

Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych
Uniwersytetu Łódzkiego

Katarzyna Bednarczyk

Badanie przemian kwasu taninowego w koloidach nanocząstek srebra

Investigation of tannic acid transformations
in silver nanoparticle colloids

Praca doktorska wykonana
pod kierunkiem promotora
dr hab. Katarzyny Ranošek-Soliwody, prof. UŁ
w Katedrze Technologii i Chemii Materiałów
Wydziału Chemii, Uniwersytetu Łódzkiego

Podziękowania

*Z wyrazami wdzięczności dziękuję Pani dr hab. Katarzynie Ranoszek-Soliwodzie, prof. UŁ,
za merytoryczne wsparcie, cierpliwe przewodnictwo, życzliwość i motywację,
które towarzyszyły mi na każdym etapie realizacji niniejszej pracy.*

*Szczególne podziękowania kieruję do mojej rodziny,
za nieustanne wsparcie, wiarę w moje możliwości i siłę,
dzięki którym mogłam wytrwale dążyć do celu.*

*Dziękuję także przyjaciołom, współpracownikom oraz wszystkim bliskim mi osobom,
którzy swoją obecnością, dobrym słowem i pomocą
dodawali mi odwagi i inspirowali do dalszej pracy.*

Sobie – z wdzięcznością i szacunkiem za każdy krok, który doprowadził mnie do tego miejsca.

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	7
STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM	9
ABSTRACT	10
1. Nanocząstki funkcjonalne	11
1.1. Nanocząstki metaliczne	11
1.2. Wpływ ligandów na powierzchni nanocząstek metalicznych na właściwości biomedyczne nanocząstek funkcjonalnych	15
1.3. Wykorzystanie nanocząstek funkcjonalnych w aplikacjach biomedycznych	21
2. Polifenole jako ligandy funkcyjne nanocząstek metalicznych	27
2.1. Podział polifenoli i ich właściwości	27
2.2. Wykorzystanie polifenoli w aplikacjach biomedycznych	29
2.3. Koniugaty nanocząstek srebra i polifenoli	31
3. Metody charakterystyki nanocząstek funkcjonalnych	39
4. Uzasadnienie podjęcia tematyki badawczej.....	47
Cel, teza oraz zakres pracy badawczej.....	49
5. Materiały i metody	51
5.1. Spis odczynników i materiałów	51
5.2. Nanocząstki srebra otrzymane metodą redukcji chemicznej jako przedmiot badań	52
5.3. Metody charakterystyki wykorzystane w pracy	54
6. Dobór warunków chromatograficznych do analizy przemian kwasu taninowego	59
7. Optymalizacja metody Folina-Ciocalteu do oznaczania całkowitego stężenia wolnych grup hydroksylowych w koloidzie nanocząstek srebra	66
8. Badanie przemian kwasu taninowego w koloidzie nanocząstek srebra	73
8.1. Charakterystyka kwasu taninowego	73
8.2. Charakterystyka kompleksu kwasu taninowego z cytrynianem sodu	80
8.3. Charakterystyka układu koloidalnego nanocząstek srebra	86
8.3.1. Charakterystyka nanocząstek srebra w czasie (t_0)	87
8.3.2. Stabilność nanocząstek srebra w czasie kondycjonowania (t_0 - t_{180})	89
8.3.3. Monitorowanie przemian kwasu taninowego techniką FT-IR oraz oznaczenie całkowitej zawartości polifenoli metodą Folina–Ciocalteu w układzie koloidalnym.....	90
8.3.4. Analiza składu układu koloidalnego metodą TLC i LC-MS	92
8.3.5. Analiza wytrąconych kryształów w układzie koloidalnym TA-AgNPs	95

9. Aktywność biologiczna nanocząstek funkcjonalnych w postaci nanocząstek srebra.....	99
10.Podsumowanie i wnioski	104
Wykaz dorobku naukowego	106
Literatura	111

WYKAZ SKRÓTÓW

AgNPs – nanocząstki srebra (ang. *silver nanoparticles*)

ATR – spektroskopia w podczerwieni z przystawką do całkowitego wewnętrznego odbicia (ang. *Attenuated Total Reflectance*)

AuNPs – nanocząstki złota (ang. *gold nanoparticles*)

CA – kwas cytrynowy (ang. *citric acid*)

Cryo-TEM – mikroskopia kriogeniczna transmisyjna (ang. *Cryo-Transmission Electron Microscopy*)

DLS – metoda dynamicznego rozpraszania światła (ang. *Dynamic Light Scattering*)

EA – kwas elagowy (ang. *ellagic acid*)

FC – metoda kolorymetryczna Folina–Ciocâlțu (ang. *Folin–Ciocâlțu method*)

FT-IR – spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ang. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

GA – kwas galusowy (ang. *gallic acid*)

HSV – wirus opryszczki (ang. *herpes simplex virus*)

HSV-1 – wirus opryszczki pospolitej typu 1 (ang. *herpes simplex virus type 1*)

HSV-2 – wirus opryszczki pospolitej typu 2 (ang. *herpes simplex virus type 2*)

LC-MS – chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (ang. *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*)

MCT – detektor z tellurku rtęciowo–kadmowego (ang. *Mercury Cadmium Telluride detector*)

NPs – nanocząstki (ang. *nanoparticles*)

PGG – 1,2,3,4,6-penta-O-galloilo-β-D-glukoza (ang. *pentagalloyl glucose*)

PGG+CA – mieszanina PGG z kwasem cytrynowym (ang. *PGG with citric acid*)

PtNPs – nanocząstki platyny (ang. *platinum nanoparticles*)

PdNPs – nanocząstki palladu (ang. *palladium nanoparticles*)

SC – cytrynian sodu (ang. *sodium citrate*)

SEM – skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. *Scanning Electron Microscopy*)

TA – kwas taninowy (ang. *tannic acid*)

TA–AgNPs – nanocząstki srebra modyfikowane kwasem taninowym (ang. *tannic acid–silver nanoparticles*)

TA–SC – kompleks kwasu taninowego i cytrynianu sodu (ang. *tannic acid–sodium citrate complex*)

ΔTA–SC – mieszanina kwasu taninowego z cytrynianem sodu przygotowana w warunkach

syntezy (100°C)

TEM – transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. *Transmission Electron Microscopy*)

TLC – chromatografia cienkowarstwowa (ang. *Thin-Layer Chromatography*)

UV-Vis – spektroskopia w zakresie nadfioletu i światła widzialnego (ang. *Ultraviolet–Visible Spectroscopy*)

ZnSe – selenek cynku (ang. *zinc selenide*)

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Nanocząstki funkcjonalne stanowią jedną z najważniejszych grup nanomateriałów, znajdujących szerokie zastosowanie w aplikacjach biomedycznych. Szczególne zainteresowanie budzą nanocząstki srebra (AgNPs), które łączą unikalne właściwości fizykochemiczne z szerokim spektrum aktywności biologicznej, obejmującym działanie przeciwdrobnoustrojowe, wirusobójcze i immunomodulujące. Istotnym czynnikiem kształtującym te właściwości są ligandy powierzchniowe, odpowiadające zarówno za stabilność układów koloidalnych, jak i za dodatkowe funkcje biologiczne. Wśród nich szczególną rolę odgrywają polifenole, takie jak kwas taninowy (TA) – naturalny związek pochodzenia roślinnego o właściwościach antyoksydacyjnych, redukujących, przeciwzapalnych i wirusobójczych, wykazujący także zdolności do tworzenia kompleksów z metalami.

Niniejsza rozprawa doktorska poświęcona jest badaniu przemian kwasu taninowego w koloidach nanocząstek srebra (TA-AgNPs) oraz ich wpływu na właściwości fizykochemiczne i potencjalną aktywność biologiczną. Przyjęto założenie, że procesy zachodzące podczas przechowywania TA-AgNPs mogą prowadzić do zmian w strukturze kwasu taninowego, a tym samym modulować funkcjonalność całego układu koloidalnego. W pracy zastosowano zestaw komplementarnych metod analitycznych obejmujących spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR), spektroskopię w zakresie nadfioletu i światła widzialnego (UV-Vis), dynamiczne rozpraszanie światła (DLS), mikroskopię elektronową (SEM) oraz chromatografię cienkowarstwową (TLC) i cieczerową sprzężoną ze spektrometrią mas (LC-MS). Umożliwiło to zarówno charakterystykę morfologii i stabilności nanocząstek, jak i monitorowanie przemian polifenoli zachodzących w czasie kondycjonowania układów. Uzyskane rezultaty pozwoliły opisać dynamikę procesów towarzyszących kondycjonowaniu koloidów nanocząstek srebra oraz wskazały, że przemiany kwasu taninowego odgrywają kluczową rolę w kształtowaniu właściwości fizykochemicznych i biologicznych badanych układów.

ABSTRACT

Functional nanoparticles constitute one of the most important groups of nanomaterials, with wide-ranging applications in the biomedical field. Silver nanoparticles (AgNPs) are of particular interest, as they combine unique physicochemical properties with a broad spectrum of biological activities, including antimicrobial, virucidal, and immunomodulatory effects. A crucial factor influencing these properties is the presence of surface ligands, which ensure the stability of colloidal and provide biological functions. Among them, polyphenols such as tannic acid (TA) – a natural plant compound with antioxidant, reducing, anti-inflammatory, and virucidal properties, as well as the ability to form complexes with metals – are of particular importance.

This dissertation is devoted to the investigation of tannic acid transformations in silver nanoparticle colloids (TA-AgNPs) and their impact on physicochemical properties and potential biological activity. It was assumed that the processes occurring during the storage of TA-AgNPs may lead to transformations of tannic acid, and modulating the functionality of the entire colloidal system. A set of analytical methods was used to investigate the transformation of tannic acid in TA-AgNPs colloids, including Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), ultraviolet–visible spectroscopy (UV-Vis), dynamic light scattering (DLS), electron microscopy (SEM), thin-layer chromatography (TLC), and liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS). This approach enabled the characterization of nanoparticle morphology and stability, as well as the monitoring of polyphenol transformations occurring during system conditioning in time.

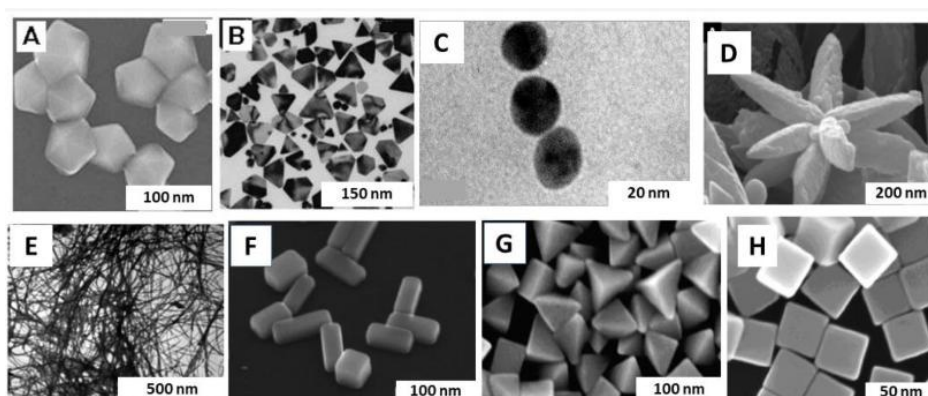
The obtained results allows the dipper understanding of the polyphenol transformation in the colloidal systems containing silver nanoparticles and highlighted the key role of those transformations and its influence on the the physicochemical and biological properties of the final functional nanoparticles.

1. Nanocząstki funkcjonalne

1.1. Nanocząstki metaliczne

Nanocząstki metaliczne (NPs) to obiekty o wymiarach mieszczących się w skali nanometrycznej, zazwyczaj w przedziale 1–100 nm, wykonane z metali lub tlenków metali [1]. Nanomateriały te stanowią jedną z najlepiej poznanych i najczęściej wykorzystywanych klas nanomateriałów nieorganicznych. Ich cechą wyróżniającą jest obecność metalicznego rdzenia wraz z ligandami na powierzchni, których skład chemiczny oraz właściwości fizykochemiczne determinują potencjał aplikacyjny całego układu [2]. Zmiana rozmiaru materiału z wymiarów makroskopowych do nanometrycznych powoduje istotne zmiany w jego właściwościach. W nanoskali znacząco wzrasta stosunek powierzchni do objętości, co oznacza, że duży odsetek atomów znajduje się na powierzchni cząstki. Zwiększa to liczbę dostępnych centrów aktywnych, a tym samym reaktywność chemiczną materiału. Dodatkowo, w nanoskali mogą ujawniać się efekty kwantowe, które wpływają na przewodnictwo elektryczne, absorpcję i emisję promieniowania czy właściwości magnetyczne [1-2]. W rezultacie nanocząstki metaliczne wykazują szereg cech niedostępnych dla ich makroskopowych odpowiedników, takich jak: specyficzne pasma absorpcji w zakresie UV-Vis, właściwości katalityczne [3], optyczne [4], przewodzące [5], magnetyczne [6] czy aktywność biologiczna [7]. Do najczęściej badanych i stosowanych nanocząstek metalicznych należą nanocząstki srebra (AgNPs), złota (AuNPs), miedzi (CuNPs), platyny (PtNPs) oraz palladu (PdNPs) [3, 8]. Każdy z tych materiałów może być wytwarzany w szerokim zakresie form morfologicznych, różniących się zarówno kształtem, jak i rozmiarem [9]. W początkowych badaniach nad nanocząstkami metalicznymi główny nacisk kładziono na analizę rdzenia metalicznego – jego skład chemiczny, rozmiar, kształt i struktura krystaliczna [10]. Celem tych prac było opracowanie metod syntezy pozwalających uzyskać cząstki monodyspersyjne o przewidywalnych parametrach fizykochemicznych. W literaturze opisano wiele technik umożliwiających kontrolę morfologii poprzez modyfikację warunków reakcji, takich jak pH, temperatura, czas syntezy, rodzaj reduktora czy obecność stabilizatorów [9, 11]. Dobór tych parametrów decyduje, czy otrzymane cząstki będą miały kształt kulisty, pryzmatów, piramid, drutów, prętów czy sześciątów. Różnorodność form morfologicznych nanocząstek srebra, uzyskanych w warunkach kontrolowanej syntezy, przedstawiono na Rysunku 1 [9]. Obrazy wykonane metodami transmisyjnej (TEM) i skaningowej (SEM) mikroskopii elektronowej ukazują m.in. formy sferyczne, pryzmatyczne, kwiatowe, prętowe, sześciennie oraz druty,

które stanowią przykład możliwości precyzyjnego kształtowania parametrów morfologicznych nanomateriałów.



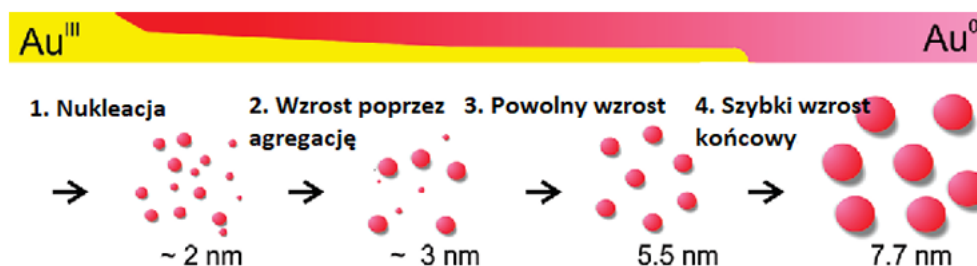
Rysunek 1. Obrazy TEM i SEM nanocząstek srebra o różnych kształtach: (A) wielościany, (B) struktury trójkątne, (C) struktury kuliste, (D) struktury kwiatowe, (E) druty, (F) pręty, (G) piramidy, (H) sześciiany [9].

Metody otrzymywania nanocząstek metalicznych można podzielić na dwie główne kategorie: podejścia typu *top-down* oraz *bottom-up* [12-13]. W metodach typu *top-down* nanostruktury powstają w wyniku mechanicznej lub fizycznej fragmentacji materiału masywnego do skali nanometrowej, natomiast metoda *bottom-up* opiera się na procesach samoorganizacji atomów, jonów lub małych cząsteczek prowadzących do powstania nanostruktur. Oba kierunki są intensywnie rozwijane, jednak różnią się stopniem kontroli morfologii, kosztownością oraz potencjałem aplikacyjnym [12].

Strategie typu *top-down* obejmują metody fizyczne i mechaniczne. Do najczęściej stosowanych należy ablacja laserowa, polegająca na oddziaływaniu wiązką lasera o wysokiej energii na powierzchnię litego metalu zanurzonego w cieczy lub gazie. W wyniku tego procesu fragmenty materiału odrywane są od powierzchni i ulegają kondensacji, tworząc nanocząstki o stosunkowo jednorodnych wymiarach. Ablacja laserowa pozwala uzyskać stabilne koloidy pozbawione zanieczyszczeń chemicznych, co czyni tę technikę atrakcyjną w kontekście zastosowań biomedycznych [12]. Wadą jest jednak wysoki koszt aparatury i ograniczona możliwość kontroli dyspersji wielkości. Inne metody *top-down* to rozdrabnianie mechaniczne [9] (np. w młynach kulowych lub planetarnych), prowadzące do otrzymania nanocząstek o dużej polidispersyjności i tendencji do aglomeracji, oraz litografia czy wytrawianie chemiczne [9]. Te ostatnie umożliwiają precyzyjne kształtowanie nanostruktur o określonym układzie przestrzennym, jednak wymagają zaawansowanej infrastruktury technologicznej,

dlatego są częściej wykorzystywane w nanofotonice i mikroelektronice niż w nanomedycynie [9].

Strategie typu *bottom-up* zdominowały obecnie badania nad nanocząstkami metalicznymi, ponieważ umożliwiają precyzyjne sterowanie procesem nukleacji i wzrostu, a tym samym kontrolę rozmiaru, kształtu i właściwości powierzchniowych cząstek [14]. Do tej grupy zalicza się metody chemiczne, fizykochemiczne, elektrochemiczne, fotochemiczne oraz biologiczne. Najczęściej stosowaną metodą jest redukcja chemiczna. Proces polega na redukcji jonów metalu (np. Ag^+ , Au^{3+}) do formy metalicznej w obecności reduktora, którym może być cytrynian sodu, borowodorek sodu, kwas askorbinowy czy hydrazyna [15]. Mechanizm syntezy obejmuje dwa zasadnicze etapy: nukleację – szybkie powstawanie zarodków metalicznych – oraz ich dalszy wzrost, prowadzący do powiększania cząstek i kształtowania ich morfologii. Kluczowe znaczenie ma równowaga pomiędzy szybkością redukcji a stabilizacją powierzchniową. Schematyczne ujęcie tego procesu przedstawiono na Rysunku 2, gdzie zilustrowano kolejne etapy powstawania nanocząstek – od tworzenia jąder, przez ich koalescencję i wzrost dyfuzyjny, aż po końcową fazę intensywnego przyrostu wynikającego z pełnej redukcji prekursora [14].



Rysunek 2. Schematyczne przedstawienie procesu wzrostu nanocząstek złota metodą redukcji chemicznej [14].

Stabilizatory (np. cytrynian sodu, polimery, surfaktanty) zapobiegają agregacji poprzez oddziaływania elektrostatyczne, steryczne lub mieszane [9]. W zależności od doboru reduktora, stabilizatora i parametrów reakcji (pH, temperatura, stosunek molowy, czas syntezy) [9], można uzyskać cząstki o różnorodnych formach: kulistych, sześciennych, prętowych czy dendrytycznych [16]. Klasyczne przykłady to metoda Turkevicha (cytrynian sodu jako reduktor i stabilizator) oraz metoda Brust–Schiffrin (redukcja w dwufazowym układzie wodno-organicznym z tiolami jako stabilizatorami) [13, 16].

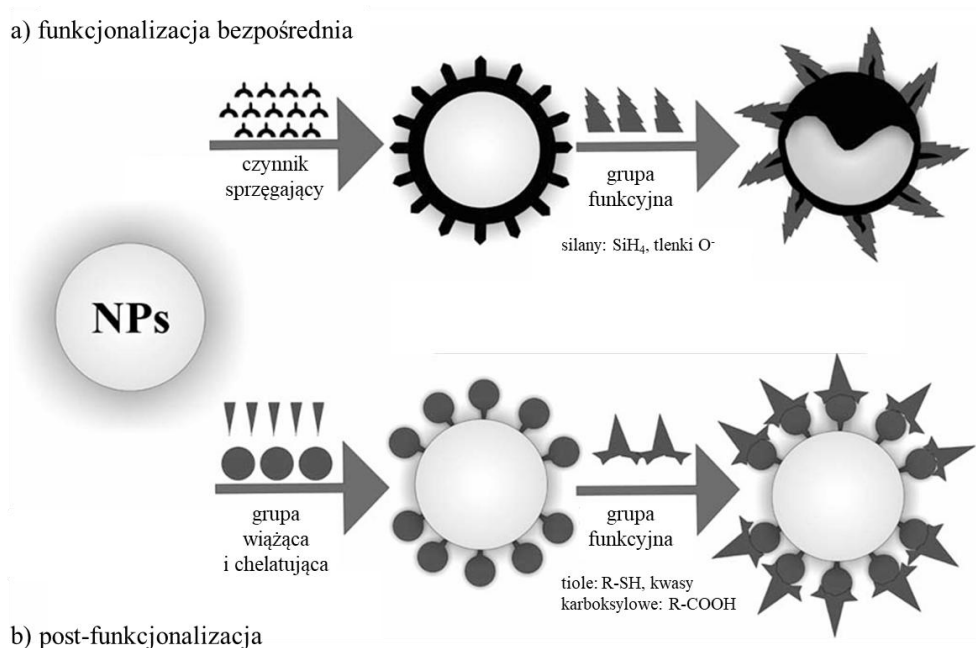
W ostatnich latach intensywnie rozwija się również metoda redukcji chemicznej z wykorzystaniem związków pochodzenia naturalnego. Ekstrakty roślinne, metabolity mikroorganizmów czy białka mogą pełnić podwójną rolę: reduktorów i stabilizatorów [14]. Polifenole, alkaloidy, terpenoidy czy aminokwasy obecne w tych materiałach uczestniczą w redukcji jonów metali, a jednocześnie stabilizują otrzymane nanocząstki, nadając im dodatkowe właściwości biologiczne – m.in. antyoksydacyjne czy przeciwdrobnoustrojowe [12].

Uzupełnieniem metod chemicznych wytwarzania nanocząstek są techniki fotochemiczne i elektrochemiczne [9]. W metodzie fotochemicznej redukcja jonów zachodzi pod wpływem promieniowania UV lub widzialnego, często przy udziale fotoinicjatorów. Pozwala to regulować szybkość reakcji poprzez dobór długości fali, intensywności i czasu naświetlania [13]. Synteza elektrochemiczna polega na redukcji jonów metalu na katodzie w układzie elektrolitycznym, co umożliwia precyzyjne kształtowanie rozmiaru i morfologii cząstek poprzez zmianę natężenia prądu, napięcia czy składu elektrolitu [12]. Oba podejścia umożliwiają otrzymywanie cząstek o wysokiej czystości, jednak ich zastosowanie ogranicza konieczność użycia specjalistycznej aparatury.

Podsumowując, wachlarz metod otrzymywania nanocząstek metalicznych jest niezwykle szeroki. Strategie typu *top-down* pozwalają na fizyczne rozdrobnienie materiału, jednak wiążą się z mniejszą kontrolą nad dyspersją i kształtem. Z kolei podejścia *bottom-up*, a zwłaszcza metoda redukcji chemicznej zapewnia możliwość precyzyjnego sterowania procesem syntezy i uzyskiwania nanocząstek o ściśle określonych parametrach. To właśnie te techniki stanowią obecnie fundament badań w obszarze nanomateriałów biomedycznych, otwierając drogę do projektowania nanocząstek o kontrolowanych właściwościach morfologicznych, powierzchniowych i biologicznych [17-18].

1.2. Wpływ ligandów na powierzchni nanocząstek metalicznych na właściwości biomedyczne nanocząstek funkcjonalnych

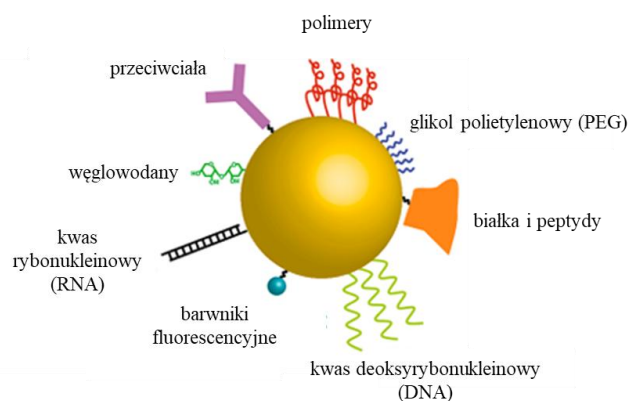
Współczesne badania jednoznacznie wskazują, że właściwości nanocząstek nie są determinowane wyłącznie przez parametry ich metalicznego rdzenia, lecz w znacznym stopniu zależą również od związków obecnych na powierzchni [19-20]. Obecność ligandów na powierzchni nanocząstek odgrywa kluczową rolę, pełniąc jednocześnie dwie zasadnicze funkcje. Po pierwsze, stabilizują one układ koloidalny, ograniczając niepożądane procesy aglomeracji NPs i utratę stabilności. Po drugie, umożliwiają nadawanie nanocząstkom określonych cech fizykochemicznych lub biologicznych, istotnych z punktu widzenia konkretnych zastosowań [21]. W tym kontekście wykształciło się pojęcie nanocząstek funkcjonalnych – nanocząstek, których powierzchnia została celowo zmodyfikowana poprzez przyłączenie odpowiednich związków chemicznych lub biomolekuł. Taka funkcjonalizacja może odbywać się na dwa sposoby (Rysunek 3) [22]:



Rysunek 3. Schematyczne przedstawienie dwóch strategii funkcjonalizacji nanocząstek: a) funkcjonalizacji bezpośredniej (w trakcie syntezy) oraz b) post-funkcjonalizacji (modyfikacji powierzchni już otrzymanych nanocząstek) [22].

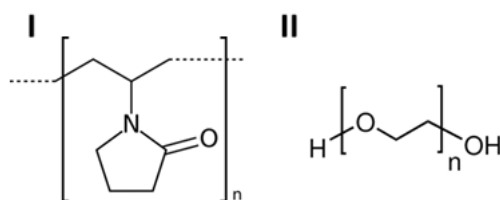
Funkcjonalizacja w trakcie syntezy (ang. *direct functionalization*) – ligand czy cząsteczka dwufunkcyjna obecna jest już w mieszaninie reakcyjnej podczas otrzymywania nanocząstek. Jedna część cząsteczki wiąże się z nowo powstającym rdzeniem (np. Ag, Au), a druga pozostaje „na zewnątrz” i nadaje gotowej nanocząstce określone właściwości (stabilizacja, rozpuszczalność, biokompatybilność). Post-funkcjonalizacja (ang. *post-functionalization*) – nanocząstki są już otrzymane i dopiero później ich powierzchnia jest modyfikowana dodatkowymi ligandami. Może to być wymiana istniejących ligandów (ang. *ligand exchange*), dołączanie kolejnych grup funkcyjnych (np. $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, PEG), czy też tworzenie warstw związków pośrednich, które następnie sprzęga się z docelowymi związkami chemicznymi. Funkcjonalizacja nanocząstki może służyć m.in. poprawie biokompatybilności, zwiększeniu aktywności katalitycznej czy modulowaniu efektu farmakologicznego, co otwiera szerokie możliwości aplikacyjne tych materiałów [22].

Nanocząstki metaliczne, podobnie jak inne nanomateriały, charakteryzują się niezwykle rozwiniętą powierzchnią – w przypadku obiektów o rozmiarach rzędu pojedynczych nanometrów większość atomów znajduje się na powierzchni i pozostaje dostępna do modyfikacji. W praktyce oznacza to, że właściwości nanocząstek mogą być kształtowane poprzez odpowiedni dobór ligandów. Dzięki temu zakres ich potencjalnych zastosowań znacznie wykracza poza te wynikające z natury samego rdzenia. Właściwie dobrane ligandy umożliwiają nie tylko kontrolę nad stabilnością koloidalną, ale również precyzyjne dostosowanie cząstek do określonych środowisk reakcyjnych lub biologicznych. Najczęściej wykorzystywane ligandy to między innymi: polimery, przeciwciała, węglowodany, kwasy nukleinowe, białka, czy peptydy. Przykłady często wykorzystywanych ligandów przedstawiono na Rysunku 4 [23].



Rysunek 4. Schematyczne przedstawienie najczęściej wybieranych ligandów w aplikacjach biomedycznych [23].

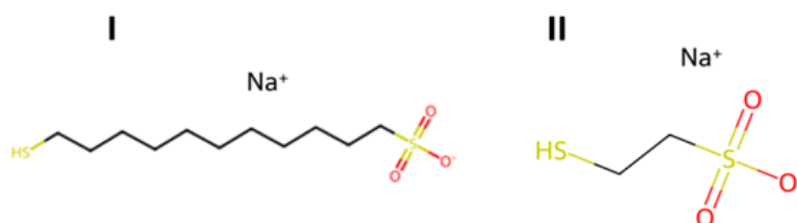
Charakter chemiczny zastosowanych modyfikatorów bezpośrednio wpływa na funkcjonalność układu – inne ligandy stosowane są w katalizie, inne w elektronice, a jeszcze inne w zastosowaniach biomedycznych. Z tego względu opis rodzajów ligandów i ich właściwości stanowi fundament w rozumieniu nanocząstek funkcjonalnych [23]. Przykładowo, polimery hydrofilowe, takie jak poliwinylpirolidon (PVP) i glikol polietylenowy (PEG) przedstawione na Rysunku 5, należą do najczęściej stosowanych ligandów stabilizujących w koloidach nanocząstek metalicznych [24]. Ich obecność w układzie koloidalnym odgrywa kluczową rolę zarówno podczas procesu syntezy, jak i w kształtowaniu właściwości fizykochemicznych otrzymanych nanomateriałów [25].



