo žinomos medžiagos. Nanodalelės pasižymi optinėmis savybėmis, kurios priklauso nuo dalelių dydžio, formos, koncentracijos bei aglomeracijos. Šios savybės nurodo UV-RŠ analizės svarbą, norint identifikuoti ir charakterizuoti susidariusias nanodaleles [57].

*Skenuojanti elektroninė mikroskopijos* analizė yra paremta elektronų skenavimo principu ir suteikia informaciją apie daleles nano dydžio skalėje. Šis analizės metodas nustato susidariusių nanodalelių morfologines savybes, taip pat galima ištirti dalelių dispersiją [22].

*Transmisinė elektronų mikroskopijos* analizė, panašiai kaip SEM analizėje, yra mikroskopinė analizė paremta elektronų transmisijos principu ir suteikia morfologinę informaciją apie nanodaleles naudojant mažą bei itin didelį dalelių priartinimą. Elektronų srautui pasiekus tiriamąją medžiagą, dalis elektronų susigeria į medžiagą, o kita dalis – pereina medžiagą ir pasiekia detektorius. Tai vienas tiksliausių metodų nustatant nanodalelių dydį, formą, dispersiją, galimas priemaišas [57].

*Rentgeno spindulių energijos dispersinė spektroskopija* – naudojama elementinei analizei ar cheminiam mėginio apibūdinimui. EDS analizė yra dažniausiai atliekama kartu su SEM ar TEM analize. Elektronų srovė pereina pro tiriamąją medžiagą ir suformuoja cheminių elementų, esančių medžiagoje, spektrogramą [59].

### **1.2.5. Nanodalelių savybės**

Nanodalelės pasižymi plačiu pritaikomumu įvairiose srityse. Tai lemia dalelių dydis, fizikinės, cheminės ir biologinės savybės. Nanodalelių savybės ir privalumai [26]:

1. Mažas dydis. Dalelės yra 1-100 nm dydžio, todėl tai leidžia joms prasiskverbti pro įvairius biologinius barjerus;
2. Didelis dalelių paviršiaus plotas. Tai leidžia dalelėms sąveikauti su biologinėmis sistemomis ir pernešti didelę vaistų ar ligų aptikimui naudojamų agentų apkrovą;
3. Paviršiaus cheminės savybės. Nanodalelės gali kontaktuoti su įvairiomis biologinėmis sistemomis, prisijungdamos prie įvairių ligandų;
4. Biologinis suderinamumas. Nanodalelės gali būti suderinamos su biologinėmis sistemomis, taip sumažinant toksiškumą ir neigiamą imuniteto atsaką;
5. Stabilumas. Metalų nanodalelės pasižymi dideliu stabilumu esant įvairioms biologinėmis bei sandėliavimo sąlygomis, todėl nanodalelės gali būti ilgą laiką sandėliuojamos ir saugiai transportuojamos;

6. Optinių savybių pritaikymas. Tokios nanodalelės kaip aukso ar sidabro, pasižymi unikaliomis optinėmis savybėmis, kurios gali būti modifikuojamos keičiant dalelių dydį ar formą, taip geriau pritaikant nanodaleles vaizdavimo ir sensorių gamybos panaudojime.

#### **1.2.6. Nanodalelių panaudojimas ir ekonominė apžvalga**

Įvairios nanodalelės pasižymi unikaliomis savybėmis, kurios gali būti modifikuojamos keičiant dalelių dydį bei formą. Tokia nanodalelių savybė prisitaikyti prie reikiamų parametrų gerokai praplečia jų pritaikomumą. Pagrindinės sritys, kuriose yra naudojamos nanodalelės – medicina, elektronika, agrokultūra, kosmetika, aplinkosauga, dažų ir įvairių dangų gamyba, energija, automobilių pramonė bei aviacija.

Aplinkosaugoje nanodalelės gali būti naudojamos bioremediacijai, įvairių sensorių gamyboje, bei kaip katalizatorius įvairioms cheminėms reakcijoms [60]. Nanodalelės pasižymi savybe pašalinti aplinką teršiančias medžiagas, tokias kaip, sunkieji metalai iš vandens ar organinės kilmės teršalai iš dirvožemio. Dėl savo itin mažo dydžio, nanodalelės gali pasiekti tokias vietas, kurios yra sunkiai prieinamos didesnėms dalelėms [60]. Taip pat nanodalelės yra naudojamos vandens kokybei pagerinti. Atlikti tyrimai parodė, kad nanodydžio sensoriai gali būti panaudoti mikrobinių patogenų bei biologinių junginių, kaip toksinai, aptikimui vandens aplinkoje [61].

Medicinos srityje nanodalelės yra naudojamos dėl savo fizikinių, cheminių ir biologinių savybių, todėl yra pritaikomos biomedicinoje. Nanodalelės yra naudojamos vėžio gydymo, biologinio skenavimo, vaistų pernešimo bei cheminių sensorių gamyboje [62, 63]. Kai kurios nanodalelės pasižymi, antimikrobinėmis savybėmis, todėl yra naudojamos dezinfekavimo priemonių, sterilių medžiagų bei medicininės įrangos gamyboje [64].

Agrokultūroje nanodalelės yra naudojamos dėl antimikrobinės savybės, kurios gali būti panaudojamos įvairių pesticidų bei herbicidų gamyboje [22]. Tai biologinė alternatyva cheminėms medžiagoms, teršiančioms aplinką bei turinčioms neigiamą poveikį žmogaus organizmui. Taip pat augalai yra apsaugomi nuo tam tikrų ligų, todėl naudojant nanodaleles yra išsaugomos augalinės kultūros. Nano dydžio dalelės gali būti naudojamos kaip trąšos, gerinančios augalų aplinką mineralinėmis medžiagomis. Sidabro, cinko, vario bei aukso nanodalelės naudojamos kaip trąšos bei pasižymi augalo augimo skatinančiomis savybėmis. Taip pagerina augalo maistinę vertę bei augalo augimą ir derlių [65].

Maisto pramonėje nanodalelės dažniausiai yra naudojamos maisto pakuočių gamyboje. Tokios pakuotės pasižymi antimikrobinėmis savybėmis, todėl pakuojamas maistas turi ilgesnį galiojimo laiką, išlaiko savo tekstūrą, kvapą, skonį ir yra atsparus įvairiems mikroorganizmams [66].

Elektronikos ir automobilių pramonėje nanodalelės yra naudojamos ekranų – LCD (skystųjų kristalų) ir OLED (organinio šviesos diodo) – gamyboje. Dalelės pagerina šviesumą, spalvų ryškumą bei kontrastą. Taip pat nanodalelės yra naudojamos energijos talpų veikimo ir ilgaamžiškumo gerinimui [67]. Taip pat nanodalelės naudojamos laikmenos įrenginių talpos bei greičio gerinimui.

Ekonominiu požiūriu nanodalelių gamyba bei panaudojimas kasmet sparčiai auga. Tai lemia įvairūs nauji nanodalelių sintezės metodai, leidžiantys gaminti nano dydžio daleles nereikalaujant sudėtingų procesų, įrangos ir neišsekvojant didelių energijos ir finansinių kaštų. Pasak ekonomistų, 2022 metais globaliu mastu, nanodalelių rinka buvo įvertinta 11,99 milijardais JAV dolerių. Nanodalelių pasiūlos



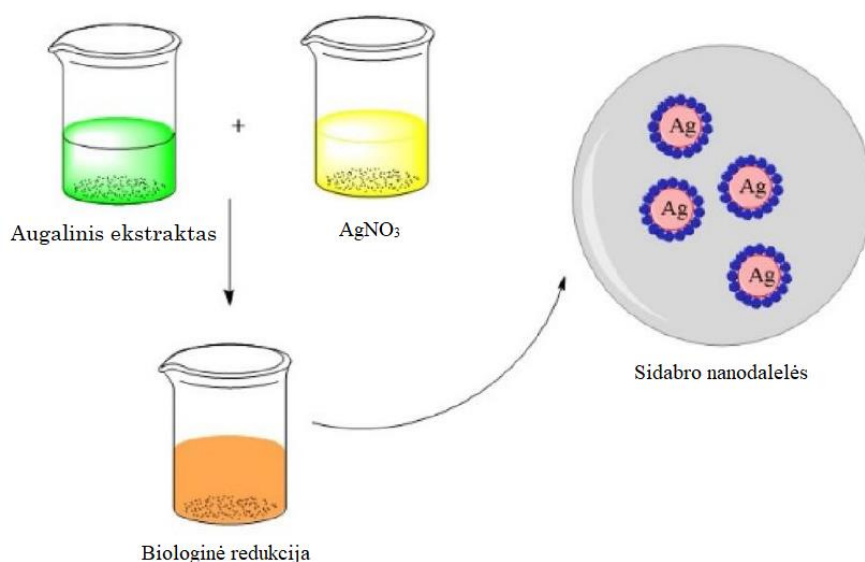
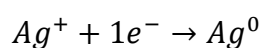
ir paklausos rodikliams kylant, yra numatoma, jog ši rinka kasmet didės ir 2032 metais prognozuojama, jog ši rinka gali būti verta 61,96 milijardų JAV dolerių. Didžiausią rinkos dalį (apie 30 %) sudaro nanodalelių panaudojimas medicinos srityje [68].

### 1.3. Sidabro nanodalelės

Sidabras nuo senų laikų yra žinomas dėl savo antibakterinių savybių, todėl buvo naudojamas įvairių medicininių preparatų gamyboje. Nano dydžio sidabras pasižymi unikaliomis savybėmis, kuriomis galima varijuoti keičiant dalelių morfologiją. Fizikiniai ir cheminiai nanodalelių sintezės metodai yra brangūs bei susidarę šalutiniai produktai ar naudojami organiniai tirpikliai kelia pavojų aplinkai ir gyvajai gamtai. „Žalioji“ biosintezė yra nesudėtingas, nereikalaujantis brangios įrangos, aplinkai saugus sidabro nanodalelių sintezės metodas. Biologiniu būdu susintetintos sidabro nanodalelės pasižymi dideliu stabilumu, didele išėiga, vienodos formos dalelėmis.

#### 1.3.1. Sidabro nanodalelių biosintezės

Biosintezės būdu sintetinamų sidabro nanodalelių procesas yra nesudėtingas, redukcijos reakcija įvyksta gan greitai – trunka nuo kelių minučių iki kelių valandų. Sintezės metu yra sumaišomi du reagentai – augalinis ekstraktas, kuris veikia kaip redukcijos agentas, bei sidabro nitrato ( $\text{AgNO}_3$ ) tirpalas (žiūrėti 1.5 pav.). Redukcijos reakcijos metu vyksta sidabro jonų redukcija į stabilias sidabro daleles:



1.5 pav. Sidabro nanodalelių biosintezės reakcijos, naudojant augalo ekstraktą schema [69]

Biosintezės metu naudojamas augalas yra pasirenkamas pagal cheminę sudėtį. Kuo daugiau redukuoti gebančių junginių grupių turi augalas, tuo geresnės augalinio ekstrakto redukavimo savybės. Tokie junginiai kaip, fenoliai, fenolinės rūgštys, terpenai, alkaloidai ar baltymai, esantys augaliniame ekstrakto, sintezės metu dalyvauja ir kaip susidarančias nanodaleles stabilizuojantys junginiai.

Kaip ir buvo anksčiau minėta nanodalelių apžvalginuose skyriuose, nanodalelių savybės gali būti modifikuojamos keičiant sintezės parametrus, tokius kaip pH, temperatūra, reakcijos laikas ar reagentų koncentracijos. Taip pat ir AgND savybės gali būti keičiamos, norint geriau jas pritaikyti tam tikrose panaudojimo srityse.

### **1.3.2. Sidabro nanodalelių savybės ir pritaikymas**

Sidabro nanodalelės, dėl savo fizikinių bei cheminių savybių, vis plačiau naudojamos medicinos, maisto, sveikatos priežiūros bei įvairios gamybos pramonėse. Tai – optinės, elektrinės, terminės, aukšto elektrinio konduktyvumo bei antibakterinės savybės. Dėl šių savybių jos yra naudojamos kaip antibakterinis agentas gamybos pramonėje, buitinių prekių srityje, sveikatos priežiūros produktuose, medicinos priemonėse, optinių sensorių bei kosmetikos, farmacijos ir maisto pramonėse [70].

Šiuo metu didžiausią dėmesį atkreipia sidabro nanodalelių panaudojimas vėžio aptikimo bei gydymo srityse. Nauji tyrimai rodo, jog nanodalelių panaudojimas gali palengvinti ankstyvą vėžio identifikavimą ir diagnozavimą – esminį veiksnį, lemiantį vėžio gydymo eigą. Ankstyva pacientų navikų diagnozė palengvina vėžio gydymą ir riboją jo plitimą. Taigi, itin svarbūs metodai leidžiantys identifikuoti ir aptikti navikus. Dėl gerai žinomos didelės absorbcijos ir šviesos sklaidos plazmono rezonanso bangos ilgio srityse, AgND yra naudojamos ląstelių aptikimo programose [71]. Atlikti tyrimai taip pat nagrinėja AgND, kaip tikslinį chemoterapinių medžiagų, spinduliuotės bei fotodinaminės terapijos stiprintuvų nanonešiklį [72].

Agrokultūroje trąšos yra naudojamos augalų augimo ir vystymosi gerinimui, tačiau dauguma trąšų nepasiekia augalų dėl kelių priežasčių – skilimo fotolizės metu, hidrolizė ir išplovimas. Todėl itin svarbu yra sumažinti maistinių medžiagų praradimą tręšiant ir pagerinti pasėlių derlių. Šiam tikslui yra naudojamos nanodalelės. Sidabro nanodalelės, priklausomai nuo naudojamos koncentracijos, gali veikti kaip trąša arba inhibitorius augalų augimo proceso metu. Parinkus tinkamą AgND koncentraciją, galima pagerinti augalų augimą ar sėklų dygimą, padidinti chlorofilo koncentraciją bei pagerinti augalų cheminę sudėtį – padidinti baltymų, angliavandenių bei kitų junginių koncentraciją [73].

### **1.4. Lietratūros apžvalgos apibendrinimas**

Gvaizdūnė (lot. *Zinnia elegans*) – visame pasaulyje plačiai paplitęs augalas, pradėtas auginti dėl dekoratyvinių savybių, tačiau atlikti tyrimai parodė, jog gvaizdūnė pasižymi įvairiomis biologinėmis savybėmis: antibakteriniu, antioksidaciniu, insekticidiniu bei priešgrybeliniu aktyvumu. Šias savybes lemia gvaizdūnės antrinių metabolitų junginiai – flavonoidai, saponinai, glikozidai bei polifenoliai.

Dėl unikalių fizikinių, cheminių bei biologinių savybių, sidabro nanodalelės pasižymi plačiu pritaikymu įvairiose pramoninės gamybos srityse: medicinos, kosmetikos, maisto, aplinkosaugos bei tekstilės pramonėse. Pagrindinė tokio plataus sidabro nanodalelių panaudojimo priežastis – antibakterinis aktyvumas.

Sparčiai didėjantis sidabro nanodalelių poreikis ir gamybos mastas verčia ieškoti alternatyvių gamybos būdų nanodalelėms gaminti. AgND gamybos fizikiniai ir cheminiai metodai pasižymi itin didelėmis energijos sąnaudomis, naudojama brangi įranga, gamybos proceso metu yra sunaudojami dideli kiekiai kenksmingų medžiagų (tirpiklių, stabilizatorių), o taip pat neišvengiamai susidaro aplinkai kenksmingi šalutiniai produktai. Atsižvelgiant į šiuos aspektus buvo pradėta naudoti

biologiniai sidabro nanodalelių gamybos būdai, dar vadinami „žaliąja“ biosinteze. Tai aplinkai draugiškas AgND gamybos metodas, kurio metu nenaudojamos aplinkai ir gyviesiems organizmams kenksmingos medžiagos, procesas yra paprastas, nereikalauja sudėtingos įrangos ar didelių energijos sąnaudų. Biosintezės metodas yra paremtas AgND gamyba naudojant mikroorganizmus arba augalinius ekstraktus. Susidariusių dalelių savybės priklauso nuo pasirinkto naudoti mikroorganizmo ar augalo. Norint išvengti papildomo sidabro nanodalelių atskyrimo etapo iš mikroorganizmų yra naudojamas augalinio ekstrakto metodas. Vertinant proceso paprastumą, biologinės žaliavos prieinamumą bei gaunamų dalelių savybes, šio tiriamojo darbo metu buvo pasirinktas biosintezės naudojant augalinius ekstraktus metodas.

Atlikus mokslinės literatūros analizę nustatyta, jog gvaizdūnė (lot. *Zinnia elegans*), dėl augalo audiniuose esančių biologiškai aktyvių medžiagų (polifenolinių junginių bei flavonoidų), gali būti pritaikoma sidabro nanodalelių gamyboje „žaliosios“ biosintezės būdu. Šis augalinių ekstraktų panaudojimas sidabro nanodalelių gamyboje praplečia ir sujungia nanotechnologijų bei biotechnologijų mokslo šakas.

## 2. Medžiagos ir tyrimų metodai

### 2.1. Prietaisai ir priemonės

AgND sintezei bei tyrimams naudoti prietaisai ir priemonės:

1. pH metras (WinLab);
2. Centrifuga (Universal 320R);
3. termostatinė vandens vonelė (Memmert);
4. svarstyklės (Vibra AJ);
5. automatinės pipetės (1-10, 20-200 ir 100-1000  $\mu$ l tūrio);
6. vienkartiniai automatinių pipetėlių antgaliai;
7. džiovavimo spinta (Binder, Model E 28 – 28 L);
8. *Eppendorf* mėgintuvėlių purtyklė (neoLab D – 6015);
9. *Eppendorf* mėgintuvėliai;
10. mėgintuvėlių purtyklė (Biosan Bio Vortex V1);
11. mėgintuvėliai (15, 50 ml);
12. matavimo kolba (100 ml; 500 ml) ;
13. piltuvėliai;
14. popieriniai filtrai (porų dydis 8–12  $\mu$ m);
15. „Vortex“ purtyklė;
16. spektrofotometras (Shimadzu UV – 1280);
17. skenuojantis elektroninis mikroskopas Zeiss EVO MA10 (Vokietija);
18. Rentgeno spinduliuotės energijos dispersijos spektroskopas Bruker Quantax 200 su detektoriumi XFlash 6/10 (Vokietija);
19. Petri lėkštelės (Labochema);
20. autoklavas (Certoclav CV-EL);
21. termostatas (Binder BD23).;
22. termostatinis kratytuvas (Biosan).

### 2.2. Medžiagos ir reagentai

Eksperimento metu naudojamos medžiagos ir reagentai (Sigma Aldrich, Vokietija):

1. gvaizdūnės (lot. *Zinnia elegans*) augalas;
2. distiliuotas vanduo;
3. natrio fosfatinis buferis 0,2 M (pH = 6,6);
4. kalio heksaciano feratas – 1 %  $K_3[Fe(CN)_6]$ ;
5. trichloracto rūgštis – 10 % TCA,  $CCl_3COOH$ ;
6. geležies chloridas – 0,1 %  $FeCl_3$ ;
7. acetato buferis 300 mM (pH=3,6);
8. 10 mmol TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazinas) ištirpintas 40 mmol/l HCl;
9.  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  (20 mmol/l);
10. 2000  $\mu$ mol/L  $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ ;
11. DMSO;
12. acetonas 70 %;
13. tanino rūgšties tirpalas;
14. Folino-Kiokalto reagentas;

15. natrio karbonato 7,5 % tirpalas;
16. Arnovo reagentas;
17. natrio šarmo (40 g/l) tirpalas;
18. vandenilio chloridas – HCl (18 g/l) tirpalas;
19. metanolis 80%;
20. aliuminio chloridas 2 %;
21. kvercetas;
22. natrio šarmas – 0,1 M NaOH;
23. natrio šarmas – 0,01 M NaOH;
24. sieros rūgštis – 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;
25. sidabro nitratas – 1M AgNO<sub>3</sub>.

### 2.3. Metodai

Baigiamasis magistro projektinis darbas susideda iš dviejų pagrindinių dalių. Pirmoje darbo dalyje yra atliekami pasirinkto augalo – gvaizdūnės (lot. *Zinnia elegans*) – žiedų, lapų bei stiebų ekstraktų antioksidacinių, antibakterinių savybių bei bioaktyviųjų junginių koncentracijų nustatymo tyrimai. Antroje darbo dalyje atliekami susintetintų sidabro nanodalelių, naudojant gvaizdūnės augalo ekstraktus, struktūriniai, morfologiniai, cheminės sudėties bei antibakterinių savybių tyrimai.

#### 2.3.1. *Zinnia elegans* žiedų, lapų, bei stiebų žaliavos paruošimas

Analizėje naudota gvaizdūnės (lot. *Zinnia elegans*) augalinė žaliava 2023 metų derliaus, išauginta Kaune. Atskiriamos augalo dalys – žiedai, lapai ir stiebai. Žaliava nuplauta distiliuotu vandeniu ir džiovinta kambario temperatūroje. Išdžiovinta augalinė medžiaga buvo susmulkinama ir naudojama tyrimuose.

#### 2.3.2. Antioksidacinių savybių tyrimai

##### 2.3.2.1. Redukcinių (antioksidacinių) savybių nustatymas skirtingose *Zinnia elegans* augalo dalyse

Eksperimentui atlikti 0,1 g išdžiovintos augalinės medžiagos buvo ekstrahuota metanolyje (5 ml) 45 °C 30 min. Gautas ekstraktas centrifuguotas 10 min ir naudotas tolimesniam tyrimui.

Į 0,5 ml žiedų, lapų ir stiebų ekstraktų mėginius buvo supilama 1,25 ml 0,2 M fosfatinio buferio bei 1,25 ml 1% K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]. Tirpalai buvo sumaišyti sukuriniame maišytuve ir inkubuoti 20 min 50 °C temperatūroje. Pridedama 1,25 ml 10 % trichloracto rūgšties, sumaišoma ir, esant nuosėdoms, centrifuguojama 5 min [74].

1,25 ml nucentrifuguoto tirpalo buvo sumaišoma su 1,25 ml distiliuotu vandeniu ir 0,25 ml 0,1 % FeCl<sub>3</sub>. Šviesos sugertis matuojama spektrofotometru esant 700 nm bangos ilgiui. Atliekami 3 kiekvieno mėginio matavimai. Kuo ryškesnė mėlyna gauto tirpalo spalva, tuo didesnė šviesos sugertis. Redukcinių savybių priklausomybė nuo šviesos sugerties: kuo didesnė šviesos sugertis, tuo geresnės redukcinės savybės.

**Tuščio mėginio ruošimas:** 1 ml 0,2 M fosfatinio buferio yra sumaišomas su 1 ml 1% K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>].

### 2.3.2.2. *Zinnia elegans* skirtingų augalo dalių antioksidacinis aktyvumas pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną

Siekiant įvertinti *Zinnia elegans* žiedų, lapų bei stiebų ekstraktų antioksidacinį aktyvumą buvo naudojamas FRAP metodas. Šis metodas naudojamas nustatant augalo redukuojančias savybes, kuris yra paremtas  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ pavirtimu į  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ (mėlyna spalva) 593 nm bangos ilgyje [74].

Tyrimas atliktas 0,1 g išdžiovintos augalinės medžiagos ekstrahuojant metanolyje (5 ml) 45 °C 30 min. Gautas ekstraktas centrifuguojamas 10 min ir naudojamas tolimesniame tyrime.

#### **Reagentų ruošimas:**

Paruošiami šie tirpalai: 300 mM acetato buferis (pH=3,6), 10 mmol TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazinas) ištirpintas 40 mmol/l HCl,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (20 mmol/l).

FRAP reagentas buvo paruoštas su 25 ml 300 mM acetato buferio, 2,5 ml 10 mmol TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazino) ir 2,5 ml  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (20 mmol/l).

**Tuščio mėginio ruošimas:** 100  $\mu\text{L}$  metanolio buvo sumaišyta su 3 ml FRAP reagentu.

20  $\mu\text{L}$  gautų augalų ekstraktų mėginiai buvo sumaišyti su 80  $\mu\text{L}$  metanolio ir 3 ml FRAP reagento. Reakcijos mišinys buvo spektrofotometriškai matuojamas 593 nm bangos ilgyje.

#### **Kalibravimo kreivė:**

Kalibravimo kreivė buvo sudaroma paruošiant skirtingų koncentracijų  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (5, 10, 15, 20; 25  $\mu\text{mol/L}$ ) mėginius. Reikšmė apskaičiuota pagal kalibravimo kreivę  $\mu\text{mol/L Fe(II)/L}$ . Tuščias kalibravimo kreivės mėginys buvo ruošiamas sumaišant 3 ml FRAP reagento ir 7 ml  $\text{H}_2\text{O}$ .

### 2.3.2.3. *Zinnia elegans* ekstraktų antioksidacinis aktyvumas, pagal DPPH metodą

Gvaizdūnės augalinių ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimui buvo naudojamas DPPH laisvųjų radikalų pašalinimo metodas. Tyrimui atlikti ant 0,2 g susmulkintos augalinės žaliavos buvo užpilta 2 ml metanolio ir homogenizuojama 10 min. Homogenatas centrifuguotas 10 minučių 9000 aps./min. Gautas supernatantas surinktas į mėgintuvėlį [74].

Etaloninis DPPH tirpalas paruoštas 0,0024 g DPPH radikalo tirpinant metanolyje 100 ml talpos matavimo kolboje. Palyginamasis tirpalas paruoštas iš 0,077 ml metanolio, 3 ml DPPH etaloninio tirpalo. Tiriamasis tirpalas paruoštas į mėgintuvėlį įpilant 0,077 ml paruošto ekstrakto ir 3 ml DPPH etaloninio tirpalo. Mėgintuvėlio turinys buvo sumaišytas ir po 15 minučių laikymo tamsoje spektrofotometru išmatuota tirpalo šviesos sugertis.

Oksidacinis slopinimas buvo apskaičiuojamas:

$$\% \text{ slopinimas} = \left( \frac{A_B - A_A}{A_B} \right) \times 100$$

$A_A$  – tiriamojo tirpalo šviesos sugerties dydis.

$A_B$  – palyginamojo tirpalo šviesos sugerties dydis.

### 2.3.3. Bendros fenolinių junginių koncentracijos nustatymas Folino – Kiokalto metodu

Folino – Kiokalto metodu nustatomas bendras fenolinių junginių kiekis augalinėje žaliavoje. Tai kolorimetrinis metodas, pagrįstas elektronų perdavimo reakcijomis tarp fenolinių junginių ir Folino – Kiokalto reagento.

0,05 g augalinės žaliavos buvo supilta į 10 ml acetono (70%) tirpalą ir maišyta kratytuve 20 min kambario temperatūroje. Mėginys centrifuguotas 10 min 9000 aps/min 4 °C temperatūroje. Gautas mėginys dar kartą centrifuguotas 2 min *Eppendorf* mėgintuvėliuose. Supernatantas yra surenkamas ir toliau naudojamas tyrimuose [74].

**Kalibravimo tiesės parengimas:** paimta 0,0; 20; 40; 60; 80; 100, 120 µl standartinio tanino rūgšties tirpalo, supilta į mėgintuvėlius ir įpilta distiliuoto vandens iki 500 µl mėgintuvėlyje. Į tirpalą pridėta 250 µl Folino-Kiokalto reagento ir 1,25 ml 7,5 % natrio karbonato tirpalo. Tirpalas buvo sumaišytas ir inkubuotas tamsoje 40 min kambario temperatūroje. Šviesos sugertis išmatuota spektrofotometru, 725 nm bangos ilgyje.

**Tiriamųjų mėginių ruošimas:** 30 µl paruošto ekstrakto buvo praskiesta distiliuotu vandeniu iki 500 µl. Į jį pridėta 250 µl Folino-Kiokalto reagento ir įpilta 1,25 ml 7,5 % natrio karbonato tirpalo. Mėginiai buvo sumaišyti ir 40 min laikyti tamsoje kambario temperatūroje. Šviesos absorbcija išmatuota spektrofotometru 725 nm bangos ilgyje. Apskaičiuojama bendra fenolinių junginių koncentracija pagal tanino rūgšties ekvivalentą (mg/100 g) pagal formulę:

$$X (\%) = \frac{a \times V \times 100}{n}$$

a – tanino rūgšties koncentracija iš kalibravimo kreivės, mg/l;

V – pradinis ekstrakto tūris l;

n – augalinė masė, g.

### 2.3.4. Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos nustatymas *Zinnia elegans* augalinėje žaliavoje

**Tiriamąjo mėginio ruošimas:** 0,1 g augalinės žaliavos buvo homogenizuota 2,5 ml distiliuotu vandeniu ir termostatuota kratytuve 30 min 25 °C temperatūroje. Po to centrifuguota 10 min 9000 aps/min. Po centrifugavimo 2 ml ekstrakto buvo praskiesta distiliuotu vandeniu iki 5 ml. 1 ml gauto ekstrakto buvo sumaišytas su 5 ml distiliuoto vandens, 1 ml HCl (18 g/l), 1 ml Arnovo reagentu, 1 ml natrio šarmu (40 g/l) ir praskiestas iki 10 ml distiliuotu vandeniu. Gauta mėginio šviesos sugertis spektrofotometriškai išmatuota 490 nm bangos ilgyje.

**Tuščio mėginio ruošimas:** 1 ml distiliuoto vandens buvo sumaišyta su 5 ml distiliuotu vandeniu, 1 ml HCl (18 g/l), 1 ml Arnovo reagentu, 1 ml natrio šarmu (4 g/l) ir praskiesta iki 10 ml distiliuotu vandeniu. Šviesos sugertis spektrofotometriškai išmatuota 490 nm bangos ilgyje.

Fenolinių rūgščių koncentracija (%) pagal kavos rūgštį apskaičiuota pagal formulę:

$$X(\%) = \frac{A \times 1,7544}{m}$$

A – šviesos sugerties reikšmė;

m – augalinė masė, g.

### 2.3.5. Flavonoidų nustatymas *Zinnia elegans* augaliniuose ekstraktuose

**Augalinio ekstrakto paruošimas:** 0,2 g augalinės žaliavos kartu su 2 ml 80 % metanolio buvo maišyta vieną parą 150 aps/min. Gautas homogenatas nucentrifuguotas 10 min 9000 aps/min ir gautas supernatantas toliau naudotas tyrime.

Į 0,1 ml gauto ekstrakto buvo įpilta 0,9 ml 80 % metanolio ir 1 ml 2 % aliuminio chlorido. Mišinys paliktas 30 min. Spektrofotometru išmatuojama šviesos sugertis 415 nm bangos ilgyje. Flavonoidai apskaičiuoti pagal kvercetiną mg/g sausos masės.

Flavonoidų koncentracija mg/g pagal kvercetiną apskaičiuojama pagal formulę:

$$C \text{ (mg/g)} = \frac{C_1 \times V}{g}$$

$C_1$  – kvercetino koncentracija mg/ml pagal kalibravimo kreivę;

$V$  – ekstrakto pradinis tūris, ml;

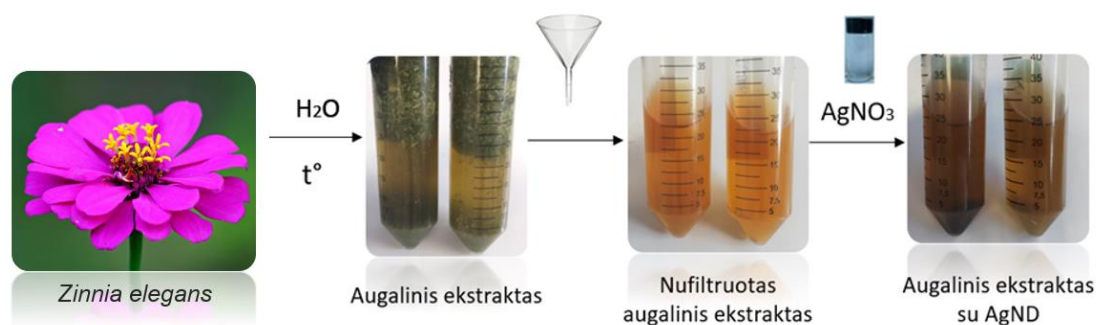
$g$  – augalinė masė, g.

#### Kvercetino kalibravimo kreivė

Kvercetinas (1 mg/ml) buvo ištirpintas metanolyje. Paruoštos skirtingos kvercetino koncentracijos: 10 mg/l; 20 mg/l; 30 mg/l; 40 mg/l; 50 mg/l. Į mėgintuvėlius buvo įpiltas kvercetinas (0,1 ml; 0,2 ml; 0,3 ml; 0,4 ml; 0,5 ml), 0,15 ml 2% aliuminio chloridas bei praskiestas iki 10 ml su metanoliumi. Spektrofotometru išmatuota šviesos sugertis 415 m bangos ilgyje. Tuščias bandinys – metanolis. Braižoma kvercetino kalibravimo kreivė.

### 2.3.6. Sidabro nanodalelių biosintezė, naudojant *Zinnia elegans*

2,5 g augalinės žaliavos užpilami 45 ml distiliuotu vandeniu ir laikomi 40 min 60 °C vandens vonioje. Gautas augalinis ekstraktas buvo nucentrifuguojamas 10 min 9000 aps/min ir nufiltruojamas naudojant Vatmano popierinį filtrą. Gauti augaliniai ekstraktai su 1 M sidabro nitrato ( $\text{AgNO}_3$ ) tirpalu sumaišyti dviem santykiais – 0,5:1 bei 2:1. Pirmuose mėgintuvėliuose įpilama 2,5 ml augalinio ekstrakto ir 5 ml  $\text{AgNO}_3$  tirpalas. Antruose mėgintuvėliuose įpilama 5 ml augalinio ekstrakto ir 2,5 ml  $\text{AgNO}_3$  tirpalo. Koreguojamas gautų tirpalų pH, (0,1 M NaOH ir 0,01 M NaOH tirpalais), kad pasiektų 9 vertę. Tirpalas sumaišomas ir paliekamas 24 valandoms kambario temperatūroje šviesioje aplinkoje. Nusėdusios AgND yra nucentrifuguojamos 10 min 9000 aps/min, nusėdusios sidabro nanodalelės 3 kartus perplautos distiliuotu vandeniu, o vėliau išdžiovinamos džiovavimo spintoje (žr. 2.1 pav.) [75, 76].



2.1 pav. Sidabro nanodalelių biosintezės schema



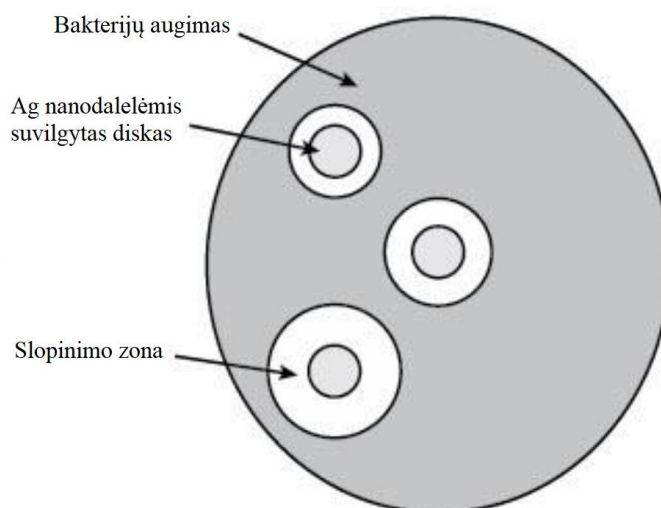
### 2.3.7. Antibakterinis aktyvumas

Gvaizdūnės antibakterinių savybių įvertinimui buvo pasirinktos dvi patogeninių bakterijų kultūros – *Escherichia coli* ATCC 25922 ir *Bacillus subtilis* ATCC 11774. Sidabro nanodalelių antibakterinėms savybėms nustatyti buvo naudojamos *Bacillus subtilis* ATCC 11774 bakterijos. Kontrolinis mėginys – antibiotikas ciprofloksacinas.

**Augalinio ekstrakto ruošimas:** į 0,2 g augalinės žaliavos buvo įpilta 2 ml DMSO. Tirpalas išmaišytas ir laikytas 7 paras kambario temperatūroje. Vėliau nucentrifuguotas 10 min 9000 aps/min. Gauti ekstraktai naudoti antibakterinio aktyvumo nustatyme [74].

Petri lėkštelėse ant LB terpės buvo užpilta 50 μl *Escherichia coli* bei *Bacillus subtilis* bakterijų suspensija. Ant bakterijų pasėtos lėkštelės buvo uždėti popieriniai diskeliai, suvilgyti 50 μl augalų ekstraktu. Petri lėkštelės sudėtos į termostatą, kuriame buvo palaikoma 37 °C temperatūra. Po paros buvo stebimas bakterijų augimas bei augalinio ekstrakto antibakterinis poveikis (žr. 2.2 pav.).

Tyrimas atliktas su DMSO *Zinnia elegans* augaliniais ekstraktais bei AgND *Zinnia elegans* augaliniais ekstraktais.



2.2 pav. Antibakterinio aktyvumo slopinimo zonos įvertinimas

### 2.3.8. Sidabro nanodalelių ultravioletinės – regimosios šviesos spinduliuotės analizė

Ultravioletinės – regimosios šviesos spinduliuotės analizės metu matuojamas šviesos intensyvumas, atsispindintis nuo mėginio, ir palyginamas su šviesos intensyvumu, atsispindinčiu nuo etaloninės medžiagos. UV-RŠ spektroskopija nanodalelių analizei yra naudinga dėl jos gebėjimo suteikti informaciją apie nanodalelių optines savybes, plazmoninius rezonansus. Plazmoniniai rezonansai gali būti naudojami nustatant nanodalelių dydį, formą, koncentraciją ir kitus parametrus. Tyrimo metu naudojamas spektrofotometras Shimadzu UV – 1280.

### 2.3.9. Sidabro nanodalelių Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija

Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija (FT-IR) yra analitinis metodas naudojamas junginių identifikavimui ar mėginių sudėčiai iširti. Šis tyrimas buvo atliktas spektrometru Spectrum GX 2000, horizontalioji atspindžio sistema Hart Accessory For Spectrum

GX. Pralaidumo spektro registravimo diapazonas  $10\ 000 - 200\ \text{cm}^{-1}$ , horizontalaus daugkartinio atspindžio IR spektro registravimas  $4000 - 500\ \text{cm}^{-1}$  ribose. Gauti duomenys apdoroti OriginPro 9 programine įranga.