Rysunek 5. Wzór chemiczny: (I) poliwinylpirolidonu (PVP) oraz (II) glikolu polietylenowego (PEG).

Hydrofilowe łańcuchy polimerowe tworzą wokół nanocząstek warstwę ochronną, która ogranicza niepożądaną aglomerację i zapewnia długotrwałą stabilność dyspersji. Dodatkowo, polimery te mogą wpływać na średni rozmiar i kształt cząstek powstających w trakcie syntezy [10]. W obecności PVP lub PEG wzrost nanocząstek przebiega w sposób bardziej kontrolowany, co pozwala otrzymywać materiały o węższym rozkładzie wielkości i bardziej jednolitej morfologii [24]. PEG może również pełnić funkcję łagodnego reduktora jonów metali [26]. Na poziomie właściwości biologicznych polimery hydrofilowe zwiększają rozpuszczalność i biokompatybilność nanocząstek, zmniejszając jednocześnie ich cytotoksyczność. Modyfikacja powierzchni nanocząstek PEG-iem (PEGylacja) pozwala wydłużyć czas ich obecności w środowisku biologicznym, ponieważ utrudnia szybkie rozpoznanie i usuwanie przez komórki układu odpornościowego [25]. Z kolei PVP, dzięki swoim właściwościom amfifilowym, ułatwia funkcjonalizację nanocząstek dodatkowymi cząsteczkami biologicznie aktywnymi [10]. W efekcie polimery hydrofilowe nie tylko stabilizują układ, ale także tworzą warunki sprzyjające dalszej modyfikacji chemicznej i adaptacji nanocząstek do wymagań środowiska biologicznego [26].

W grupie ligandów małowartościowych szczególną rolę odgrywają związki tiolowe, takie jak 2-merkaptanoetanosulfonian sodu (MESNa) oraz 11-merkaptoundekanosulfonian sodu (MUSNa) zaprezentowane na Rysunku 6 [27]

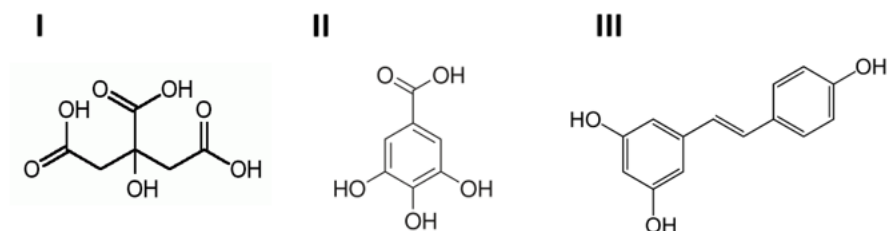


Rysunek 6. Wzór chemiczny: (I) 11-merkaptoundekanosulfonianu sodu (MUSNa) oraz (II) 2-merkaptopetanosulfonianu sodu (MESNa).

Ich wspólną cechą jest zdolność do tworzenia wiązań kowalencyjnych pomiędzy atomem siarki a powierzchnią nanocząstki metalicznej, co zapewnia jej trwałe związanie z powierzchnią nanocząstki [28]. Obecność grupy sulfonowej nadaje tym związkom dodatkowo silnie hydrofilowy charakter, umożliwiając stabilizację cząstek w roztworze wodnym i chroniąc je przed aglomeracją. Istotnym elementem różnicującym MES i MUS jest długość łańcucha węglowodorowego – w przypadku MES są to jedynie dwa atomy węgla, podczas gdy MUS posiada ich jedenaście. Ta różnica przekłada się na odmienny sposób organizacji ligandów na powierzchni nanocząstek: krótkie cząsteczki MES tworzą mniej zwarte, bardziej „rozproszone” powłoki, podczas gdy długie cząsteczki MUS ułatwiają formowanie uporządkowanych i gęstych monowarstw dzięki oddziaływaniom międzyłańcuchowym [29]. Z tego względu długość łańcucha determinuje nie tylko stabilność i gęstość upakowania na powierzchni NPs, ale także to, w jaki sposób nanocząstki będą oddziaływać ze środowiskiem biologicznym. W kontekście zastosowań biomedycznych różnice te mogą warunkować, czy nanocząstki zachowują się głównie jako inhibitory przyłączania wirusa do komórki gospodarza, czy też prowadzą do jego nieodwracalnej dezaktywacji [28, 29, 30, 31].

Kwasy organiczne stanowią kolejną istotną grupę związków wykorzystywanych w syntezie i stabilizacji nanocząstek metalicznych [32]. W odróżnieniu od polimerów czy ligandów tiolowych, pełnią one często rolę wielofunkcyjną – mogą działać jednocześnie jako reduktory jonów metali, stabilizatory koloidów oraz ligandy wiążące się z powierzchnią nanocząstki [30]. Ich naturalne pochodzenie, nietoksyczność oraz dobra rozpuszczalność w wodzie sprawiają, że znajdują szerokie zastosowanie w układach o potencjalnym znaczeniu biomedycznym [32],

[33]. Do najczęściej stosowanych (przedstawione na Rysunku 7) należą kwas cytrynowy (i jego sól – cytrynian sodu), kwas galusowy oraz inne polifenole, takie jak na przykład resweratrol.



Rysunek 7. Wzór chemiczny kwasu cytrynowego (I), kwasu galusowego (II) oraz resweratrolu (III).

Kwas cytrynowy (jak również jego sól - cytrynian sodu), oprócz roli reduktora i stabilizatora elektrostatycznego, pełni również funkcję ligandu przygotowującego układ koloidalny do dalszej funkcjonalizacji [33]. Nanocząstki otrzymane metodą cytrynianową stanowią często punkt wyjścia do kolejnych modyfikacji powierzchni, ponieważ obecność cytrynianu zapewnia stabilność, ale jednocześnie nie blokuje całkowicie aktywnych miejsc na powierzchni metalu [34-35]. Dzięki temu możliwe jest zastępowanie lub uzupełnianie go innymi ligandami – zarówno małowzrosteczkowymi, jak i bardziej złożonymi, np. białkami czy polimerami – co otwiera drogę do tworzenia nanocząstek funkcjonalnych o ukierunkowanych właściwościach biomedycznych. Warto również podkreślić, że zarówno kwas cytrynowy, jak i cytrynian sodu są związkami uznawanymi za bezpieczne i nietoksyczne, szeroko stosowanymi również w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym [36]. To sprawia, że układy koloidalne stabilizowane cytrynianem są nie tylko łatwe do otrzymania i powtarzalne, ale także charakteryzują się wysoką biokompatybilnością, co czyni je atrakcyjnymi do dalszej funkcjonalizacji w kierunku zastosowań biomedycznych [33, 34, 35, 36, 37].

Kolejnym przykładem ligandu o istotnym znaczeniu jest kwas galusowy, należący do grupy naturalnych polifenoli [38]. Z punktu widzenia biomedycznego kluczowe znaczenie ma fakt, że sam w sobie wykazuje silne właściwości antyoksydacyjne i przeciwzapalne [39]. Obecność kwasu galusowego na powierzchni nanocząstek nie tylko zapewnia im stabilność koloidalną, ale również nadaje im bioaktywność – ograniczając stres oksydacyjny i mogąc wspierać mechanizmy ochronne wobec komórek [40]. Dzięki temu funkcjonalizacja nanocząstek kwasem galusowym jest postrzegana jako strategia wzmacniająca ich potencjał terapeutyczny [40-41].

Podobnie resweratrol, będący związkiem polifenolowym o szeroko udokumentowanych właściwościach biologicznych, może pełnić rolę ligandu nadającego nanocząstkom dodatkowe funkcje ochronne i regulacyjne [42]. Jego zdolność do modulowania szlaków oksydacyjnych i zapalnych sprawia, że w połączeniu z nanocząstkami metalicznymi może potęgować ich bioaktywność. Resweratrol stabilizuje układ koloidalny, a jednocześnie wnosi właściwości farmakologiczne, które zwiększają szansę wykorzystania tak funkcjonalizowanych nanocząstek w zastosowaniach biomedycznych [43-44].

Kolejną grupę związków wykorzystywanych jako ligandy na powierzchni nanocząstek stanowią białka, które w przeciwieństwie do małych cząsteczek organicznych czy polimerów syntetycznych nie posiadają prostych wzorów sumarycznych, lecz składają się z setek reszt aminokwasowych ułożonych w złożone struktury drugorzędowe i trzeciorzędowe [45]. To właśnie konformacja przestrzenna, obecność licznych grup funkcyjnych oraz często także glikozylacja warunkują ich unikatową zdolność do oddziaływania z powierzchnią metalu [46]. Dzięki temu białka nie tylko stabilizują koloidy, ale także nadają nanocząstkom cechy bioaktywne, związane z ich własnymi funkcjami biologicznymi [45, 46, 47]. Szczególnym przykładem jest laktoferyna [45], białko o silnych właściwościach immunomodulacyjnych i przeciwdrobnoustrojowych. Jej zdolność do wiązania jonów metali oraz bogactwo reszt aminokwasowych sprawiają, że skutecznie pokrywa powierzchnię nanocząstek, chroniąc je przed agregacją i zwiększając ich stabilność w środowisku biologicznym [48]. Co więcej, nanocząstki funkcjonalizowane laktoferyną wykazują nie tylko zwiększoną biokompatybilność, ale także ukierunkowane działanie przeciwwirusowe i przeciwbakteryjne [45], wynikające z synergii pomiędzy właściwościami metalu a bioaktywnością białka. W tym sensie laktoferyna pełni podwójną rolę – jest zarówno ligandem stabilizującym, jak i nośnikiem specyficznych funkcji biologicznych do nanocząstki [49]. Podobne podejście wykorzystuje się w przypadku albuminy surowicy ludzkiej (HSA), jednego z najlepiej poznanych białek w układach biologicznych, która dzięki licznym resztom aminokwasowym i naturalnej zdolności do transportu cząsteczek, stabilizuje powierzchnię nanocząstek, a jednocześnie może pełnić funkcję nośnika dodatkowych leków lub ligandów [50]. Funkcjonalizacja nanocząstek albuminą poprawia ich cyrkulację w organizmie, ogranicza nieswoiste oddziaływania oraz ułatwia dostarczanie do określonych tkanek [51].

1.3. Wykorzystanie nanocząstek funkcjonalnych w aplikacjach biomedycznych

Dynamiczny rozwój nanotechnologii w ostatnich dekadach sprawił, że nanocząstki funkcjonalne stały się jedną z najbardziej perspektywicznych klas materiałów wykorzystywanych w medycynie [52]. Ich potencjał wynika nie tylko z właściwości samego rdzenia, lecz przede wszystkim z możliwości precyzyjnej modyfikacji powierzchni odpowiednio dobranymi ligandami o określonych funkcjach biologicznych. Dzięki temu nanocząstki mogą być projektowane jako wielofunkcyjne systemy terapeutyczno-diagnostyczne, zdolne do selektywnej interakcji z komórkami i tkankami organizmu. Szczególne znaczenie mają tutaj zastosowania ukierunkowane na zwiększenie skuteczności leczenia przy jednoczesnym ograniczeniu działań niepożądanych, co stanowi istotną przewagę nad klasycznymi metodami farmakoterapii [53].

Jednym z najintensywniej badanych kierunków wykorzystania nanocząstek funkcjonalnych jest ich zastosowanie jako nośników leków (ang. *drug delivery systems*). Koncepcja ta opiera się na zdolności nanocząstek do selektywnego gromadzenia się w tkankach zmienionych chorobowo oraz na możliwości ich powierzchniowej modyfikacji w celu specyficznego rozpoznawania komórek docelowych [53]. Wyróżnia się dwa główne mechanizmy warunkujące ukierunkowane dostarczanie leków. Pierwszy z nich to efekt zwiększonej przepuszczalności i retencji (ang. *Enhanced Permeability and Retention*, EPR) – zjawisko polegające na akumulacji nanocząstek i makrocząsteczek w tkankach nowotworowych wskutek zwiększonej przepuszczalności naczyń krwionośnych oraz ograniczonego drenażu limfatycznego. Zjawisko to jest charakterystyczne dla guzów nowotworowych, których naczynia krwionośne są nieprawidłowo zbudowane i cechują się podwyższoną przepuszczalnością. Nanocząstki, dzięki swoim niewielkim rozmiarom, łatwo przenikają przez taką nieszczelną sieć naczyń i gromadzą się w obrębie guza. Dzięki temu lek może kumulować się w guzie w wyższym stężeniu, przy zminimalizowanym ryzyku uszkodzenia zdrowych tkanek [54]. Drugim mechanizmem jest przekraczanie barier biologicznych, w tym bariery krew–mózg (ang. *Blood–Brain Barrier*, BBB). Bariera krew–mózg jest jedną z najtrudniejszych do pokonania struktur fizjologicznych, chroniącą centralny układ nerwowy przed toksynami i patogenami. Funkcjonalizacja nanocząstek ligandami rozpoznającymi specyficzne receptory na komórkach śródbłonna (np. peptydami, kwasem foliowym czy przeciwciałami) umożliwia ich transport przez BBB i tym samym otwiera nowe możliwości w leczeniu chorób neurologicznych, w tym nowotworów mózgu, choroby Alzheimera czy stwardnienia rozsianego [55]. Oprócz pasywnego nagromadzenia w tkankach zmienionych

chorobowo (efekt EPR) oraz aktywnego celowania receptorowego, nanocząstki pozwalają także na kontrolowane uwalnianie leków. Oznacza to, że substancja terapeutyczna może być uwalniana w sposób zależny od warunków środowiskowych (np. pH guza, obecność określonych enzymów) lub w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne, takie jak światło, pole magnetyczne czy zmiana temperatury [55-56]. Dzięki tym właściwościom nanocząstki funkcjonalne znajdują zastosowanie między innymi w nowoczesnych terapiach onkologicznych, gdzie zwiększają skuteczność chemioterapii przy ograniczeniu działań ubocznych. Można je również wykorzystać w terapiach chorób neurodegeneracyjnych, dzięki możliwości przenikania przez barierę krew-mózg, jak również w systemach wielolekowych, w których możliwe jest jednoczesne dostarczanie kilku substancji czynnych o synergistycznym działaniu [56].

Funkcja nanocząstek nie ogranicza się wyłącznie do roli nośników substancji aktywnych. Coraz więcej badań wskazuje, że mogą one wykazywać własne działanie niszczące komórki nowotworowe, wynikające z ich unikalnych właściwości fizykochemicznych [57]. Na przykład, w badaniach przedklinicznych udowodniono, że AuNPs mogą hamować proces angiogenezy, czyli powstawania nowych naczyń krwionośnych niezbędnych do wzrostu guza [58]. Dodatkowo, dzięki właściwościom plazmonicznym, AuNPs znajdują zastosowanie w terapii fototermicznej, w której absorpcja promieniowania w zakresie bliskiej podczerwieni prowadzi do lokalnego podgrzania i destrukcji komórek nowotworowych [49, 57]. Podobne właściwości wykazują nanocząstki srebra, zdolne do indukcji stresu oksydacyjnego w komórkach nowotworowych. Mechanizm ten prowadzi do powstawania reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS), uszkodzeń mitochondrialnych oraz aktywacji szlaków apoptotycznych [55]. Efekt ten zachodzi w większym stopniu w komórkach nowotworowych niż w zdrowych, co stanowi podstawę ich preferencyjnego działania niszczącego komórki nowotworowe [55, 57, 59]. Znaczący potencjał wykazują także nanocząstki tlenku cynku (ZnO NPs), które indukują apoptozę w różnych liniach komórkowych, m.in. białaczkowych (HL60), hepatoma (HepG2) czy nabłonka płuc (A549). Ich działanie wiąże się z uwalnianiem jonów Zn^{2+} oraz generacją ROS, co prowadzi do destabilizacji błon komórkowych i zaburzeń funkcji organelli [60-61].

Nanocząstki funkcjonalne znalazły szerokie zastosowanie w zwalczaniu drobnoustrojów, zarówno bakterii, jak i grzybów, co czyni je atrakcyjną alternatywą wobec klasycznych antybiotyków i leków przeciwgrzybiczych [28]. Szczególne zainteresowanie budzą nanocząstki srebra, które od dawna znane są ze swoich właściwości bakteriobójczych. Mechanizm ich działania jest wieloetapowy i obejmuje bezpośrednie oddziaływanie z błoną komórkową

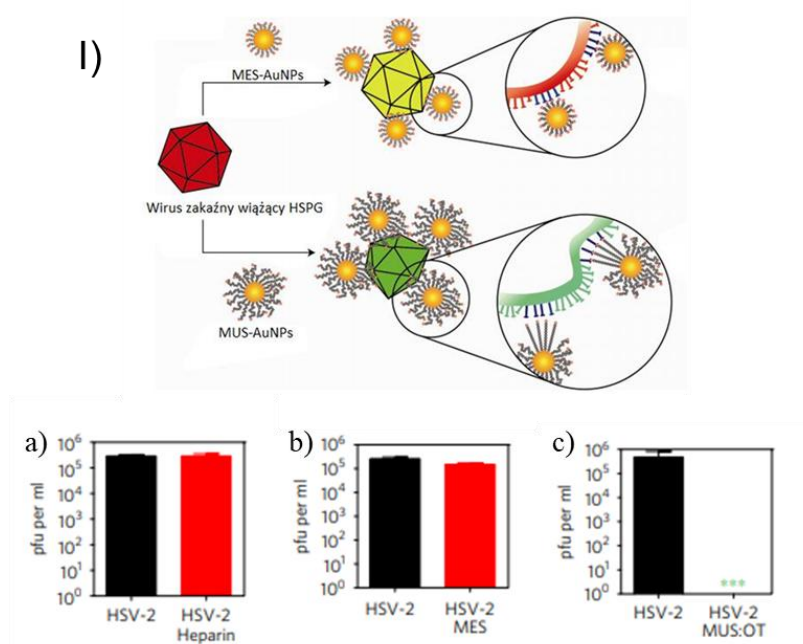
mikroorganizmów, prowadzące do destabilizacji jej struktury, przenikanie jonów srebra do wnętrza komórki oraz indukcję stresu oksydacyjnego [62]. Powstawanie reaktywnych form tlenu w obecności AgNPs skutkuje uszkodzeniem białek enzymatycznych, kwasów nukleinowych oraz lipidów, co w konsekwencji prowadzi do śmierci komórki bakteryjnej [49, 55, 62, 63]. Nanocząstki srebra potrafią także skutecznie zatrzymać tworzenie się biofilmu bakteryjnego – czyli warstwy ochronnej, którą bakterie budują, aby przetrwać i bronić się przed lekami. AgNPs uniemożliwiają bakteriom adhezję do powierzchni i zaburzają ich wzajemne „porozumiewanie się” za pomocą sygnałów chemicznych, co jest niezbędne do tworzenia trwałych skupisk [64]. Dzięki temu są stosowane m.in. w opatrunkach, powłokach implantów i specjalistycznych materiałach medycznych, które mają zapobiegać infekcjom [65-66]. Dzięki funkcjonalizacji możliwe jest również rozszerzenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej nanocząstek na szczepy wielolekooporne [67]. Na przykład koniugacja AgNPs z antybiotykami, takimi jak tetracyklina czy ampicylina, prowadzi do synergistycznego działania, przełamując mechanizmy oporności bakterii. Układy tego typu mogą obniżać minimalne stężenia hamujące (ang. *minimum inhibitory concentration*, MIC), co pozwala na stosowanie niższych dawek leku i redukcję efektów ubocznych terapii [68]. Nanocząstki wykazują również aktywność przeciwgrzybiczą, których mechanizm opiera się m.in. na uszkodzaniu błon komórkowych grzybów, zaburzaniu pracy enzymów i hamowaniu procesów niezbędnych do rozmnażania, takich jak kiełkowanie zarodników czy tworzenie biofilmu. Nanocząstki te są skuteczne wobec różnych patogenów, w tym *Candida albicans*, *Aspergillus* i *Fusarium*, a ich działanie może być dodatkowo wzmacniane przez synergiczne połączenie z lekami przeciwgrzybiczymi [69].

Nanocząstki funkcjonalne odgrywają istotną rolę w nowoczesnych strategiach wspomagania gojenia ran i regeneracji tkanek, szczególnie tam, gdzie tradycyjne metody leczenia okazują się niewystarczające [70-71]. Proces gojenia ran jest złożony i obejmuje kilka etapów: hemostazę, reakcję zapalną, proliferację komórek i odbudowę tkanek. W każdym z tych etapów nanocząstki mogą modulować odpowiedź biologiczną, skracając czas regeneracji oraz minimalizując ryzyko powikłań [71-72]. Nanocząstki srebra, zwłaszcza modyfikowane kwasem taninowym (TA-AgNPs), wykazują zdolność przyspieszania procesu gojenia ran dzięki połączeniu działania przeciwbakteryjnego i immunomodulacyjnego. Badania wykazały, że TA-AgNPs skuteczniej niż niemodyfikowane nanocząstki ograniczają rozwój bakterii takich jak *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* czy *Pseudomonas aeruginosa*, jednocześnie stymulując migrację keratynocytów i proliferację fibroblastów. Efekt ten jest zależny od rozmiaru – cząstki o średnicy 33–46 nm sprzyjają szybszemu zamykaniu ran, epitelializacji,

angiogenezie oraz formowaniu tkanki ziarninowej, a także wykazują korzystny profil przeciwzapalny. Obecność TA dodatkowo stabilizuje nanocząstki i wzmacnia ich interakcję z tkankami, co przekłada się na zwiększoną biokompatybilność i potencjał aplikacyjny w opatrunkach wspomagających gojenie ran skórnych [59]. Z kolei nanocząstki złota odgrywają ważną rolę w regeneracji kości i tkanek miękkich [73]. Mogą poprawiać właściwości materiałów stosowanych jako rusztowania w inżynierii tkankowej, zwiększając ich wytrzymałość i sprzyjając zasiedlaniu przez komórki. Badania pokazują, że nanocząstki złota pobudzają komórki macierzyste do różnicowania się w osteoblasty, czyli komórki tworzące kość, a jednocześnie ograniczają rozwój komórek tłuszczowych. Efekt ten zależy od wielkości cząstek – średnie (20–50 nm) najlepiej wspierają regenerację tkanki kostnej, podczas gdy bardzo małe mogą być mniej korzystne. Dodatkowo nanocząstki złota zmniejszają nadmierną degradację kości przez osteoklasty i działają antyoksydacyjnie, co ogranicza stan zapalny. Dzięki tym właściwościom uznaje się je za obiecujący element terapii w leczeniu ubytków kostnych i chorób takich jak osteoporoza [73].

Wirusy stanowią wyjątkową grupę patogenów – nie można ich jednoznacznie zaklasyfikować jako organizmy żywe, ponieważ nie posiadają własnych struktur metabolicznych, a do namnażania wymagają komórki gospodarza. Jednocześnie charakteryzują się niezwykle wysoką zdolnością do replikacji i częstymi mutacjami, co sprawia, że klasyczne terapie przeciwwirusowe szybko tracą skuteczność. Problem dodatkowo potęguje ogromna różnorodność wirusów RNA i DNA oraz ich zdolność do rozwijania mechanizmów oporności wobec dostępnych leków [74]. Przykładowo, leczenie zakażeń HSV opiera się na stosowaniu leków przeciwwirusowych (acyklowir, denotiwir, dokozanol, tromantadyna), które w łagodnych zmianach podawane są miejscowo, a w cięższych przypadkach – ogólnoustrojowo. Preparaty te hamują replikację wirusa, jednak łagodzą jedynie objawy zakażenia pierwotnego i nawrotowego, nie eliminując wirusa w formie utajonej ani nie zmniejszając ryzyka kolejnych infekcji [25]. Wszystko to powoduje, że potrzebne są nowe strategie walki z infekcjami wirusowymi – skuteczne zarówno w hamowaniu rozwoju wirusa, jak i w jego trwałej inaktywacji. W tym kontekście szczególne znaczenie zyskały nanocząstki metali szlachetnych, w tym złota, których działanie zależy od rodzaju ligandów powierzchniowych [30]. Nanocząstki pokryte krótkimi sulfonianowymi ligandami (MES-AuNPs) wykazują działanie wirustatyczne (Rysunek 8b) – blokują przyłączanie i wnikanie wirusa do komórki, lecz efekt ten jest odwracalny po rozcieńczeniu. Z kolei wydłużone i bardziej elastyczne ligandy (MUS- i MUS:OT-AuNPs) umożliwiają wielowalentne, silne oddziaływanie z glikoproteinami wirusa, prowadząc do nieodwracalnej deformacji kapsydu

i trwałej utraty zakaźności (Rysunek 8c) [30].



Rysunek 8. Schematyczny mechanizm działania nanocząstek złota z krótkimi (MES) i długimi (MUS) ligandami sulfonianowymi (I) w interakcji z HSV-2. Wykresy (a–c) przedstawiają wyniki testów wirusobójczych dla HSV-2: a) kontrola – heparyna (efekt wirusostatyczny), b) MES-AuNPs (efekt wirusostatyczny), c) MUS:OT-AuNPs (efekt wirusobójczy, całkowita utrata zakaźności wirusa) [30].

Tego typu układy wykazały szerokie spektrum aktywności wobec różnych patogenów, nie tylko wobec HSV, ale również HPV, RSV czy wirusa denga, co potwierdza ich potencjał jako materiałów o mechanizmie wirusobójczym [30, 55]. Na szczególną uwagę zasługują nanocząstki srebra funkcjonalizowane polifenolami, takimi jak kwas taninowy. Wykazują one podwójny mechanizm działania: bezpośrednio wiążą się z białkami wirusa, utrudniając infekcję, a jednocześnie modulują odpowiedź immunologiczną gospodarza. W badaniach z udziałem HSV wykazano, że TA-AgNPs nie tylko obniżają procent zakażenia HSV, lecz także stymulują wydzielanie cytokin i aktywują komórki układu odpornościowego, co wzmacnia naturalną obronę organizmu [20, 55, 75].

Podsumowując, nanocząstki funkcjonalne otwierają nowe możliwości w terapii przeciwwirusowej, łącząc mechanizmy wirusostatyczne, wirusobójcze i immunomodulacyjne. Kluczowe znaczenie ma tu odpowiednia funkcjonalizacja powierzchni nanocząstek, która decyduje o ich skuteczności i zakresie działania biologicznego. Wśród różnych strategii szczególnie obiecujące są układy oparte na polifenolach – naturalnych związkach o szerokim

spektrum aktywności, które nadają nanomateriałom unikatowe właściwości terapeutyczne.

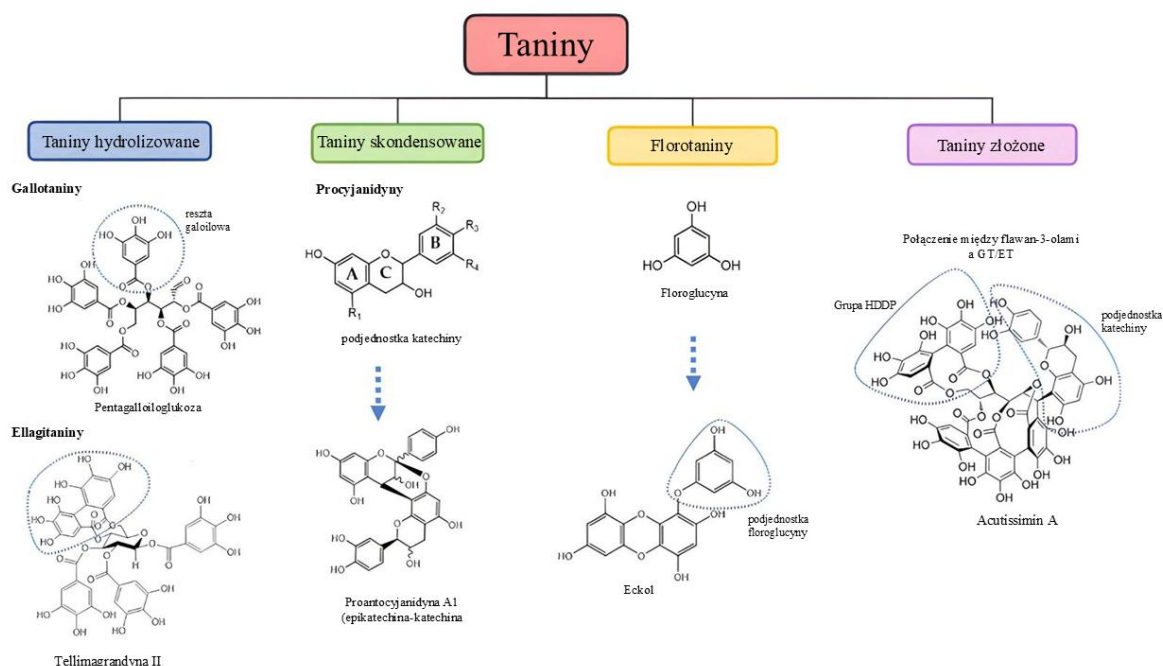
2. Polifenole jako ligandy funkcyjne nanocząstek metalicznych

2.1. Podział polifenoli i ich właściwości

Polifenole stanowią szeroką i zróżnicowaną grupę naturalnych związków organicznych, które występują powszechnie w świecie roślinnym [76]. Ich wspólną cechą strukturalną jest obecność pierścieni aromatycznych zawierających liczne grupy hydroksylowe, co nadaje im wysoką reaktywność chemiczną oraz zdolność do tworzenia trwałych interakcji z innymi cząsteczkami [77]. Z punktu widzenia biologii roślin pełnią one szereg istotnych funkcji – uczestniczą w mechanizmach obronnych przed szkodnikami, drobnoustrojami i promieniowaniem UV, biorą udział w regulacji wzrostu i dojrzewania, a także odpowiadają za cechy sensoryczne, takie jak barwa, smak czy cierpkość owoców [77-78]. Wielość grup hydroksylowych decyduje ponadto o ich właściwościach antyoksydacyjnych, chelatujących i przeciwwzapalnych [79].