### 2.3.10. Sidabro nanodalelių Rentgeno spinduliuotės difrakcijos analizė

Rentgeno spinduliuotės difrakcinė analizė (RSDA) metu yra nustatoma sidabro nanodalelių kristalinė struktūra. Šis tyrimas nurodo Milerio (Miller) indeksus, kurie charakterizuoja kristalo gardelės plokštumas ir jų orientaciją. Tyrimas atliktas Rentgeno difraktometru „D8 Advance“ (Bruker AXS, Karlsruhe, Vokietija). Darbinė difraktometro įtampa 40 kV, srovė vamzdyje 40 mA. Gauti duomenys apdoroti „Microsoft Excel“, OriginPro 9 programine įranga.

Iš analizės metu gautų duomenų buvo apskaičiuojamas kristalinių dydis, tarplokštuminiai atstumai bei kristalinių gardelės parametrai.

Kristalinių dydis ( $D_{hkl}$ ) apskaičiuotas pagal Schererio lygtį [77]:

$$D_{hkl} = \frac{k \cdot \lambda}{\beta_{hkl} \cdot \cos \theta};$$

$\lambda$  – Cu K $\alpha$  rentgeno spinduliuotės bangos ilgis (0,1541 nm);

$\theta$  – Brago difrakcijos kampas, ° arba radianais;

$\beta_{hkl}$  – būdingosios intensyviosios smailės plotis radianais, esant pusei smailės aukščio (FWHM);

$k$  – Schererio konstanta (0,89).

Tarplokštuminiai atstumai ( $d$ ) buvo apskaičiuoti pagal Brago dėsnį [77]:

$$n\lambda = 2d \sin \theta;$$

$d$  – tarplokštuminis atstumas, nm;

$n$  – atspindžio eilė.

Sidabro nanodalelių kristalinių gardelės parametrai ( $a$ ) buvo apskaičiuoti pagal lygtį [77]:

$$\frac{1}{d^2} = \frac{(h^2 + k^2 + l^2)}{a^2};$$

$d$  – tarplokštuminis atstumas, nm;

### 2.3.11. Sidabro nanodalelių skenuojančios elektroninės mikroskopijos ir transmisinės elektroninės mikroskopijos analizė

Skenuojančios elektroninės mikroskopijos metodas buvo naudojamas susintetintų sidabro nanodalelių morfologinių savybių nustatymui. Susintetintos AgND buvo nucentrifuguotos, atskirtos nuo augalinio ekstrakto, grynintos distiliuotu vandeniu ir išdžiovintos. AgND morfologinės savybės buvo tiriamos naudojant Zeiss EVO MA10 skenuojantį elektroninį mikroskopą (žr. 2.3 pav.). Dalelių nuotraukos gautos naudojant 20 kV įtampą.



**2.3 pav.** Skenuojantis elektroninis mikroskopas (SEM) Zeiss EVO MA10

Transmisinės elektroninės mikroskopijos analizės metodas, dėl didesnės priartinimo galimybės, yra naudojamas tikslesniam susidariusių sidabro nanodalelių dydžio bei formos nustatymui. Nuo skenuojančios elektroninės mikroskopijos skiriasi galingumu bei elektronų srauto trajektorija: SEM tyrimo metu elektronai atsimuša nuo tiriamosios medžiagos ir patenka į detektorius, o TEM analizės metu elektronai pereina tiriamąją medžiagą, susidaro šešėliai, pagal kuriuos nustatoma dalelių forma ir dydis. Morfologinės AgND savybės buvo tiriamos TECNAI G2 F20 X-TWIN transmisiniu elektroniniu mikroskopu (žr. 2.4 pav.). Tyrimo metu naudojama 200 kV įtampa.



**2.4 pav.** Transmisinis elektronų mikroskopas TECNAI G2 F20 X-TWIN

### **2.3.12. Sidabro nanodalelių elementinės sudėties Rentgeno spinduliuotės energijos dispersijos spektroskopijos tyrimai**

Rentgeno spinduliuotės energijos dispersijos spektroskopija (EDS) yra naudojama siekiant nustatyti mėginio elementinę sudėtį. Šiam tyrimui buvo naudojamas Bruker Quantax 200 EDS spektrometras su detektoriumi XFlash 6/10 ir ESPRIT programine įranga (atliekant SEM analizę) bei energijos dispersijos spektrometras EDAX su r-TEM rentgeno kvantų detektoriumi (atliekant TEM analizę).

### 3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

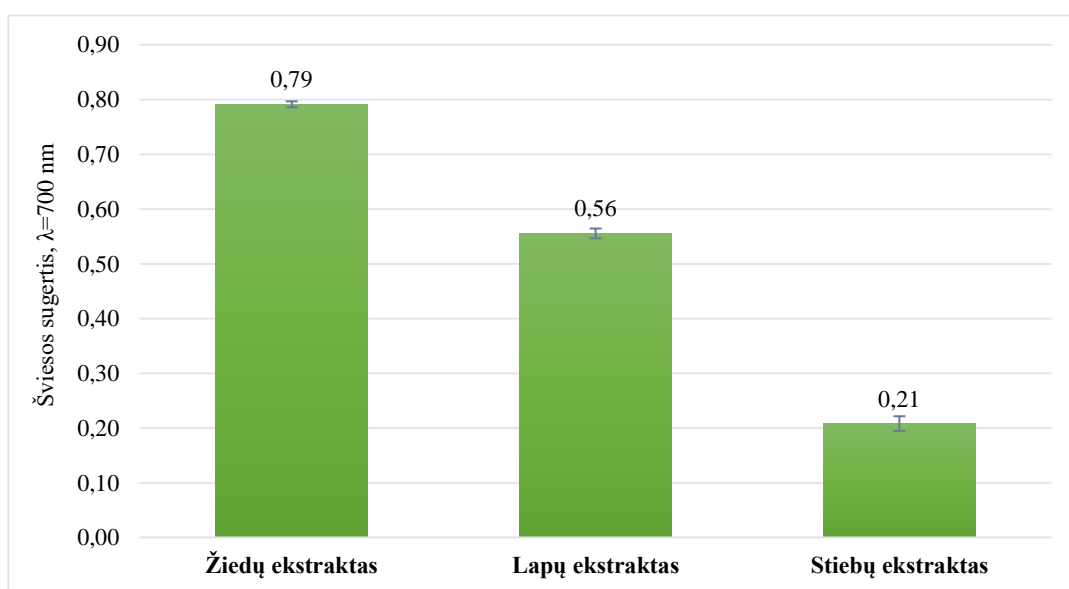
Baigiamąjį projektinį darbą sudaro dvi pagrindinės dalys. Pirmoje darbo dalyje tiriamos pasirinkto augalo – gvaizdūnės (lot. *Zinnia elegans*) – žiedų, lapų, stiebų biocheminės savybės. Skirtingais metodais yra tiriamos antioksidacinės savybės, biologiškai aktyvių junginių (fenolinių junginių, fenolinių rūgščių bei flavonoidų) koncentracijos, įvertinamos antibakterinės savybės naudojant gramteigiamas bei gramneigiamas bakterijas. Antroje darbo dalyje yra atliekama sidabro nanodalelių biosintezė, naudojant augalinius ekstraktus, susidariusių nanodalelių charakterizavimo tyrimai bei sidabro nanodalelių įtakos sėklų dygimui *in vitro* nustatymas.

Gvaizdūnės (lot. *Zinnia elegans*) antioksidacinėms savybėms įvertinti buvo pasirinkti trys metodai – redukcinių (antioksidacinių) savybių tyrimas, FRAP bei DPPH. Tyrimų metu buvo nustatytas žiedų, lapų bei stiebų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas.

#### 3.1. *Zinnia elegans* ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

##### 3.1.1. Redukcinių (antioksidacinių) savybių nustatymas *Zinnia elegans* augaliniuose ekstraktuose

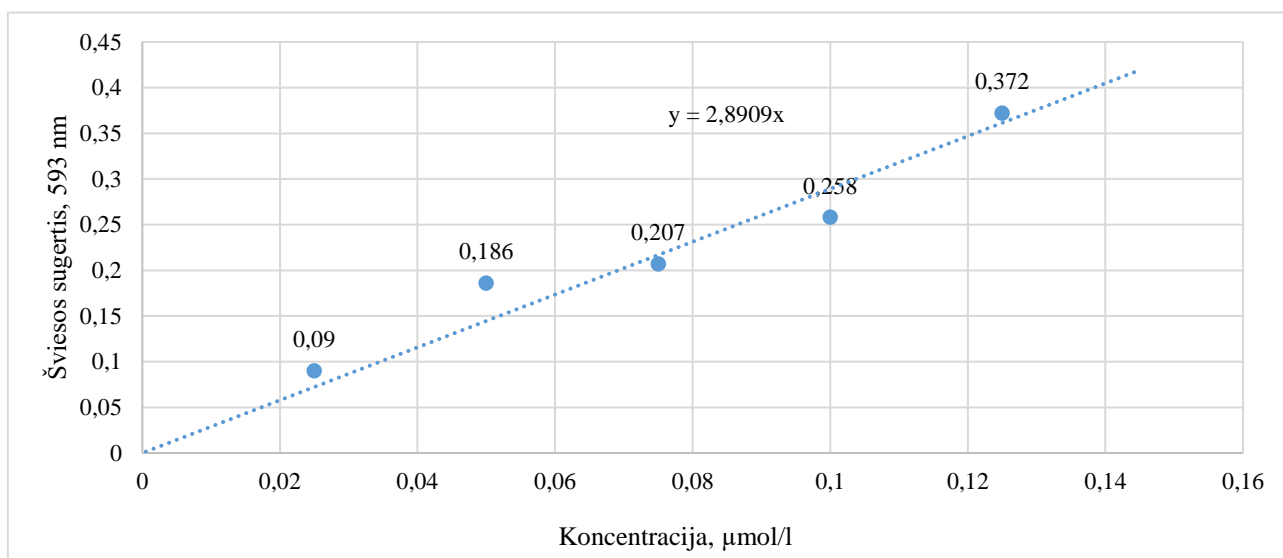
Optinis tankis tiesiogiai rodo tiriamos medžiagos redukcinį aktyvumą, todėl didesnė šviesos sugertis reiškia geresnes redukcines savybes. Atlikus *Zinnia elegans* žiedų, lapų bei stiebų ekstraktų redukcinių savybių tyrimą ir įvertinus gautus rezultatus nustatyta, jog labiausiai redukcinėmis (antioksidacinėmis) savybėmis pasižymėjo *Zinnia elegans* žiedų ekstraktas (3.1. pav.). Žiedų ekstraktų šviesos sugertis, esanti 700 nm bangos ilgiui yra 0,79. Mažiausia šviesos sugertimi – 0,21 – esant 700 nm bangos ilgiui, pasižymėjo gvaizdūnės stiebų ekstraktas, todėl galima teigti, jog stiebai pasižymi mažiausiomis redukcinėmis savybėmis.



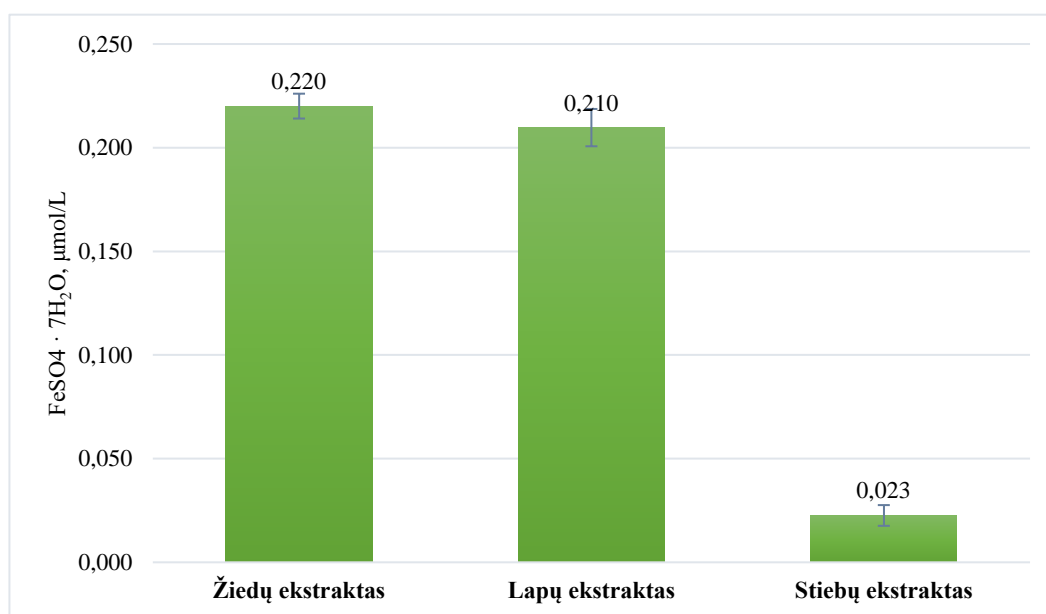
3.1 pav. *Zinnia elegans* žiedų, lapų, stiebų ekstraktų redukcinės savybės

### 3.1.2. Antioksidacinis aktyvumas *Zinnia elegans* augaliniuose ekstraktuose, naudojant FRAP metoda

FRAP metodas vertina augalo redukcines savybes, pagrįstas biologiškai aktyvių junginių gebėjimu redukuoti  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ į tamsiai mėlynos spalvos  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ, esant šviesos sugerčiai 593 nm bangos ilgyje. Antioksidacinio aktyvumo nustatymui buvo sudaryta  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  kalibracinė kreivė (3.2 pav.), gauta tiesinė lygtis ( $y = 2,8909x$ ) ir apskaičiuota  $\text{Fe(II)}$  koncentracija ( $\mu\text{mol/l}$ ).



3.2 pav.  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  kalibracinė kreivė

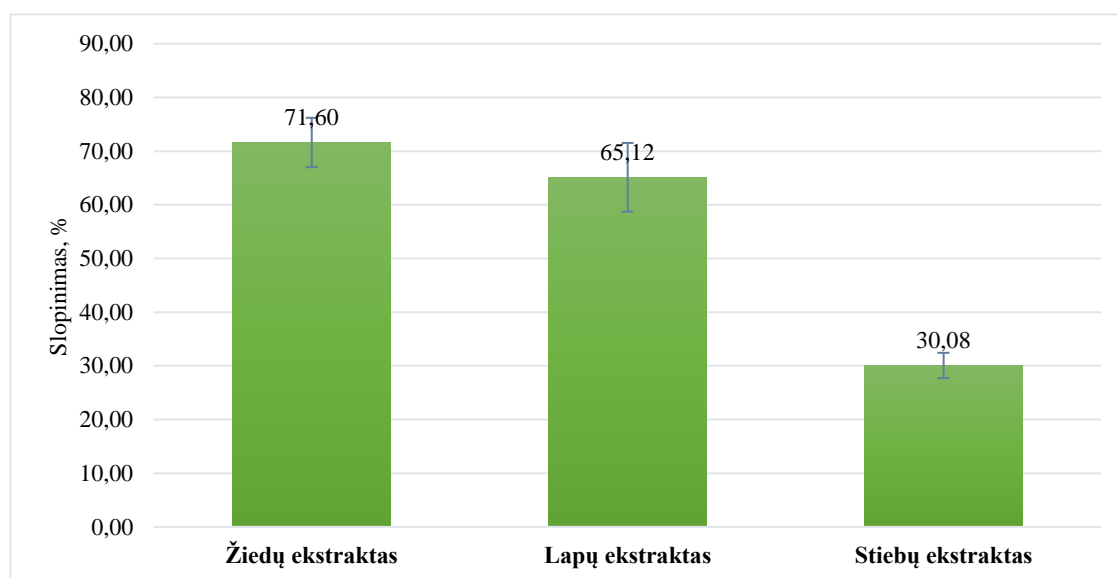


3.3 pav. *Zinnia elegans* žiedų, lapų, stiebų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas, pagal FRAP metoda

Atlikus antioksidacinio aktyvumo, pagal FRAP metoda nustatymą, nustatyta, jog gvaizdūnės žiedų ir lapų ekstraktuose yra didžiausias antioksidacinis aktyvumas (3.3 pav.). Žiedų ir lapų ekstraktuose nustatyta 0,220  $\mu\text{mol/l}$  bei 0,210  $\mu\text{mol/l}$   $\text{Fe}^{2+}$  junginių koncentracija. Mažiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo stiebų ekstraktas – tyrimas parodė 0,023  $\mu\text{mol/l}$   $\text{Fe}^{2+}$  junginių koncentraciją.

### 3.1.3. Antioksidacinis aktyvumas *Zinnia elegans* augaliniuose ekstraktuose, naudojant DPPH metoda

Atlikus antioksidacinio aktyvumo DPPH metodu tyrimą, iš gautų spektrofotometrinių duomenų buvo apskaičiuotas DPPH radikalo slopinimas procentine dalimi (3.4 pav.). Įvertinus gautus tyrimo rezultatus buvo nustatyta, jog didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo gvaizdūnės žiedų ekstraktas – DPPH radikalo slopinimas lygus 71,60 %. Šiek tiek mažesniu slopinimo rodikliu – 65,12 % pasižymėjo lapų ekstraktas, o mažiausias antioksidacinis aktyvumas fiksuojamas stiebų ekstrakto – 30,08 %.



3.4 pav. *Zinnia elegans* žiedų, lapų, stiebų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas, pagal DPPH metoda

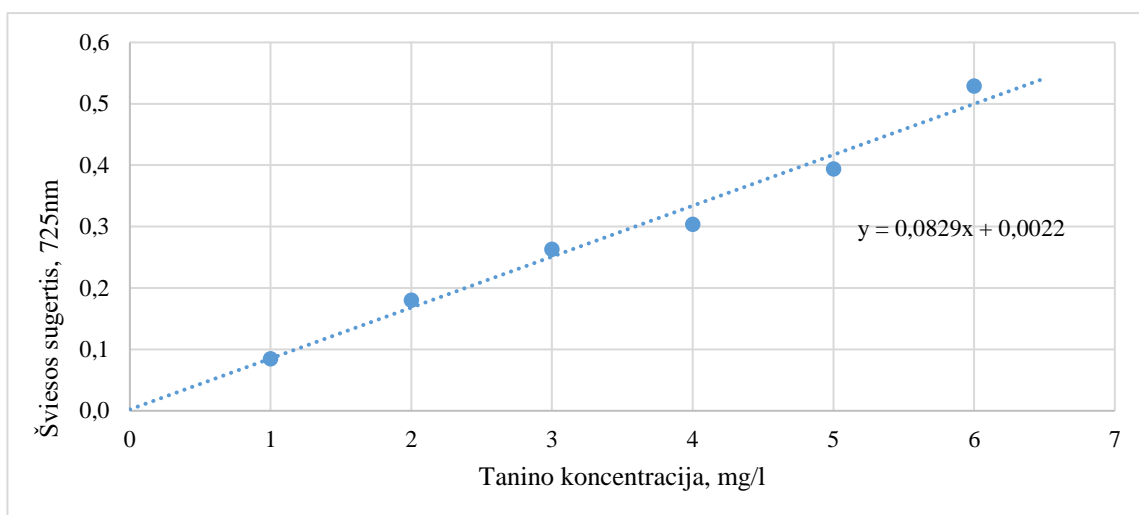
Apibendrinant gvaizdūnės (lot. *Zinnia elegans*) žiedų, lapų bei stiebų ekstraktų antioksidacines savybes, galima teigti, jog labiausiai antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo gvaizdūnės žiedų ekstraktas. Mažiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo gvaizdūnės stiebų ekstraktas. Antioksidacines savybes augaliniuose ekstraktuose lemia biologiškai aktyvūs junginiai, kaip fenolinių junginiai.