Ze względu na dużą różnorodność strukturalną polifenole nie posiadają jednolitej klasyfikacji, jednak najczęściej dzieli się je na kilka głównych grup i podgrup, w zależności od budowy chemicznej [80]. Do najczęściej wyróżnianych należą flawonoidy (kwercetyna, cyjanidyna), kwasy fenolowe (kwas galusowy, kwas kawowy), stilbeny (resweratrol, piceatannol), lignany oraz taniny. Ze względu na zakres tematyczny niniejszej pracy doktorskiej szczególną uwagę poświęcono taninom, które stanowią kluczową grupę polifenoli o istotnym znaczeniu w badaniach nad syntezą i funkcjonalizacją nanocząstek srebra.

Taniny, określane również mianem garbników, to związki o zróżnicowanej budowie chemicznej, wykazujące zdolność do tworzenia silnych kompleksów z białkami i jonami metali. Klasyfikuje się je na kilka głównych podgrup (Rysunek 9) [80-81]: taniny hydrolizowalne – powstają jako estry kwasu galusowego lub elagowego z cukrami (najczęściej glukozą). Typowym przykładem jest kwas taninowy (gallotanin), a do tej grupy należą również elagitaniny, np. tellimagrandyna II; taniny skondensowane (procyjanidyny) – stanowią oligomery i polimery flawanoli, takich jak katechina czy epikatechina. Wyróżnia je brak jednostki sacharydowej w strukturze; przykładem jest proantocyjanidyna A1; florotaniny – charakterystyczne dla brunatnic (Phaeophyceae), w których powstają w wyniku polimeryzacji floroglucyny. Przykładem może być eckol, zbudowany z jednostek floroglucynowych; taniny złożone – zawierają w swojej strukturze elementy charakterystyczne zarówno dla tanin hydrolizowalnych, jak i skondensowanych. Typowym przykładem jest acutissimin A, w której występuje połączenie fragmentów kwasu elagowego i jednostek flawan-3-oli.



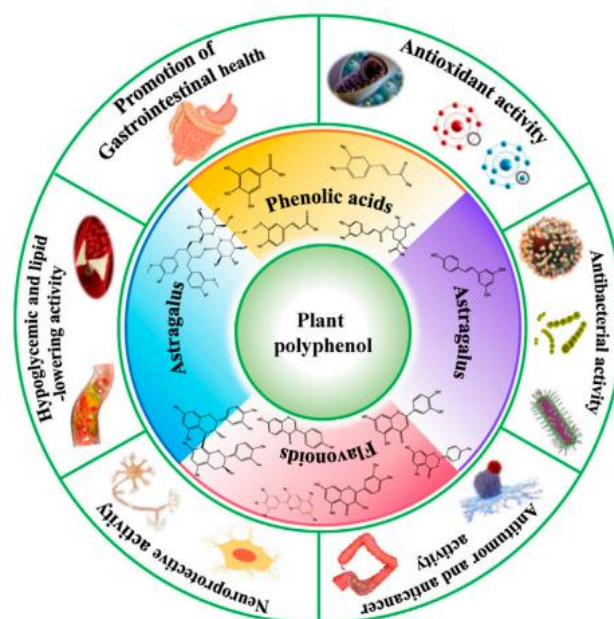
Rysunek 9. Schematyczne przedstawienie podziału tanin [81].

Taniny charakteryzują się szerokim zakresem właściwości chemicznych i biologicznych, które wynikają z ich złożonej budowy oraz obecności licznych grup hydroksylowych [77]. Te strukturalne elementy nadają im wysoką reaktywność chemiczną, zdolność do tworzenia wiązań wodorowych i kompleksów koordynacyjnych, a także decydują o ich zachowaniu w układach biologicznych [80]. Taniny hydrolizowalne, takie jak kwas taninowy, są bardzo dobrze rozpuszczalne w wodzie i wykazują słabo kwasowy odczyn ($pK_a \approx 6$) [82]. Ich liczne grupy hydroksylowe sprzyjają tworzeniu wiązań wodorowych i ułatwiają chelatowanie jonów metali przejściowych, zwłaszcza żelaza i miedzi. Podatność na autooksydację prowadzi do powstawania oligomerów i polimerów o zmienionej masie cząsteczkowej. Zjawisko to wpływa na stabilność roztworów zawierających taniny, a także modyfikuje ich właściwości biologiczne [83]. Z kolei taniny skondensowane (procyjanidyny), zbudowane z polimerów flawan-3-oli, odznaczają się mniejszą rozpuszczalnością i większą odpornością na hydrolizę w porównaniu z taninami hydrolizowalnymi [81]. Procesy polimeryzacji oksydacyjnej katechin i epikatechin prowadzą do powstawania związków o dużej masie cząsteczkowej, które wykazują mniejszą toksyczność i bardziej stabilne właściwości fizykochemiczne [82]. Cechą charakterystyczną tanin jest zdolność do tworzenia stabilnych kompleksów z białkami, polisacharydami i kwasami nukleinowymi. Wiązanie z białkami opiera się na oddziaływaniach hydrofobowych i wiązaniach wodorowych, co prowadzi do ich koagulacji i zmiany konformacji [84]. Właściwość ta leży u podstaw efektu adstringencji, czyli

uczucia cierpkości i ściągania w jamie ustnej. Taniny mogą również oddziaływać z polisacharydami roślinnymi oraz błonami biologicznymi, zmieniając ich przepuszczalność i stabilność [83]. Taniny wykazują silną aktywność przeciwutleniającą, polegającą na zdolności do neutralizacji reaktywnych form tlenu oraz chelatowania jonów metali katalizujących reakcje oksydacyjne. W testach *in vitro* kwas taninowy przewyższał skutecznością witaminę E i syntetyczne przeciwutleniacze, takie jak BHA (butylowany hydroksyanizol) i BHT (butylowany hydroksytoluen) [83, 84, 85]. Taniny wykazują szerokie spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego obejmujące bakterie Gram-dodatnie, Gram-ujemne, grzyby oraz niektóre wirusy. Mechanizm ich aktywności jest złożony i opiera się na kilku uzupełniających się procesach. Po pierwsze, taniny mogą destabilizować błony komórkowe drobnoustrojów i zakłócać syntezę peptydoglikanu, prowadząc do wzrostu przepuszczalności i śmierci komórki. Po drugie, dzięki zdolności do chelatowania jonów metali, w szczególności żelaza, ograniczają dostęp mikroorganizmów do niezbędnych składników odżywczych, co skutkuje zahamowaniem ich metabolizmu. Dodatkowo taniny hamują aktywność enzymów bakteryjnych oraz zakłócają procesy metaboliczne, takie jak fosforylacja oksydacyjna [86-87].

2.2. Wykorzystanie polifenoli w aplikacjach biomedycznych

Polifenole, powszechnie występujące związki pochodzenia roślinnego, wykazują szerokie spektrum aktywności biologicznych, które nadają im szczególne znaczenie w kontekście biomedycznym (Rysunek 10) [88]. Do najważniejszych należy działanie przeciwutleniające, przeciwzapalne oraz przeciwdrobnoustrojowe, które mogą wspierać ochronę organizmu przed stresem oksydacyjnym i infekcjami. Coraz więcej badań wskazuje także na ich potencjał przeciwnowotworowy, jak również na rolę w regulacji procesów metabolicznych, takich jak gospodarka lipidowa i glukozaowa, co znajduje zastosowanie w profilaktyce chorób cywilizacyjnych. Dodatkowo, polifenole wspomagają zdrowie przewodu pokarmowego oraz wykazują działanie neuroprotekcyjne, przyczyniając się do utrzymania równowagi fizjologicznej organizmu. Polifenole mogą działać zarówno jako środki terapeutyczne, jak i elementy składowe zaawansowanych systemów dostarczania leków, zwiększając stabilność, ukierunkowane dostarczanie i kontrolowane uwalnianie substancji aktywnych [89].



Rysunek 10. Schematyczne przedstawienie biomedycznego wykorzystania polifenoli [88].

W jednej z prac wykazano, że ekstrakty roślinne bogate w taniny mogą stanowić obiecujące źródło związków o działaniu przeciwwirusowym [90]. Theisen i wsp. badali aktywność ekstraktów z kory *Hamamelis virginiana*, zawierających mieszaninę tanin hydrolizowalnych i skondensowanych, wobec wirusów grypy typu A (w tym pandemicznych szczepów H1N1 i H7N9) oraz wirusa brodawczaka ludzkiego (HPV-16). Analizy wykazały, że szczególnie frakcje wzbogacone w taniny o wysokiej masie cząsteczkowej skutecznie hamowały infekcję, działając głównie na etapie wczesnym – poprzez blokowanie wiązania wirusa do komórki gospodarza. Autorzy podkreślili, że aktywność przeciwwirusowa była wyraźnie silniejsza w przypadku frakcji wieloskładnikowych niż w przypadku pojedynczych związków fenolowych (takich jak kwas galusowy, czy galusan epigallokatechiny), co wskazuje na istotną rolę synergii pomiędzy różnymi typami tanin. Wyniki te potwierdzają, że polifenole, a w szczególności taniny, mogą stanowić potencjalną bazę do opracowania naturalnych środków wspomagających profilaktykę i terapię infekcji wirusowych [90]. Z kolei w innej pracy zwrócono uwagę na potencjał polifenoli, w tym tanin, jako związków o szerokim spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego oraz na ich możliwe zastosowanie w walce z rosnącym problemem antybiotykoodporności [91]. Farha i wsp. [91] podkreślili, że mechanizm działania polifenoli jest wielokierunkowy i obejmuje destabilizację błon komórkowych, chelatowanie jonów metali niezbędnych do wzrostu drobnoustrojów, inhibicję enzymów oraz zakłócanie procesów metabolicznych, a także hamowanie tworzenia biofilmów

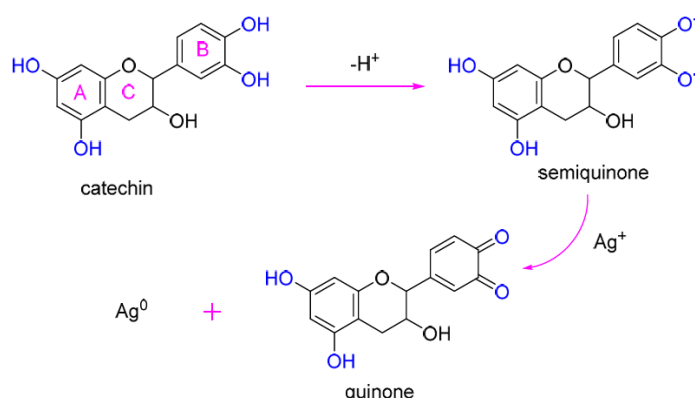
i quorum sensing. Szczególnie istotnym aspektem omawianym przez autorów jest zdolność polifenoli do synergii z antybiotykami, która przejawia się obniżeniem wartości MIC, zwiększeniem skuteczności terapii oraz ograniczeniem ryzyka rozwoju oporności. Wskazuje to, że polifenole mogą być wykorzystane zarówno jako naturalne środki przeciwdrobnoustrojowe, jak i adiuwanty w konwencjonalnej terapii zakażeń [91]. W pracy przeglądowej [92] przedstawiono hydrożele oparte na polifenolach – od prostych struktur sieciowanych po zaawansowane systemy o ukierunkowanych właściwościach terapeutycznych. Autorzy podkreślili, że obecność licznych grup hydroksylowych oraz zdolność polifenoli do tworzenia interakcji kowalencyjnych i niekowalencyjnych (m.in. wiązania wodorowe, π - π stacking, koordynacja z jonami metali) umożliwia konstruowanie materiałów o unikalnych cechach, takich jak adhezja, biogodność, zdolność samonaprawy czy aktywność antyoksydacyjna i przeciwbakteryjna. Hydrożele tego typu znalazły zastosowanie m.in. w przyspieszaniu gojenia ran, terapii przeciwnowotworowej (chemioterapia, terapia fototermiczna, immunoterapia), regeneracji tkanek kostnych i chrzęstnych, leczeniu chorób przyzębia czy chorób przewodu pokarmowego. Szczególną uwagę zwrócono także na koncepcję tzw. „odwrotnego projektowania”, w której punkt wyjścia stanowi oczekiwane działanie biologiczne, a następnie dobierana jest odpowiednia architektura hydrożelu [92].

Zestawione przykłady dowodzą, że polifenole mogą pełnić podwójną rolę – zarówno jako aktywne związki terapeutyczne o szerokim spektrum działania biologicznego, jak i jako komponenty nowoczesnych systemów biomateriałowych, co czyni je wyjątkowo cennymi w kontekście rozwoju innowacyjnych aplikacji biomedycznych.

2.3. Koniugaty nanocząstek srebra i polifenoli

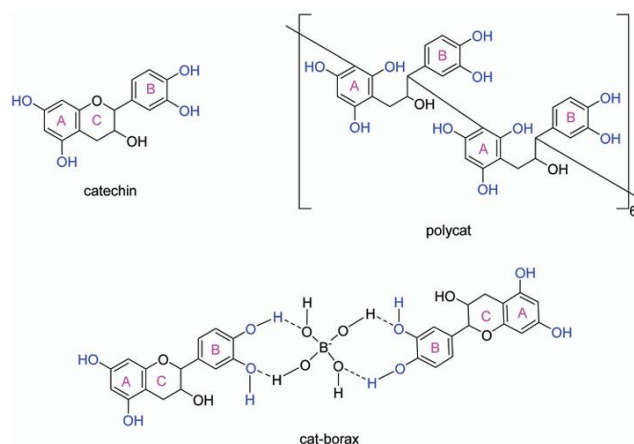
Połączenie nanocząstek metali z naturalnymi związkami bioaktywnymi stanowi jeden z najbardziej obiecujących kierunków w projektowaniu nanomateriałów o zastosowaniach biomedycznych. Szczególną uwagę zwracają koniugaty nanocząstek srebra (AgNPs) z polifenolami, które łączą w sobie właściwości fizykochemiczne i przeciwdrobnoustrojowe srebra z aktywnością biologiczną ligandów fenolowych [93]. Jak wspomniano wcześniej, polifenole mogą pełnić podwójną rolę: z jednej strony działają jako czynniki redukujące i stabilizujące podczas syntezy nanocząstek, z drugiej zaś działają jako funkcjonalne ligandy nadające im specyficzne cechy biologiczne, takie jak zwiększona biokompatybilność, kontrola uwalniania jonów srebra czy ukierunkowane oddziaływanie z komórkami [94].

Synergia wynikająca z obecności obu komponentów przekłada się na unikalny profil aktywności koniugatów, obejmujący m.in. działanie przeciwbakteryjne i przeciwwirusowe, właściwości antyoksydacyjne, potencjał w terapii przeciwnowotworowej oraz zastosowanie w inżynierii biomateriałów. W literaturze wskazuje się ponadto, że nanocząstki funkcjonalizowane polifenolami wykazują większą stabilność koloidalną i zmniejszoną cytotoksyczność wobec komórek eukariotycznych w porównaniu z niemodyfikowanymi AgNPs, co czyni je szczególnie interesującym obszarem badań przedklinicznych [95]. Przykład praktycznego wykorzystania polifenoli w syntezie i stabilizacji nanocząstek srebra przedstawili Oliver i wsp., którzy badali rolę katechiny oraz jej pochodnych jako czynników redukujących i stabilizujących w procesie powstawania AgNPs [96]. Mechanizm redukcji opiera się na utlenianiu grup hydroksylowych pierścienia B katechiny, prowadzącym do powstania semichinonu i następnie chinonu, przy jednoczesnej redukcji jonów srebra (I) do srebra metalicznego (Ag^0) (Rysunek 11).



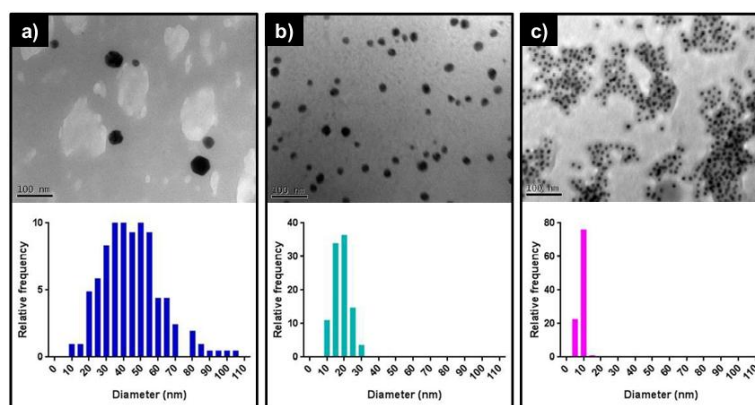
Rysunek 11. Redukcja azotanu (V) srebra do nanocząstek srebra przez katechinę [96].

W ten sposób katechina pełni podwójną funkcję – redukuje sól srebra oraz stabilizuje powstające NPs dzięki obecności licznych grup hydroksylowych. Autorzy porównali trzy stabilizatory: czystą katechinę, kompleks katechiny z boraksem (cat-borax) oraz polimeryzowaną formę katechiny (polycat) (Rysunek 12).



Rysunek 12. Reprezentatywne struktury trzech stabilizatorów (katechiny, cat-borax i polycat) wykorzystanych w syntezie nanocząstek srebra [96].

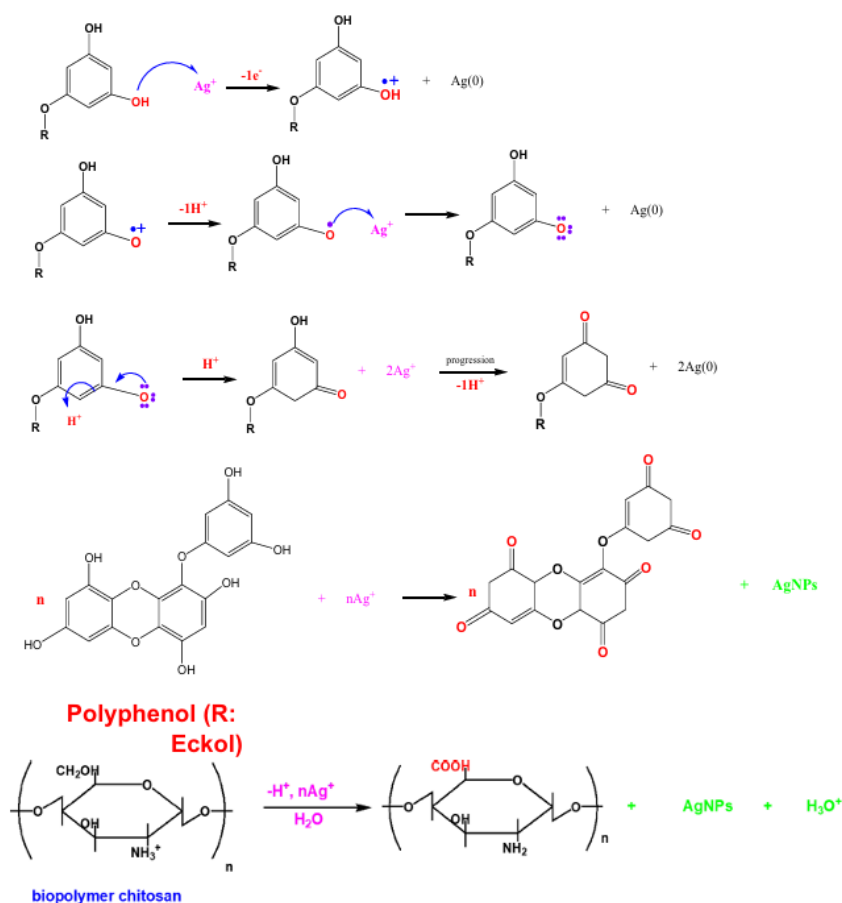
Analizy TEM wykazały, że rodzaj stabilizatora istotnie wpływa na rozmiar i morfologię uzyskanych nanocząstek. W przypadku zastosowania katechiny (cat@AgNPs) średnice cząstek mieściły się w zakresie 20–90 nm, przy czym rozkład wielkości był szeroki (Rysunek 13a). Zastosowanie kompleksu cat-borax (borax@AgNPs) pozwoliło na uzyskanie mniejszych i bardziej jednorodnych nanocząstek o średnicach głównie 10–30 nm (Rysunek 13b). Najlepszą kontrolę nad wielkością i dyspersyjnością uzyskano dla polimeryzowanej formy katechiny (polycat@AgNPs), gdzie średnice nanocząstek wynosiły ok. 10–15 nm, a histogram wskazywał na wyjątkowo wąski rozrzut wielkości (Rysunek 13c).



Rysunek 13. Obrazy TEM i histogramy rozkładu średnic dla cat@AgNPs (a), cat-borax@AgNPs (b) oraz polycat@AgNPs (c) [96].

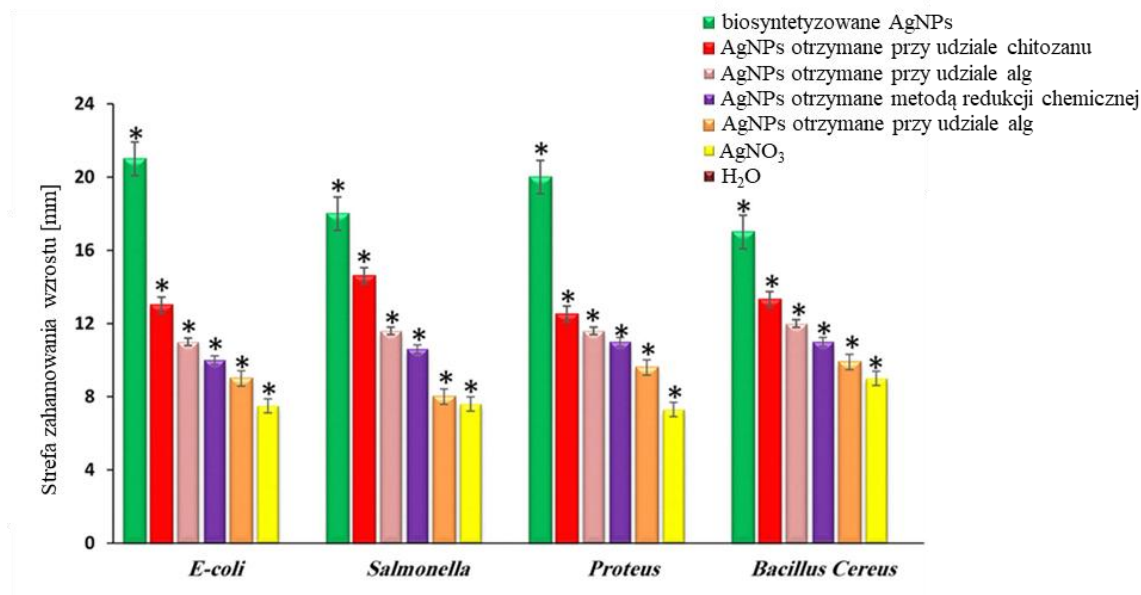
Badania te jasno pokazują, że chemiczna modyfikacja polifenoli może znacząco wpływać na właściwości powstających koniugatów AgNPs–polifenole. Dzięki różnym formom katechiny uzyskano cząstki o odmiennym rozkładzie wielkości i stabilności koloidalnej, co ma kluczowe

znaczenie dla potencjalnych zastosowań biomedycznych. Szczególnie interesujące jest to, że polimeryzacja katechiny prowadziła do formowania nanocząstek o bardzo jednorodnych rozmiarach, które uznaje się za pożądane w kontekście kontroli właściwości biologicznych i toksykologicznych [96]. W pracy Rezazadeh i wsp. nanocząstki srebra otrzymano metodą biosyntezy z wykorzystaniem ekstraktu z brunatnic, bogatego w polifenole, oraz chitozanu jako naturalnego biopolimeru [97]. Połączenie tych składników umożliwiło jednoczesną redukcję jonów srebra i stabilizację powstających nanocząstek. Autorzy zaproponowali mechanizm, w którym grupy hydroksylowe polifenoli odpowiadają za redukcję Ag^+ do Ag^0 , natomiast grupy aminowe chitozanu uczestniczą w stabilizacji powstałych cząstek, zapobiegając ich aglomeracji i nadając im wysoką stabilność koloidalną (Rysunek 14). Otrzymane AgNPs charakteryzowały się kulistą morfologią, średnią średnicą ok. 12 nm oraz wysoką stabilnością koloidalną (zeta potencjał -27 mV).



Rysunek 14. Proponowany mechanizm biosyntezy nanocząstek srebra (AgNPs) z udziałem polifenoli i chitozanu [96].

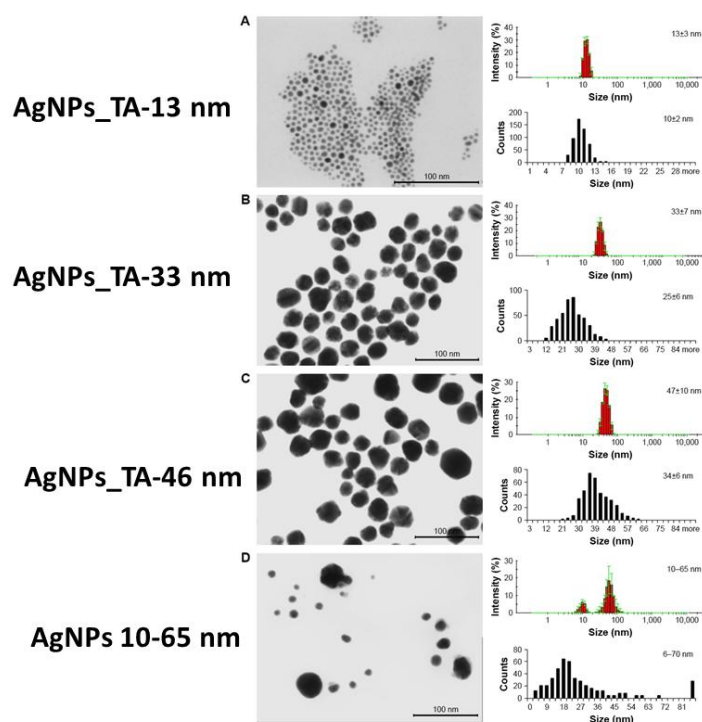
Testy biologiczne wykazały, że biofunkcjonalizowane AgNPs wykazywały silniejsze działanie przeciwdrobnoustrojowe w porównaniu z klasycznie syntetyzowanymi nanocząstkami, co szczególnie wyraźnie zaznaczyło się w przypadku bakterii Gram-ujemnych, takich jak *Escherichia coli* czy *Salmonella* (Rysunek 15).



Rysunek 15. Porównanie działania przeciwbakteryjnego nanocząstek srebra biosyntetyzowanych oraz syntetyzowanych chemicznie wobec różnych szczepów bakteryjnych [96].

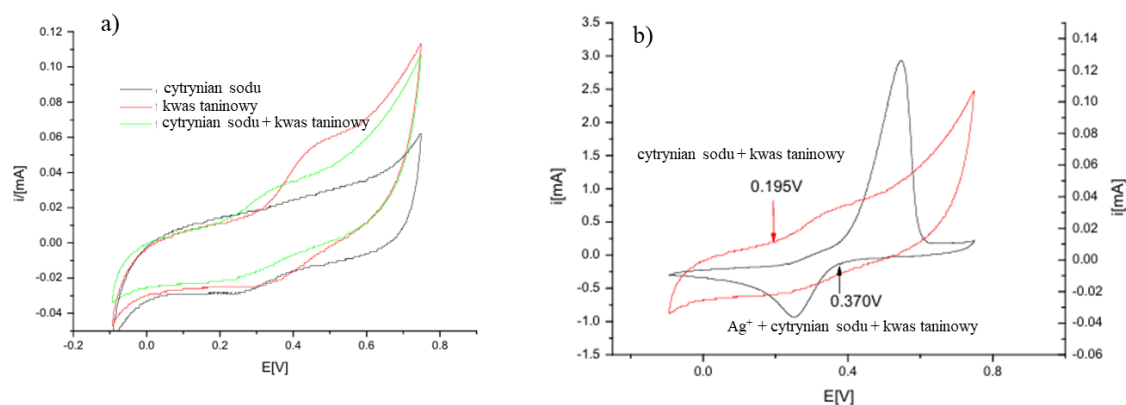
Autorzy podkreślili, że to właśnie synergiczne działanie chitozanu i polifenoli obecnych na powierzchni nanocząstek odpowiadało zarówno za zwiększoną stabilność układu, jak i za podwyższoną aktywność przeciwdrobnoustrojową koniugatów. Wyniki te potwierdzają, że łączenie polifenoli z biopolimerami może być skuteczną strategią w projektowaniu nanocząstek o zoptymalizowanych właściwościach biologicznych [97].

W jednej z prac [33] wykorzystano metodę redukcji chemicznej, w której prekursorem srebra był azotan(V) srebra, a czynnikami redukującymi i stabilizującymi – kwas taninowy oraz cytrynian sodu. Syntezę prowadzono zarówno w temperaturze pokojowej, jak i w 100 °C, co pozwoliło ocenić wpływ warunków na morfologię cząstek. Zastosowanie pojedynczego reduktora – cytrynianu sodu bądź kwasu taninowego – prowadziło do powstawania cząstek o szerokim rozrzucie wielkości i zróżnicowanej geometrii. Dopiero jednoczesne użycie obu reagentów umożliwiło otrzymanie jednorodnych, sferycznych nanocząstek srebra o średniej wielkości około 30 nm i wąskim rozkładzie rozmiarów, co jednoznacznie wskazuje na synergiczny charakter działania tych związków (Rysunek 16).



Rysunek 16. Histogramy DLS oraz obrazy STEM wraz z histogramami rozkładu wielkości nanocząstek srebra: (A) TAm-13, (B) TAm-33, (C) TAm-46 nm AgNPs oraz (D) UN 10–65 nm AgNPs. Skróty: TAm – nanocząstki srebra modyfikowane kwasem taninowym; UN – niemodyfikowane [33].

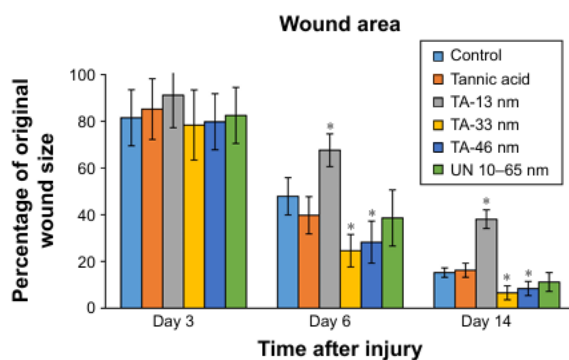
Znaczenie współdziałania cytrynianu sodu i kwasu taninowego w procesie redukcji jonów srebra potwierdziły badania woltamperometryczne (Rysunek 17). Analiza właściwości redoks poszczególnych składników wykazała, że cytrynian sodu charakteryzuje się bardzo ograniczonym potencjałem redukcyjnym, co przełożyło się na niski sygnał na krzywej woltamperometrycznej (Rysunek 17a, krzywa czarna). Kwas taninowy, dzięki obecności licznych grup fenolowych, generował wyraźny sygnał utleniania (Rysunek 17a, krzywa czerwona). Dopiero połączenie obu reagentów prowadziło do istotnej zmiany charakteru krzywej (Rysunek 17a, krzywa zielona), co wskazuje na synergiczne działanie i powstanie kompleksu TA–SC o korzystniejszych właściwościach redukujących niż każdy ze składników osobno.



Rysunek 17. Krzywe woltamperometryczne przedstawiające właściwości redoks cytrynianu sodu i kwasu taninowego. (a) Porównanie przebiegów dla cytrynianu sodu (czarny), kwasu taninowego (czerwony) oraz ich mieszaniny (zielony); (b) krzywe dla mieszaniny cytrynianu sodu i kwasu taninowego (czerwony) oraz układu zawierającego dodatkowo jony srebra (czarny) [33]

Jeszcze wyraźniej efekt ten widoczny był w obecności jonów srebra (Rysunek 17b). W układzie zawierającym jedynie mieszaninę cytrynianu i kwasu taninowego zarejestrowano sygnał utleniania przy potencjale ok. 0,195 V (krzywa czerwona). Po dodaniu jonów Ag^+ pojawił się dodatkowy sygnał redukcji srebra przy potencjale ok. 0,252 V (krzywa czarna), a natężenie prądu było wyraźnie wyższe niż w innych układach. Zestawienie tych wartości jednoznacznie potwierdza, że kompleks TA–SC ułatwia proces redukcji srebra i umożliwia jego spontaniczne zachodzenie już w temperaturze pokojowej.

W modelu gojenia ran u myszy porównano skuteczność TA–AgNPs o różnych rozmiarach (13, 33 i 46 nm), niemodyfikowanych AgNPs (10–65 nm), wolnego kwasu taninowego oraz grupy kontrolnej (Rysunek 18). Wyniki wykazały, że rozmiar nanocząstek miał kluczowe znaczenie dla ich aktywności biologicznej. W szóstym dniu po urazie proces gojenia był wyraźnie przyspieszony w przypadku TA–AgNPs o średnicach 33 i 46 nm, podczas gdy najmniejsze nanocząstki (13 nm) nie wspierały regeneracji, a wręcz opóźniały zamykanie rany względem kontroli. Po czternastu dniach najbardziej efektywne okazały się cząstki średniej wielkości (33–46 nm), które zmniejszały powierzchnię ran do około 10–20% wartości początkowej, przewyższając skutecznością zarówno niemodyfikowane AgNPs, jak i wolny kwas taninowy.



Rysunek 18. Wpływ nanocząstek srebra modyfikowanych kwasem taninowym na proces gojenia ran w modelu mysim. Zmniejszenie powierzchni rany (wyrażone jako % powierzchni początkowej) po 3, 6 i 14 dniach od zranienia [33].

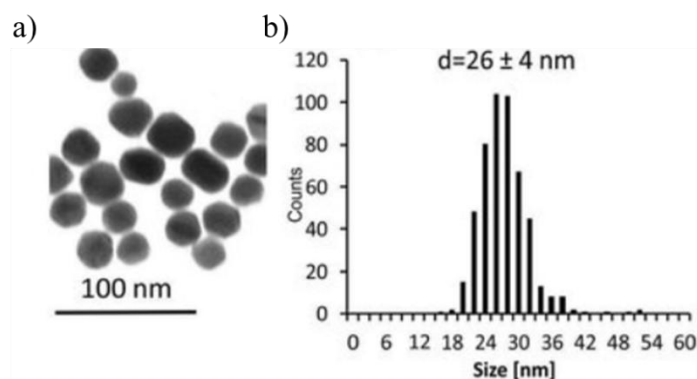
Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że koniugacja nanocząstek srebra z polifenolami, takimi jak kwas taninowy, nie tylko zwiększa stabilność i biogodność układu, ale także pozwala modulować jego aktywność biologiczną poprzez kontrolę rozmiaru cząstek. Badania te potwierdzają duży potencjał TA–AgNPs jako biomateriałów w terapii regeneracyjnej, zwłaszcza w leczeniu ran przewlekłych.

3. Metody charakterystyki nanocząstek funkcjonalnych

Charakterystyka nanocząstek funkcjonalnych wymaga zastosowania szerokiego wachlarza technik analitycznych, umożliwiających określenie ich właściwości fizykochemicznych i strukturalnych [98]. Dobór odpowiednich metod pozwala uzyskać informacje dotyczące m.in. rozmiaru i morfologii cząstek, struktury krystalicznej, stabilności koloidalnej oraz obecności i właściwości ligandów powierzchniowych. W badaniach nanomateriałów konieczne jest wykorzystanie metod komplementarnych, obejmujących zarówno techniki mikroskopowe wysokiej rozdzielczości, jak i metody spektroskopowe, dyfrakcyjne, dynamiczne, czy kolorymetryczne [99]. Ze względu na wielość technik umożliwiających szczegółową charakterystykę układów koloidalnych, w niniejszym rozdziale zostaną omówione najważniejsze techniki pod kątem owej pracy.

Metody mikroskopowe

Wśród dostępnych metod charakterystyki nanocząstek funkcjonalnych szczególne miejsce zajmują techniki mikroskopii elektronowej, które umożliwiają bezpośrednie obrazowanie cząstek z wysoką rozdzielczością. Najczęściej stosowane są transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM), skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM) oraz mikroskopia kriogeniczna TEM (cryo-TEM). TEM pozwala na precyzyjne określenie kształtu i rozmiaru pojedynczych nanocząstek oraz na opracowanie histogramów rozkładu wielkości w populacji, co czyni ją podstawowym narzędziem w analizie morfologicznej nanomateriałów metalicznych. SEM dostarcza informacji o topografii i rozmieszczeniu cząstek na powierzchni podłoża, a przy zastosowaniu detektorów elektronów wstecznie rozproszonych umożliwia również uzyskanie kontrastu zależnego od liczby atomowej pierwiastków. Z kolei cryo-TEM, stanowiąca rozwinięcie klasycznej mikroskopii transmisyjnej, pozwala na obrazowanie nanocząstek w ich naturalnym, uwodnionym stanie, minimalizując artefakty związane z preparatyką próbek. Zastosowanie tych metod w sposób komplementarny umożliwia pełną charakterystykę morfologii i struktury nanocząstek funkcjonalnych [100-101]. Przykładowy obraz HR-STEM (ang. *High-Resolution STEM*) nanocząstek srebra oraz histogram rozrzutu wielkości wokół wartości średniej przedstawiono na Rysunku 19.

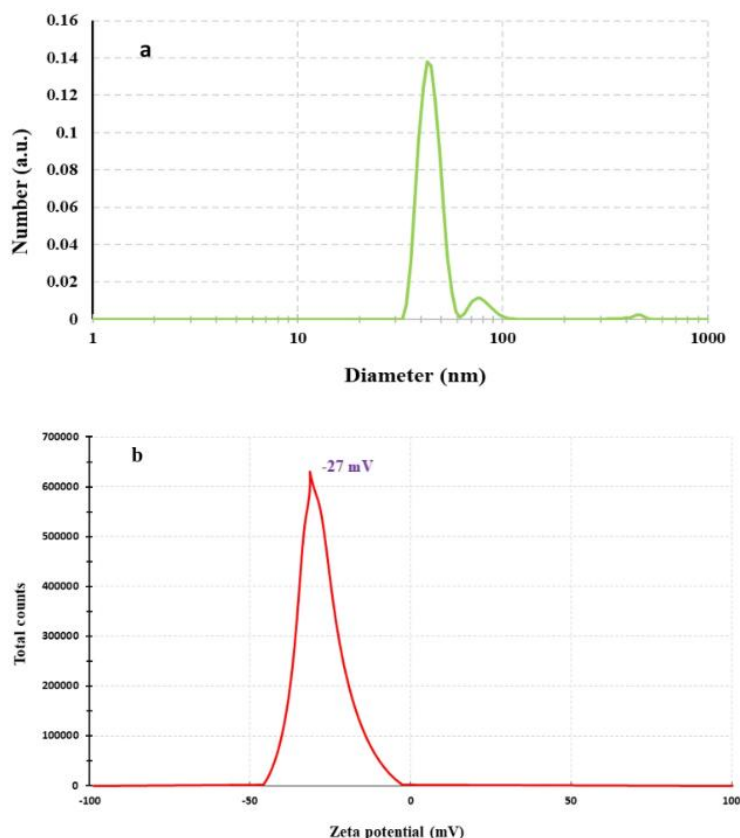


Rysunek 19. Obraz HR-STEM nanocząstek srebra (a) oraz histogram rozrzutu wielkości AgNPs wokół wartości średniej (b) [102].

Metody spektroskopowe

Pomiar potencjału zeta wraz z dynamicznym pomiarem rozproszenia światła

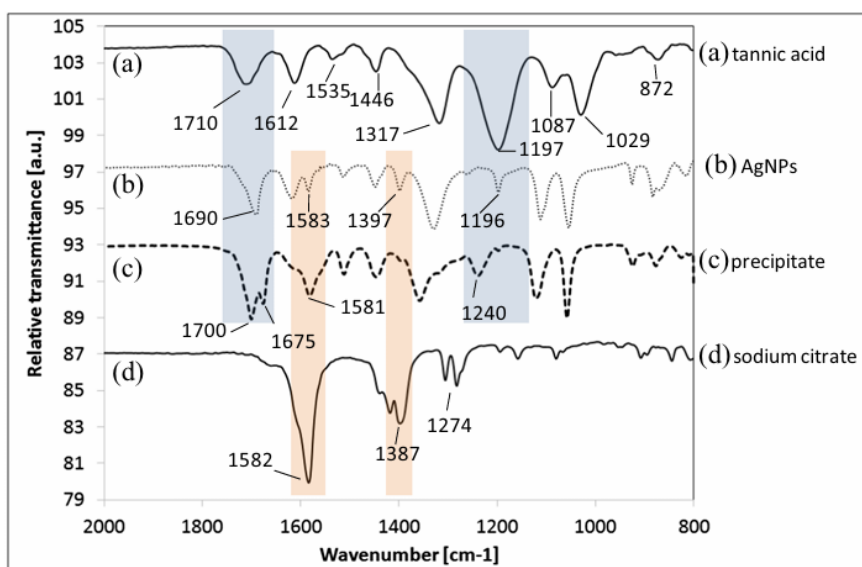
Dynamiczne rozpraszanie światła (ang. *Dynamic Light Scattering*, DLS) oraz pomiar potencjału zeta należą do podstawowych technik stosowanych w charakterystyce układów koloidalnych, w tym nanocząstek metalicznych funkcjonalizowanych związkami organicznymi. Obie metody są komplementarne – DLS dostarcza informacji o wielkości i rozkładzie rozmiarów cząstek, natomiast analiza potencjału zeta pozwala ocenić stabilność elektrostatyczną zawiesiny. Zasada metody DLS opiera się na analizie fluktuacji intensywności światła rozproszonego przez cząstki podlegające ruchom Browna w roztworze. Na tej podstawie wyznacza się współczynnik translacyjnej dyfuzji, a następnie – z równania Stokesa–Einsteina – oblicza się hydrodynamiczny promień cząstek. Otrzymany rozmiar obejmuje zarówno rdzeń nieorganiczny, jak i otaczającą go warstwę hydratacyjną oraz cząsteczki ligandów, co sprawia, że wartości wyznaczone metodą DLS są zwykle większe niż te uzyskane technikami mikroskopowymi. Istotnym parametrem charakteryzującym układ jest także wskaźnik polidispersyjności (PDI), który umożliwia ocenę jednorodności koloidu. Z kolei pomiar potencjału zeta opiera się z kolei na analizie ruchliwości elektroforetycznej cząstek w polu elektrycznym. Na tej podstawie oblicza się różnicę potencjału pomiędzy warstwą ściśle związaną z powierzchnią nanocząstki a granicą warstwy dyfuzyjnej. Wartość potencjału zeta odzwierciedla ładunek powierzchniowy cząstek i stanowi pośrednią miarę stabilności elektrostatycznej układu koloidalnego.[103, 104, 105]. Przykładowy wykres DLS (Rysunek 20a) oraz potencjału zeta (Rysunek 20b) przedstawiono poniżej.



Rysunek 20. Przykładowy zestaw wyników DLS (a) oraz pomiaru potencjału zeta (b) w koloidzie nanocząstek srebra [97].

Spektroskopia IR z transformacją Fouriera

Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR) jest jedną z najczęściej stosowanych metod analizy materiałów organicznych i nieorganicznych, pozwalającą na identyfikację charakterystycznych grup funkcyjnych w badanych próbkach. Podstawą tej techniki jest rejestracja widma drgań cząsteczkowych w zakresie średniej podczerwieni ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$), które odzwierciedlają obecność i charakter wiązań chemicznych. Dzięki temu możliwe jest określenie, jakie grupy funkcyjne występują w danym układzie koloidalnym oraz w jaki sposób mogą być zaangażowane w oddziaływania powierzchniowe nanocząstek [106]. W badaniach nanomateriałów FT-IR odgrywa szczególnie istotną rolę w analizie ligandów stabilizujących nanocząstki, takich jak polifenole, białka czy polisacharydy. Przykładowe widma przedstawiono na Rysunku 21.



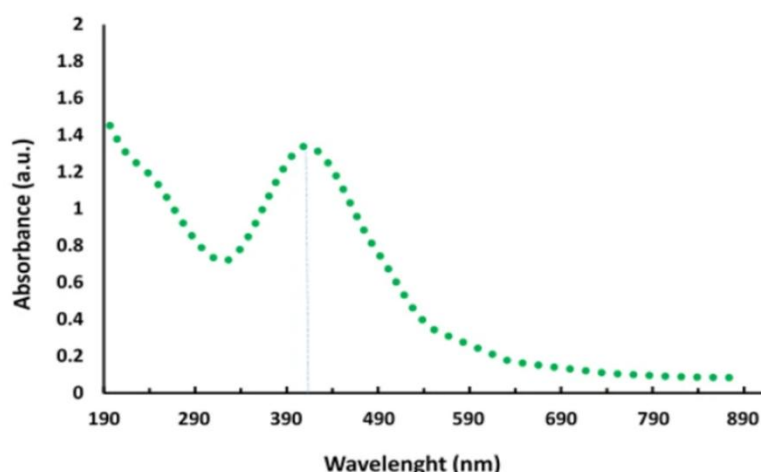
Rysunek 21. Widma FI-IR a) kwasu taninowego, b) nanocząstek srebra, c) wytrąconych kryształów oraz d) cytrynianu sodu [33].

Widma dostarczają informacji o obecności i zmianach pasm charakterystycznych, np. w obszarze $3200\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ (drżenia rozciągające O–H i N–H), $1600\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$ (wiązania C=C w pierścieniach aromatycznych, drżenia amidowe) czy $1000\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ (wiązania C–O w alkoholu i estrach). Porównanie widm uzyskanych dla substancji wyjściowych oraz dla nanocząstek funkcjonalizowanych pozwala jednoznacznie potwierdzić obecność określonych grup chemicznych w strukturze powierzchniowej [107–108]. Na praktyczną wartość FT-IR istotnie wpływa wybór odpowiedniego trybu pracy. W niniejszej rozprawie zastosowano trzy uzupełniające się akcesoria: przystawkę ATR z kryształem ZnSe, umożliwiającą analizę próbek w stanie rzeczywistym bez konieczności modyfikacji stężenia czy postaci próbki; przystawkę odbiciową EasyDiff, wykorzystywaną do badań proszków i cienkich warstw; oraz klasyczną metodę transmisyjną z wykorzystaniem pastylek KBr, pozwalającą uzyskać widma o wysokiej rozdzielczości. Takie podejście umożliwiało elastyczną analizę próbek o różnym charakterze i zapewniało wiarygodność uzyskanych wyników.

Wykorzystanie spektroskopii UV-vis

Spektroskopia w zakresie ultrafioletu i światła widzialnego (UV-Vis) należy do kluczowych metod służących do charakterystyki nanocząstek metalicznych, w tym nanocząstek srebra. Technika ta opiera się na analizie ekstynkcji promieniowania (suma absorpcji i rozpraszania) w funkcji długości fali, co pozwala uzyskać charakterystyczne widmo związane

z właściwościami optycznymi badanych układów [103]. W przypadku nanocząstek srebra szczególnie istotnym parametrem jest zjawisko rezonansu plazmonów powierzchniowych (ang. *Surface Plasmon Resonance*, SPR), które objawia się obecnością pasma absorpcyjnego w zakresie 350–500 nm. Położenie i kształt tego pasma zależy od rozmiaru, kształtu, stanu agregacji oraz otoczenia dielektrycznego nanocząstek. Dla małych, kulistych nanocząstek srebra maksimum SPR obserwuje się zazwyczaj w okolicach 400 nm, natomiast wzrost średnicy cząstek czy ich aglomeracja prowadzi do przesunięcia piku w stronę dłuższych fal (tzw. red shift) oraz jego poszerzenia [109]. Spektroskopia UV-Vis znajduje szerokie zastosowanie w monitorowaniu procesów powstawania i stabilności nanocząstek. W literaturze często opisuje się obserwowaną zmianę barwy roztworu w trakcie syntezy – od bladożółtej do ciemnobrązowej – która jest bezpośrednio związana z pojawieniem się i rozwojem pasma SPR. Pomiar spektroskopowy pozwala potwierdzić obecność nanocząstek w roztworze, a także na śledzenie ich stabilności i procesów agregacji w czasie [105-106]. Przykładowe widmo UV-Vis przedstawiono na Rysunku 22. Maksimum absorpcji dla nanocząstek srebra w tym przypadku wynosi $\lambda_{\max} = 425$ nm [97].



Rysunek 22. Widmo UV-Vis nanocząstek srebra przy maksimum absorpcji $\lambda_{\max} = 425$ nm [97].

Metody chromatograficzne

Chromatografia cienkowarstwowa

Chromatografia cienkowarstwowa (ang. thin-layer chromatography, TLC) jest powszechnie stosowaną techniką rozdzielania mieszanin związków organicznych, szeroko wykorzystywaną w badaniach nad polifenolami. Umożliwia zarówno analizę jakościową, jak i ilościową, a w zależności od konfiguracji (TLC klasyczna lub wysokosprawna HPTLC) zapewnia wysoką

rozdzielczość i powtarzalność oznaczeń [110-111]. Podstawowym materiałem nośnikowym są płytki pokryte żelem krzemionkowym, choć w przypadku bardziej specyficznych analiz stosuje się również inne adsorbenty, np. poliamidowe, szczególnie przydatne do rozdzielania katechin i teaflawin. Dobór fazy ruchomej, opartej zwykle na układach zawierających octan etylu, kwasy organiczne lub butanol, determinowany jest charakterem analizowanych metabolitów. Rozdzielone związki wizualizuje się w świetle UV lub po zastosowaniu odpowiednich odczynników barwiących, a w HPTLC możliwe jest dodatkowo ilościowe oznaczanie markerów z użyciem densytometrii [112-113].

Chromatografia cieczowa ze spektroskopią mas

Chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS) stanowi jedną z kluczowych technik w analizie złożonych układów polifenolowych, w tym tanin hydrolizujących i skondensowanych. Jej przewaga polega na połączeniu wysokiej zdolności rozdzielczej chromatografii cieczowej z możliwością jednoznaczej identyfikacji związków na podstawie stosunku masy do ładunku (m/z) uzyskiwanego w spektrometrii mas [98].

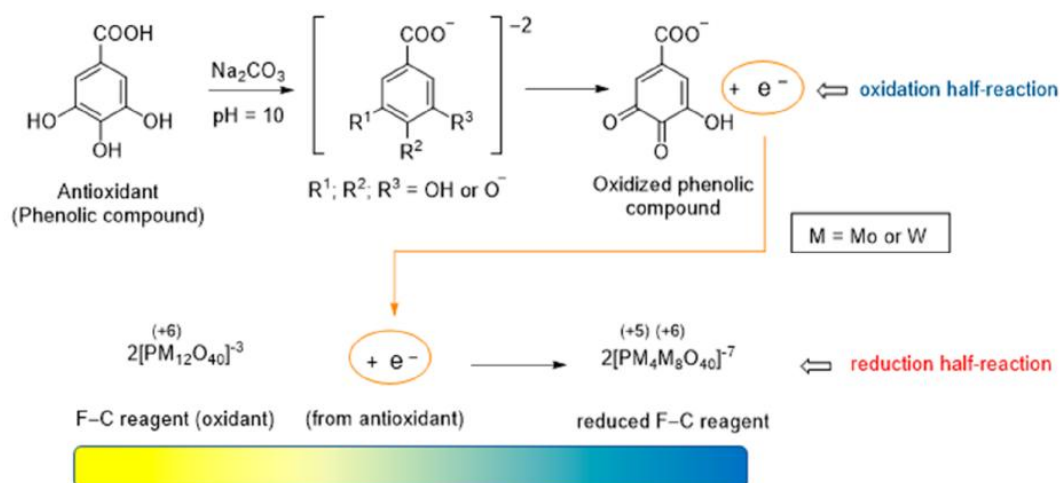
Badania Romani i wsp. [114] wykazały, że normalnofazowa (klasyczna polarna kolumna (np. krzemionkowa)) HPLC sprzężona z detektorem DAD (detektor z matrycą diodową) i MS (detektor oparty na pomiarze stosunku masy do ładunku (m/z)) jest szczególnie przydatna w analizie związków o wysokim stopniu polimeryzacji, takich jak procyanidyny z kory sosny nadmorskiej (*Pinus maritima* L.). Pozwala ona nie tylko na rozdział oligomerów (od dimerów do heptamerów), lecz także na ich scharakteryzowanie na podstawie jonów diagnostycznych $[M-H]^-$ i $[M-2H]^{2-}$. W przypadku kwasu taninowego (TA) metoda ta umożliwiła identyfikację estrów glukozy zawierających od trzech do siedmiu reszt kwasu galusowego. Dzięki temu można jednoznacznie różnicować taniny hydrolizujące od skondensowanych i określać ich udział w badanych ekstraktach.

W badaniach nad garbnikami dębowymi (*Quercus alba*, *Quercus robur*) zastosowanie HPLC-ESI-MS w trybie jonizacji ujemnej pozwoliło na identyfikację licznych estrów kwasu galusowego i elagowego (np. monogalloyl-, di- i trigalloylglukozy), a także bardziej złożonych struktur, takich jak kastalagina, wescalagina, grandinina czy roburina E. Uzupełnieniem analizy były skany fragmentacyjne (MS/MS), które pozwoliły określić charakterystyczne jony potomne i potwierdzić strukturę poszczególnych związków [115].

Przygotowanie próbek obejmuje zazwyczaj ekstrakcję wodno-etanolową, z dodatkiem kwasu mrówkowego lub fosforowego w celu stabilizacji analitów. W zależności od charakteru badanych związków stosuje się kolumny odwróconofazowe (C18) lub normalnofazowe (krzemionka), a elucja prowadzona jest w gradientach mieszanin woda–acetonitryl–kwas mrówkowy. W analizach tanin hydrolizujących (np. glukozydów kwasu galusowego) lepsze efekty uzyskuje się w odwróconej fazie, natomiast dla oligomerów proantocyjanidyn – w fazie normalnej. Spektrometria mas z jonizacją przez rozpylanie w polu elektrycznym (ESI) w trybie ujemnym umożliwia detekcję szerokiego spektrum jonów fenolowych. Typowe jony obserwowane dla tanin to m/z 169 (kwas galusowy), m/z 301 (kwas elagowy) czy m/z 483 (digalloylgłukoza). Analiza jonów fragmentacyjnych pozwala na określenie stopnia polimeryzacji i liczby reszt galusowych w cząsteczce [114, 115, 116].

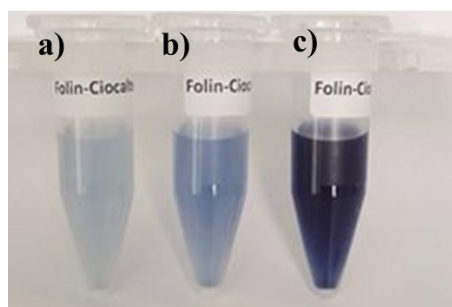
Metody kolorymetryczne - metoda Folina-Ciocalteu

Jedną z najczęściej stosowanych metod oznaczania całkowitej zawartości polifenoli w próbkach roślinnych, surowcach zielarskich, napojach i żywności jest metoda kolorymetryczna wykorzystująca odczynnik Folina-Ciocalteu (FC). Została ona po raz pierwszy opisana w 1927 roku przez Otto Folina oraz Vintilę Ciocalteu jako procedura służąca do oznaczania aminokwasów aromatycznych – tyrozyny i tryptofanu – w białkach [117]. Odczynnik Folina– Ciocalteu stanowi mieszaninę soli molibdenu i wolframu (molibdenianu sodu, wolframianu sodu), siarczanu litu, wody bromowej oraz stężonych kwasów mineralnych – fosforowego i solnego. Przygotowanie roztworu polega na rozpuszczeniu odpowiednich ilości uwodnionych soli molibdenu i wolframu w wodzie destylowanej, a następnie dodaniu stężonych kwasów. Powstałą mieszaninę ogrzewa się przez około 10 godzin pod chłodnicą zwrotną. Po częściowym schłodzeniu roztworu wprowadza się uwodniony siarczan litu. Ostateczny produkt ma postać klarownego, intensywnie żółtego roztworu [118]. Zasada metody opiera się na reakcji redoks zachodzącej w środowisku zasadowym. Jony molibdenu i wolframu, początkowo obecne na stopniu utlenienia +6, ulegają redukcji do formy +5 pod wpływem związków fenolowych, które pełnią rolę czynników redukujących. Równocześnie dochodzi do utlenienia grup hydroksylowych przyłączonych do pierścienia aromatycznego (Rysunek 23).



Rysunek 23. Schematyczne przedstawienie reakcji utlenienia kwasu galusowego odczynnikiem FC [119].

W wyniku tych przemian powstaje intensywnie niebieski kompleks typu $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)]^{4-}$, którego maksimum absorpcji obserwuje się w zakresie 620–760 nm [120-121]. W jednej z prac badano ekstrakt z liści brzozy, gdzie wykazano, że intensywność barwy kompleksu zależy od całkowitego stężenia polifenoli w badanej próbce (Rysunek 24) – im większa zawartość, tym kompleks stanowi ciemniejszą barwę [122].



Rysunek 24. Intensywność barwy kompleksu w zależności od całkowitego stężenia polifenoli w próbce badanej (ekstrakt z liści białej brzozy), gdzie a) najniższe stężenie polifenoli, b) średnie stężenie polifenoli, c) najwyższe stężenie polifenoli [122].

Metoda Folina–Ciocalteu, pomimo swojej prostoty, pozostaje jedną z najbardziej uniwersalnych technik pozwalających na ilościową ocenę całkowitej zawartości fenoli. Jej istotną zaletą jest możliwość zastosowania do szerokiego spektrum związków o zróżnicowanej budowie chemicznej, co czyni ją przydatnym narzędziem zarówno w badaniach podstawowych, jak i w analizach aplikacyjnych [122].

4. Uzasadnienie podjęcia tematyki badawczej

W dobie narastającej oporności patogenów na klasyczne terapie przeciwdrobnoustrojowe poszukiwanie alternatywnych strategii staje się jednym z priorytetów współczesnej nauki i medycyny. Światowa Organizacja Zdrowia uznaje antybiotykooporność za jedno z najpoważniejszych zagrożeń zdrowia publicznego XXI wieku, a liczba infekcji trudnych w leczeniu systematycznie rośnie. W tym kontekście nanotechnologia otwiera nowe możliwości, oferując materiały o unikalnych właściwościach fizykochemicznych i biologicznych. Wśród nich szczególne miejsce zajmują nanocząstki srebra, które wykazują szerokie spektrum aktywności biologicznej – od działania bakteriobójczego, przez przeciwwgrzybicze, po wirusobójcze. Ich skuteczność jest wynikiem kilku nakładających się mechanizmów: zdolności do penetracji i destabilizacji błon biologicznych, generowania reaktywnych form tlenu, interakcji z białkami i kwasami nukleinowymi oraz stopniowego uwalniania jonów srebra. Co istotne, mechanizmy te działają równocześnie i wielokierunkowo, co ogranicza możliwość wykształcenia klasycznej oporności bakteryjnej czy wirusowej. Jednak aktywność biologiczna AgNPs nie zależy wyłącznie od właściwości samego srebra. Kluczową rolę odgrywa chemiczne i strukturalne otoczenie nanocząstek, obejmujące ligandy stabilizujące powierzchnię nanocząstki oraz składniki środowiska koloidalnego. To właśnie ligandy decydują o stabilności układu, ładunku powierzchniowym i, w konsekwencji, o skuteczności bioaktywnej w środowisku biologicznym. Szczególne zainteresowanie wzbudza w tym kontekście kwas taninowy – naturalny polifenol o złożonej strukturze, licznych grupach hydroksylowych i udokumentowanej własnej aktywności przeciwdrobnoustrojowej. TA pełni rolę zarówno reduktora jonów srebra, jak i liganda funkcyjnego powierzchni NPs, tworząc hybrydowe układy organiczno–nieorganiczne. Dotychczasowe badania wykazały, że układy AgNPs modyfikowane TA charakteryzują się wysoką aktywnością wirusobójczą, m.in. wobec wirusa opryszczki pospolitej. Jednak większość prac koncentruje się na ocenie samego efektu biologicznego, pomijając szczegółową analizę przemian chemicznych, jakim podlega TA w środowisku koloidalnym. Tymczasem taniny są związkami dynamicznymi i podatnymi na transformacje. Mogą ulegać utlenianiu, hydrolizie, tworzeniu oligomerów czy polimerowych powłok na powierzchni nanocząstek. Procesy te prowadzą do zmian w składzie chemicznym koloidu, w strukturze powłoki powierzchniowej oraz o dostępności wolnych grup funkcyjnych. Zrozumienie tych przemian jest niezbędne do powiązania składu układu z jego aktywnością biologiczną i do świadomego projektowania nowych systemów terapeutycznych.