## 3.2. Biologiškai aktyvių junginių koncentracijos nustatymas

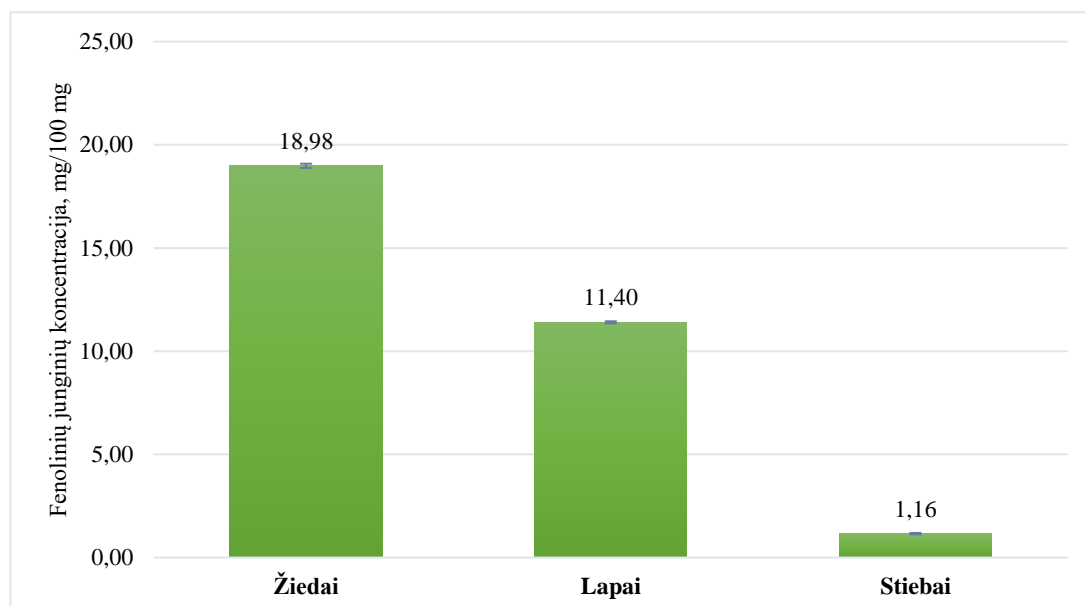
Norint įvertinti biologiškai aktyvių junginių koncentracijas, esančias gvaizdūnės (lot. *Zinnia elegans*) augaliniuose ekstraktuose, buvo atliktas fenolinių junginių koncentracijos nustatymas Folino – Kiokalto metodu, bendrų fenolinių rūgščių koncentracijos nustatymas bei flavonoidų koncentracijos nustatymas.

### 3.2.1. Bendros fenolinių junginių koncentracijos nustatymas Folino – Kiokalto metodu

Bendrajai fenolinių junginių koncentracijai nustatyti Folino – Kiokalto metodu buvo sudaroma tanino koncentracijos kalibracinė kreivė (3.5 pav.). Iš kalibracinės kreivės buvo išvesta tiesinė lygtis ( $y = 0,0829x + 0,0022$ ), naudojama fenolinių junginių koncentracijai apskaičiuoti bei spektrofotometro pagalba išmatuota tiriamų augalinių ekstraktų šviesos sugertis.



**3.5 pav.** Tanino kalibracinė kreivė



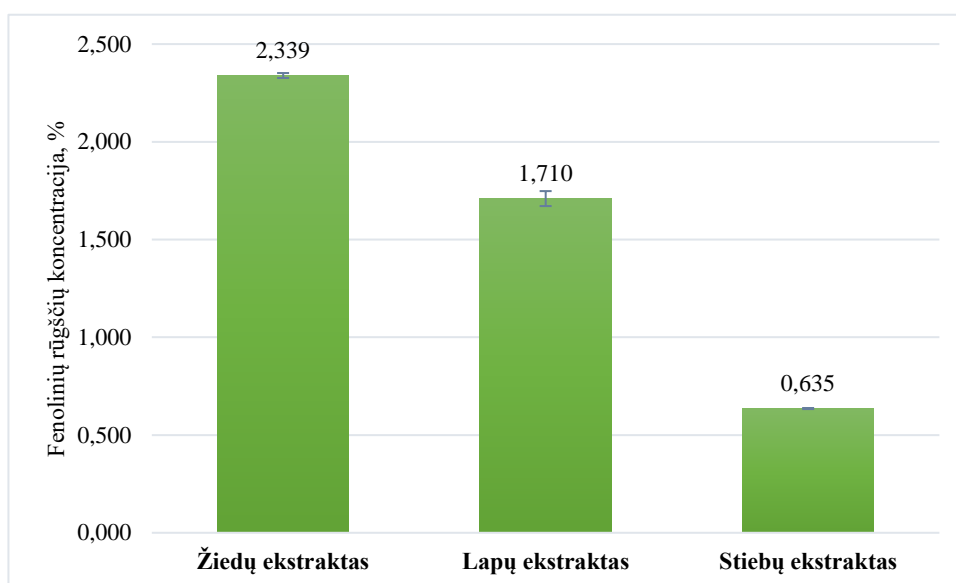
**3.6 pav.** Fenolinių junginių koncentracija *Zinnia elegans* žiedų, lapų bei stiebų ekstraktuose

Vertinant gautus duomenis atlikus fenolinių junginių koncentracijos nustatymą, galima teigti, jog didžiausia fenolinių junginių koncentracija yra gvaizdūnės žiedų ekstraktuose – 18,98 mg/100 mg (3.6 pav.). Šiek tiek mažesnė fenolinių junginių koncentracija yra fiksuojama gvaizdūnės lapų ekstraktuose – 11,40 mg/100 mg. Gvaizdūnės stiebų ekstraktas pasižymėjo mažiausia fenolinių junginių koncentracija – 1,16 mg/100 mg.

### 3.2.2. Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos nustatymas *Zinnia elegans* auglinėje žaliavoje

Atlikus bendrųjų fenolinių rūgščių koncentracijos nustatymo tyrimą, pagal gautus rezultatus galima teigti, jog gvaizdūnės (lot. *Zinnia elegans*) žiedų ekstraktas pasižymėjo didžiausia fenolinių rūgščių koncentracija – 2,339 % (3.7 pav.). Gvaizdūnės lapų ekstraktoje buvo nustatyta 1,710 % fenolinių

rūgščių koncentracija. Mažiausia fenolinių rūgščių koncentracija pasižymėjo gvaizdūnės stiebų ekstraktas – 0,635 %.

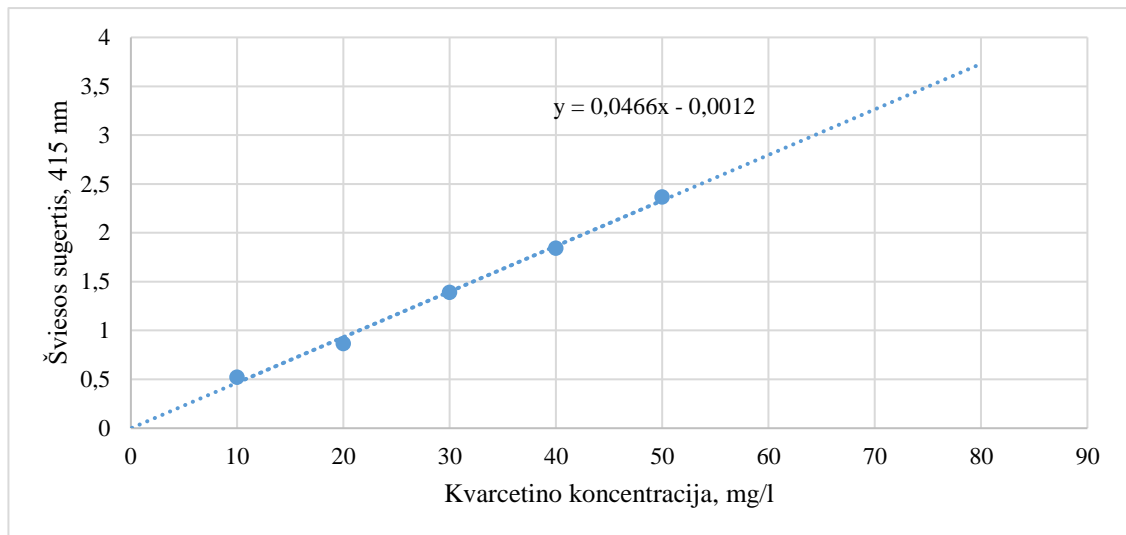


3.7 pav. Fenolinių rūgščių koncentracija *Zinnia elegans* augaliniuose ekstraktuose

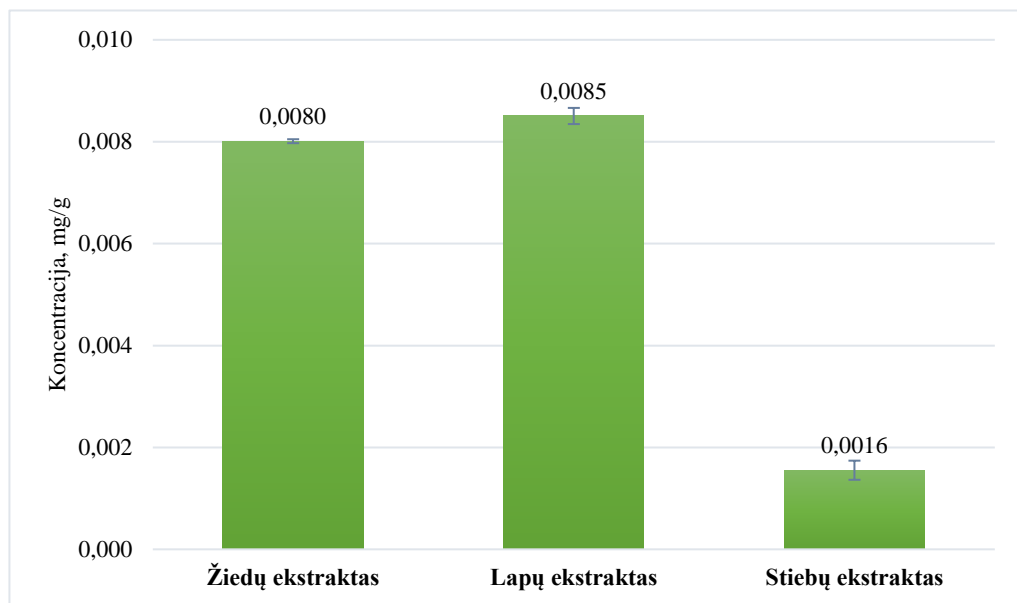
### 3.2.3. Flavonoidų nustatymas *Zinnia elegans* augaliniuose ekstraktuose

Vieni pagrindinių fenolinių junginių, pasiskirsčiusių visose augalo dalyse – flavonoidai. Tai pigmentiniai junginiai, dažnai randami augalo vaisiuose, lapuose ar žieduose. Kai kuriuose augaluose žiedų oranžinę ar geltoną spalvą lemia augale esantys flavonoidai. Šių junginių koncentracijai nustatyti buvo sudaryta kalibracinė kreivė pagal kvercetiną (3.8 pav.), taip pat išvesta tiesinė lygtis ( $y = 0,0466x - 0,0012$ ), kuri buvo naudojama flavonoidų koncentracijos apskaičiavimui tirtuose augaliniuose ekstraktuose.





3.8 pav. Kvercetino kalibracinė kreivė



3.9 pav. Flavonoidų (kvercetino) koncentracija *Zinnia elegans* augaliniuose ekstraktuose

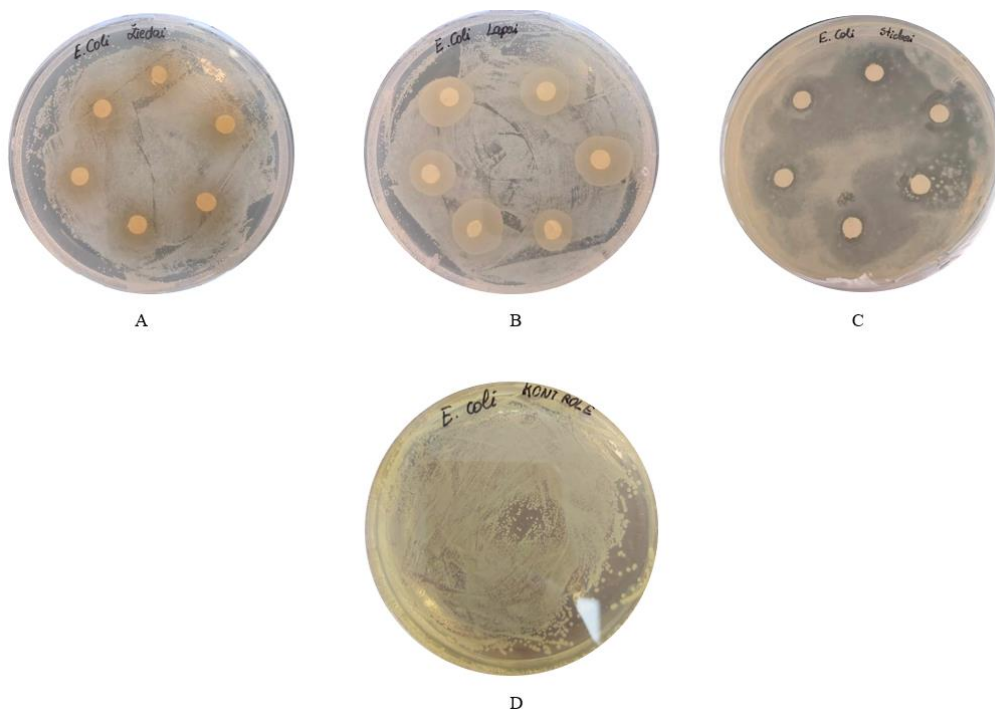
Atlikus flavonoidų koncentracijos nustatymo tyrimą naudojant gvaizdūnės (lot. *Zinnia elegans*) ekstraktus, galima teigti, jog didžiausia flavonoidų (kvercetino) koncentracija pasižymėjo lapų ekstraktas – 0,0085 % (žr. 3.9 pav.). Kiek mažesne flavonoidų koncentracija – 0,0080 % – pasižymėjo žiedų ekstraktas. Mažiausia koncentracija buvo nustatyta gvaizdūnės stiebų ekstrakto – 0,0016 %.

### 3.3. Antibakterinis aktyvumas

*Zinnia elegans* žiedų, lapų bei stiebų ekstraktų antibakterinio aktyvumo nustatymas atliktas naudojant difuzijos į agarą metodą. Siekiant įvertinti antibakterinį aktyvumą skirtingų bakterijų atžvilgiu, buvo pasirinktos gramneigiamos *Escherichia coli* ir granteigiamos *Bacillus subtilis* bakterijos.

### 3.3.1. Antibakterinis aktyvumas, naudojant *Escherichia coli* bakterijas

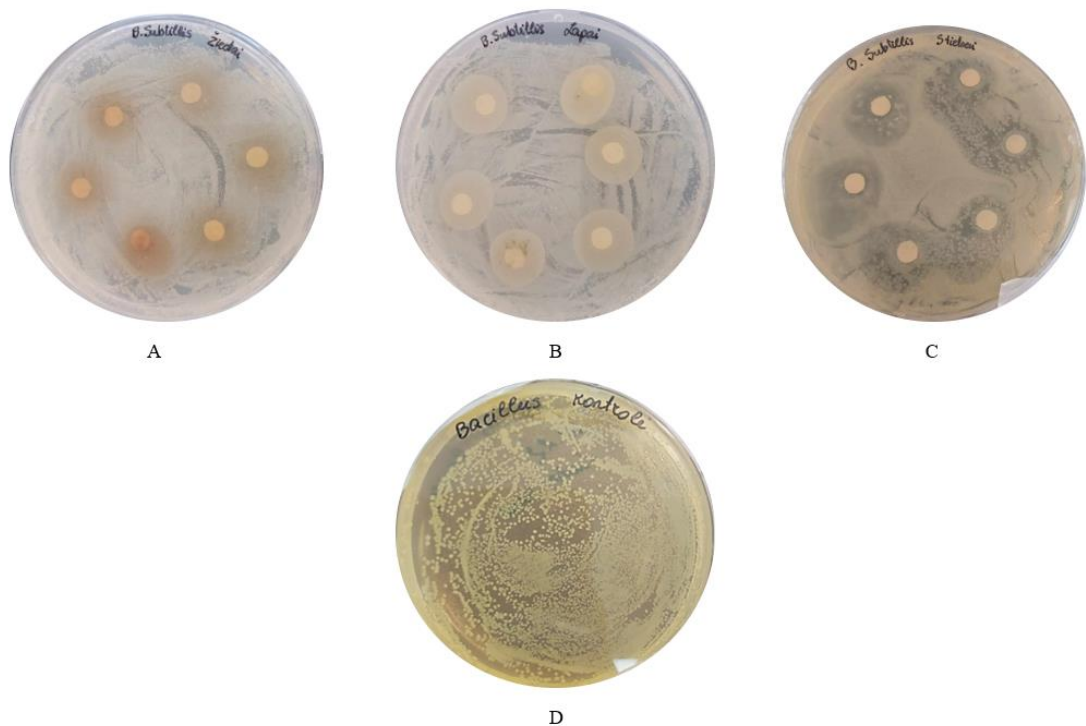
Atlikus *Zinnia elegans* žiedų, lapų ir stiebų ekstraktų antibakterinio aktyvumo tyrimą, naudojant *E.coli* bakterijas, gauti rezultatai parodė, jog didžiausias antibakterinis aktyvumas pasireiškė naudojant gvaizdūnės stiebų ekstraktus (3.10 pav.).



**3.10 pav.** Antibakterinio aktyvumo įvertinimas, naudojant *Escherichia coli* bakterijas. Gvaizdūnės (lot. *Zinnia elegans*) augaliniai ekstraktai: A – žiedų, B – lapų, C – stiebų, D – kontrolinis *E. coli* mėginys

### 3.3.2. Antibakterinis aktyvumas naudojant *Bacillus subtilis* bakterijas

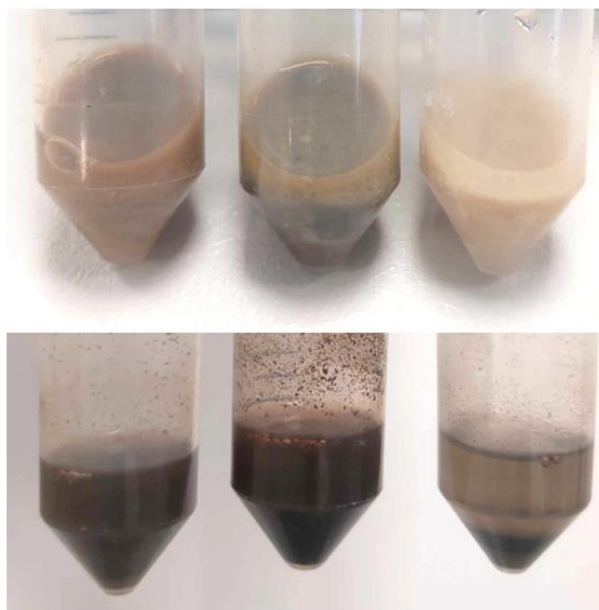
Atlikus *Zinnia elegans* žiedų, lapų ir stiebų ekstraktų antibakterinio aktyvumo įvertinimą, naudojant *Bacillus subtilis* bakterijas, matome, jog didžiausias antibakterinis aktyvumas pasireiškė naudojant gvaizdūnės lapų ir stiebų ekstraktus (3.11 pav.).