Brak szczegółowych badań nad charakterystyką chemiczną i przemianami kwasu taninowego w obecności nanocząstek srebra stanowi istotną lukę badawczą. Jej wypełnienie wymaga zastosowania zestawu wzajemnie uzupełniających się technik, obejmujących mikroskopię elektronową (TEM, SEM), metody dyspersyjne i elektrokinetyczne (DLS, pomiar potencjału zeta) oraz techniki spektroskopowe i analityczne (UV-Vis, FT-IR, TLC, FC, LC-MS). Pozwala to na jednoczesne monitorowanie zmian zachodzących zarówno w czasie kondycjonowania całego układu koloidalnego. Podjęcie tej problematyki ma znaczenie zarówno poznawcze, jak i aplikacyjne, gdyż umożliwia identyfikację czynników determinujących stabilność koloidu, właściwości fizykochemiczne i aktywność biologiczną układów TA–AgNPs. Uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę do dalszego projektowania nanomateriałów o kontrolowanych parametrach i świadomym wykorzystaniu ich w zastosowaniach biomedycznych.

Cel, teza oraz zakres pracy badawczej

Cel pracy:

Celem pracy doktorskiej było zbadanie przemian chemicznych kwasu taninowego w środowisku koloidalnym nanocząstek srebra oraz określenie ich wpływu na właściwości fizykochemiczne i biologiczne układu.

Teza pracy:

Kwas taninowy ulega przemianom w koloidach nanocząstek srebra wytwarzanych metodą redukcji chemicznej z wykorzystaniem cytrynianu sodu wpływając na aktywność biologiczną nanocząstek funkcjonalnych.

Zakres niniejszej pracy obejmował:

- Charakterystykę wyjściowych związków organicznych – kwasu taninowego i cytrynianu sodu – pod kątem ich właściwości fizykochemicznych istotnych w syntezie nanocząstek.
- Syntezę nanocząstek srebra metodą redukcji chemicznej w obecności kwasu taninowego i cytrynianu sodu, prowadzącą do uzyskania stabilnych koloidów o średnim rozmiarze rdzenia ok. 30 nm.
- Analizę morfologii i rozmiaru rdzenia otrzymanych nanocząstek przy użyciu technik mikroskopowych i rozpraszania światła oraz monitorowanie stabilności koloidów w czasie kondycjonowania (przechowywania)
- Dobór warunków chromatograficznych do analizy przemian kwasu taninowego oraz optymalizacja metody Folina-Ciocalteu do oznaczania całkowitego stężenia wolnych grup hydroksylowych TA w układach zawierających nanocząstki srebra oraz w układach bez obecności srebra
- Badanie przemian kwasu taninowego w układzie koloidalnym oraz w układach odpowiadającym warunkom syntezy bez obecności srebra (próbki odniesienia), z wykorzystaniem technik komplementarnych (SEM, DLS, FC, TLC, UV-Vis, LC-MS).

- Porównanie układu (AgNPs) z układami kontrolnymi zawierającymi TA i/lub cytrynian sodu w warunkach syntezy i przechowywania, w celu określenia roli srebra w przebiegu przemian chemicznych.
- Korelację uzyskanych danych fizykochemicznych z aktywnością biologiczną wobec wirusów HSV-1 i HSV-2, celem określenia, które elementy składu i przemian koloidu warunkują jego działanie wirusobójcze.

5. Materiały i metody

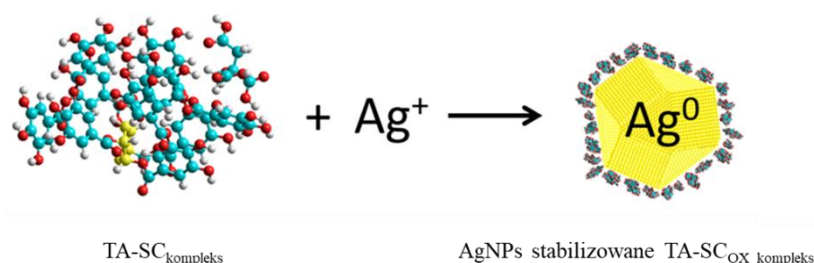
5.1. Spis odczynników i materiałów

Poniżej zestawiono listę wykorzystanych odczynników do realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej:

- azotan (V) srebra – AgNO_3 , Sigma-Aldrich, 99,9999%, CAS: 7761-88-8,
- kwas taninowy - $\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$, Fluka, CAS: 1401-55-4,
- cytrynian trisodu (dwuwodny) – $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich, $\geq 99,0\%$, CAS: 6132-04-3,
- woda dejonizowana (korzystano z dejonizatora Millipore Simplicity UV),
- aceton – $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$, Poch Basic, 99,5%, CAS: 67-64-1,
- octan etylu – $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$, Sigma-Aldrich, $\geq 99,9\%$, CAS: 141-78-6,
- toluen – $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$, Poch Basic, 99,5%, CAS: 108-88-3
- alkohol metylowy – CH_3OH , Chempur, CAS: 67-56-1,
- kwas mrówkowy – CH_2O_2 , Chempur, 85%, CAS: 64-18-6,
- odczynnik Folina-Ciocalteu, Sigma-Aldrich,
- węglan sodu jednowodny - $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich, CAS: 5968-11-6,
- jod krystaliczny, Chempur, CAS: 7553-56-2
- płytki do chromatografii cienkowarstwowej (TLC), Supelco, 60778-25EA.

5.2. Nanocząstki srebra otrzymane metodą redukcji chemicznej jako przedmiot badań

Metoda redukcji chemicznej należy do najczęściej stosowanych sposobów otrzymywania nanocząstek srebra (AgNPs), ze względu na swoją powtarzalność i możliwość kontrolowania parametrów fizykochemicznych produktu końcowego. W podejściu tym kluczową rolę odgrywają: prekursor jonów srebra, reduktor, który odpowiada za redukcję jonów srebra (Ag^+) do formy metalicznej (Ag^0) oraz stabilizator, zapobiegający aglomeracji powstających nanocząstek. Przebieg reakcji, a tym samym wielkość, kształt i rozkład rozmiarów nanocząstek, w dużej mierze zależy od zastosowanego układu reagentów oraz warunków prowadzenia syntezy: temperatury, czasu, pH i stężenia składników [123-124]. W niniejszej pracy wykorzystano metodę redukcji chemicznej z udziałem kompleksu tworzonego przez kwas taninowy i cytrynian sodu (TA-SC), którego rola została opisana w Rozdziale 2.3. Kwas taninowy, dzięki obecności licznych grup hydroksylowych, pełni funkcję reduktora jonów Ag^+ do Ag^0 , ulegając przy tym częściowej oksydacji do struktur chinonowych. Cytrynian sodu odpowiada natomiast za kompleksowanie jonów srebra oraz stabilność powstających nanocząstek [33]. Schematyczne przedstawienie otrzymywania nanocząstek srebra w obecności kompleksu TA-SC przedstawiono na Rysunku 25.



Rysunek 25. Schematyczne przedstawienie reakcji otrzymywania nanocząstek srebra w obecności kompleksu kwasu taninowego z cytrynianem sodu (TA-SC) metodą redukcji chemicznej [33].

Procedura syntezy nanocząstek srebra

Nanocząstki srebra o rozmiarze 30 nm otrzymano metodą redukcji chemicznej w roztworze wodnym. W Tabeli 1 przedstawiono ilości odczynników użytych do syntezy. Stosunek molowy reagentów wynosił 1:7:2 (azotan (V) srebra: cytrynian sodu: kwas taninowy).

Tabela 1. Ilości reagentów użytych do syntezy nanocząstek srebra.

Reagent	Stężenie roztworu [%]	Masa użyta [g]
Azotan (V) srebra AgNO_3	1,0	1,574
Kwas taninowy $\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$	5	0,630
Cytrynian sodu $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	4	4,181
Woda dejonizowana H_2O	-	95,613

Przebieg procesu wytwarzania nanocząstek: do kolby stożkowej o pojemności 250 ml dodano 1,574 g wcześniej przygotowanego roztworu azotanu (V) srebra (AgNO_3 , 1%), a następnie 95,613 g wody dejonizowanej. Otrzymaną mieszaninę ogrzewano do wrzenia na mieszadle magnetycznym z funkcją grzania, stosując chłodnicę zwrotną. Równolegle przygotowano roztwór kwasu taninowego (TA, 5%) oraz cytrynianu sodu ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 4%), a następnie odmierzone do jednej probówki 0,630 g roztworu TA i 4,181 g roztworu cytrynianu sodu i wstawiono do łaźni wodnej na ok. 5 minut (80°C). Po doprowadzeniu roztworu azotanu (V) srebra do wrzenia natychmiast dodano mieszaninę kwasu taninowego i cytrynianu sodu do mieszaniny reakcyjnej. Po kilku sekundach od wprowadzenia reagentów roztwór zmienił barwę herbacianą, co świadczyło o redukcji jonów Ag^+ i formowaniu się nanocząstek srebra. Reakcję prowadzono przez 15 minut w temperaturze wrzenia, ciągle mieszając, zapewniając jednorodne rozproszenie ciepła w mieszaninie reakcyjnej. Po zakończeniu syntezy koloid miał postać jednorodnej, herbacianej mieszaniny (Rysunek 26). Otrzymany układ pozostawiono do schłodzenia do temperatury pokojowej i przechowywano w miejscu bez dostępu światła.



Rysunek 26. Zdjęcie koloidu nanocząstek srebra po procesie syntezy.

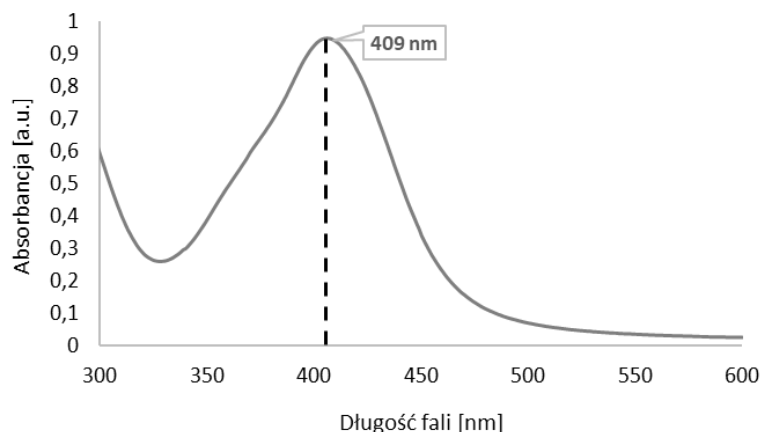
Tak przygotowany koloid nanocząstek srebra poddano dalszej analizie pod kątem stabilności, wielkości cząstek, potencjału zeta oraz składu chemicznego środowiska koloidalnego otaczającego nanocząstki z wykorzystaniem technik: SEM, DLS, FT-IR, FC, TLC, UV-Vis, LC-MS. Wyniki tych badań przedstawiono w kolejnych rozdziałach.

5.3. Metody charakterystyki wykorzystane w pracy

W celu charakterystyki układów koloidalnych zawierających nanocząstki srebra wytwarzane z udziałem kwasu taninowego i cytrynianu sodu zastosowano zestaw metod i technik analitycznych, które opisują zarówno rdzeń metaliczny nanocząstek oraz związki obecne w fazie ciekłej. Analizie poddano: (i) kształt i wielkość rdzenia nanocząstek, a także wytrącone krystality (mikroskopia elektronowa), (ii) średnicę hydrodynamiczną i rozkład wielkości oraz ładunek powierzchniowy/potencjał zeta (DLS), (iii) właściwości optyczne związane z pasmem plazmonowym (UV-Vis), (iv) grupy funkcyjne i oddziaływania ligand-metal oraz zmiany w czasie (FT-IR), (v) jakościowy profil związków fenolowych oraz ich przemiany (TLC) oraz (vi) całkowitą zawartość wolnych grup hydroksylowych (metoda Folina-Ciocalteu).

Kształt oraz rozmiar otrzymanych nanocząstek srebra analizowano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego Nova NanoSEM 450 (FEI), wyposażonego w detektor STEM II, pracującego w trybie elektronów przechodzących przy napięciu przyspieszającym 30 kV. Próbkę NPs przygotowywano poprzez naniesienie kropli koloidu na podłoże węglowe umieszczone na miedzianych siatkach (Rysunek 27a), a następnie





Rysunek 28. Widmo UV-Vis nanocząstek srebra.

Średnicę hydrodynamiczną oraz rozkład wielkości cząstek wyznaczano metodą dynamicznego rozpraszania światła z użyciem Litesizer™ 500 firmy Anton Paar. Pomiar prowadzono w temperaturze 25 °C, w kuwetach kwarcowych (1 cm). Parametry optyczno-reologiczne użyte w obliczeniach: materiał (cząstki): srebro, rozpuszczalnik: woda, średni współczynnik załamania światła rozpuszczalnika wynosił 1,330267, lepkość = 0,00089 Pa·s. Dla każdej próbki wykonywano serię niezależnych oznaczeń. Opracowanie danych prowadzono w oprogramowaniu Kalliope Anton Paar; raportowano średnicę hydrodynamiczną oraz rozrzut wielkości. Potencjał elektrokinetyczny określano metodą elektroforetycznego rozpraszania światła na Litesizer™ 500 (Anton Paar), w kuvecie typu Omega, w temperaturze 25 °C. Urządzenie rejestrowało liczbę przebiegów przetworzonych dla każdego pomiaru (np. 300) oraz parametry wspomagające. Wyniki przedstawiano jako średni potencjał zeta wraz z odchyleniem standardowym.

Pomiary uzyskanych widm FT-IR koloidów NPs oraz próbek odniesienia prowadzono w zakresie 4000–400 cm⁻¹ za pomocą spektrofotometru Nicolet iS50 firmy Thermo Scientific, wyposażonego w detektor MCT (ang. *Mercury Cadmium Telluride*), umożliwiającego rejestrację pasm absorpcyjnych w zakresie średniej podczerwieni. W badaniach zastosowano dwie techniki pomiarowe. Pierwsza z nich - spektroskopia w trybie odbiciowym z użyciem pastylek KBr (Easydiff KBr) – próbki odnośników (np. kwasu elagowego, galusowego, taninowego) oraz wytrąconych krystalitów przygotowano poprzez utarcie proszku/osadu w moździerzu agatowym wraz z bromkiem potasu (KBr), a następnie umieszczano w formach (kubkach) pomiarowych. Rejestrację prowadzono w trybie odbiciowym względem tła KBr.

Natomiast druga metoda - spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia (ang. *Attenuated Total Reflectance*, ATR) – zastosowano przystawkę ATR z kryształem z selenku cynku (ZnSe), przy kącie padania promieniowania równym 40°. Metoda ta umożliwiła bezpośrednią analizę koloidów nanocząstek srebra oraz mieszanin kwasu taninowego z cytrynianem sodu (TA–CA) w stanie ciekłym, bez konieczności ich suszenia. Pozwoliło to na zachowanie rzeczywistych warunków fizykochemicznych próbek, takich jak pH, stężenie i temperatura.

Chromatografia cienkowarstwowa została zastosowana w celu jakościowej analizy przemian związków fenolowych obecnych w układach zawierających kwas taninowy, cytrynian sodu oraz nanocząstki srebra. Technika ta umożliwia szybkie rozdzielanie mieszanin wieloskładnikowych oraz porównanie profili badanych próbek względem próbek odniesienia. Do analiz zastosowano płytki chromatograficzne pokryte żelem krzemionkowym z fluorescencyjnym wskaźnikiem przy 254 nm (Silica Gel 60 F254, Supelco). Na linii startu nanoszono 3 µL próbki przy użyciu skalibrowanej pipety automatycznej o zmiennej objętości. Po aplikacji krople pozostawiano do całkowitego wyschnięcia w temperaturze pokojowej, a następnie płytki dodatkowo suszono w próżni w celu usunięcia pozostałości rozpuszczalników przed rozwijaniem chromatogramów. Komorę chromatograficzną nasycano parami fazy ruchomej przez około 15 minut w celu zapewnienia stabilnych i powtarzalnych warunków rozdzielania. Do rozwijania zastosowano dwa układy rozpuszczalników: toluen : aceton : kwas mrówkowy (3:3:1, v/v/v) – faza F1 oraz toluen : octan etylu : kwas mrówkowy (5:5:1, v/v/v) – faza F2.

Badania z wykorzystaniem chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS) przeprowadzono we współpracy z Polską Akademią Nauk w Łodzi, z zastosowaniem aparatu Waters Synapt G2-Si. Rozdział prowadzono na kolumnie odwróconofazowej typu C8, stosując gradient oparty na mieszaninie wody i metanolu. Zastosowane warunki umożliwiły efektywne rozdzielenie związków o zróżnicowanej polarności oraz śledzenie jakościowych zmian w badanych układach.

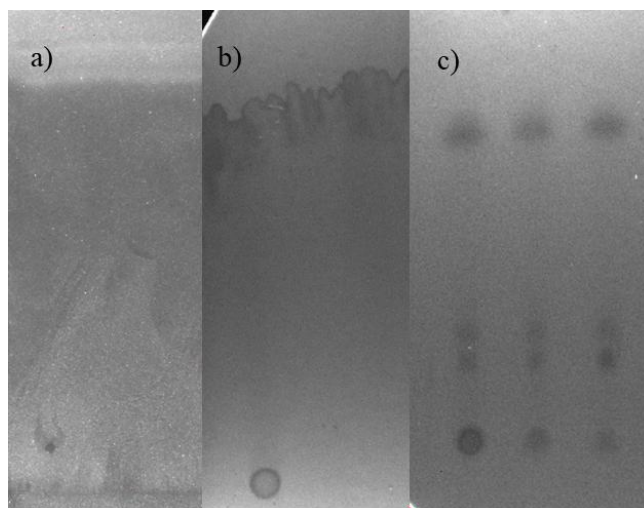
Badania aktywności wirusobójczej przeprowadzono we współpracy z Wojskowym Instytutem Higieny i Epidemiologii im. gen. Karola Kaczkowskiego w Warszawie w ramach projektu badawczego NCN-OPUS (2018/31B/NZ6/02606). Testy prowadzono z wykorzystaniem laboratoryjnych szczepów *herpes simplex virus* typu 1 (HSV-1, szczep McKrae) oraz typu 2 (HSV-2, szczep 333), namnażanych w hodowlach komórkowych linii Vero. W badaniach *in vitro* oceniano zdolność nanocząstek srebra do ograniczania zakaźności wirusa w klasycznym teście tworzenia plaków (plaque assay). W tym celu wirusy inkubowano

z zawiesiną nanocząstek przez określony czas, a następnie nanoszono na monowarstwy komórek Vero. Po okresie adsorpcji usuwano nadmiar wirusa, a hodowle przykrywano pożywką zawierającą warstwę półstałą. Po inkubacji prowadzono barwienie i zliczanie powstałych ognisk cytopatycznych (plaków), co umożliwiło określenie stopnia zahamowania infekcji w obecności badanych układów koloidalnych.

6. Dobór warunków chromatograficznych do analizy przemian kwasu taninowego

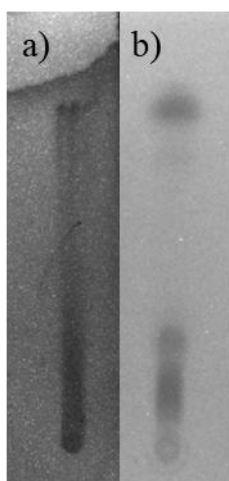
W niniejszych badaniach konieczność optymalizacji metody chromatografii cienkowarstwowej wynikała z kilku czynników: stosowania niskich stężeń próbek (rzędu ppm), wysokiego podobieństwa strukturalnego pomiędzy analizowanymi związkami fenolowymi oraz możliwości zachodzenia przemian prowadzących do powstawania produktów o zbliżonych strukturach. W tych warunkach standardowe procedury TLC okazały się niewystarczające, dlatego podjęto próbę opracowania zestawu warunków umożliwiających uzyskanie powtarzalnych i jednoznacznych chromatogramów. Proces optymalizacji obejmował zarówno dobór odpowiedniego rodzaju płytek chromatograficznych i faz ruchomych, jak i określenie zestawu próbek odniesienia, które stanowiły punkt porównawczy dla dalszych analiz. Chociaż metoda TLC jest powszechnie znana do separacji związków organicznych, w literaturze brak jest ugruntowanych procedur prowadzenia analiz TLC dla układów koloidalnych zawierających nanocząstki srebra, stąd konieczność dostosowania warunków eksperymentalnych do specyfiki badanego materiału.

Do testów wybrano trzy różne rodzaje płytek (Rysunek 29): RP-18 (ang. *reversed phase*), celulozowe oraz pokryte żel krzemionkowym (Silica Gel 60). Każdy z tych sorbentów reprezentuje odmienne właściwości powierzchniowe – RP-18 charakteryzuje się hydrofobową fazą odwróconą, celuloza stanowi przykład sorbentu polarnego o charakterze węglowodanowym, natomiast żel krzemionkowy to klasyczny sorbent polarny oparty na grupach $-Si-OH$. Porównanie tych płytek pozwoliło ocenić wpływ charakteru fazy stacjonarnej na rozdział związków fenolowych w badanych układach. Na trzech płytkach rozwijano tą samą próbkę, w celu porównania efektów wizualnych i rozdziału mieszaniny. Próbką testową był koloid nanocząstek srebra otrzymany w obecności kwasu taninowego i cytrynianu sodu. Najlepsze rezultaty uzyskano dla płytek pokrytych żel krzemionkowym (Rysunek 29c) z fluorescencyjnym wskaźnikiem (Silica Gel 60 F254), które wykazywały wysoką czułość w detekcji UV (254 nm), dobrą powtarzalność rozdziału oraz równomierne rozwijanie fazy stacjonarnej (w porównaniu do płytek a i c na Rysunku 29), co istotnie ułatwiało interpretację chromatogramów.



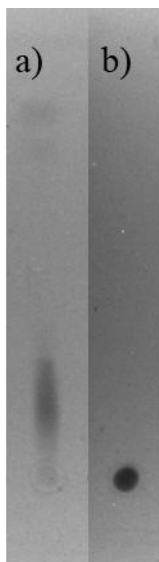
Rysunek 29. Płytki TLC: a) hydrofobowe płytki RP-18 z fazą odwróconą, b) płytki pokryte celulozą oraz c) płytki pokryte żelalem krzemionkowym.

Na podstawie analizy literatury [111, 112, 113] oraz wstępnych badań własnych, wyselekcjonowano układy trójskładnikowe z udziałem: toluenu, acetonu lub octanu etylu oraz kwasu mrówkowego. Dodatek składnika o odczynie kwaśnym był konieczny, ponieważ poprawiał ostrość sygnałów (Rysunek 30b) i ograniczał oddziaływania grup hydroksylowych z sorbentem krzemionkowym, co zwiększało efektywność rozdzielania w stosunku do płytki bez składnika o odczynie kwaśnym (Rysunek 30a). Na Rysunku 30 przedstawiono wybraną płytkę TLC bez składnika o odczynie kwaśnym (a) oraz ze składnikiem o odczynie kwaśnym (b).



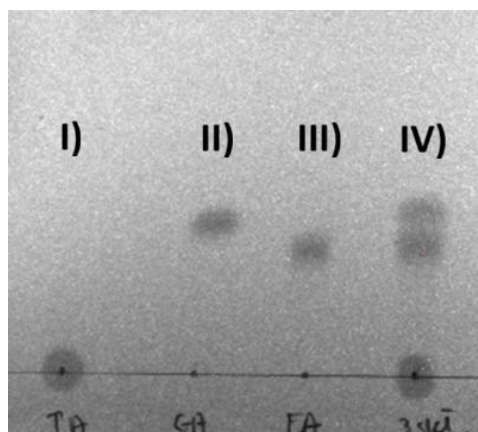
Rysunek 30. Płytki TLC z przykładową fazą ruchomą bez składnika o odczynie kwaśnym (a) oraz ze składnikiem o odczynie kwaśnym (b).

Zastosowanie fazy ruchomej F1 toluen : aceton : kwas mrówkowy (3:3:1, v/v/v) powodowało migrację kwasu taninowego z linii startu (Rysunek 31a). Natomiast przy użyciu fazy F2 toluen : octan etylu : kwas mrówkowy (5:5:1, v/v/v) zaobserwowano, że kwas taninowy pozostawał na linii startu (Rysunek 31b).



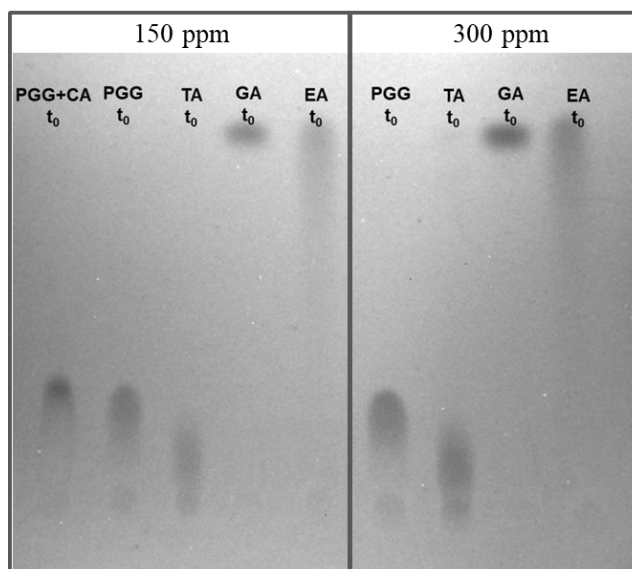
Rysunek 31. Płytki TLC z wykorzystaniem: a) fazy ruchomej F1 oraz b) fazy ruchomej F2.

Kolejnym etapem było wyselekcjonowanie związków o budowie zbliżonej do kwasu taninowego, a jednocześnie dostępnych komercyjnie, ponieważ nie wszystkie związki pochodzenia naturalnego posiadają wzorce analityczne. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi [125] kwas taninowy może ulegać przemianom prowadzącym do powstania kwasu galusowego i kwasu elagowego. W związku z tym, oprócz kwasu taninowego, do badań włączono również te związki jako próbki odniesienia, aby możliwe było śledzenie potencjalnych przemian w analizowanych układach. W tych warunkach możliwe było uzyskanie wyraźnej separacji pomiędzy kwasem galusowym (GA), kwasem elagowym (EA) oraz kwasem taninowym (TA) – przedstawione na Rysunku 32, co miało kluczowe znaczenie dla dalszych analiz. W analizach wykorzystano zestaw próbek odniesienia przygotowanych w stężeniu 150 ppm. Ze względu na ograniczoną rozpuszczalność kwasu elagowego, który nie tworzył klarownych roztworów wodnych nawet przy stężeniu 1 ppm, próbki tego związku przygotowywano w metanolu. Na Rysunku 26 przedstawiono przykład chromatogramu dla GA, EA i TA oraz ich mieszaniny, uzyskany w optymalnych warunkach rozdzielania.



Rysunek 32. Chromatogram próbek odniesienia: I) kwas taninowy (TA), II) kwas galusowy (GA), III) kwas elagowy (EA) oraz (IV) ich mieszanina (3 składniki, 150 ppm), rozwinięty w układzie fazy ruchomej toluen : octan etylu : kwas mrówkowy (5:5:1, v/v/v).

W ramach optymalizacji warunków chromatografii cienkowarstwowej przygotowano matrycę próbek odniesienia (Rysunek 33) w czasie t_0 obejmującą związki fenolowe istotne z punktu widzenia dalszych badań. Do zestawu włączono: 1,2,3,4,6-penta-O-galloilo- β -D-glukoza (PGG), mieszaninę PGG z cytrynianem sodu (PGG+CA), kwas taninowy (TA), kwas galusowy (GA) oraz kwas elagowy (EA). Roztwory próbek przygotowywano w stężeniu 150 ppm, co stanowiło kompromis pomiędzy czułością detekcji a stabilnością roztworów. Dodatkowo, w wybranych przypadkach nanoszono na linię startu podwójną objętość ($2 \times 3 \mu\text{L}$), co odpowiadało efektywnemu stężeniu około 300 ppm i pozwalało ocenić wpływ ilości naniesionej substancji na intensywność sygnałów.

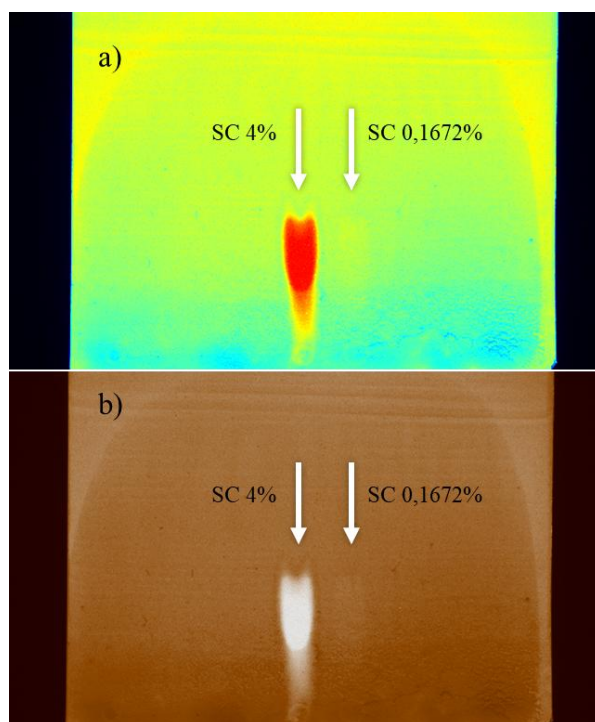


Rysunek 33. Matryca próbek odniesienia: PGG+CA (1,2,3,4,6-penta-O-galloilo- β -D-glukoza z cytrynianem sodu), PGG (1,2,3,4,6-penta-O-galloilo- β -D-glukoza), TA (kwas taninowy), GA (kwas galusowy) oraz EA (kwas elagowy) w stężeniu 150 ppm; po prawej stronie powtórzone próby PGG, TA, GA i EA w podwójnym nakropleniu (≈ 300 ppm). Chromatogram rozwinięty w układzie fazy ruchomej F1 (toluen : aceton : kwas mrówkowy, 3:3:1, v/v/v).

Analiza chromatogramów wykazała, że GA i EA w fazie F1 migrują w bardzo zbliżonym zakresie wysokości, co utrudnia ich jednoznaczne rozróżnienie. Ponadto sygnały odpowiadające EA miały tendencję do smużenia, co wskazuje na jego ograniczoną kompatybilność z wybraną fazą ruchomą. W przypadku TA, jako związku o największej masie cząsteczkowej w zestawie, obserwowano częściowe pozostawienie sygnału na linii startu w określonych warunkach rozwijania. W niniejszych badaniach nie obliczano wartości współczynników retencji (R_f), gdyż analiza miała charakter jakościowy. Głównym celem było uchwycenie obecności i względnych różnic w migracji poszczególnych związków, a nie ilościowa ocena ich mobilności. Interpretacja chromatogramów opierała się zatem na porównaniu położenia oraz intensywności sygnałów względem matrycy próbek odniesienia, co było wystarczające dla oceny przemian zachodzących w badanych układach.

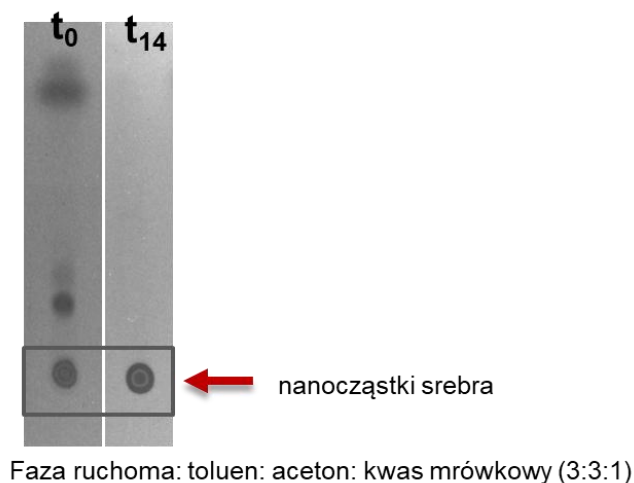
W celu pełnej oceny wszystkich składników układu konieczne było zastosowanie różnych metod wizualizacji chromatogramów. Podstawową techniką detekcji była obserwacja w świetle UV przy długości fali 254 nm, umożliwiającą szybką identyfikację związków fenolowych. W niektórych przypadkach stosowano dodatkowo ekspozycję płytek na opary jodu, co pozwalało potwierdzić/wykluczyć obecność związków organicznych niewykazujących wyraźnej fluorescencji. Nie wszystkie składniki były jednak widoczne przy

użyciu tych standardowych procedur. Cytrynian sodu nie dawał sygnału ani w świetle UV, ani po wywołaniu jodem, dlatego jego detekcja wymagała zastosowania roztworu nadmanganianu potasu (NaMnO_4). W celu poprawy kontrastu i jakości obrazu sygnałów wykorzystano dodatkowo program Image Lab, umożliwiający analizę w różnych trybach wizualizacji. Do badań przygotowano dwie próbki cytrynianu sodu w różnych stężeniach: 4% oraz 0,1672%. Roztwór 4% odpowiadał stężeniu cytrynianu stosowanemu w procesie syntezy nanocząstek srebra, natomiast stężenie 0,1672% zostało dobrane tak, aby odzwierciedlało warunki występujące w badanych układach koloidalnych. Dzięki temu możliwe było zarówno potwierdzenie obecności cytrynianu w próbce o wysokim stężeniu, jak i ocena czułości detekcji w zakresie odpowiadającym rzeczywistym układom. Na Rysunku 34 przedstawiono przykład chromatogramu cytrynianu sodu uzyskanego przy obu stężeniach. Sygnały różniły się intensywnością, przy czym ich położenie pozostawało niezmienione, co potwierdza specyficzność zastosowanej metody wywoływania.



Rysunek 34. Zdjęcie płytki TLC cytrynianu sodu (SC) o stężeniu 4% oraz 0,1672% po wywołaniu nadmanganianem potasu (NaMnO_4) i analizie obrazu w programie Image Lab (a) – odwzorowanie kolorystyczne intensywności, b) – obraz w skali odwróconej).

W odróżnieniu od związków odniesienia, nanocząstki srebra pozostawały na linii startu niezależnie od zastosowanej fazy ruchomej (Rysunek 35). Brak migracji wskazuje na istotne ograniczenia ich mobilności w żelu krzemionkowym, wynikające najprawdopodobniej z dużego rozmiaru i charakteru koloidalnego cząstek, które nie mogą przemieszczać się w porowatej strukturze sorbentu.



Rysunek 35. Zdjęcie płytki TLC nanocząstek srebra w czasie przechowywania (t_0 oraz t_{14}). Sygnały pochodzące od nanocząstek pozostają na linii startu niezależnie od warunków rozwijania i czasu kondycjonowania.

Takie zachowanie nanocząstek na płytkach TLC okazało się jednak korzystne z punktu widzenia analizy porównawczej. Umożliwiało bowiem jednoznaczne rozróżnienie sygnałów pochodzących od samych nanocząstek (pozycja startowa) oraz od produktów przemian zachodzących w ich otocze organicznej, które w czasie inkubacji układów migrowały z różną szybkością w zależności od zastosowanej fazy ruchomej. Dzięki temu TLC stała się narzędziem nie tylko do identyfikacji podstawowych składników matrycy, lecz także do monitorowania dynamiki przemian jakościowych w badanych układach koloidalnych. Należy jednak podkreślić, że w przypadku złożonych układów polifenolowych współczynnik retencji / migracji (ang. *retardation factor*, R_f) nie zawsze pozwala na jednoznaczną identyfikację poszczególnych związków, dlatego TLC pełni głównie rolę metody wstępnej, którą należy uzupełniać bardziej precyzyjnymi technikami, takimi jak UV-Vis, metoda Folina-Ciocalteu czy LC-MS.

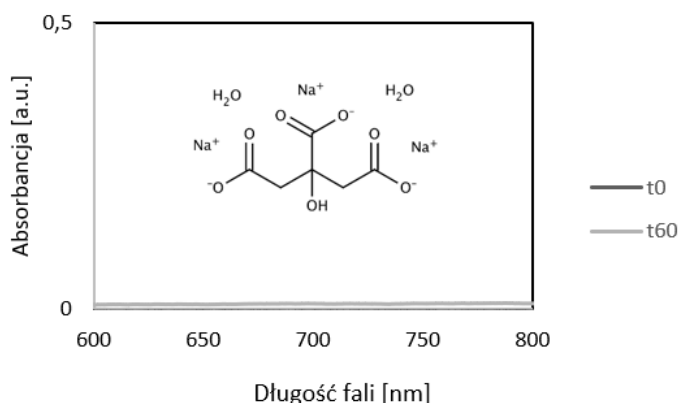
7. Optymalizacja metody Folina-Ciocalteu do oznaczania całkowitego stężenia wolnych grup hydroksylowych w koloidzie nanocząstek srebra

W celu monitorowania przemian kwasu taninowego w badanych układach konieczne było dostosowanie warunków metody Folina–Ciocalteu do koloidu nanocząstek srebra. Technika ta jest powszechnie stosowana do oznaczania całkowitej zawartości polifenoli (jak opisano w Rozdziale 3). Podstawowym standardem odniesienia w tej metodzie jest kwas galusowy, stanowiący jednostkę strukturalną kwasu taninowego, a zarazem jedną z jego dziesięciu cząsteczek. Związek ten charakteryzuje się wysoką reaktywnością dzięki obecności trzech grup hydroksylowych w pierścieniu aromatycznym, co czyni go odpowiednim punktem odniesienia do wyrażania wyników w przeliczeniu na kwas galusowy.

Procedura oznaczeń metodą Folina–Ciocalteu

We wszystkich oznaczeniach, niezależnie od rodzaju badanej próbki, stosowano identyczną procedurę postępowania. Do jednorazowych kuwet dodawano kolejno: 1,0 ml wody dejonizowanej, 0,125 ml badanej próbki oraz 0,125 ml odczynnika Folina–Ciocalteu rozcieńczonego trzykrotnie wodą dejonizowaną. Po 5 minutach inkubacji w warunkach pokojowych do mieszaniny dodawano 0,125 ml roztworu węgla sodu, po czym całość dokładnie wymieszano i przechowywano w zaciemnieniu przez 1 godzinę. Czas ten został dobrany tak, aby zapewnić stabilność barwy powstającego kompleksu molibdenowo-wolframowego, stanowiącego podstawę metody Folina–Ciocalteu (opisanej w Rozdziale 3). Po upływie 1 godziny próbki charakteryzowano techniką spektroskopii UV-Vis, rejestrując widmo w zakresie 600–800 nm i odczytując maksimum absorpcji przy długości fali 765 nm. Wszystkie czynności wykonywano przy użyciu pipet automatycznych, uprzednio sprawdzonych i skalibrowanych. Objętości odmierzano wagowo, co zapewniało wysoką precyzję i powtarzalność przygotowania próbek do oznaczeń. Ponieważ oznaczenia dotyczyły określania całkowitego stężenia wolnych grup hydroksylowych, w pierwszej kolejności sprawdzono, czy sam cytrynian sodu (o stężeniu 0,1672% - jak w syntezie TA-AgNPs) wchodzi w reakcję z odczynnikiem FC (Rysunek 36).

Widma rejestrowano bezpośrednio po zmieszaniu wszystkich odczynników (t_0) oraz po upływie 60 minut (t_{60}) – zgodnie z procedurą metody oznaczeń FC (Rysunek 36). Pomiar w chwili początkowej (t_0) miał na celu ocenę, czy reakcja redukcji mogłaby zachodzić natychmiast po kontakcie cytrynianu z odczynnikiem FC. Natomiast analiza po 60 minutach pozwoliła sprawdzić, czy ewentualne efekty mogłyby ujawniać się dopiero w czasie inkubacji, zgodnie ze standardowym przebiegiem metody.

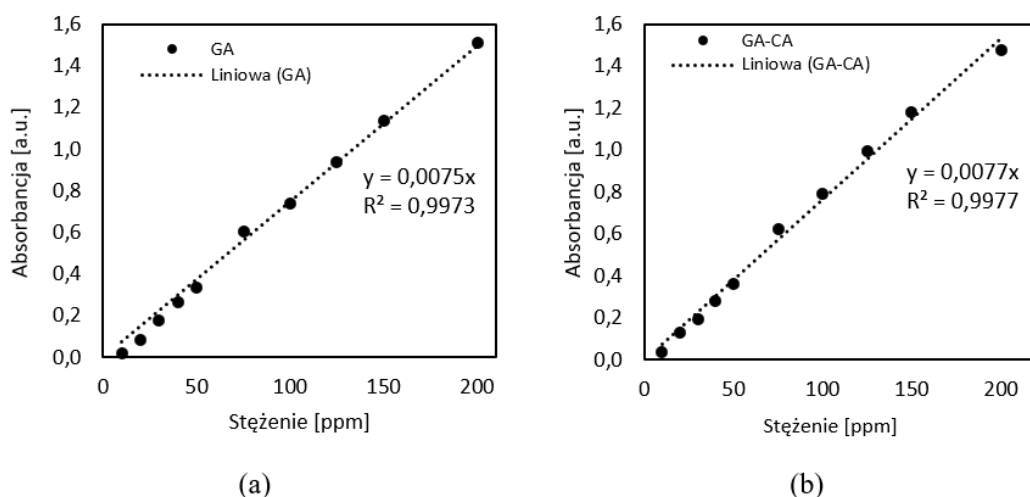


Rysunek 36. Widmo UV-Vis próbki roztworu cytrynianu sodu oznaczanej metodą FC (w stężeniu odpowiadającym warunkom syntezy nanocząstek srebra (0,1672%), zarejestrowane bezpośrednio po przygotowaniu próbki (t_0) oraz po 60 minutach inkubacji (t_{60}) wraz ze wzorem strukturalnym cząsteczki cytrynianu sodu.

W obu przypadkach nie zaobserwowano powstania charakterystycznego pasma absorpcji w zakresie 765 nm, a przebieg widm odpowiadał wartościom równym zero. Wynik ten jednoznacznie potwierdza, że cytrynian sodu nie redukuje odczynnika FC i nie generuje sygnału analitycznego.

Krzywe kalibracyjne

Na podstawie opisanej procedury przygotowano krzywe kalibracyjne w zakresie stężeń 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 200 ppm. Pierwszą z nich opracowano dla kwasu galusowego (GA). Drugą krzywą przygotowano dla mieszaniny GA z cytrynianem sodu (GA-CA), ponieważ cytrynian sodu stanowi składnik badanych układów koloidalnych – pełniąc rolę stabilizatora nanocząstek srebra – dlatego konieczne było sprawdzenie, czy jego obecność może wpływać na przebieg reakcji barwnej i dokładność oznaczeń w obecności GA. Na Rysunku 37 przedstawiono krzywe kalibracyjne dla: a) kwasu galusowego (GA) oraz b) kwasu galusowego z cytrynianem sodu (GA-CA).

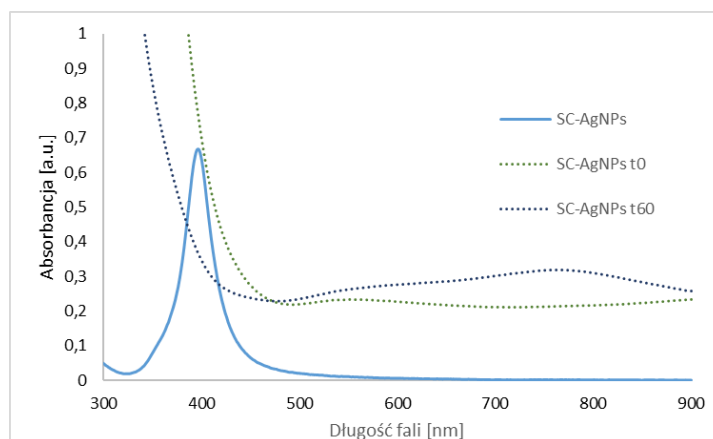


Rysunek 37. Krzywe kalibracyjne: a) kwasu galusowego (GA) oraz b) kwasu galusowego z cytrynianem sodu (GA-CA) w zakresie stężeń 10-200ppm.

Uzyskane zależności absorbancji od stężenia cechowały się bardzo wysoką liniowością, o czym świadczą wartości współczynników determinacji ($R^2 = 0,9973$ dla GA oraz $R^2 = 0,9977$ dla GA-CA). Nachylenia prostych regresji były zbliżone (0,0075 oraz 0,0077), co wskazuje, że obecność cytrynianu sodu w połączeniu z kwasem galusowym nie powoduje istotnych różnic w intensywności reakcji ani w czułości metody. Wynik ten jest szczególnie istotny, gdyż jednoznacznie potwierdza, że cytrynian sodu nie wchodzi w reakcję z odczynnikiem FC i nie zakłóca oznaczeń prowadzonych dla związków fenolowych. W konsekwencji wszystkie dalsze oznaczenia wykonywano w przeliczeniu na kwas galusowy, zgodnie z powszechnie przyjętą praktyką w literaturze [120].

Wpływ nanocząstek srebra stabilizowanych cytrynianem sodu na oznaczenia metodą FC

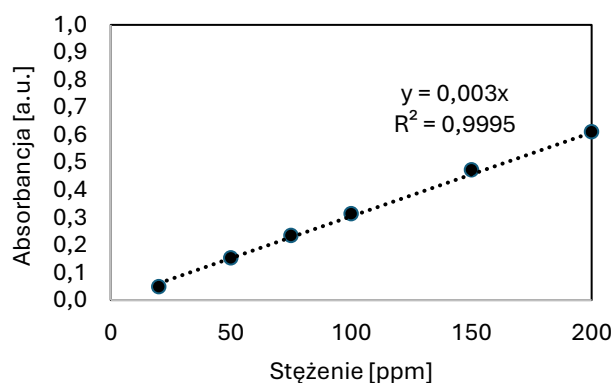
W kolejnym etapie oceniono możliwość wykorzystania metody Folina–Ciocâlțeu do oznaczeń w obecności nanocząstek srebra. W tym celu wykorzystano nanocząstki srebra stabilizowane cytrynianem sodu (SC-AgNPs), otrzymane zgodnie z procedurą opisaną w pracy [25], o średnim rozmiarze cząstek ~ 30 nm, zbliżonym do morfologii nanocząstek srebra będących przedmiotem badań. Doświadczenia przeprowadzono przy stężeniu srebra 100 ppm, odpowiadającym warunkom zastosowanym w badanych koloidach. Widmo UV-Vis SC-AgNPs (Rysunek 38) charakteryzowało się obecnością wyraźnego pasma plazmonowego przy ok. 400 nm, typowego dla nanocząstek srebra, które nie wpływało na odczyty w zakresie 765 nm stosowanym w metodzie FC. Po zmieszaniu z odczynnikami Folina–Ciocâlțeu już w chwili początkowej (t_0) zaobserwowano podniesienie linii bazowej, a po 60 minutach (t_{60}) efekt ten był wyraźnie nasilony. Otrzymane wyniki wskazują, że obecność nanocząstek srebra może zawyżać absorbcję rejestrowaną w warunkach reakcji FC, co należy uwzględnić przy interpretacji wyników.



Rysunek 38. Widma UV-Vis nanocząstek srebra stabilizowanych cytrynianem sodu (SC-AgNPs, 100 ppm Ag, linia ciągła niebieska), bezpośrednio po zmieszaniu reagentów (t_0 , linia przerywana zielona) oraz po 60 minutach inkubacji (t_{60} , linia przerywana fioletowa).

Krzywa kalibracyjna SC-AgNPs

W celu ilościowej oceny wpływu obecności nanocząstek srebra na wynik oznaczeń przygotowano krzywą kalibracyjną dla AgNPs stabilizowanych cytrynianem sodu (SC-AgNPs). Procedura przygotowania próbek była analogiczna jak w przypadku krzywych kalibracyjnych GA oraz GA-CA, przy czym zakres stężeń nanocząstek obejmował wartości od 20 do 200 ppm (wyrażone jako stężenie srebra). Uzyskana zależność (Rysunek 39) charakteryzowała się bardzo wysoką liniowością ($R^2 = 0,9995$), a nachylenie prostej regresji (0,003) wskazuje na systematyczny wzrost absorbancji wraz ze stężeniem nanocząstek.



Rysunek 39. Krzywa kalibracyjna nanocząstek srebra stabilizowanych cytrynianem sodu (AgNPs-CA) w zakresie stężeń 20–200 ppm (wyrażonych jako stężenie srebra), uzyskana metodą Folina–Ciocâlțeu.

Otrzymane wyniki jednoznacznie potwierdzają, że obecność AgNPs prowadzi do zawyżania sygnału rejestrowanego w metodzie Folina–Ciocâlțeu. Efekt ten jest proporcjonalny do stężenia srebra i powinien być uwzględniany przy interpretacji wyników uzyskanych dla właściwych układów koloidalnych zawierających kwas taninowy (lub jego pochodne).

Wpływ obecności nanocząstek srebra na oznaczenia kwasu taninowego metodą FC

W celu ilościowej oceny wpływu obecności nanocząstek srebra na wyniki oznaczeń przygotowano serię prób, w których stężenie kwasu taninowego (TA) utrzymywano stałe na poziomie 100 ppm, natomiast zmieniano stężenie nanocząstek srebra stabilizowanych cytrynianem sodu (SC-AgNPs) w zakresie 20–200 ppm. Stężenie TA (100 ppm) zostało uprzednio zweryfikowane metodą Folina–Ciocâlteu i przyjęte jako wartość odniesienia. Każdą z próbek analizowano zgodnie z opisanym wcześniej schematem procedury FC, a uzyskane wartości absorbancji przeliczano na jednostki kwasu galusowego.

Tabela 2. Wpływ ilości nanocząstek srebra o zmiennym stężeniu na dodatek stałego stężenia kwasu taninowego (stężenie kwasu taninowego: 100 ppm).

AgNPs ^(a) [ppm]	Stężenie obliczone na podstawie pomiaru i krzywej kalibracyjnej [ppm] ^(b)	Wartość stężenia srebra przy danym stężeniu Ag [ppm] ^(c)	Stężenie finalne TA po uwzględnieniu nanocząstek [ppm] ^(d)
200	169	79	90
150	153	62	91
100	132	41	91
75	122	31	91
50	117	20	97
20	105	6	99

Analiza wyników zestawionych w Tabeli 2 wykazała, że wraz ze wzrostem stężenia AgNPs obserwuje się systematyczne zawyżanie wartości ilości tanin oznaczonych metodą FC (Tabela 2^(b)). Przykładowo, przy stężeniu nanocząstek 200 ppm wynik oznaczenia wynosił 169 ppm, natomiast przy 20 ppm – 105 ppm (Tabela 2^(b)). W celu korekcji uzyskanych danych wykorzystano krzywą kalibracyjną SC-AgNPs i od wartości całkowitych odejmowano udział odpowiadający stężeniu srebra (udział – wartość stężenia srebra przy danym stężeniu Ag Tabela 2^(c)). Po uwzględnieniu tego efektu uzyskano wartości oscylujące wokół 90–99 ppm, a więc bardzo bliskie rzeczywistej zawartości TA (Tabela 2^(d)). Przeprowadzone prace badawcze jednoznacznie potwierdzają, że obecność nanocząstek srebra prowadzi do zawyżania sygnału w metodzie Folina–Ciocâlteu. Zjawisko to ma charakter proporcjonalny do stężenia AgNPs i może być efektywnie skorygowane poprzez odjęcie udziału nanocząstek wyliczonego na podstawie odpowiedniej krzywej kalibracyjnej. Wynik ten ma istotne znaczenie metodyczne, ponieważ wskazuje, że metoda FC – po przeprowadzeniu optymalizacji i zastosowaniu odpowiednich poprawek – może być z powodzeniem stosowana do monitorowania zawartości TA w złożonych układach koloidalnych zawierających nanocząstki metali.

Przeprowadzona optymalizacja warunków metody Folina–Ciocâlteu wykazała, że:

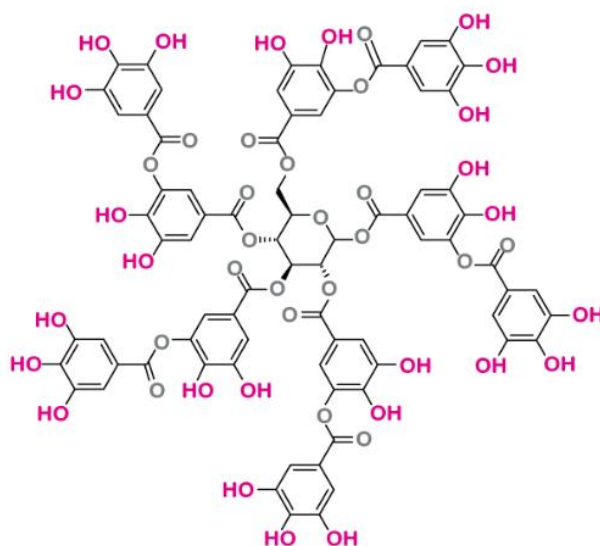
- krzywe kalibracyjne przygotowane dla GA oraz GA-CA były ze sobą zgodne, co potwierdziło brak wpływu cytrynianu sodu na oznaczenia polifenoli;
- sam cytrynian sodu nie wykazywał reaktywności wobec odczynnika FC;
- obecność nanocząstek srebra stabilizowanych cytrynianem (SC-AgNPs) prowadziła do zawyżania wyników, proporcjonalnego do stężenia srebra;
- zastosowanie dodatkowej krzywej kalibracyjnej dla SC-AgNPs umożliwiło oszacowanie i odjęcie udziału nanocząstek, co pozwoliło uzyskać wartości odpowiadające rzeczywistej zawartości kwasu taninowego w układzie koloidalnym AgNPs.

Otrzymane rezultaty jednoznacznie wskazują, że metoda Folina–Ciocâlteu – choć nie jest rutynowo stosowana w badaniach układów koloidalnych zawierających nanocząstki metali – może być w nich z powodzeniem wykorzystana, pod warunkiem uwzględnienia i odpowiedniej korekcji sygnału pochodzącego od nanocząstek.

8. Badanie przemian kwasu taninowego w koloidzie nanocząstek srebra

8.1. Charakterystyka kwasu taninowego

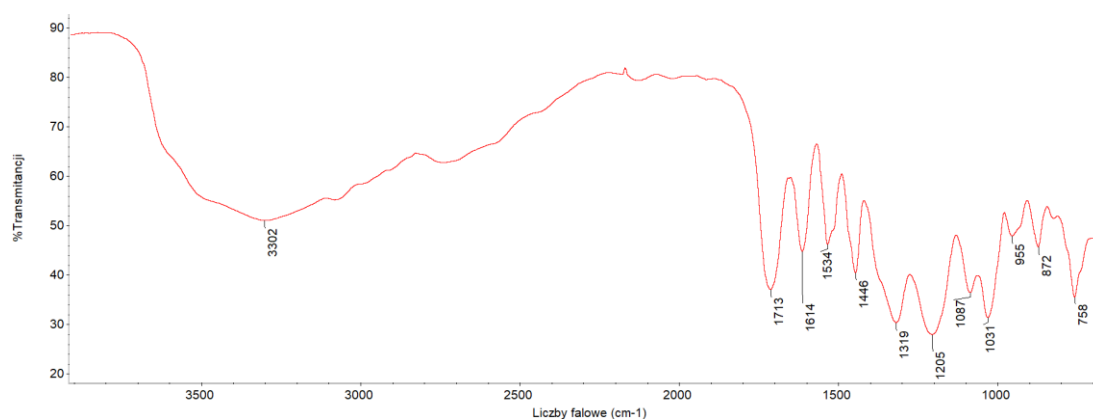
Kwas taninowy ($C_{76}H_{52}O_{46}$), jak wspomniano wcześniej, to związek chemiczny pochodzenia naturalnego, zaliczany do tanin hydrolizowalnych, tradycyjnie pozyskiwany ze źródeł roślinnych, takich jak galasówki, czy kora dębu [126]. Pomimo tego, że jest dostępny komercyjnie pod jedną nazwą, kwas taninowy nie jest pojedynczym, dobrze zdefiniowanym związkiem chemicznym. Najczęściej składa się z centralnego rdzenia glukozy (Rysunek 40), do którego przyłączonych jest pięć cząsteczek kwasu galusowego, a do nich – kolejnych pięć cząsteczek kwasu galusowego, wraz z charakterystycznymi grupami hydroksylowymi. Grupy te nadają silne właściwości przeciwutleniające i wysokie powinowactwo do jonów metali — zarówno poprzez chelatowanie, jak i chemię redoks [127]. Kwas taninowy oddziałuje z różnymi materiałami nieorganicznymi, organicznymi, hydrofobowymi i hydrofilowymi, takimi jak białka i polisacharydy, poprzez wiązania wodorowe, wiązania elektrostatyczne, koordynacyjne i oddziaływania hydrofobowe [128]. Co więcej, TA wykazuje szerokie spektrum działań farmakologicznych, w tym działanie przeciwzapalne, neuroprotekcyjne, przeciwnowotworowe, więc jest on szeroko stosowany w farmakologii, biomedycynie i inżynierii materiałowej ze względu na swoje właściwości sieciujące, przeciwutleniające i bioaktywne [126, 127, 129].



Rysunek 40. Wzór strukturalny kwasu taninowego.

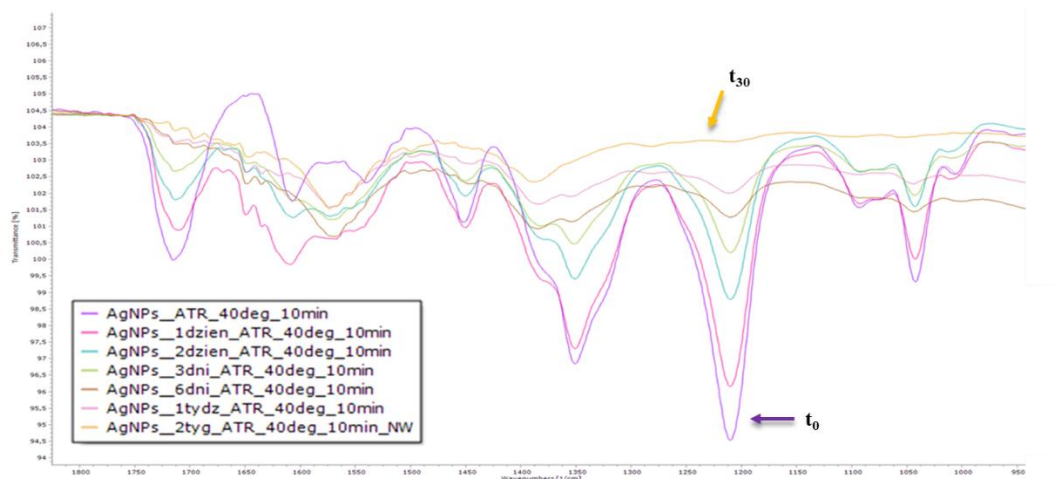
Pomimo szerokiego wykorzystania kwasu taninowego w badaniach i publikacjach naukowych, jest on często stosowany bez wcześniejszej charakterystyki lub weryfikacji jego składu chemicznego. Naukowcy traktują go zazwyczaj jako zdefiniowany odczynnik, podczas gdy jego rzeczywista struktura molekularna nie jest ściśle określona ani kontrolowana w większości eksperymentów [130]. Takie podejście utrudnia rzetelną interpretację wyników i porównywanie danych literaturowych, ponieważ zachowanie kwasu taninowego może ulegać zmianom w czasie i zależy od warunków prowadzenia badań. Dlatego szczegółowa charakterystyka TA jest kluczowa dla prawidłowego opisu jego właściwości i dla projektowania nanomateriałów przeznaczonych do zastosowań biomedycznych.