**3.11 pav.** Antibakterinio aktyvumo įvertinimas, naudojant *Bacillus subtilis* bakterijas. Gvaizdūnės (lot. *Zinnia elegans*) augaliniai ekstraktai: A – žiedų, B – lapų, C – stiebų, D – kontrolinis *Bacillus subtilis* mėginys

### 3.4. Sidabro nanodalelių biosintezė naudojant *Zinnia elegans* augalinius ekstraktus ir jų savybių įvertinimas

Sidabro nanodalelių biosintezei pasirinkta naudoti gvaizdūnės (lot. *Zinnia elegans*) augalinius ekstraktus, kurie, kaip parodė tyrimai (žr. 3.2 sk.), sudėtyje turi biologiškai aktyviųjų junginių – fenolinių junginių, fenolinių rūgščių bei flavonoidų. Šios biologiškai aktyviosios medžiagos sidabro nanodalelių biosintezės metu veikia kaip redukuojančios medžiagos, todėl geba redukuoti  $Ag^+$  jonus iki metalinių  $Ag^0$  nanodalelių.



**3.12 pav.** Sidabro nanodalelių biosintezės, naudojant gvaizdūnės augalinius ekstraktus, mėginiai: viršuje – augaliniai ekstraktai sintezės pradžioje, apačioje – augaliniai ekstraktai po 24 val. sintezės.

Biosintezės proceso pradžioje, sumaišius 1M AgNO<sub>3</sub> tirpalą ir gvaizdūnės žiedų, lapų bei stiebų ekstraktus, susidarė neskaidrios spalvos mėginiai. Tai indikuoja pakitusi mėginių spalva (3.12 pav.). Po 24 valandų mėginiuose buvo pastebėtas spalvinis pakitimas – mėginiai tapo tamsesnės spalvos, o ant mėgintuvėlio dugno atsirado juodos spalvos nuosėdos (3.12 pav.). Tirpalo spalvos pokytis ir susidariusios nuosėdos leido daryti prielaidą, jos tirpale susidarė sidabro nanodalelės [78].

Siekiant optimizuoti sidabro nanodalelių biosintezės procesą, sintezė buvo atlikta naudojant skirtingus augalinių ekstraktų bei AgNO<sub>3</sub> tirpalo santykius. AgND sintezės metu gautos išeišos pateiktos 3.1 lentelėje.

**3.1 lentelė.** Sidabro nanodalelių išeišos, naudojant skirtingus augalinio ekstrakto ir AgNO<sub>3</sub> santykius

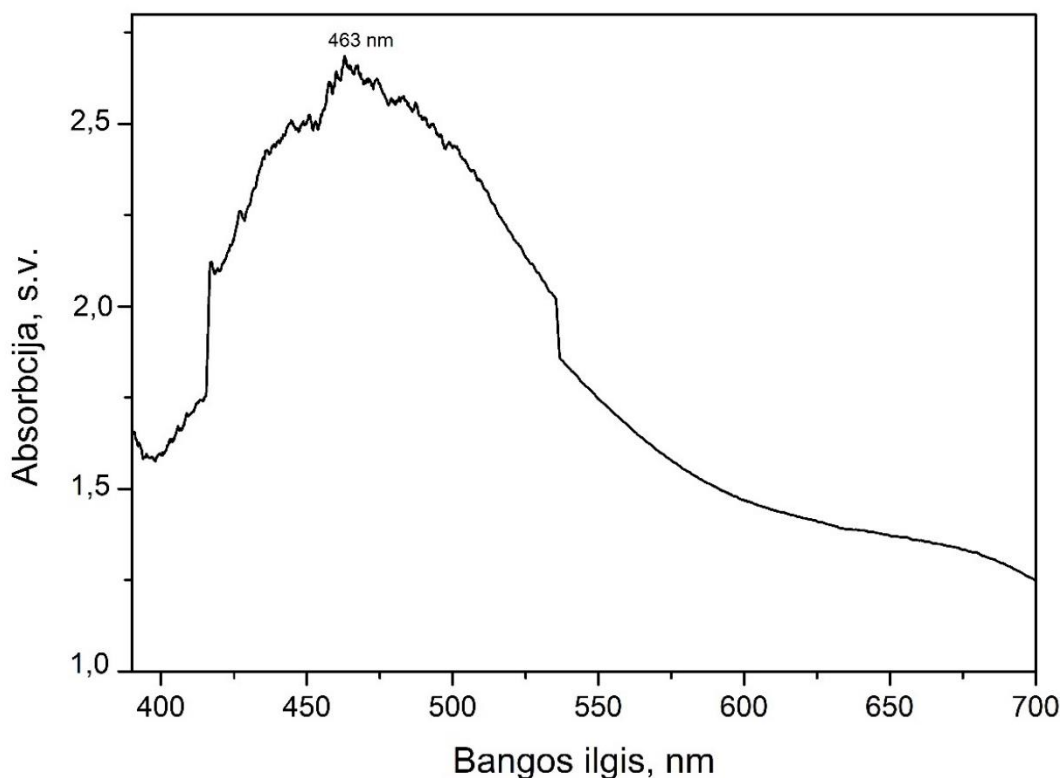
Augalinis ekstraktas	Augalinio ekstrakto ir AgNO <sub>3</sub> santykis	
	0,5:1	2:1
	Išeiša, g	Išeiša, g
Žiedų ekstraktas	0,0542	0,1834
Lapų ekstraktas	0,0426	0,1724
Stiebų ekstraktas	0,299	0,0969

Sidabro nanodalelių biosintezės metu buvo naudojami skirtingi augalinio ekstrakto bei AgNO<sub>3</sub> tirpalo santykiai – 0,5:1 bei 2:1 (3.1 lentelė). Iš gautų sidabro nanodalelių išeišos rezultatų matyti, jog daugiausia AgND susidarė naudojant žiedų ekstraktą – 0,5:1 santykiu gauta 0,0542 g, o 2:1 santykiu gauta net 0,1834 g AgND. Naudojant lapų ekstraktą AgND išeiša kiek mažesnė – 0,5:1 santykiu gauta 0,0426 g, o 2:1 santykiu gauta 0,1724 g. Mažiausia AgND išeiša pasižymėjo stiebų ekstraktas – 0,5:1 santykiu gauta 0,299 g, o 2:1 santykiu gauta 0,0969 g. Atsižvelgiant į gautus rezultatus, tolimesniems sidabro nanodalelių tyrimams buvo pasirinkta naudoti žiedų ekstrakto ir AgNO<sub>3</sub> 2:1 santykiu sintetintas daleles.

Norint įvertinti įvairias susidariusių sidabro nanodalelių savybes buvo atlikta ultravioletinės – regimosios šviesos spinduliuotės analizė, Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija, rentgeno spindulių difrakcinė analizė, skenuojanti elektroninė mikroskopija, rentgeno spindulių energijos dispersinė spektroskopija bei transmisinė elektronų mikroskopijos analizė. Šiais metodais analizuojami tokie parametrai, kaip sidabro nanodalelių morfologija, kristalinė struktūra bei kristališkumas, nanodalelių dydis ir kt.

### 3.4.1. Ultravioletinės – Regimosios šviesos spinduliuotės analizė

Siekiant nustatyti sidabro nanodalelių susidarymą buvo atliekama ultravioletinės – regimosios šviesos spinduliuotės analizė. Kai metalo nanodalelės, pavyzdžiui, aukso ar sidabro, yra apšviečiamos, jų paviršiaus elektronai gali kolektyviai virpėti rezonansiniu dažniu, kuris priklauso nuo šviesos bangos ilgio. Plazmonų rezonansas ir sukelia stiprų šviesos sugėrimą ir išsklaidymą specifiniame bangos ilgyje, kuris stebimas UV-RŠ spektre. Šis efektas pasireiškia kaip ryškus, intensyvus pikas absorbcijos spektre.



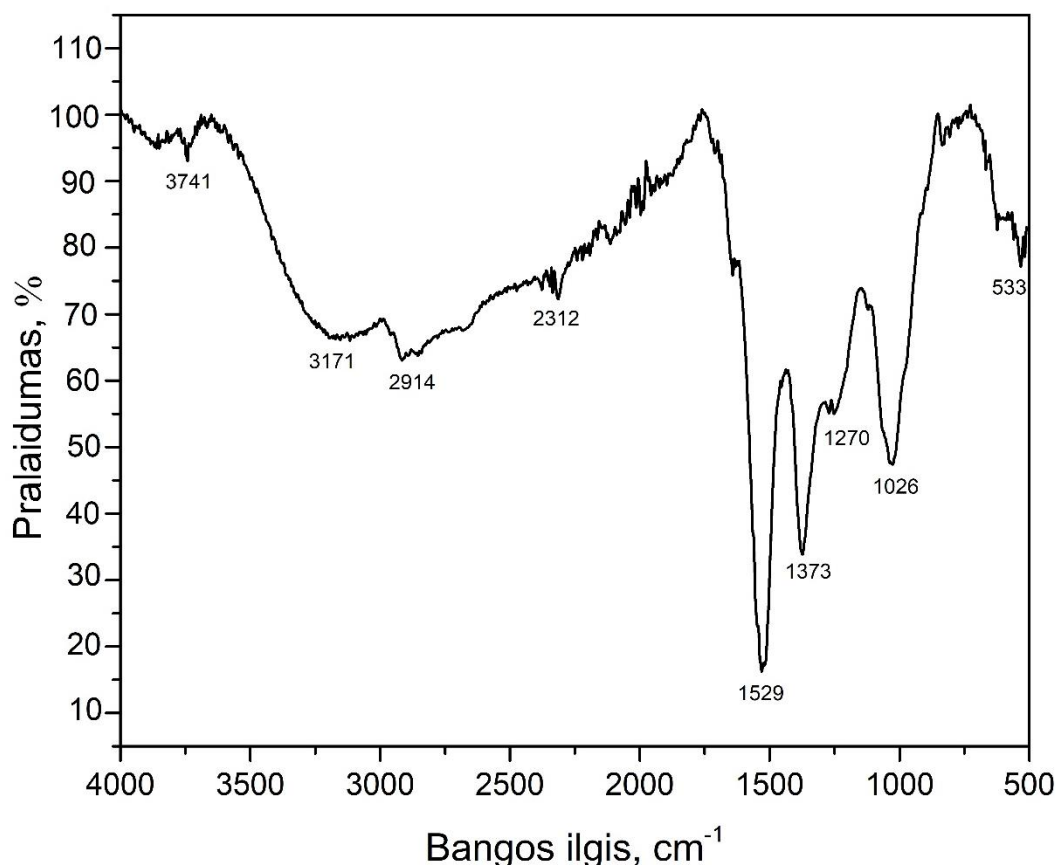
3.13 pav. Sidabro nanodalelių UV-RŠ absorbcijos spektras

Sidabro nanodalelių ultravioletinės spinduliuotės analizė buvo atlikta 400 – 700 nm ilgio bangų spektre. Gautame UV-RŠ spektre matome, jog charakteringos smailės pikas yra ties 463 nm bangos ilgiu, o plėtėjanti smailė nurodo, jog gautos nanodalelės yra polidispersinės (3.13 pav.). Remiantis literatūros duomenimis, žinoma, kad sidabro nanodaleles charakterizuojanti UV-RŠ spindulių sugertis yra 400 – 500 nm bangos ilgio diapazone [79], taigi gauti rezultatai patvirtina AgND susidarymą mėginiuose.

Galima teigti, jog susiformavo sferinės nanodalelės, kadangi UV-RŠ spektre stebimas vienas rezonanso pikas.

### 3.4.2. Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija

Siekiant ištirti susintetintų sidabro nanodalelių, naudojant gvaizdūnės žiedų ekstraktą, funkcines grupes buvo atlikta FT-IR analizė, kurios metu buvo matuojamas pralaidumas infraraudonojoje spektro srityje 4000 – 500  $\text{cm}^{-1}$  srityje.



3.14 pav. AgND, susidariusių naudojant gvaizdūnės žiedų ekstraktą, FT-IR spektrograma

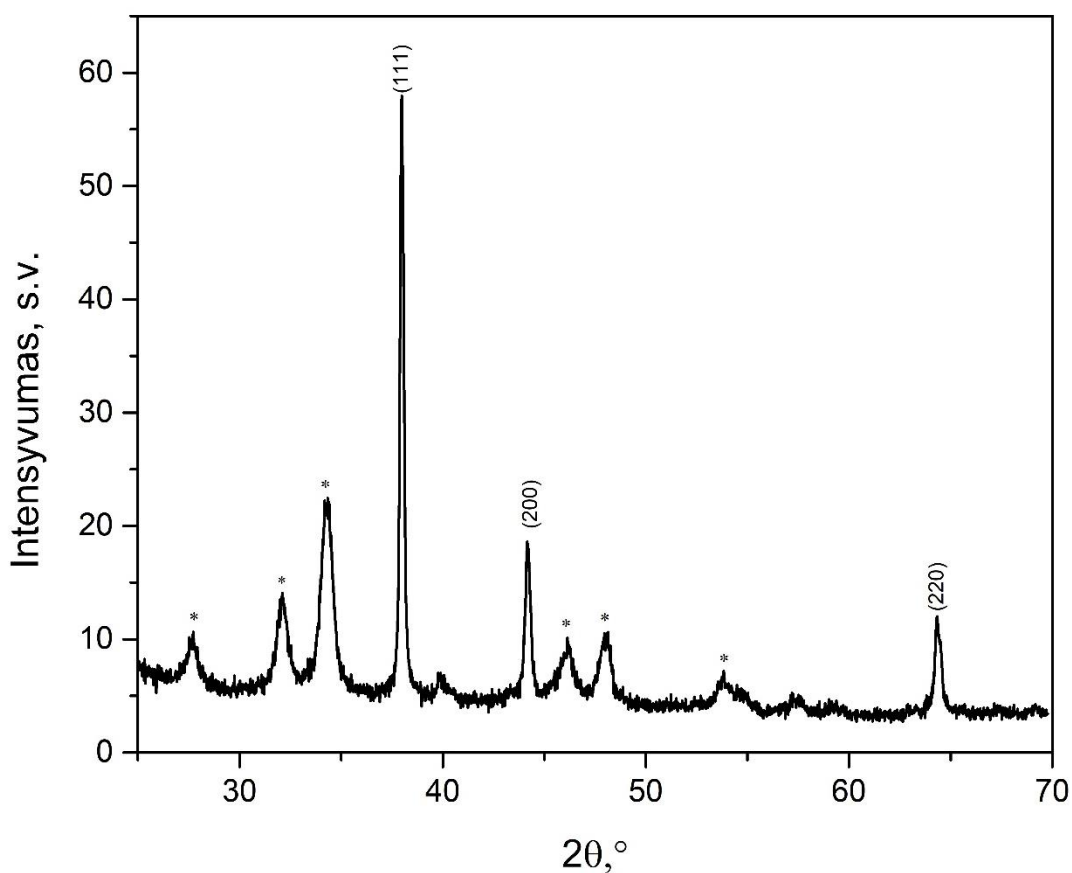
Gautame spektre matomos net kelios intensyvios smailės (žr. 3.14 pav.). Absorbcijos smailė, esanti ties 3171  $\text{cm}^{-1}$  atitinka hidroksi O–H grupės valentinius virpesius ir indikuoja fenolinės grupės buvimą augaliniame ekstrakte. Smailė, esanti ties 2914  $\text{cm}^{-1}$  bangos ilgiu priskiriama  $-\text{CH}_3$  ir  $-\text{CH}_2$  funkcinė grupių C–H valentiniams virpesiams. Tai rodo aromatinių junginių buvimą. Karboksirūgšties karbonilo  $-\text{C}=\text{O}$  grupė ir hidroksi  $-\text{O}-\text{H}$  grupė, esančios ties 1529  $\text{cm}^{-1}$  rodo šių funkcinė grupių buvimą augaliniame ekstrakte. Smailės esančios ties 1373  $\text{cm}^{-1}$  bei 1270  $\text{cm}^{-1}$  bangos ilgiais yra priskiriamos C–O viengubą ryšio funkcinėi grupei. 1026  $\text{cm}^{-1}$  bangos ilgyje esanti smailė yra priskiriama C–N grupės valentiniams virpesiams. Ši funkcinė grupė yra siejama su augalinės kilmės aminorūgštimis. Smailė esanti 533  $\text{cm}^{-1}$  bangos ilgyje indikuoja fenolinių junginių grupes. Atlikus FT-IR analizę, galima teigti, jog susidariusių AgND, naudojant gvaizdūnės žiedų ekstraktą, spektre dominuoja C–H, O–H bei  $-\text{C}=\text{O}$  grupės, pasižyminčios sunkiųjų metalų adsorbcija [80, 81].

### 3.4.3. Rentgeno spindulių difrakcinė analizė

Sidabro nanodalelių, susidariusių naudojant gvaizdūnės augalinius ekstraktus, fazinė sudėtis buvo nustatyta RSDA metodu, analizuojant difraktogramos sritį, kurios difrakcinis kampas  $2\theta = 30 - 70^\circ$ .

Naudojantis duomenų bazėje turimais duomenimis ir programine įranga, buvo atliekama smailių sutaptis su tarptautinio difrakcijos duomenų centro (JCPDC) bazės duomenimis.

Rentgeno spindulių difrakcijos rezultatai rodo, kad sidabro nanodalelės, susidariusios naudojant zinijos augalinius ekstraktus, yra polikristalinės. Difrakcinės smailės ties  $2\theta = 38,13^\circ$ ,  $44,33^\circ$  ir  $64,51^\circ$ , atitinkamai atitinkančios plokštumos Milerio indeksus (111), (200) ir (220) rodo kubinės struktūros sidabro fazę (JCPDC 4-0783) (žr. 3.15 pav.) [82]. Smailės, difraktogramoje esančios ties  $2\theta = 27,67^\circ$ ,  $32,14^\circ$ ,  $34,28^\circ$ ,  $46,17^\circ$ ,  $48,11^\circ$  ir  $53,83^\circ$  (paveiksle pažymėtos \*) yra susijusios su kristalinėmis ir amorfinėmis organinėmis fazėmis [82, 83, 84].



3.15 pav. AgND, gautų naudojant gvaizdūnės žiedų ekstraktą, difraktograma

AgND kristalitų dydžiai, tarplokštuminiai atstumai ir kristalinės gardelės parametrai, apskaičiuoti pagal 2.3.8 skyriuje aprašytą metodiką, pateikti 3.2 lentelėje.