Widmo FT-IR przygotowanego kwasu taninowego o stężeniu 315 ppm (Rysunek 41), zarejestrowane techniką KBr, ujawnia obecność charakterystycznych sygnałów potwierdzających obecność licznych grup funkcyjnych typowych dla polifenoli. Szerokie i intensywne pasmo przy 3302 cm^{-1} odpowiada drganiom rozciągającym grup hydroksylowych -OH , silnie poszerzonym na skutek tworzenia licznych wiązań wodorowych. W zakresie 1713 cm^{-1} widoczne jest wyraźne maksimum związane z drganiami rozciągającymi wiązań karbonylowych C=O w grupach estrowych. Dodatkowe pasma przy 1614 cm^{-1} oraz 1534 cm^{-1} można przypisać drganiom rozciągającym C=C w pierścieniach aromatycznych. Kolejne sygnały przy 1446 cm^{-1} , 1319 cm^{-1} oraz 1205 cm^{-1} odpowiadają głównie drganiom rozciągającym wiązań C-O w fenolach oraz w ugrupowaniach estrowych. Pasma przy 1087 cm^{-1} oraz 1031 cm^{-1} świadczą o obecności wiązań C-O-C w strukturze polifenolowej. Niższe rejony widma ($995\text{--}750\text{ cm}^{-1}$) związane są z drganiami deformacyjnymi C-H w układach aromatycznych oraz z kolejnymi sygnałami charakterystycznymi dla wiązań eterowych. Uzyskane widmo jest zgodne z literaturowym profilem kwasu taninowego i potwierdza obecność kluczowych ugrupowań funkcyjnych: hydroksylowych, estrowych oraz aromatycznych [33].



Rysunek 41. Widmo FT-IR-ATR kwasu taninowego.

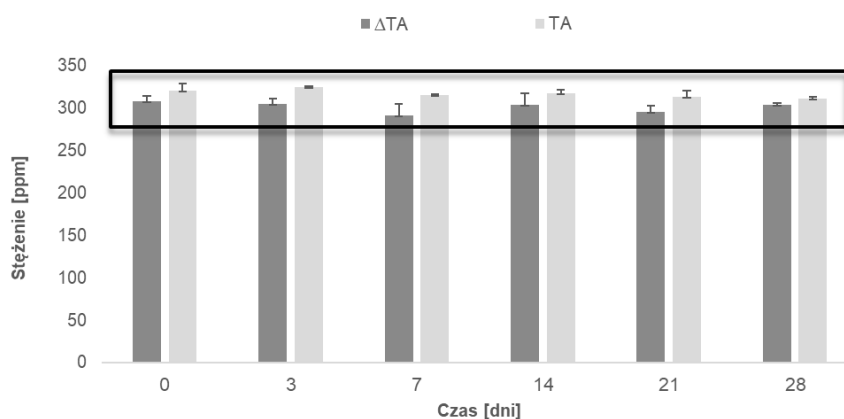
Kwas taninowy, jako substancja chemicznie aktywna i podatna na przemiany redoks oraz hydrolizę, wykazuje tendencję do stopniowych zmian strukturalnych nawet w warunkach przechowywania w wodzie lub wilgotnym środowisku (ze względu na obecność tlenu rozpuszczonego w wodzie) [131]. W związku z tym, w niniejszej pracy przeprowadzono analizę widm FT-IR (z przystawką ATR) próbki kwasu taninowego po różnych czasach kondycjonowania (Rysunek 42) w wodnym środowisku. Celem tych badań było uchwycenie ewentualnych zmian strukturalnych, takich jak: utlenianie grup hydroksylowych do grup karbonylowych lub chinonowych (co mogłoby się objawiać wzrostem intensywności pasma $C=O$ oraz zmniejszeniem pasma $-OH$), hydroliza wiązań estrowych, prowadząca do powstawania wolnych grup karboksylowych i kwasu galusowego (zmiany w zakresie $1700\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$ oraz $1300\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$), wewnątrzcząsteczkowe i międzycząsteczkowe interakcje wodorowe, prowadzące do reorganizacji strukturalnej cząsteczki (modyfikacja kształtu i szerokości pasma $-OH$).



Rysunek 42. Widma FT-IR kwasu taninowego zarejestrowane w czasie t_0 – od momentu przygotowania próbki w czasie kondycjonowania t_{30} (30 dni).

Śledzenie zmian w widmach FT-IR w czasie pozwoliło na wstępną ocenę stabilności chemicznej badanego kwasu taninowego oraz wskazanie potencjalnych przemian, które mogą mieć wpływ na jego późniejsze zachowanie w układach reakcyjnych i koloidalnych. Wyniki te stanowią ważny punkt odniesienia do dalszych badań, w których kwas taninowy będzie pełnił aktywną rolę jako czynnik redukujący i stabilizujący w obecności jonów srebra i nanocząstek. Z analizy widm kwasu taninowego (Rysunek 42) od momentu przygotowania próbki (t_0) w czasie jego kondycjonowania (t_{30}) wynika, że kwas taninowy nie zmienia się w czasie, ponieważ nie są obserwowane żadne zmiany w widmie świadczące o pojawieniu się lub zaniku

charakterystycznych pasm. Jednak spadek intensywności wszystkich pasm w widmie FT-IR w czasie kondycjonowania próbki może wynikać z fizycznych zmian w układzie, takich jak agregacja cząsteczek kwasu taninowego, reorganizacja struktury przestrzennej ograniczająca swobodę drgań grup funkcyjnych, osadzanie się próbki na ściankach naczynia lub zmiany właściwości optycznych układu, np. indeksu załamania. Aby uzupełnić analizę FT-IR i zapewnić szersze zrozumienie zachowania chemicznego kwasu taninowego w czasie, zastosowano techniki: metodę kolorymetryczną Folina–Ciocâlțu i chromatografię cienkowarstwową (TLC). Wybrano te metody, aby wykryć wszelkie subtelne produkty degradacji lub transformacji TA, które mogłyby nie być widoczne za pomocą samej spektroskopii FT-IR. Metoda Folina–Ciocâlțu została użyta do monitorowania stężenia wolnych fenolowych grup hydroksylowych (Rysunek 43) w wodnych roztworach kwasu taninowego w czasie. Zastosowano dodatkowy parametr – temperaturę, aby sprawdzić, czy przygotowanie próbki kwasu taninowego w warunkach syntezy (w temperaturze wrzenia przez 15 minut) wpłynie na jego przemiany.

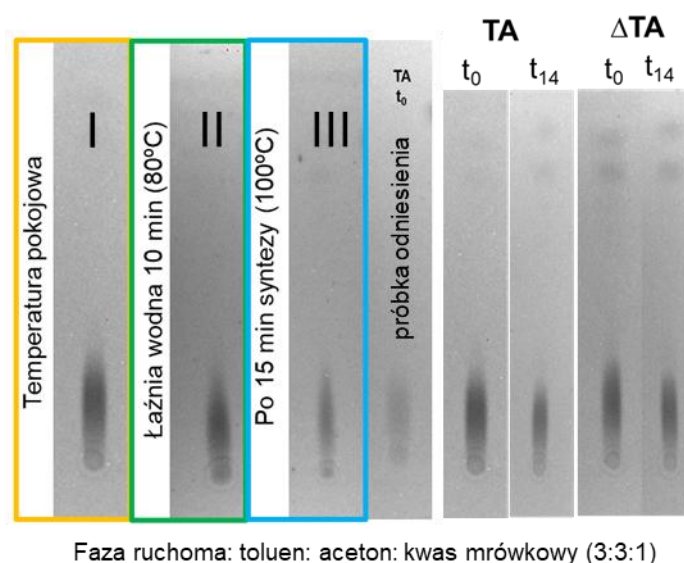


Rysunek 43. Wykres stężenia wolnych grup hydroksylowych kwasu taninowego – przygotowanego w temperaturze pokojowej (TA) oraz w warunkach syntezy (Δ TA) od momentu przygotowania próbek t_0 – w czasie kondycjonowania t_{28} .

Z analizy wykresu stężenia wolnych grup hydroksylowych TA określonych metodą FC (Rysunek 43) zarówno w układzie przygotowanym w temperaturze pokojowej (TA), jak również po zastosowaniu warunków syntezy (Δ TA), nie zaobserwowano spadku całkowitego stężenia wolnych grup hydroksylowych przez cały okres kondycjonowania próbki (28 dni) - stężenie utrzymywało się na podobnym poziomie (było bliskie stężeniu wyjściowemu ± 315

ppm, niewielkie różnice mogą wynikać z etapów przygotowania próbek – rozcieńczenia ich do analizy). Wynik ten sugeruje, że kwas taninowy zachowuje swoje aktywne grupy funkcyjne podczas przechowywania w środowisku wodnym i, że w badanych warunkach nie wystąpiło żadne istotne utlenianie grup hydroksylowych.

Jednocześnie analiza płytek TLC (Rysunek 44) dostarczyła informacji na temat składu próbki kwasu taninowego i jego zachowania w różnych warunkach temperaturowych. Próbkę TA inkubowano w temperaturze pokojowej, w łaźni wodnej (80 °C) oraz w warunkach syntezy (100 °C). Na płytce TLC (Rysunek 44) zaobserwowano trzy główne pasma: szeroki sygnał odpowiadający kwasowi taninowemu oraz dodatkowe, bardziej ruchliwe sygnały, których mobilność i pozycja na płytce odpowiadają kwasowi galusowemu i digalusowemu. Ich obecność jest zgodna z doniesieniami literaturowymi, według których w komercyjnych próbkach TA, ze względu na złożoną budowę, mogą występować fragmenty galoilowe oraz niewielkie ilości wolnych jednostek GA i jego pochodnych [132].

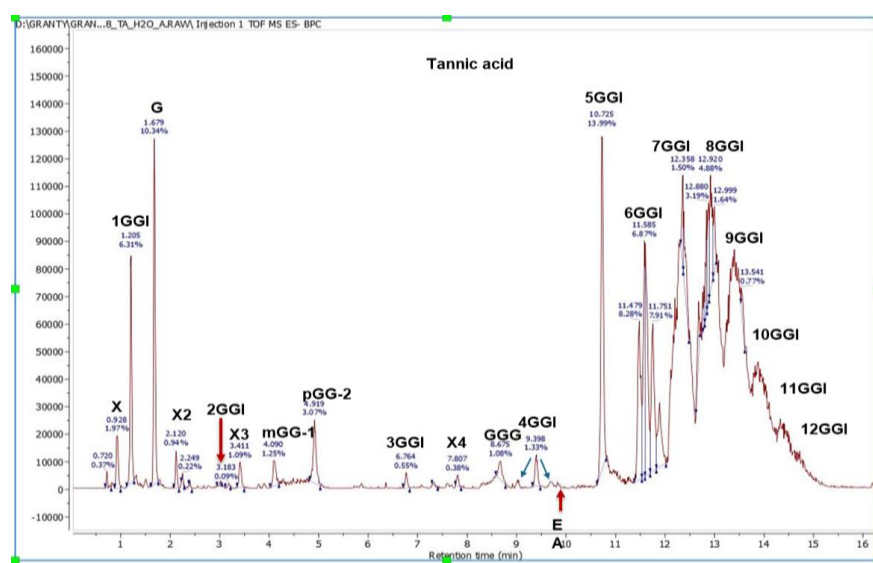


Rysunek 44. Płytkę TLC kwasu taninowego (TA) analizowanego w czasie – od momentu przygotowania próbki (t_0) w czasie kondycjonowania (t_{14}). Próbkę: TA – I) roztwór kwasu taninowego przygotowany w temperaturze pokojowej (25 °C), II) inkubacja TA w łaźni wodnej (80 °C) oraz III) w warunkach syntezy (100 °C).

W świetle przeprowadzonych badań nie ma jednak podstaw do stwierdzenia, że w warunkach inkubacji dochodzi do hydrolizy TA – wyniki odzwierciedlają heterogeniczność odczynnika niż postępujące przemiany chemiczne. Stabilność uzyskanych profili TLC w czasie dodatkowo

potwierdza brak zachodzących procesów degradacji, co jest w pełni zgodne z obserwacjami spektroskopii FT-IR oraz oznaczeniami metodą Folina–Ciocâlteu.

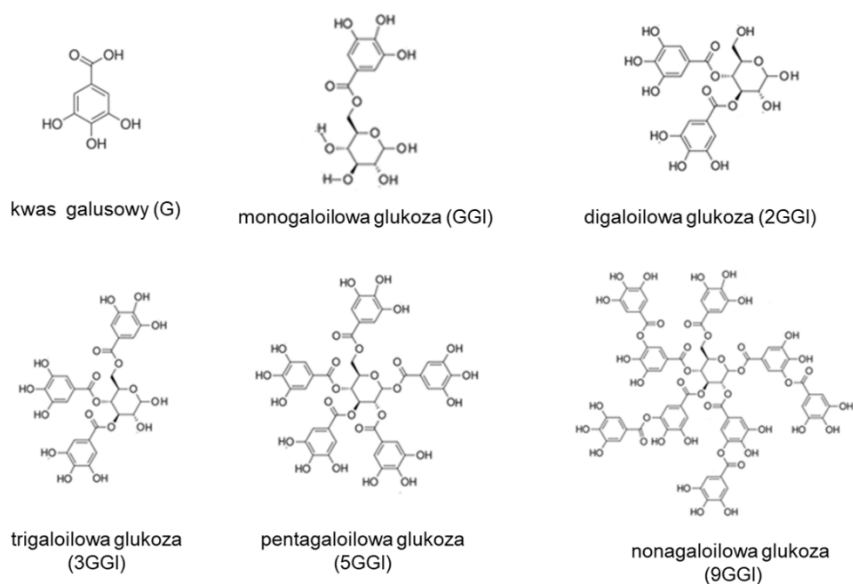
Przeprowadzone badania poszerzono o technikę spektroskopii mas, aby zbadać skład cząsteczkowy kwasu taninowego i uzupełnić spostrzeżenia strukturalne uzyskane za pomocą wykorzystanych technik opisanych w niniejszym rozdziale. Spektrometria mas z jonizacją elektrorozpyłową (ESI-MS) wykonana w trybie jonów ujemnych, ujawniła zróżnicowany zestaw pików (Rysunek 45) odpowiadających pochodnym kwasu taninowego i jego struktur izomerycznych.



Rysunek 45. Widmo MS kwasu taninowego, gdzie: G – kwas galusowy; GGI – galusan glukozy; nGGI – oligomeryczne formy galusanu glukozy (np. 2GGI – digaloilowa glukoza, 3GGI – trigaloilowa glukoza, 5GGI – pentagaloilowa glukoza, 7GGI – heptagaloilowa glukoza); pGG-2 – digalusowy ester glukozy; mGG-1 – monogalusowy ester glukozy; EA – kwas elagowy; X, X2, X3, X4 – sygnały dodatkowe, nieuwzględnione w szczegółowej interpretacji.

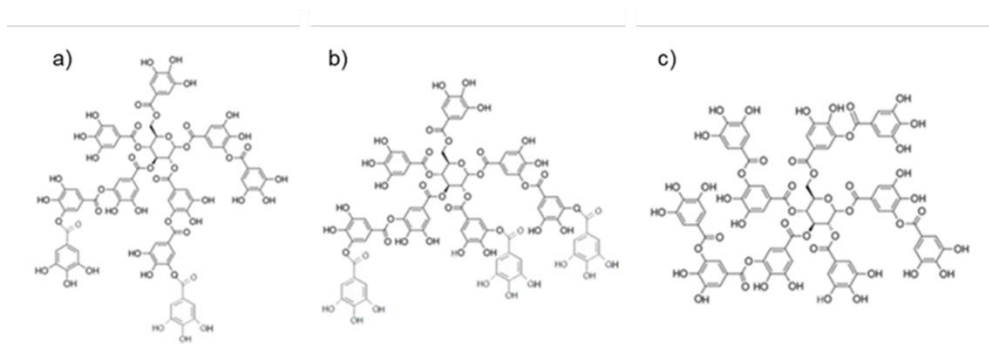
Analiza widma masowego (Rysunek 45) wykazała, że badana próbka kwasu taninowego nie stanowi pojedynczej, jednorodnej cząsteczki. Obecność licznych jonów fragmentacyjnych świadczy o oligomerycznej budowie układu oraz o występowaniu wielu wiązań estrowych łączących reszty kwasu galusowego z glukozą. W warunkach jonizacji wiązania te ulegają rozpadowi, co skutkuje powstaniem fragmentów odpowiadających m.in. wolnym jednostkom kwasu galusowego (G), galusanowi glukozy (GGI) oraz ich dalszym wariantom (np. 2GGI, 3GGI). Dominującymi sygnałami w widmie są jony odpowiadające kwasowi galusowemu (G) oraz 1,2,3,4,6-penta-O-galloilo- β -D-glukozie (5GGI), natomiast słabsze sygnały wskazują na

obecność kolejnych wariantów glukozy podstawionej różną liczbą reszt galusowych. Wybrane przykłady zidentyfikowanych cząsteczek zestawiono na Rysunku 46.



Rysunek 46. Wybrane cząsteczki odpowiadające jonom fragmentacyjnym widma MS.

Uzyskane wyniki potwierdzają, że badany materiał nie jest związkiem o jednoznacznie zdefiniowanej strukturze lecz mieszaniną oligomerów galoilowych glukozy o zmiennym stopniu podstawienia. Na tej podstawie wyróżniono kilka potencjalnych wariantów budowy cząsteczek, określanych zbiorczo jako „kwas taninowy” (Rysunek 47). Przykłady te dobrze ilustrują niejednorodną naturę badanego odczynnika, co należy brać pod uwagę przy interpretacji jego właściwości i roli w procesie syntezy nanocząstek srebra.



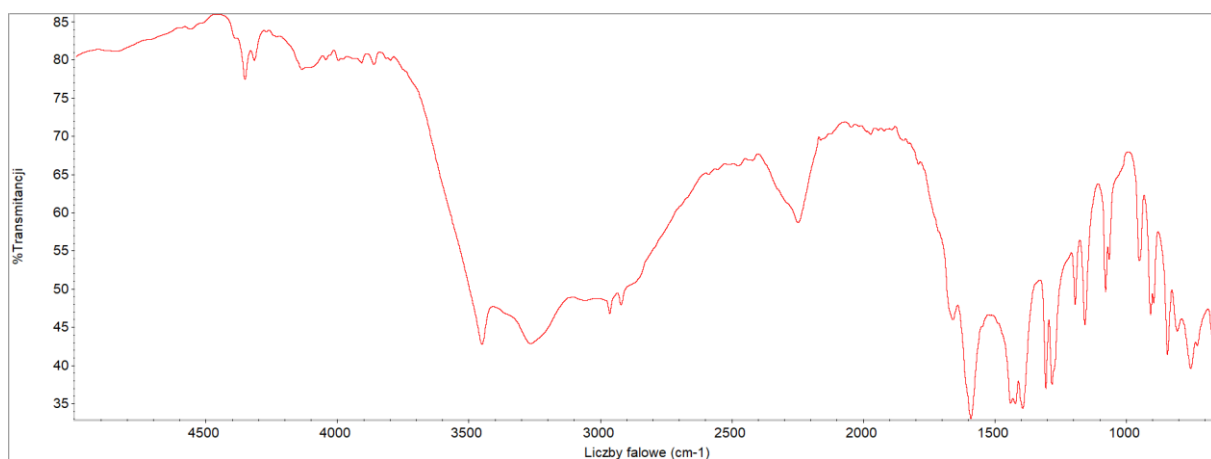
Rysunek 47. Przykładowe izomery (a, b, c) strukturalne kwasu taninowego (poligalloylloglukozy) różniące się liczbą i pozycją podstawienia reszt kwasu galusowego na rdzeniu glukozy, wygenerowane na podstawie wyników analizy MS.

8.2. Charakterystyka kompleksu kwasu taninowego z cytrynianem sodu

Opierając się na kompleksowej charakterystyce kwasu taninowego w jego niezmodyfikowanej formie, rozdział ten koncentruje się na jego interakcji z cytrynianem sodu, związkiem powszechnie stosowanym w syntezie nanocząstek jako środek redukujący i stabilizujący [33]. W wielu badaniach naukowych [23, 33] kwas taninowy i cytrynian są stosowane razem, celowo lub jako część układów buforowanych, jednak ich łączone zachowanie w roztworze wodnym — i potencjalne tworzenie kompleksów międzycząsteczkowych — nie zostało systematycznie zbadane. Charakterystyka takich interakcji jest niezbędna do zrozumienia środowiska chemicznego, do którego jony srebra są wprowadzane w kolejnych etapach syntezy nanocząstek. Kwas taninowy i cytrynian sodu mają kilka wspólnych cech chemicznych: oba są rozpuszczalne w wodzie, polianionowe i bogate w grupy funkcyjne donorów tlenu, co sprawia, że są zdolne do angażowania się w wiązania wodorowe, oddziaływania jonowe i potencjalnie koordynację z jonami metali [128]. Tworzenie kompleksu kwas taninowy–cytrynian w roztworze wodnym występuje, szczególnie w warunkach, w których asocjacja międzycząsteczkowa może być napędzana przez siły elektrostatyczne lub wiązania wodorowe. Zrozumienie natury i stabilności tego kompleksu jest kluczowe, ponieważ może on znacząco wpłynąć na potencjał redoks, zachowanie agregacji i dynamikę nukleacji nanocząstek na późniejszych etapach procesu [33, 133].

W tym rozdziale świeżo przygotowany roztwór kwasu taninowego i cytrynianu sodu poddano kondycjonowaniu – od momentu wytworzenia t_0 – w czasie przechowywania t_{30} dni. Celem było zbadanie, czy współistnienie tych dwóch cząsteczek powoduje strukturalne lub chemiczne przekształcenia różniące się od ich indywidualnego zachowania. Podobnie jak poprzednio, w badaniu zastosowano kilka technik służących do charakterystyki: spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera, metodę kolorymetryczną Folina–Ciocâlțu, chromatografię cienkowarstwową, oraz spektroskopię mas, które razem zapewniają uzupełniające się informacje na temat oddziaływań molekularnych, stabilności grup funkcyjnych i składu układu.

W celu zrozumienia roli cytrynianu sodu w badanym układzie, dokonano spektroskopowej analizy tej substancji w postaci czystej, wykorzystując technikę FT-IR (z zastosowaniem akcesorium Easydiff i pastylki KBr). Uzyskane widmo (Rysunek 48) wykazuje liczne charakterystyczne pasma, odpowiadające obecności grup funkcyjnych typowych dla soli kwasów karboksylowych oraz grup hydroksylowych [33].



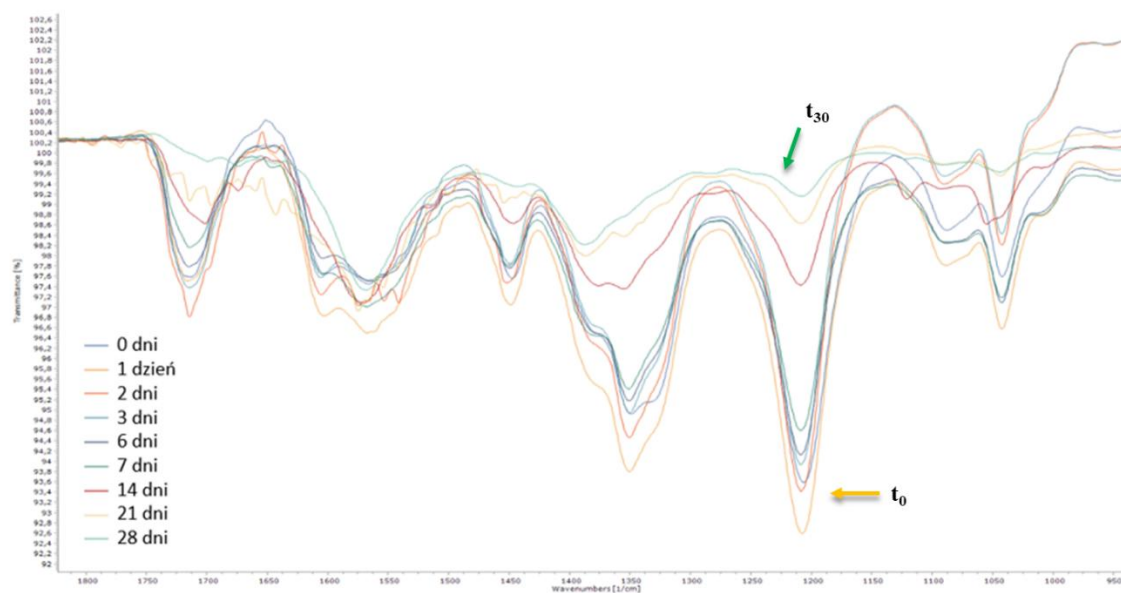
Rysunek 48. Widmo FT-IR cytrynianu sodu.

Poniżej przedstawiono szczegółową interpretację zarejestrowanych pasm w oparciu o doniesienia literaturowe [33]: $\sim 3440\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ – szerokie pasmo odpowiadające rozciągającym drganiom grup --OH . Obecność tej szerokiej strefy absorpcji świadczy o licznych wiązaniach wodorowych, zarówno pomiędzy grupami hydroksylowymi cytrynianu, jak i z cząsteczkami wody zaadsorbowanej lub krystalicznej. Higroskopijny charakter cytrynianu sodu sprzyja tworzeniu układów silnie uwodnionych [134]; $\sim 2950\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$ – dwa wyraźne, symetryczne pasma drgań rozciągających wiązania C--H (ν_{as} , ν_{s} C--H) w grupach alifatycznych. Tzw. „uszy” w tym zakresie są charakterystyczne dla grup metylenowych ($\text{--CH}_2\text{--}$) obecnych w szkieletie węglowym cytrynianu; $\sim 2250\text{ cm}^{-1}$ – szerokie i stosunkowo intensywne pasmo, nietypowe dla prostych soli organicznych, może być przypisane drganiom kombinacyjnym lub nadtonom złożonych drgań grup karboksylanowych i hydroksylowych. Alternatywnie może pochodzić od zanieczyszczeń atmosferycznych (np. CO_2) lub obecności przejściowych jonów związanych z wilgocią i solwatacją; $\sim 1667\text{ cm}^{-1}$ – średnio intensywne pasmo, które można interpretować jako: drgania deformacyjne wody związanej ($\delta(\text{H--O--H})$), co potwierdza uwodniony charakter próbki. Często w widmach soli sodowych notuje się to pasmo jako wynik obecności cząsteczek wody krystalicznej lub higroskopijnej [134] oraz drgania rozciągające C=O słabo zdysocjowanych grup karboksylowych (częściowo zprotonowanych); $\sim 1580\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ – intensywne pasmo odpowiadające asymetrycznym drganiom rozciągającym grup karboksylanowych ($\nu_{\text{as}}\text{ COO}^-$). Jest to jedno z dominujących pasm w widmie cytrynianu sodu i potwierdza obecność trzech zjonizowanych grup karboksylowych; $\sim 1395\text{--}1410\text{ cm}^{-1}$ – wyraźne pasmo przypisane symetrycznym drganiom rozciągającym COO^- ($\nu_{\text{s}}\text{ COO}^-$). Różnica wartości pomiędzy ν_{as} i ν_{s} pozwala oszacować charakter wiązania jonowego – w tym przypadku sugeruje obecność w pełni zjonizowanych

grup karboksylanowych; $\sim 1260\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ – pasma odpowiadające rozciągającym drganiom wiązań C–O z grup hydroksylowych oraz C–O–C w szkielecie cząsteczki. Obszar ten może także zawierać wkład drgań skręcających grup –OH; $\sim 1140\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ – złożony region drgań szkieletowych, głównie C–C oraz C–O–H, obejmujący również wkład z mostków eterowych lub wiązań pomiędzy fragmentami alifatycznymi i karboksylanowymi. Typowy dla hydroksykwasów; $<900\text{ cm}^{-1}$ – słabsze pasma deformacyjne, przypisywane drganiom grup CH_2 . Brak pasma w rejonie $\sim 1700\text{ cm}^{-1}$, które byłoby charakterystyczne dla niezjonizowanych grup C=O w czystych kwasach karboksylowych, dodatkowo potwierdza obecność cytrynianu wyłącznie w formie soli sodowej, tj. z grupami karboksylowymi w pełni zjonizowanymi do COO^- .

Po szczegółowej analizie kwasu taninowego oraz cytrynianu sodu, próbki mieszaniny TA–CA analizowano w kolejnych punktach czasowych (od momentu przygotowania – t_0 – przez 30 dni – t_{30}), koncentrując się na ewentualnych zmianach w widmach FT-IR, które mogłyby świadczyć o tworzeniu się nowych związków, oddziaływaniach między składnikami, bądź degradacji poszczególnych komponentów. W szczególności monitorowano charakterystyczne pasma: grup hydroksylowych ($\nu(\text{O–H}) \sim 3200\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$), grup karboksylanowych i estrowych ($\nu_{\text{as}} \text{COO}^- \sim 1580\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$, $\nu_{\text{s}} \text{COO}^- \sim 1400\text{ cm}^{-1}$, C=O $\sim 1700\text{ cm}^{-1}$), oraz pasma C–O, C–C i aromatyczne w zakresie $1000\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$.