3.2 lentelė. Ag ND kristalitų dydžiai, tarplokštuminiai atstumai ir kristalinės gardelės parametrai

Intensyviausios smailės difrakcijos laipsnis $2\theta$ (°)	FWHM $\beta_{hkl}$ (°)	Milerio indeksai ( $hkl$ )	Kristalitų skersmuo $D$ (nm)	Tarplokštuminis atstumas $d$ (nm)	Gardelės parametrai $a$ (nm)
--	------------------------	----------------------------	------------------------------	-----------------------------------	------------------------------



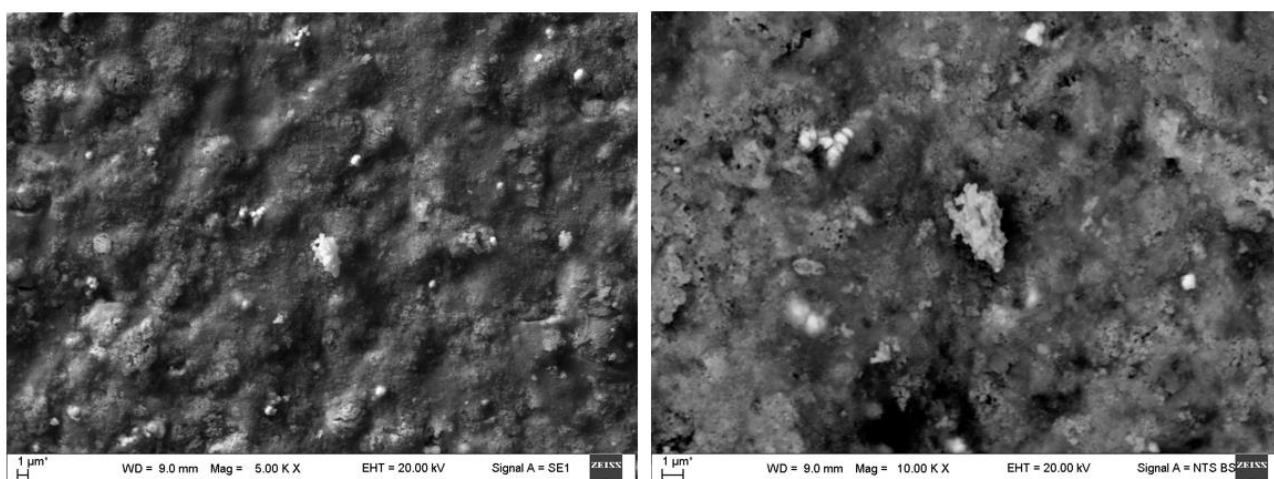
### 3.2 lentelės tęsinys

38,13	0,235	111	35,74	0,2358	0.4085
44,33	0,310	200	27,63	0,2042	0.4083
64,51	0,278	220	33,83	0,1443	0.4082
<i>Vidutinės reikšmės(nm)</i>			<i>32,40</i>	<i>0.1948</i>	<i>0.4084</i>

Iš lentelėje pateiktų rezultatų matome, jog vidutinis sidabro nanodalelių kristalitų dydis yra 32,4 nm, vidutinis gardelės parametras yra 0,4084 nm (žr. 3.2 lentelė). Gautieji gardelės parametrai yra labai panašūs į standartinius sidabro nanodalelių gardelės JCPDS 4-0783 ( $a = 0,4086$  nm) parametrus.

#### 3.4.4. Skenuojanti elektroninė mikroskopija

Nanodalelių dydis ir forma turi didelę įtaką dalelių fizikinėms, cheminėms savybėms bei pritaikymo galimybėms. Norint išanalizuoti susintetintų sidabro nanodalelių kristalų dydį bei vientisumą, buvo naudojama skenuojanti elektroninė mikroskopija. Gautose SEM nuotraukose matomas beveik vientisas netolygus paviršius, sudarytas iš smulkių, nevienodo dydžio kristalitų (žr. 3.16 pav.). Norint tiksliau nustatyti dalelių dydį ir formą buvo atlikta transmisinė elektronų mikroskopijos analizė (žr. 3.4.6 skyrių).



a)

b)

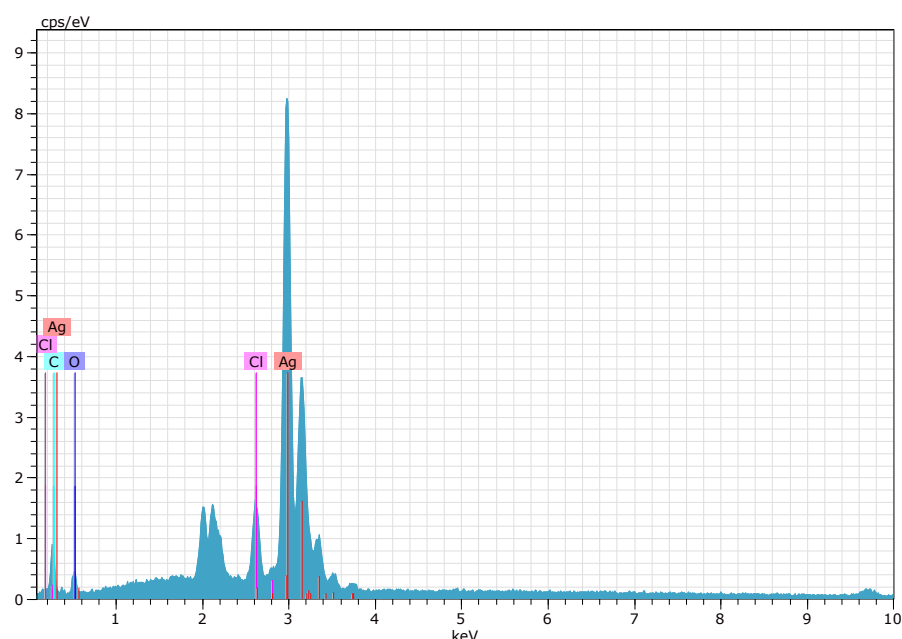
**3.16 pav.** AgND, susidariusių naudojant gvaizdūnės žiedų ekstraktą, SEM nuotraukos, esant skirtingiems didinimams: a) – x 5000, b) – x1000.

#### 3.4.5. Rentgeno spindulių energijos dispersinė spektroskopija

Siekiant įsitikinti, jog biosintezės metu susiformavo AgND, buvo atlikta kiekybinė elementinė dalelių analizė, taikant Rentgeno spindulių energijos dispersijos metodą. Šis tyrimas buvo atliekamas skenuojančiu elektroniniu mikroskopu su EDS detektoriumi (3.17 pav.) bei transmisiniu elektronų mikroskopu (3.18 pav). SEM analizės metu, naudojant ESPRIT programinę įrangą, buvo sudaroma diagrama, kurioje smailės atspindi tiriamo AgND mėginio elementinę sudėtį (žr. 3.17 pav., 3.3 lentelė). Elementinis sidabras, kurio smailės atitinka 0,3 keV bei 2,9 keV, įrodo sidabro nanodalelių



susiformavimą biosintezės metu [82]. Anglis bei deguonis EDS spektre aptinkamas dėl organinių junginių, esančių gvaizdūnės žiedų ekstrakte.

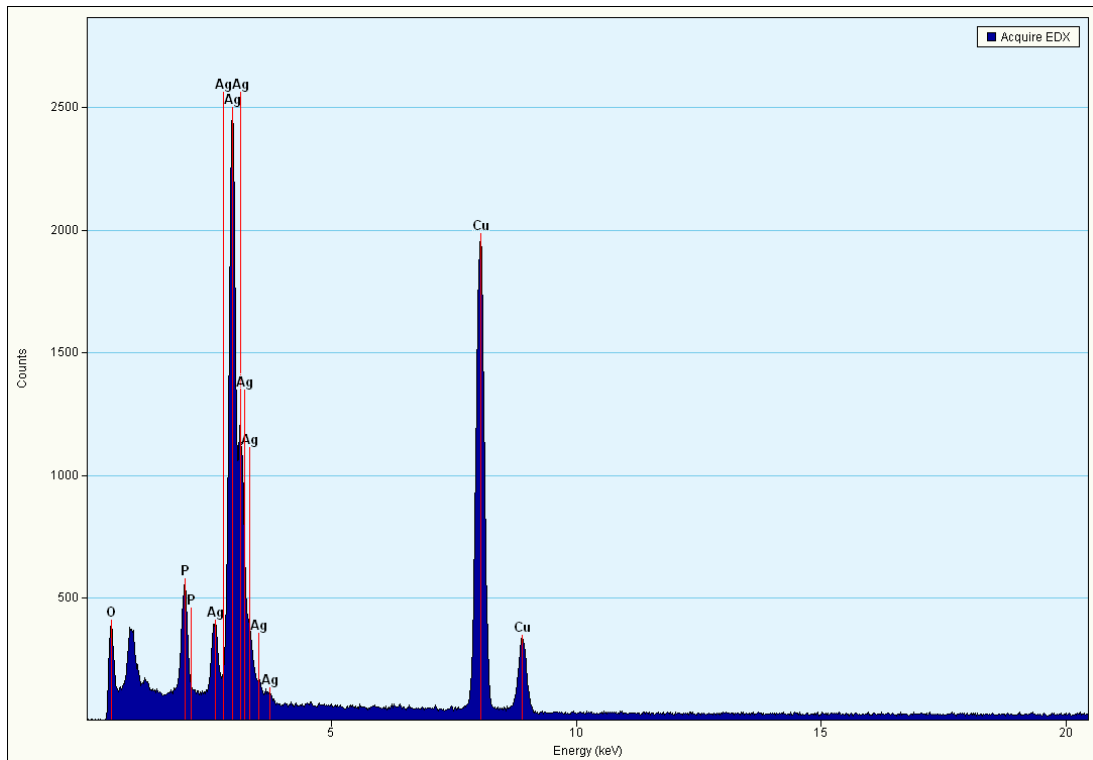


**3.17 pav.** AgND, susidariusių naudojant gvaizdūnės žiedų ekstraktą, EDS spektras (atliekant SEM analizę)

**3.3 lentelė.** EDS tyrimo cheminė elementų sudėtis

Cheminis elementas	Elementinė sudėtis atominiais procentais, at. %
Anglis	4,57
Deguonis	7,67
Chloras	3,02
Sidabras	84,74

Rentgeno spindulių energijos dispersijos tyrimas, atliktas transmisinės elektronų mikroskopijos analizės metu, tiriant sidabro nanodalelių mėginį, patvirtino, jog didžiąją dalį mėginio elementinės sudėties sudaro sidabras (žr. 3.18 pav.). Tai koreliuoja su SEM analizės rezultatais – patvirtina, kad biosintezės metu susidarė sidabro dalelės. Spektre matomos vario smailės tyrimo metu yra fiksuojamos nuo varinio tinklelio, laikančio tiriamąją medžiagą. Fosforo ir deguonies smailės indikuoja priemaišas, esančias mėginyje.

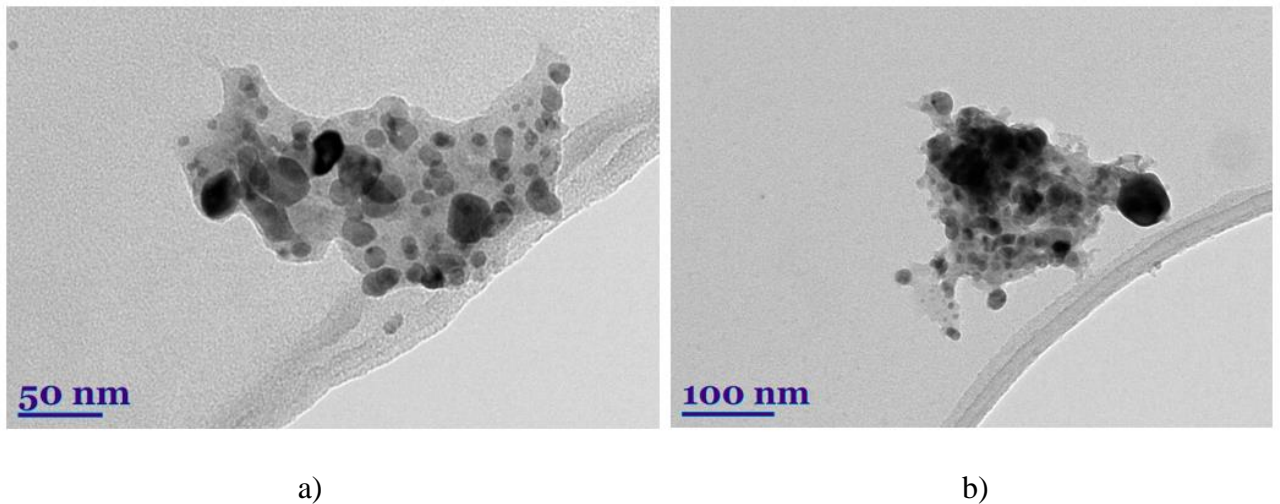


**3.18 pav.** AgND, susidariusių naudojant gvaizdūnės žiedų ekstraktą, EDS spektras (atliekant TEM analizę)

### 3.4.6. Transmisinė elektronų mikroskopijos analizė

Siekiant ištirti susidariusių sidabro nanodalelių dydį, formą bei pasiskirstymą buvo atlikta transmisinė elektronų mikroskopijos analizė. Tai vienas svarbiausių tyrimų, leidžiantis charakterizuoti nanodaleles bei nustatyti jų savybes ir pritaikomumą.

Iš gautų TEM analizės nuotraukų buvo nustatyta, jog susintetintų sidabro nanodalelių dydis yra nevienodas – svyruoja nuo 10 nm iki 50 nm (žr. 3.19 pav.). Dalelės pasiskirsčiusios nevienodai – kai kurios sukibusios su organinės kilmės priemaišomis. Kaip matome, TEM analizės rezultatai koreliavo su RSDA analizės rezultatais, kur buvo teigta, kad vidutinis sidabro nanodalelių kristalitų dydis yra 32,4 nm. Remiantis literatūros duomenimis, tokių diametrų ir sferinių formų nanodalelių paviršiaus plazmonas dažniausiai fiksuojamas ties 450 – 470 nm bangos ilgiu, tad šie rezultatai taip pat koreliuoja su UV-RŠ analizės rezultatais.



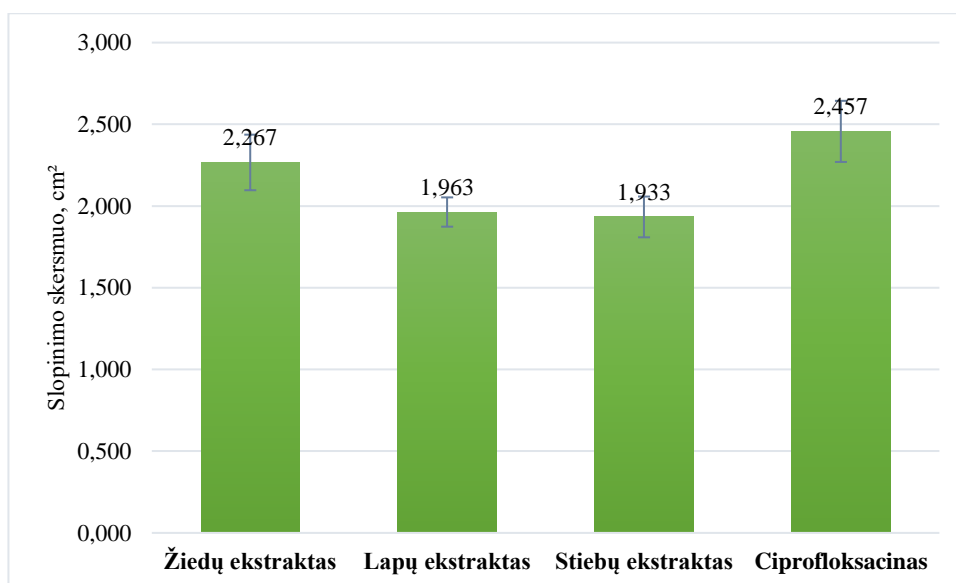
**3.19 pav.** AgND, susidariusių naudojant gvaizdūnės žiedų ekstraktą, TEM nuotraukos, esant skirtingiems didinimams: a) – 50 nm, b) – 100 nm

### 3.5. Sidabro nanodalelių antibakterinės savybės

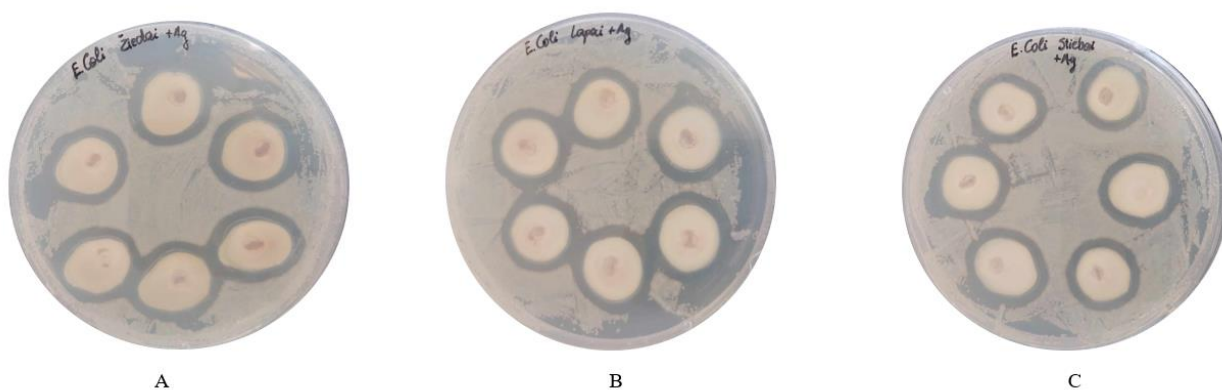
Siekiant įvertinti sidabro nanodalelių antibakterinį aktyvumą, buvo atliktas antibakterinių savybių tyrimas naudojant dvi skirtingas bakterijas – gramneigiamas *Escherichia coli* bei gramteigiamas *Bacillus subtilis*. Kontroliniam mėginiui buvo naudojamas antibiotikas – ciprofloksacinas.

#### 3.5.1. Sidabro nanodalelių antibakterinis aktyvumas naudojant gramneigiamas *Escherichia coli* bakterijas

Atlikus antibakterinio aktyvumo tyrimą, naudojant gvaizdūnės sidabro nanodalelių koloidinius tirpalus, nustatyta, jog didžiausiu antibakteriniu aktyvumu, prieš gramneigiamas *Escherichia coli* bakterijas, pasižymi žiedų AgND ekstraktas – slopinimo skersmuo lygus 2,267 cm (žr. 3.20, 3.21 pav.). Šiek tiek mažesniu antibakteriniu aktyvumu pasižymi gvaizdūnės lapų ir stiebų AgND ekstraktai. Šių ekstraktų slopinimo skersmenys atitinkamai lygūs 1,963 cm bei 1,933 cm. Lyginant gvaizdūnės žiedų AgND ekstrakto antibakterinį aktyvumą su antibiotiku ciprofloksicinu, dėl gautų panašių rezultatų, galima teigti, kad žiedų AgND ekstraktas pasižymi itin dideliu antibakteriniu aktyvumu prieš *Escherichia coli* bakterijas.



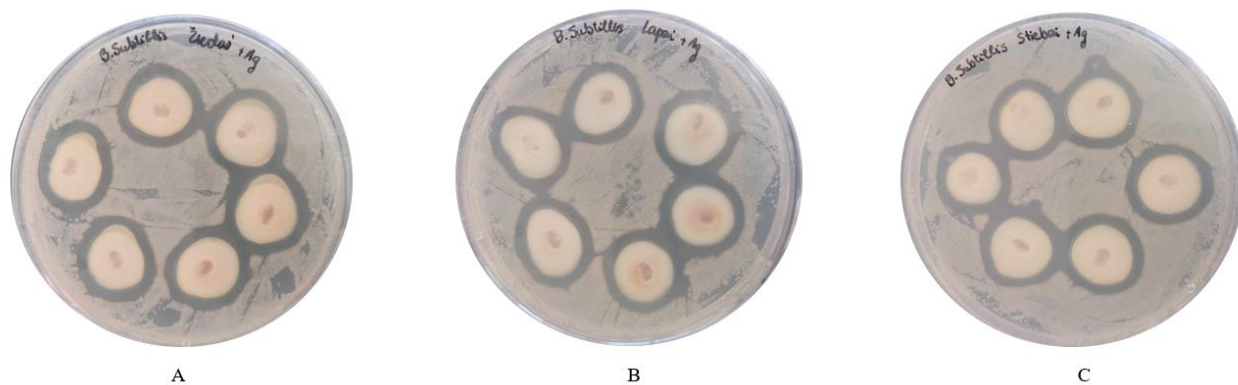
**3.20 pav.** Antibakterinės savybės naudojant *Escherichia coli* bakterijas, tiriant AgND koloidinius tirpalus



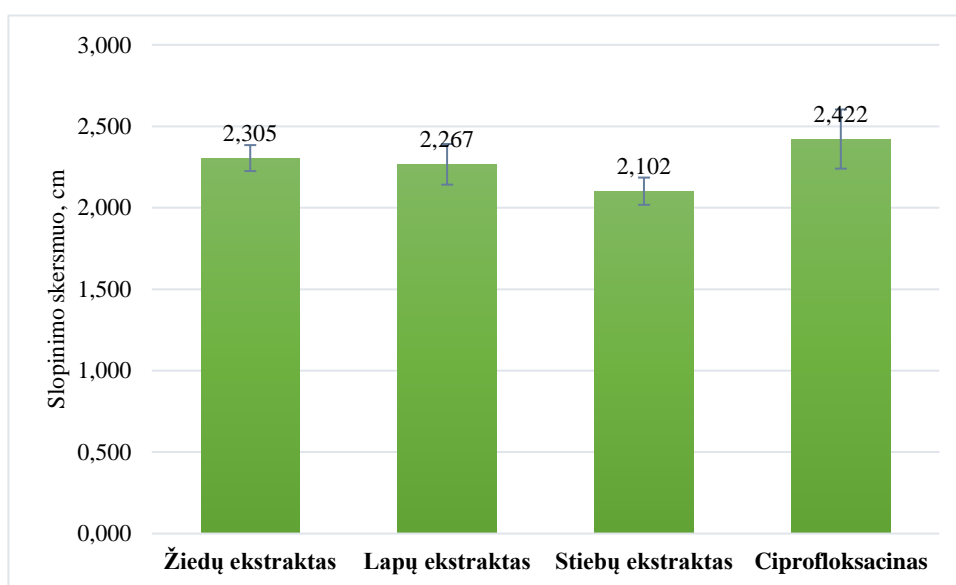
**3.21 pav.** Antibakterinis aktyvumo tyrimas, naudojant *Escherichia coli* bakterijas, tiriant koloidinius AgND tirpalus. Naudojami gvaizdūnės: A – žiedų, B – lapų, C – stiebų AgND koloidiniai tirpalai

### 3.5.2. Sidabro nanodalelių antibakterinis aktyvumas naudojant gramteigiamas *Bacillus subtilis* bakterijas

Atlikus antibakterinio aktyvumo tyrimą, naudojant gvaizdūnės sidabro nanodalelių koloidinius tirpalus, nustatyta, jog didžiausiu antibakteriniu aktyvumu, prieš gramteigiamas *Bacillus subtilis* bakterijas, pasižymi žiedų bei lapų AgND ekstraktai – slopinimo skersmuo atitinkamai lygūs 2,305 cm bei 2,267 cm (žr. 3.22, 3.23 pav.). Šiek tiek mažesniu antibakteriniu aktyvumu pasižymi gvaizdūnės stiebų AgND ekstraktas, kurio slopinimo skersmuo yra lygus 2,102 cm. Lyginant gvaizdūnės žiedų ir lapų AgND ekstraktų antibakterinį aktyvumą su antibiotiku ciprofloksicinu, dėl gautų panašių rezultatų, galima teigti, kad žiedų bei lapų AgND ekstraktai pasižymi itin dideliu antibakteriniu aktyvumu prieš *Bacillus subtilis* bakterijas.



**3.22 pav.** Antibakterinis aktyvumo tyrimas, naudojant *Bacillus subtilis* bakterijas, tiriant koloidinius AgND tirpalus. Naudojami gvaizdūnės: A – žiedų, B – lapų, C – stiebų AgND koloidiniai tirpalai

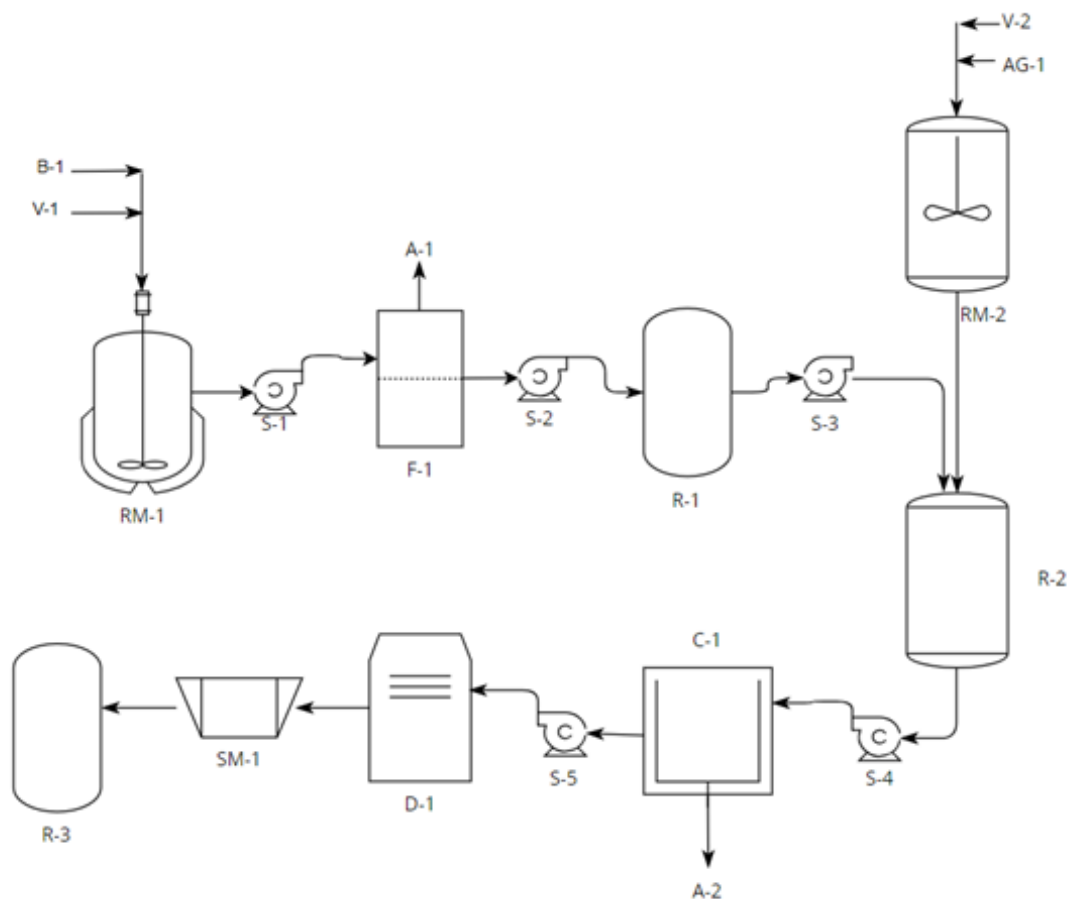


**3.23 pav.** Antibakterinės savybės naudojant *Bacillus subtilis* bakterijas, tiriant AgND koloidinius tirpalus

#### 4. Rekomendacijų dalis

Rekomenduojama sidabro nanodalelių biosintezę atlikti naudojant gvaizdūnės (lot. *Zinnia elegans*) žiedų ekstraktą, pagal pateiktą principinę aparatūrinę schemą 3.24 paveiksle.

Į pirmąjį aparatūrinės schemos rezervuarą su maišykle (RM-1) yra tiekiami biomasė (B-1), t.y. gvaizdūnės žiedai bei vandens (V-1) srautai. Šiame rezervuare yra atliekama augalinio ekstrakto gamyba 60 °C temperatūroje 40 min. Gautas augalinis ekstraktas išcentrinis siurbliu (S-1) yra tiekiamas į filtrą, kuriame yra atskiriamas augalinis ekstraktas nuo kietos augalinės medžiagos (A-1), kurios yra pašalinamos iš sistemos. Nufiltruotas augalinis ekstraktas išcentrinis siurbliu (S-2) yra tiekiamas į pirmąjį rezervuarą (R-1), kuriame yra kaupiamas tam tikras kiekis ekstrakto. Į antrąjį rezervuarą su maišykle (RM-2) yra tiekiamas vandens (V-2) ir sidabro nitrato (AG-1) srautas, kuriame yra gaminamas sidabro nitrato tirpalas. Į rezervuarą (R-2) išcentrinis siurbliu (S-3) yra tiekiamas ekstraktas iš pirmo rezervuaro bei sidabro nitrato tirpalas iš antro rezervuaro su maišykle. Rezervuare R-2 yra vykdoma sidabro nanodalelių biosintezė. Po 24 val. biosintezės, srautas iš antro rezervuaro išcentrinis siurbliu (S-4) yra tiekiamas į centrifugą (C-1). Centrifugoje yra atskiriamas ir iš sistemos pašalinamas ekstraktas (A-2), o nusėdusios sidabro nanodalelės išcentrinis siurbliu (S-5) yra tiekiamos į džiovinimo kamerą (D-1), vėliau į smulkintuvą (SM-1) bei trečiąjį rezervuarą (R-3), kuriame yra laikomos sidabro nanodalelės.



4.1 pav. Sidabro nanodalelių gamybos principinė aparatūrinė schema

**4.1 lentelė.** Principinėje aparatūrinėje schemoje pavaizduoti medžiagų žymėjimai ir jų pavadinimai

<b>Medžiagų žymėjimas</b>	<b>Medžiagos pavadinimas</b>
B-1	Biomasė
V-1, V-2	Vanduo
AG-1	Sidabro nitratas
A-1, A-2	Atliekos

**4.2 lentelė.** Principinėje aparatūrinėje schemoje pavaizduoti įrangos žymėjimai ir jų pavadinimai

<b>Įrangos žymėjimas</b>	<b>Įrangos pavadinimas</b>
RM-1, RM-2	Rezervuaras su maišykle
S-1, S-2, S-3, S-4, S-5	Išcentriniai siurbliai
F-1	Filtras
R-1, R-2, R-3	Rezervuarai
C-1	Centrifuga
D-1	Džiovinimo kamera
SM-1	Smulkintuvas

## Išvados

1. Darbo metu pagaminti vandeniniai gvaizdūnės žiedų, lapų bei stiebų ekstraktai.
2. Įvertinus gvaizdūnės žiedų, lapų bei stiebų antioksidacinį aktyvumą, nustatyta, kad didžiausiu antioksidaciniu (redukciniu) aktyvumu pasižymėjo gvaizdūnės žiedai. Įvertinus gvaizdūnės antibakterinį aktyvumą, nustatyta, kad didžiausias antibakterinis aktyvumas, naudojant *Escherichia coli* bakterijų kultūrą, pasireiškė naudojant stiebų ekstraktus. Didžiausias antibakterinis aktyvumas, naudojant *Bacillus subtilis* bakterijų kultūrą, pasireiškė naudojant gvaizdūnės lapų ir stiebų ekstraktus.
3. Biosintezės metodu, naudojant gvaizdūnės žiedų, lapų, stiebų ekstraktus bei  $\text{AgNO}_3$  tirpalą, susintetintos sidabro nanodalelės.
4. Susintetintų sidabro nanodalelių, naudojant gvaizdūnės žiedų ekstraktą, tyrimai:
  - a) Ultravioletinės – regimosios šviesos spinduliuotės analizės metu nustatyta, kad gaunamas smailės pikas, esantis 463 nm bangos ilgyje, patvirtina sidabro nanodalelių susidarymą mėginiuose. Galima teigti, jog susiformavo sferinės nano dalelės, kadangi ultravioletinės – regimosios šviesos spinduliuotės spektre stebimas vienas rezonanso pikas;
  - b) Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopijos tyrimo metu gautos smailės rodo, jog sidabro nanodalelių spektre dominuoja O–H, C–H, –C=O grupės, kurios pasižymi sunkiųjų metalų adsorbcija bei redukuoja  $\text{Ag}^+$  jonus iki metalinių  $\text{Ag}^0$  nanodalelių;
  - c) Atlikus rentgeno spindulių difrakcinę analizę, nustatyta, kad difrakcinės smailės ties  $2\theta = 38,14^\circ$ ,  $44,34^\circ$  ir  $64,66^\circ$  rodo kubinės struktūros sidabro fazę, o vidutinis kristalitų skersmuo lygus 32,4 nm;
  - d) Atlikus skenuojančios elektroninės mikroskopijos analizę, gautose nuotraukose matyti, jog susidaręs beveik vientisas netolygus paviršius, sudarytas iš smulkių, nevienodo dydžio kristalitų;
  - e) Atlikus transmisinę elektroninę mikroskopijos analizę nustatyta, jog susintetintų sidabro nanodalelių dydis yra nevienodas – svyruoja nuo 10 nm iki 50 nm, susidarė sferinės bei ovalios formos nanodalelės. Dalelės pasiskirsčiusios nevienodai – kai kurios sukibusios su organinės kilmės priemaišomis.
  - f) Rentgeno spindulių energijos dispersijos spektroskopijos analizė patvirtino, kad žaliosios biosintezės metu buvo susintetintos sidabro nanodalelės.
5. Įvertinus koloidinio sidabro nanodalelių antibakterinį poveikį *Escherichia coli* ir *Bacillus subtilis* bakterijų kolonijoms, buvo nustatyta, kad didžiausias antibakterinis aktyvumas naudojant *Escherichia coli* bakterijas pasireiškė gvaizdūnės žiedų ekstrakto sidabro nanodalelių koloidiniame tirpale, o naudojant *Bacillus subtilis* bakterijas – gvaizdūnės žiedų ir lapų ekstraktų sidabro nanodalelių koloidiniuose tirpaluose.



## Literatūros sąrašas

1. FIRDHOUSE J., LALITHA. P. Biosynthesis of Silver Nanoparticles and Its Applications. *Journal of Nanotechnology*. 2015, pp. 1-18 [žiūrėta 2023-02-24]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1155/2015/829526>
2. MOURDIKOU DIS S., PALLARES R., THANH N. Characterization Techniques for Nanoparticles: Comparison and Complementarity upon Studying Nanoparticle Properties. *Nanoscale*. 2018, **10**(27), 12871-12934 [žiūrėta 2023-02-24]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1039/C8NR02278J>
3. CAVALCANTI, É. B. V. S. ir kt. Chapter 7 - Flavonoids From Asteraceae as Multitarget Source of Compounds Against Protozoal Diseases. *Multi-Scale Approaches in Drug Discovery* [interaktyvus]. Elsevier, 2017 [žiūrėta 2023-03-23]. ISBN 9780081011294. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/>
4. MICHEL, J., RANI, A. ir HUSAIN K. A Review on the Potential Use of Medicinal Plants From Asteraceae and Lamiaceae Plant Family in Cardiovascular Diseases. *Front. Pharmacol.* 2022, vol. 11, pp. 852 [žiūrėta 2023-04-05]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00852>
5. EASMIN, F., FARIA, L. A., RANI, R., ir RAHMAN, A. M. Asteraceae: a taxonomically and medicinally important sunflower family. *American International Journal of Biology and Life Sciences* [interaktyvus]. 2021, **3**(1), 1–17 [žiūrėta 2023-04-05]. Prieiga per: <https://doi.org/10.46545/aijbls.v3i1.307>
6. SALEHI, Bahare ir kt. Tagetes spp. Essential Oils and Other Extracts: Chemical Characterization and Biological Activity. *Molecules* [interaktyvus]. Basel, 2018, **23**(11) [žiūrėta 2022-03-25]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/molecules23112847>
7. OZTURK, M., SAGDOLLINA, N., ir IBRAYEVA, M. Component composition and biological activity of essential oil of plant *Zinnia elegans*. *International Journal of Biology and Chemistry* [interaktyvus]. Scientific Journals, 2023, **16**(2), 90–96 [žiūrėta 2023-03-25]. Prieiga per: <https://doi.org/10.26577/IJBCh2023v16i2a9>
8. BURLEC, A. ir kt. Chemical Profile and Antioxidant Activity of *Zinnia elegans* Jacq. Fractions. *Molecules* [interaktyvus]. Basel, 2019, **24**(16), 2934 [žiūrėta 2023-03-25]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/molecules24162934>
9. ULFER, R., TÜRKÖĞLU, N., ir F. A. ÖZDEMİR. Micropropagation of *Zinnia elegans* L. *International Journal of Agriculture, Forestry and Life Sciences* [interaktyvus]. 2020, **4**(2), 161-166 [žiūrėta 2023-03-25]. Prieiga per: e-ISSN: 2602-4381
10. GOMAA, A., SAMY, M., YEHA, S., KAMEL, M. A comprehensive review of phytoconstituents and biological activities of genus *Zinnia*. *Journal of advanced Biomedical and Pharmaceutical Sciences* [interaktyvus]. 2018, 2, 29-37 [žiūrėta 2023-03-27]. Prieiga per: <https://doi.org/10.21608/jabps.2018.5599.1024>
11. PANDA, A. ir kt. Assessment of the phytoremediation potential of *Zinnia elegans* L. plant species for hexavalent chromium through pot experiment. *Environmental Technology & Innovation* [interaktyvus]. Elsevier, 2020, 20 [žiūrėta 2023-03-27]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101042>
12. YAN A, ir kt. Phytoremediation: A Promising Approach for Revegetation of Heavy Metal-Polluted Land. *Front. Plant Sci* [interaktyvus]. 2020, 11, 359 [žiūrėta 2023-03-26]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00359>

13. EHSAN, N. ir kt. Remediation of Heavy Metal-Contaminated Soil by Ornamental Plant *Zinnia* (*Zinnia elegance* L.). *Asian Journal of Chemistry* [interaktyvus]. 2016, **28**(6), 1338-1342 [žiūrėta 2023-03-26]. Prieiga per: <https://doi.org/10.14233/ajchem.2016.19701>
14. ULLAH, A. ir kt. Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. *Molecules* [interaktyvus]. Basel, 2020, **25**(22), 5243 [žiūrėta 2023-30-27]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/molecules25225243>
15. SAMY M. N. ir kt. Flavonoids of *Zinnia elegans*: Chemical profile and in vitro antioxidant and in silico anti-COVID-19 activities. *South African Journal of Botany* [interaktyvus]. 2022, 147, 576-585 [žiūrėta 2023-03-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.02.024>
16. TIMILSENA, Y. P., PHOSANAM, A., ir STOCKMANN, R. Perspectives on Saponins: Food Functionality and Applications. *International journal of molecular sciences* [interaktyvus]. 2023 **24**(17), 13538. <https://doi.org/10.3390/ijms241713538>
17. SHARMA, K. ir kt. Saponins: A concise review on food related aspects, applications and health implications. *Food Chemistry Advances* [interaktyvus]. Science direct, 2023, 2 [žiūrėta 2023-03-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100191>.
18. BARTNIK, M. ir P.C. FACEY. Chapter 8 – Glycosides. *Pharmacognosy* [interaktyvus]. Academic Press, 2017, 101-161 [žiūrėta 2023-03-29]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00008-1>
19. SOTO-BLANCO Benito. Chapter 12 - Herbal glycosides in healthcare. *Herbal Biomolecules in Healthcare Applications* [interaktyvus]. Academic Press, 2022, 239-282 [žiūrėta 2023-03-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85852-6.00021-4>
20. PANDEY, K. B., ir RIZVI, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity* [interaktyvus]. National Library of Medicine, 2009, **2**(5), 270–278 [žiūrėta 2023-03-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>
21. LERI M, ir kt. Healthy Effects of Plant Polyphenols: Molecular Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences* [interaktyvus]. MDPI, 2020, **21**(4), 1250 [žiūrėta 2023-03-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/ijms21041250>
22. KHAN, I., SAEED, K., KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry* [interaktyvus]. Elsevier, 2019, **12**(7), 908-931 [žiūrėta 2022-03-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
23. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *Nanotechnologies — Vocabulary — Part 6: Nano-object characterization (ISO/TS 80004-6)* [interaktyvus]. Prieiga per: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:ts:80004:-6:ed-2:v1:en:sec:3>
24. HAMIDA R.S., ir kt. Cyanobacteria – A Promising Platform in Green Nanotechnology: A Review on Nanoparticles Fabrication and Their Prospective Applications. *International Journal of Nanomedicine* [interaktyvus]. Dovepress, 2020, 15, 6033-6066 [žiūrėta 2023-03-29]. Prieiga per: <https://doi.org/10.2147/IJN.S256134>
25. GRIFFIN, S. ir kt. Natural Nanoparticles: A Particular Matter Inspired by Nature. *Antioxidants* [interaktyvus]. MDPI, 2017, **7**(1) [žiūrėta 2022-04-06]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/antiox7010003>
26. ALTAMMAR K.A (2023) A review on nanoparticles: characteristics, synthesis, applications, and challenges. *Front. Microbiol* [interaktyvus]. Frontiers, 2023, 14 [žiūrėta 2023-04-02]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1155622>

27. GORRASI, G. ir SORRENTINO, A. Mechanical milling as a technology to produce structural and functional bio-nanocomposites. *Green Chemistry* [interaktyvus]. The Royal Society of Chemistry, 2015, 17, 2610-2625 [žiūrėta 2023-04-02]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1039/C5GC00029G>
28. OSTERMANN, R., ir kt. Metal–organic framework nanofibers viaelectrospinning. *Chemical Communications* [interaktyvus]. The Royal Society of Chemistry, 2011, 47, 442-444 [žiūrėta 2023-04-02]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1039/C0CC02271C>
29. AMENDOLA, V., ir MENEGHETTI, M. Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles. *Physical chemistry chemical physics* [interaktyvus]. Pubmed, 2009, 11(20), 3805–3821 [žiūrėta 2023-04-04]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1039/b900654k>
30. JOH, D. W., JUNG, T. K., LEE, H. S., ir KIM, D. H. Synthesis of nanoparticles using electrical explosion of Ni wire in Pt solution. *Journal of nanoscience and nanotechnology* [interaktyvus]. American Scientific Publishers, 2013, 13(9), 6092–6094 [žiūrėta 2023-04-04]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1166/jnn.2013.7677>
31. ZHENG, Z., ir kt. Sonication-assisted synthesis of polyelectrolyte-coated curcumin nanoparticles. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* [interaktyvus]. American Chemical Society, 2010, 26(11), 7679–7681 [žiūrėta 2023-04-08]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/la101246a>
32. BAIG, N., KAMMAKAKAM, I., ir FALATH, W. Nanomaterials: a review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Materials Advances* [interaktyvus]. RSC, 2021, 2, 1821-1871 [žiūrėta 2023-04-08]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1039/D0MA00807A>
33. CARLSSON, J. O., MARTIN, P. M. Chapter 7 - Chemical Vapor Deposition, *Handbook of Deposition Technologies for Films and Coatings (Third Edition)* [interaktyvus]. William Andrew Publishing, 2010, 314-363 [žiūrėta 2023-04-09]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/B978-0-8155-2031-3.00007-7>
34. DAS, S., ir SRIVASATAVA, V. C. Synthesis and Characterization of ZnO–MgO Nanocomposite by Co-precipitation Method. *Smart Science* [interaktyvus]. Taylor & Francis, 2016, 4(4), 190–195 [žiūrėta 2023-04-15]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1080/23080477.2016.1260425>
35. KIM, K., ir kt. Hydrothermal synthesis of metal nanoparticles using glycerol as a reducing agent. *The Journal of Supercritical Fluids* [interaktyvus]. Elsevier, 2014, 90, 53-59 [žiūrėta 2023-04-16]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.02.022>
36. TIJERINA, E. P. Highly size-controlled synthesis of Au/Pd nanoparticles by inert-gas condensation. *Faraday Discussion* [interaktyvus]. The Royal Society of Chemistry, 2008, 138, 353-36 [žiūrėta 2023-04-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1039/B705913M>
37. GRACIA-PINILLA, M., MARTÍNEZ, E., VIDAURRI, G.S. Deposition of Size-Selected Cu Nanoparticles by Inert Gas Condensation. *Nanoscale Research Letters* [interaktyvus]. Nano express, 2010, 5 [žiūrėta 2023-04-29]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s11671-009-9462-z>
38. BANERJEE, A., KRISHNA, R. ir DAS, B. Size controlled deposition of Cu and Si nano-clusters by an ultra-high vacuum sputtering gas aggregation technique. *Applied Physics A* [interaktyvus]. Springer Link, 2008, 90, 299–303 [žiūrėta 2023-04-29]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s00339-007-4271-7>
39. PATIL, N., ir kt. Overview on methods of synthesis of nanoparticles. *International Journal of Current Pharmaceutical Research* [interaktyvus]. Innovare Academic Sciences, 2021, 13(2), 11-16 [žiūrėta 2023-04-29]. Prieiga per: <https://doi.org/10.22159/ijcpr.2021v13i2.41556>

40. KUMARI, S. C., DHAND, V., PADMA, P. N. Chapter 11 - Green synthesis of metallic nanoparticles: a review. *Nanomaterials* [interaktyvus]. Academic Press, 2021, 259-281 [žiūrėta 2023-05-03]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822401-4.00022-2>
41. MALHOTRA, S. P. K., ALGHUTHAYMI, M. A. Chapter 6 - Biomolecule-assisted biogenic synthesis of metallic nanoparticles. *Agri-Waste and Microbes for Production of Sustainable Nanomaterials* [interaktyvus]. Elsevier, 2022, 139-163 [žiūrėta 2023-05-06]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823575-1.00011-1>.
42. PANTIDOS, N. ir kt. Biological Synthesis of Metallic Nanoparticles by Bacteria, Fungi and Plants. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology* [interaktyvus]. J Nanomed Nanotechnol, 2014, **5**(5) [žiūrėta 2023-05-12]. Prieiga per: <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000233>
43. SHAH, M. ir kt. Green Synthesis of Metallic Nanoparticles via Biological Entities. *Materials* [interaktyvus]. MDPI, 2015, **8**(11), 7278-7308 [žiūrėta 2023-05-13]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/ma8115377>
44. IRAVANI Siavash. Bacteria in Nanoparticle Synthesis: Current Status and Future Prospects. *International Scholarly Research Notices* [interaktyvus]. Hindawi, 2014 [žiūrėta 2023-05-25]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1155/2014/359316>
45. PANTIDOS, N., ir HORSFALL, L. Biological Synthesis of Metallic Nanoparticles by Bacteria, Fungi and Plants. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology* [interaktyvus]. J Nanomed Nanotechno, 2014, **5**(5) [žiūrėta 2024-02-06]. Prieiga per: <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000233>
46. SLAVIN, Y.N., ASNIS, J., HÄFELI, U.O. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *Journal of Nanobiotechnology* [interaktyvus]. BMC, 2017, 15 [žiūrėta 2024-02-06]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0308-z>
47. MITTAL, A. K., CHISTI, Y., BANERJEE, U. C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances* [interaktyvus]. Elsevier, 2013, **31**(2), 346-356 [žiūrėta 2024-02-09]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.003>
48. JADOUN, S., ARIF, R., JANGID, N.K. Green synthesis of nanoparticles using plant extracts: a review. *Environ Chem Lett* [interaktyvus]. Springer Link, 2021, 19, 355–374 [žiūrėta 2024-02-09]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01074-x>
49. SHAH, M., FAWCETT, D., SHARMA, S., TRIPATHY, S. K., POINERN, G. E. J. Green Synthesis of Metallic Nanoparticles via Biological Entities. *Materials* [interaktyvus]. 2015, **8**(11), 7278-7308 [žiūrėta 2024-02-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/ma8115377>
50. SATHISHKUMAR, M., SNEHA, K., ir YUN, Y. S. Immobilization of silver nanoparticles synthesized using Curcuma longa tuber powder and extract on cotton cloth for bactericidal activity. *Bioresource technology* [interaktyvus]. Elsevier, 2010, **101**(20), 7958–7965 [žiūrėta 2024-02-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.051>
51. DUBEY, S. P., LAHTINEN, M., SILLANPÄÄ, M. Tansy fruit mediated greener synthesis of silver and gold nanoparticles. *Process Biochemistry* [interaktyvus]. Elsevier, 2010, 45(7), 1065-1071 [žiūrėta 2024-02-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.03.024>
52. HUANG, J. Ir kt. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. *Nanotechnology* [interaktyvus]. IOP Publishing Ltd, 2007, 18 [žiūrėta 2024-02-11]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/10/105104>
53. DWIVEDI, A. D., GOPAL, K. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Chenopodium album* leaf extract. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*

- [interaktyvus]. Elsevier, 2010, **369**(1-3), 27-33 [žiūrėta 2024-02-11]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.07.020>
54. PRATHNA, T.C., CHANDRASEKARAN, N., RAICHUR, A. M., MUKHERJEE, A. Kinetic evolution studies of silver nanoparticles in a bio-based green synthesis process. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [interaktyvus]. Elsevier, 2011, 377(1-3), 212-216 [žiūrėta 2024-02-13]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.12.047>.
55. SATHISHKUMAR, M., SNEHA, K., ir YUN, Y. S. Immobilization of silver nanoparticles synthesized using Curcuma longa tuber powder and extract on cotton cloth for bactericidal activity. *Bioresource technology* [interaktyvus]. Elsevier, 2010, **101**(20), 7958–7965 [žiūrėta 2024-02-18]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.051>
56. SONG, J. Y., JANG, H. K., KIM, B. S. Biological synthesis of gold nanoparticles using *Magnolia kobus* and *Diopyros kaki* leaf extracts. *Process Biochemistry* [interaktyvus]. Elsevier, 2009, **44**(10), 1133-1138 [žiūrėta 2024-02-19]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.06.005>.
57. MOURDIKOU DIS, S., PALLARES, R. M., THANH, T. K. Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale* [interaktyvus]. Royal Society of Chemistry, 2018, 10, 12871-12934 [žiūrėta 2024-02-19]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1039/C8NR02278J>
58. KHAN, I., ALI, S., MANSHA, M., QURASHI, A. Sonochemical assisted hydrothermal synthesis of pseudo-flower shaped Bismuth vanadate (BiVO<sub>4</sub>) and their solar-driven water splitting application. *Ultrasonics Sonochemistry* [interaktyvus]. Elsevier, 2017, 36, 386-392 [žiūrėta 2024-02-20]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.12.014>
59. SHOJAEI, T. R., SOLTANI, S., DERAKHSHANI, M. Chapter 6 - Synthesis, properties, and biomedical applications of inorganic bionanomaterials. *In Micro and Nano Technologies: Fundamentals of Bionanomaterials* [interaktyvus]. Elsevier, 2022, 139-174 [žiūrėta 2024-02-20]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824147-9.00006-6>
60. DAS, G., PATRA, J. K., PARAMITHIOTIS, S., ir SHIN, H. S. The Sustainability Challenge of Food and Environmental Nanotechnology: Current Status and Imminent Perceptions. *International journal of environmental research and public health* [interaktyvus]. MDPI, 2019 **16**(23) [žiūrėta 2024-02-20]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/ijerph16234848>
61. YADAV, R., DWIVEDI, S., KUMAR, S. Trends and Perspectives of Biosensors for Food and Environmental Virology. *Food Environ Virol* [interaktyvus]. Springer, 2010, 2, 53–63 [žiūrėta 2024-02-21]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s12560-010-9034-5>
62. SUN, T., ir kt. Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* [interaktyvus]. Wiley, 2014, **53**(46), 12320–12364 [žiūrėta 2024-02-22]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1002/anie.201403036>
63. ABDULLE, A., ir CHOW, J. C. L. Contrast Enhancement for Portal Imaging in Nanoparticle-Enhanced Radiotherapy: A Monte Carlo Phantom Evaluation Using Flattening-Filter-Free Photon Beams. *Nanomaterials* [interaktyvus]. Basel, 2019, **9**(7), 920 [žiūrėta 2024-02-22]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/nano9070920>
64. HOSEINZADEH, E. ir kt. A Review on Nano-Antimicrobials: Metal Nanoparticles, Methods and Mechanisms. *Current drug metabolism* [interaktyvus]. Bentham Science, 2017, **18**(2), 120–128 [žiūrėta 2024-02-22]. Prieiga per: <https://doi.org/10.2174/1389200217666161201111146>

65. JASKULSKI, D. ir kt. Silver Nanoparticles (AgNPs) in Urea Solution in Laboratory Tests and Field Experiments with Crops and Vegetables. *Materials* [interaktyvus]. Basel, 2022, **15**(3), 870 [žiūrėta 2024-03-01]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/ma15030870>
66. KAPINDER, DANGI, K., VERMA, A. K. Efficient & eco-friendly smart nano-pesticides: Emerging prospects for agriculture. *Materials Today: Proceedings* [interaktyvus]. Elsevier, 2021, 45(3), 3819-3824 [žiūrėta 2024-03-06]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.03.211>
67. MANUEL A. ir kt. Luminescent Nanomaterials for Energy-Efficient Display and Healthcare. *ACS Energy Letters* [interaktyvus]. American Chemical Society, 2022, **7**(3), 1001-1020 [žiūrėta 2024-03-07]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/acsenerylett.1c02745>
68. Nanomaterials Market Size, Growth, Trends, Report 2023-2032. *Precedence Research* [interaktyvus]. 2022 [žiūrėta 2024-03-09]. Prieiga per: <https://www.precedenceresearch.com/nanomaterials-market>
69. AHMAD, B. ir kt. Phyto-fabrication, purification, characterisation, optimisation, and biological competence of nano-silver. *IET Nanobiotechnology* [interaktyvus]. The Institution of Engineering and Technology, 2021, **15**(1), 1-18 [žiūrėta 2024-03-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1049/nbt2.12007>
70. CHERNOUSOVA, S., ir EPPLÉ, M. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* [interaktyvus]. Wiley, 2013, **52**(6), 1636–1653 [žiūrėta 2024-03-15]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1002/anie.201205923>
71. TAKÁČ P. ir kt. The Role of Silver Nanoparticles in the Diagnosis and Treatment of Cancer: Are There Any Perspectives for the Future? *Life* [interaktyvus]. MDPI, 2023, **13**(2), 466 [žiūrėta 2024-04-02]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/life13020466>
72. ZHANG, X. F., LIU, Z. G., SHEN, W., ir GURUNATHAN, S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *International journal of molecular sciences* [interaktyvus]. MDPI, 2016, **17**(9), 1534 [žiūrėta 2024-04-02]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/ijms17091534>
73. KHAN, S., ZAHOR, M., SHER, R., IKRAM, M., ir ISLAM, N. U. The impact of silver nanoparticles on the growth of plants: The agriculture applications. *Heliyon* [interaktyvus]. 2023, **9**(6) [žiūrėta 2024-04-05]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16928>
74. JONUŠKIENĖ I, STANKEVIČIENĖ R, KANTMINIENĖ K, TUMOSIENĖ I. The Influence of Phytohormones on Antioxidative and Antibacterial Activities in Callus Cultures of *Hypericum perforatum* L. *Agriculture*. 2023, **13**(8), 1543 [žiūrėta 2024-04-19]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/agriculture13081543>
75. PUIŠO J, PAŠKEVIČIUS A, ŽVIRGŽDAS J, DIMITROVA TL, LITVAKAS A, ADLIENE D. Application of Red Onion Peel Extract for Green Synthesis of Silver Nanoparticles in Hydrogels Exhibiting Antimicrobial Properties. *Gels*. 2023, **9**(6), 498 [žiūrėta 2024-04-19]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/gels9060498>
76. AGUSTINA, T., HANDAYANI, W., IMAWAN, C. The UV-VIS Spectrum Analysis From Silver Nanoparticles Synthesized Using Diospyros maritima Blume. Leaves Extract. *Proceedings of the 3rd KOBICONGRESS, International and National Conferences (KOBICINC 2020)* [interaktyvus]. Atlantis press, 2021 [žiūrėta 2024-04-20]. Prieiga per: <https://doi.org/10.2991/absr.k.210621.070>
77. KAINZ, M. ir kt. An automated indexing software for grazing-incidence x-ray diffraction data. *Journal of applied crystallography* [interaktyvus]. 2021, **54**(4), 1256–1267 [žiūrėta 2024-04-21]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1107/S1600576721006609>

78. TYAGI, P. K. ir kt. Ascorbic Acid and Polyphenols Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles from *Tagetes erecta* L. Aqueous Leaf Extract and Studied Their Antioxidant Properties. *Journal of Nanomaterials* [interaktyvus]. 2021, vol. 2021 [žiūrėta 2024-04-15]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1155/2021/6515419>
79. ASHRAF, J. M., ANSARI, M. A., KHAN, H. M., ALZOHAIRY, M. A., ir CHOI, I. Green synthesis of silver nanoparticles and characterization of their inhibitory effects on AGEs formation using biophysical techniques. *Scientific reports* [interaktyvus]. 2016, 6 [žiūrėta 2024-04-23]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/srep20414>
80. AMALADHAS, T. P. ir kt. Biogenic synthesis of silver nanoparticles by leaf extract of *Cassia angustifolia*. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* [interaktyvus]. Vietnam Academy of Science & Technology, 2012, 3 [žiūrėta 2024-04-23]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1088/2043-6262/3/4/045006>
81. VIJAYAKUMAR, S., MALAIKOZHUNDAN, B., PARTHASARATHY, A. Nano Biomedical Potential of Biopolymer Chitosan-Capped Silver Nanoparticles with Special Reference to Antibacterial, Antibiofilm, Anticoagulant and Wound Dressing Material. *J Clust Sci* [interaktyvus]. Springer, 2020, 31, 355–366 [žiūrėta 2024-24]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s10876-019-01649-x>
82. KATTA, V. K. M., R.S. DUBEY. Green synthesis of silver nanoparticles using *Tagetes erecta* plant and investigation of their structural, optical, chemical and morphological properties. *Materials Today: Proceedings* [interaktyvus]. 2021, 45(2), 794-798 [žiūrėta 2024-04-26]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.02.809>
83. AWWAD, A. M. ir N. M. SALEM. Green Synthesis of Silver Nanoparticles by Mulberry Leaves Extract. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* [interaktyvus]. 2012, 2(4), 125-128 [žiūrėta 2024-04-26]. Prieiga per: <https://doi.org/10.5923/j.nn.20120204.06>
84. THUY, N. T. T. ir kt. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Plectranthus Amboinicus* Leaf Extract for Preparation of CMC/PVA Nanocomposite Film. *Journal of Renewable Materials* [interaktyvus]. Tech Science Press, 2021, 9(8), 1393-1411 [žiūrėta 2024-04-27]. Prieiga per: <https://doi.org/10.32604/jrm.2021.015772>