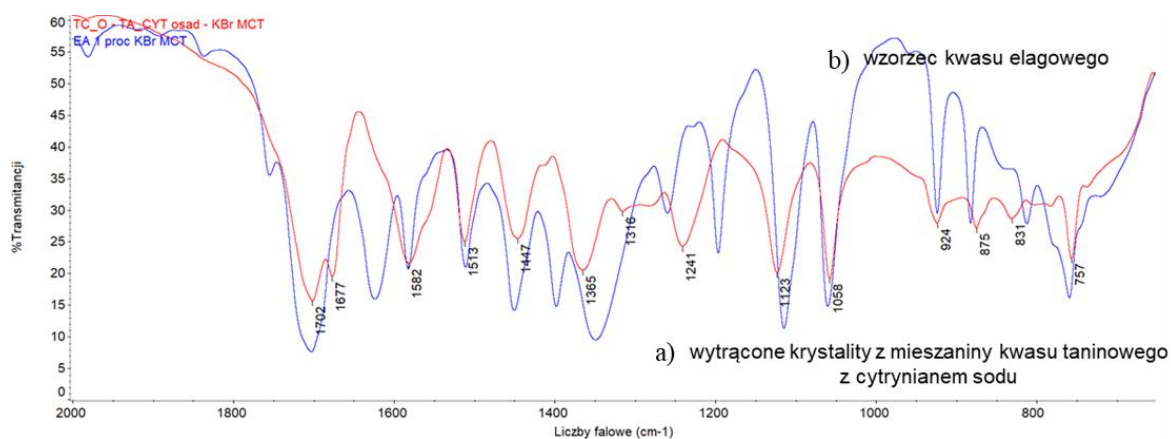
W całym zakresie pomiarowym nie zaobserwowano pojawienia się nowych sygnałów, ani też zaniku pasm charakterystycznych dla TA lub SC (Rysunek 49), co sugeruje, że nie zachodziły gwałtowne reakcje chemiczne prowadzące do utworzenia nowych grup funkcyjnych. Natomiast bardzo wyraźnym i powtarzalnym zjawiskiem był stopniowy spadek intensywności wszystkich pasm w widmie, obserwowany w miarę upływu czasu.



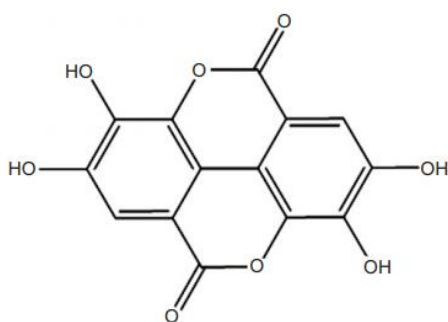
Rysunek 49. Widmo FT-IR kwasu taninowego z cytrynianem sodu od momentu wytworzenia t_0 - w czasie kondycjonowania t_{28} .

Takie jednoczesne zmniejszenie intensywności sygnałów we wszystkich zakresach może być interpretowane jako: spadek stężenia analitów w roztworze, najprawdopodobniej związany z postępującą agregacją i wytrącaniem się cząsteczek kwasu taninowego lub jego pochodnych z roztworu lub zmiana fizycznego stanu układu (np. tworzenie fazy koloidalnej), prowadząca do ograniczenia kontaktu substancji z powierzchnią kryształu ATR, co przekłada się na słabszy sygnał. Po około 14 dniach kondycjonowania w próbce zaobserwowano wyraźne wytrącenie się struktur krystalicznych. Założono, że te krystality mogą być produktem ubocznym przemian kwasu taninowego zachodzących w czasie przechowywania mieszaniny TA–CA, takich jak: utlenianie grup fenolowych do chinonów (produktów przejściowych), sprzęganie reszt galusowych, kondensacja cząsteczek taniny z udziałem cytrynianu.

W celu identyfikacji składu wytrąconych krystalitów, przeprowadzono ich analizę techniką FT-IR, TLC oraz LC-MS, porównując wyniki do kwasu elagowego. Widmo FT-IR wytrąconych krystalitów (Rysunek 50) wykazywało wyraźne podobieństwo do próbki odniesienia kwasu elagowego (Rysunek 51), znanego produktu kondensacji dwóch jednostek galusowych [134]. Jednakże, niektóre pasma nie pokrywały się całkowicie, co sugerowało możliwość obecności dodatkowych składników lub form polimorficznych.

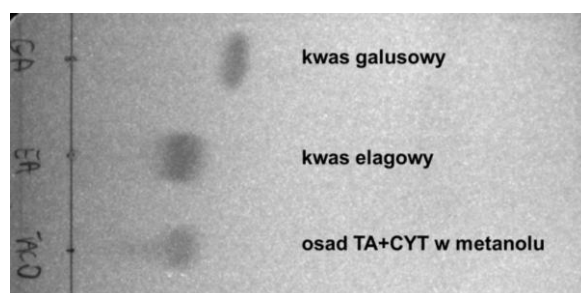


Rysunek 50. Widmo FT-IR wytrąconych krystalitów z mieszaniny TA-SC (a), z próbką odniesienia kwasu elagowego (b).



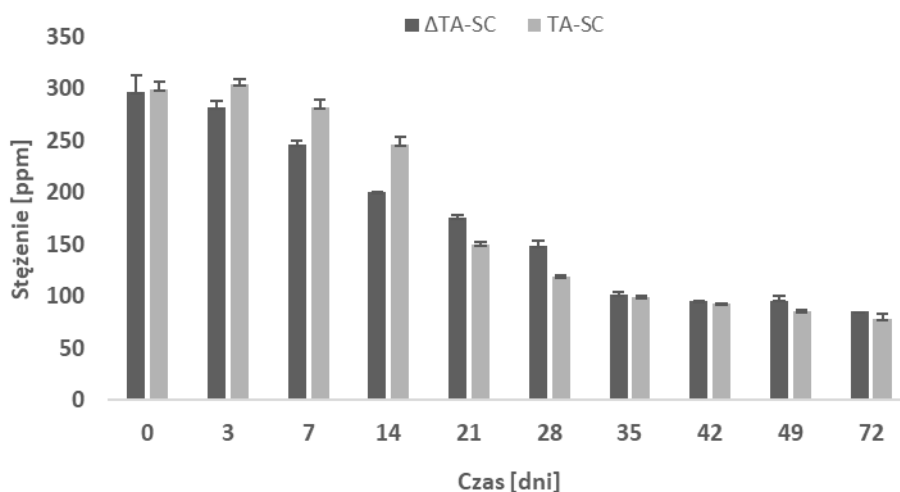
Rysunek 51. Wzór chemiczny kwasu elagowego.

Analiza wytrąconych krystalitów techniką TLC wskazała obecność struktur należących do kwasu elagowego (Rysunek 52).



Rysunek 52. Zdjęcie płytki TLC rozpuszczonych krystalitów w metanolu z próbkami odniesienia kwasu galusowego oraz kwasu elagowego w fazie rozwijającej toluen: aceton: kwas mrówkowy (3: 3: 1 v/v/v).

Porównano dynamikę zmian zawartości wolnych grup hydroksylowych (FC) w mieszaninie kwasu taninowego z cytrynianem sodu (TA-SC) przygotowanej w dwóch wariantach: bez podgrzewania (w temperaturze pokojowej) oraz po ogrzaniu do 100 °C — zgodnie z warunkami stosowanymi w syntezie nanocząstek (Rysunek 53). Analizy przeprowadzono w równoległych punktach czasowych, aby ocenić wpływ temperatury na tempo przemian zachodzących w układzie oraz dostępność funkcjonalnych grup –OH w czasie wydłużonego kondycjonowania (0–72 dni).



Rysunek 53. Wykres zmiany stężenia wolnych grup hydroksylowych w mieszaninach TA-SC (kwas taninowy + cytrynian sodu, próbka przygotowana w temperaturze pokojowej) oraz ΔTA-SC (kwas taninowy + cytrynian sodu, próbka przygotowana w warunkach syntezy, tj. w temperaturze wrzenia) podczas kondycjonowania w czasie 0–72 dni.

W obu analizowanych wariantach zaobserwowano wyraźny spadkowy trend stężenia wolnych grup hydroksylowych. Charakter przebiegu zmian różnił się jednak w zależności od sposobu przygotowania próbki. Dla układu TA-SC (Rysunek 53) początkowe wartości fenoli utrzymywały się na względnie stabilnym poziomie przez kilka pierwszych dni, po czym następował wyraźny spadek stężenia, szczególnie po dwóch tygodniach. Moment ten koreluje z pojawieniem się pierwszych widocznych wytrąceń krystalitów w roztworze, co zostało odnotowane w obserwacjach wizualnych oraz potwierdzone w badaniach spektroskopowych. Wyniki wskazują, że procesy odpowiedzialne za utratę ilości aktywnych grup –OH w warunkach pokojowych przebiegają w początkowym etapie powoli, a ich dynamika wzrasta

dopiero po kilkunastu dniach kondycjonowania. Odmienny przebieg obserwowano w próbce Δ TA-SC (słupki ciemnoszare na Rysunku 53), tj. w wariantcie przygotowanym w warunkach syntezy. W tym przypadku spadek zawartości wolnych grup hydroksylowych był zauważalny już w pierwszych dniach, a tempo zmian pozostawało wysokie także w kolejnych etapach. Uzyskane wyniki wskazują, że wysoka temperatura znacząco przyspiesza przemiany prowadzące do utraty aktywności redoks kwasu taninowego w układzie TA-SC. Dane ilościowe potwierdzają, że układ TA-SC jest nietrwały w czasie, a jego zdolność do udziału w reakcjach redoks systematycznie maleje zarówno w warunkach pokojowych, jak i po wcześniejszym podgrzaniu. Ubytek wolnych grup hydroksylowych można przypisać procesom utleniania, hydrolizy wiązań estrowych oraz powstawaniu produktów kondensacji, które charakteryzują się niską reaktywnością wobec odczynnika Folina–Ciocâlțu i często wytrącają się w formie trudno rozpuszczalnych agregatów. Wydłużone kondycjonowanie do 72 dni pozwoliło zaobserwować, że po około czterech tygodniach oba układy osiągały stan względnej równowagi. Dalszy spadek stężenia fenoli był wówczas niewielki i stabilizował się w przedziale 80–100 ppm, co sugeruje ustalenie nowego stanu dynamicznego. Wynik ten wskazuje, że pomimo znacznej utraty aktywności redoks w pierwszej fazie przechowywania, mieszanina TA–CYT stabilizuje się chemicznie i w dłuższej perspektywie utrzymuje stałą, choć obniżony poziom reaktywności.

8.3. Charakterystyka układu koloidalnego nanocząstek srebra

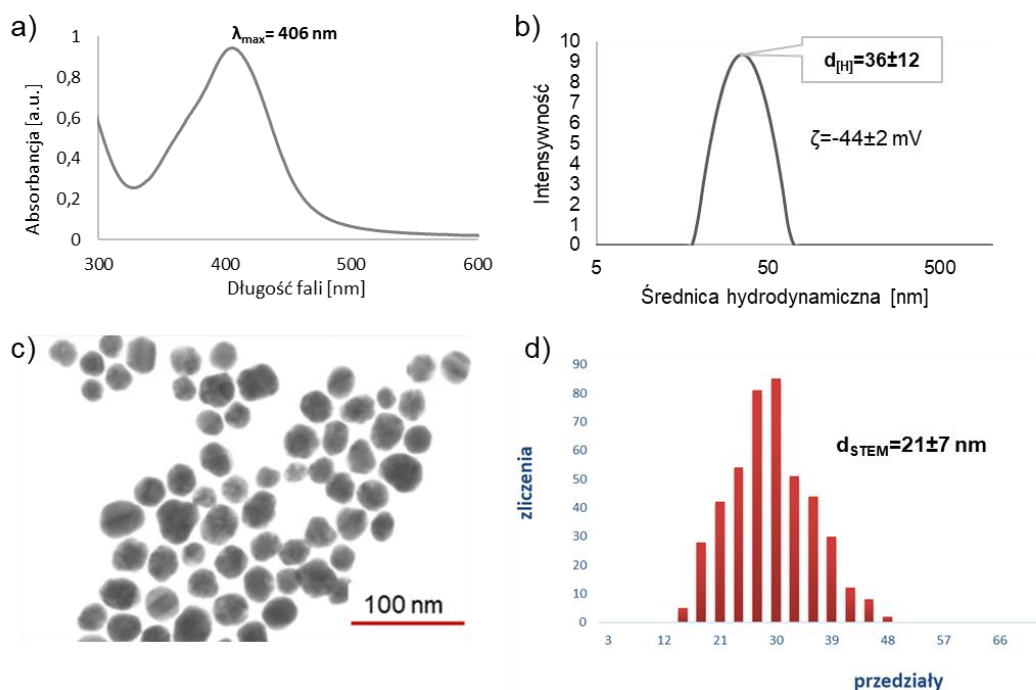
W niniejszym podrozdziale przedstawiono wyniki kompleksowej analizy układu koloidalnego zawierającego nanocząstki srebra otrzymane metodą redukcji chemicznej w obecności kwasu taninowego i cytrynianu sodu (procedurę syntezy opisano w Rozdziale 5.2). Charakterystyka została przeprowadzona etapowo, z rozdzieleniem danych dotyczących właściwości samej nanocząstki oraz pozostałych składników układu, co pozwoliło na szczegółowe uchwycenie zarówno morfologii rdzenia metalicznego, jak i roli otoczki organicznej.

Celem badań było określenie parametrów fizykochemicznych oraz śledzenie dynamiki zmian zachodzących podczas przechowywania koloidu, co ma kluczowe znaczenie dla oceny jego stabilności, funkcjonalności i potencjalnych zastosowań biologicznych. Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem komplementarnych technik obejmujących pomiary spektroskopowe, mikroskopowe, jak również metody ilościowego oznaczania zawartości grup

funkcyjnych. Do badań wybrano próbki reprezentujące różne etapy przechowywania: bezpośrednio po syntezie (t_0), po dwóch tygodniach (t_{14}) oraz po sześciu miesiącach (t_{180}). Taki układ czasowy pozwolił na ocenę zarówno początkowych właściwości układu, jak i jego ewentualnej przemiany w czasie kondycjonowania.

8.3.1. Charakterystyka nanocząstek srebra w czasie (t_0)

W pierwszym etapie przeprowadzono charakterystykę wytworzonych nanocząstek srebra (t_0), obejmującą analizę widmową UV-Vis, ocenę średnicy hydrodynamicznej techniką DLS, pomiary potencjału zeta oraz bezpośrednią obserwację morfologii za pomocą mikroskopii STEM (Rysunek 54). Widmo UV-Vis (Rysunek 54a) wykazało obecność charakterystycznego pasma plazmonowego z maksimum absorpcji przy 406 nm, co jest zgodne z literaturowymi wartościami dla stabilnych, sferycznych nanocząstek srebra o niewielkich rozmiarach [33]. Położenie maksimum nie wskazywało na obecność aglomeratów ani cząstek o znacznie większych wymiarach, co sugeruje jednorodność badanego koloidu. Wyniki pomiarów DLS (Rysunek 54b) potwierdziły, że średni rozmiar hydrodynamiczny populacji nanocząstek wynosił 36 ± 12 nm. Rozkład był stosunkowo wąski, co wskazuje na brak dominacji większych agregatów i obecność dobrze zdyspergowanych cząstek. Analiza obrazów STEM (Rysunek 54c) ujawniła, że AgNPs mają głównie kulisty kształt. Średnia średnica nanocząstek określona na podstawie pomiarów z obrazów STEM wyniosła 21 ± 7 nm. Histogram rozkładu wielkości (Rysunek 44d) potwierdził, że rozkład jest symetryczny i skoncentrowany w zakresie 20–30 nm, bez obecności frakcji o rozmiarach odstających.



Rysunek 54. Charakterystyka nanocząstek srebra w czasie to: a) widmo UV-Vis z maksimum absorpcji przy 406 nm, b) rozmiar hydrodynamiczny NPs oznaczony metodą DLS (36 ± 12 nm) i potencjał zeta (-44 ± 2 mV), c) obraz STEM przedstawiający TA-AgNPs przy powiększeniu 500 000x, d) histogram rozkładu wielkości cząstek uzyskany na podstawie analizy obrazów STEM - nanocząstki o średnicy 21 ± 7 nm.

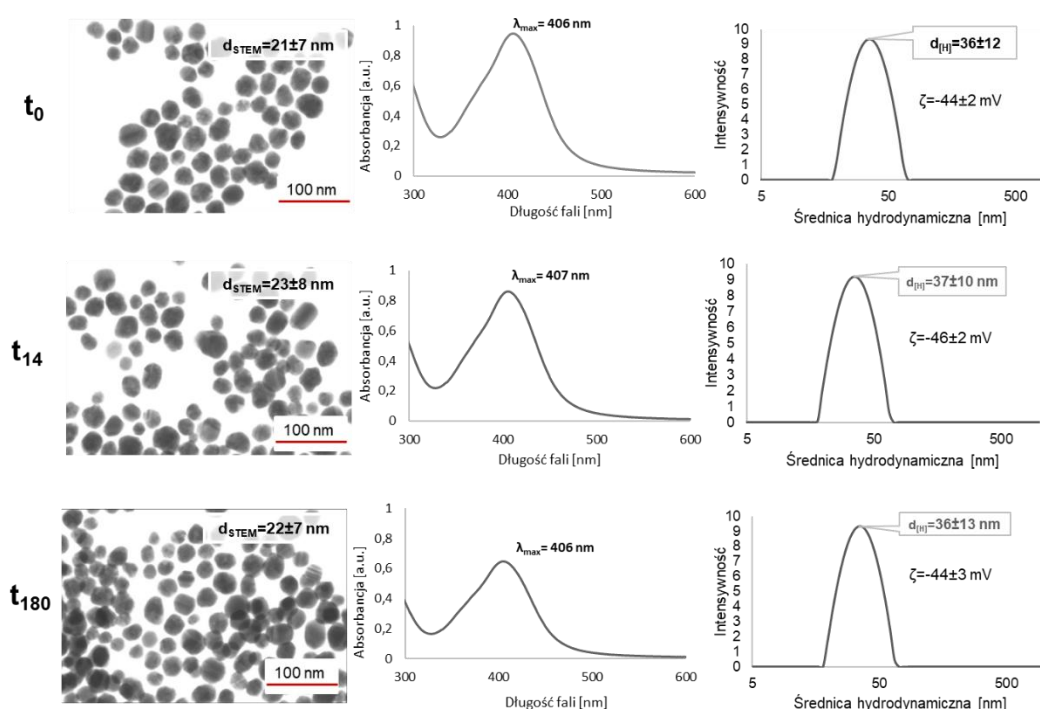
Tabela 3. Wartości: maksimum absorpcji λ_{max} , średnicy hydrodynamicznej $d_{[H]}$ oraz rozmiaru rdzenia metalicznego d_{STEM} nanocząstek srebra.

λ_{max}	406 nm
$d_{[H]}$	36 ± 12 nm
d_{STEM}	21 ± 7 nm

Otrzymane nanocząstki charakteryzowały się także wysoką stabilnością elektrokinetyczną. Otrzymano wartość potencjału zeta wynoszącą -44 ± 2 mV, mieszczącą się w zakresie uznawanym za gwarantujący stabilność koloidów w wyniku silnych odpychań elektrostatycznych pomiędzy powierzchniami cząstek

8.3.2. Stabilność nanocząstek srebra w czasie kondycjonowania (t_0 - t_{180})

Ocena stabilności morfologicznej nanocząstek srebra została przeprowadzona nie tylko w momencie syntezy (t_0), ale również po 14 dniach (t_{14}) oraz po 180 dniach przechowywania (t_{180}). Wyniki zestawiono na Rysunku 55, obejmującej obserwacje morfologiczne wykonane metodą mikroskopii STEM wraz z określeniem rozrzutu wielkości wokół wartości średniej (d_{STEM}), analizę widmową metodą UV-Vis oraz oznaczenia średnicy hydrodynamicznej przy użyciu techniki DLS wraz z potencjałem zeta (ζ).



Rysunek 55. Charakterystyka nanocząstek srebra (TA-AgNPs) w czasie kondycjonowania: obrazy STEM wraz z rozkładem średnich rozmiarów cząstek, położenie maksimum pasma plazmonowego w widmie UV-Vis, średnica hydrodynamiczna określona metodą DLS wraz z potencjałem zeta - w punktach czasowych t_0 , t_{14} i t_{180} .

W zakresie spektroskopii UV-Vis (Rysunek 45) we wszystkich punktach czasowych obserwowano charakterystyczne pasmo plazmonowe z maksimum absorpcji w obszarze 405–406 nm. Dla próbek t_0 i t_{14} maksimum znajdowało się przy 406 nm, natomiast w punkcie t_{180} przy 405 nm. Brak wyraźnych zmian w położeniu oraz kształcie pasma plazmonowego wskazuje, że nanocząstki nie ulegały procesom agregacji ani rozrostu, a ich dyspersja pozostawała stabilna przez cały okres badań. Średnica hydrodynamiczna nanocząstek wynosiła

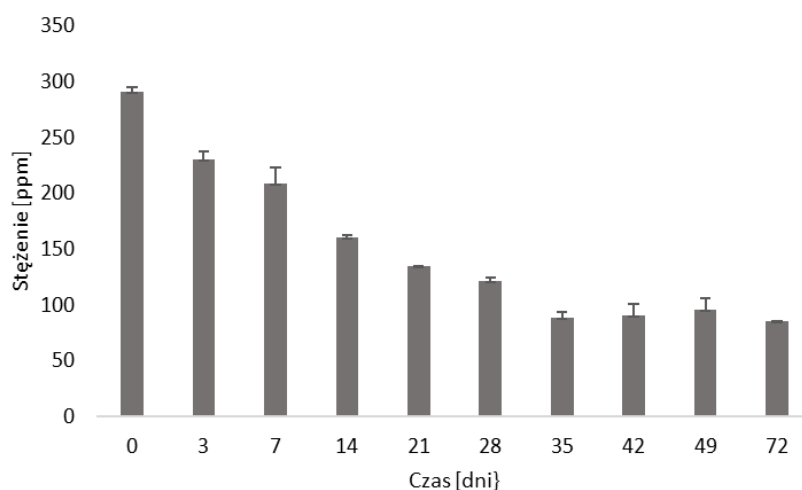
36 ± 12 nm w punkcie t_0 , 37 ± 10 nm w punkcie t_{14} oraz 36 ± 13 nm w punkcie t_{180} . Różnice w wartościach mieściły się w granicach błędu pomiarowego i nie wskazują na obecność cząstek o istotnie większych rozmiarach, które mogłyby świadczyć o procesach aglomeracyjnych. Należy przy tym zaznaczyć, że technika DLS obejmuje zarówno rdzeń metaliczny, jak i otaczającą go warstwę hydratacyjno-organiczną, co skutkuje wartościami wyższymi niż uzyskiwane metodą STEM. Stabilność elektrokinetyczną nanocząstek potwierdzają wyniki pomiarów potencjału zeta. We wszystkich punktach czasowych wartości mieściły się w zakresie -44 do -46 mV (t_0 : -44 ± 2 mV; t_{14} : -46 ± 2 mV; t_{180} : -44 ± 3 mV). Tak wysokie wartości ujemne jednoznacznie wskazują na skuteczną stabilizację układu w wyniku odpychań elektrostatycznych pomiędzy cząstkami. Analiza obrazów STEM pozwoliła na bezpośrednią ocenę kształtu i rozmiaru rdzenia nanocząstek. W każdym z badanych punktów czasowych obserwowano populację cząstek o kulistych kształtach, bez oznak aglomeracji czy tworzenia struktur o większych rozmiarach. Średnia średnica nanocząstek wynosiła odpowiednio 21 ± 7 nm (t_0), 23 ± 8 nm (t_{14}) oraz 22 ± 7 nm (t_{180}), co świadczy o zachowaniu stabilności wymiarów rdzenia metalicznego w długim okresie przechowywania. Rozkład wielkości pozostawał symetryczny i skoncentrowany w zakresie 20–30 nm. Łączna analiza wszystkich parametrów wskazuje jednoznacznie, że nanocząstki srebra otrzymane metodą redukcji chemicznej w obecności kwasu taninowego i cytrynianu sodu zachowują wysoką stabilność fizykochemiczną co najmniej przez sześć miesięcy od momentu syntezy. Stałość położenia pasma plazmonowego, niezmienny rozmiar hydrodynamiczny, utrzymujące się wysokie wartości potencjału zeta oraz jednorodna morfologia obserwowana w obrazach STEM dowodzą, że rdzeń metaliczny AgNPs nie ulega istotnym przemianom w czasie kondycjonowania.

8.3.3. Monitorowanie przemian kwasu taninowego techniką FT-IR oraz oznaczenie całkowitej zawartości polifenoli metodą Folina–Ciocâlțu w układzie koloidalnym

Do monitorowania zmian zachodzących w układzie koloidalnym zawierającym nanocząstki srebra stabilizowane kwasem taninowym i cytrynianem sodu wykorzystano metodę Folina–Ciocâlțu. W badaniach uwzględniono wcześniej przygotowaną kalibrację nanocząstek srebra stabilizowanych cytrynianem sodu (procedurę opisano w Rozdziale 7), co umożliwiło wiarygodne rozdzielenie sygnału pochodzącego od AgNPs od sygnału generowanego przez wolne grupy hydroksylowe kwasu taninowego (i jego pochodnych).

Dzięki temu możliwe było prowadzenie pomiarów bez konieczności separacji fazy koloidalnej od roztworu, a uzyskane dane odzwierciedlają rzeczywisty przebieg przemian w całym układzie.

Wartość początkowa stężenia fenoli w próbce wynosiła 315 ppm. Analiza przebiegu zmian (Rysunek 56) wykazała wyraźny spadkowy trend w czasie kondycjonowania. Już po 3 dniach zawartość wolnych grup hydroksylowych obniżyła się do ok. 230 ppm, a po tygodniu do ok. 200 ppm. Po dwóch tygodniach stężenie spadło do poziomu ~160 ppm, natomiast najniższe wartości (ok. 90 ppm) zarejestrowano w końcowej fazie eksperymentu, pomiędzy 49. a 72. dniem. Uzyskane wyniki wskazują, że największa dynamika przemian miała miejsce w pierwszych dwóch tygodniach, po czym proces ulegał stopniowemu spowolnieniu, aż do osiągnięcia stanu równowagi. Obserwowany spadek stężenia wolnych grup hydroksylowych potwierdza, że kwas taninowy w układzie koloidalnym ulega złożonym przemianom strukturalnym prowadzącym do dezaktywacji wolnych grup –OH. Mechanizmy tych procesów mogą obejmować utlenianie reszt galoilowych do form chinonowych, tworzenie wiązań estrowych i eterowych pomiędzy fragmentami polifenolowymi, a także polimeryzację produktów pośrednich. Istotną rolę odgrywa również powstawanie struktur trudno rozpuszczalnych, które w kolejnych etapach wytrącają się z roztworu, redukując ilość związków dostępnych do reakcji z odczynnikiem FC.



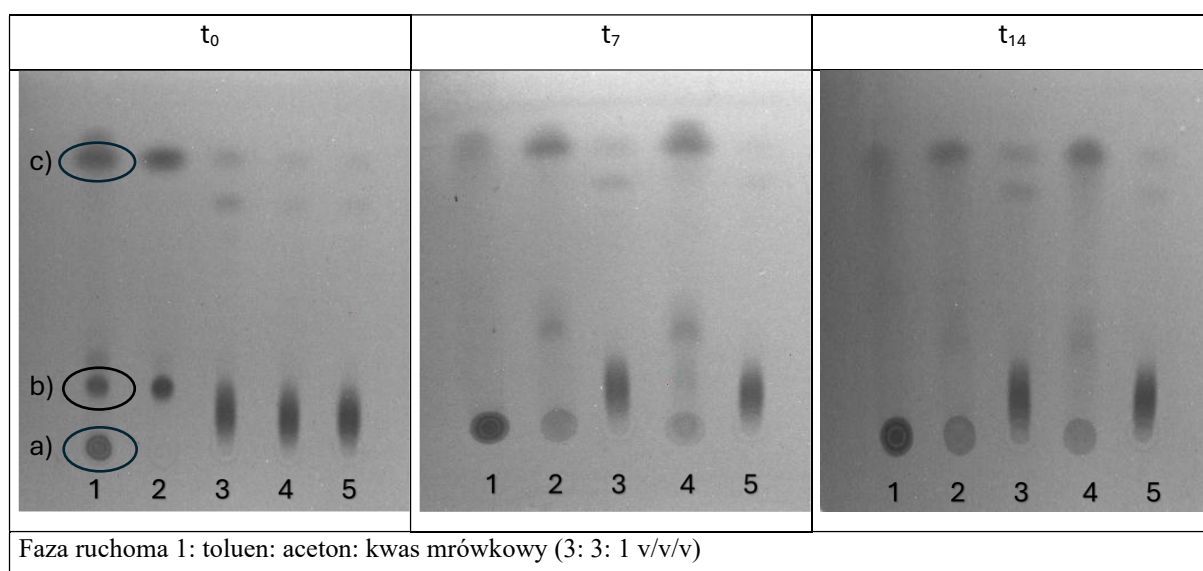
Rysunek 56. Wykres zależności stężenia wolnych grup hydroksylowych w układzie AgNPs od momentu wytworzenia t_0 – w czasie kondycjonowania t_{72} .

Uzyskane wyniki jednoznacznie potwierdzają, że w badanym układzie TA–AgNPs zachodzą przemiany prowadzące do redukcji liczby wolnych grup hydroksylowych. Kwas taninowy w obecności nanocząstek srebra i cytrynianu sodu podlega transformacjom strukturalnym wpływającym na jego zdolność do udziału w reakcjach redoks.

8.3.4. Analiza składu układu koloidalnego metodą TLC i LC-MS

Do badań wybrano preparaty, które wcześniej wykazały różnice w dynamice zmian w analizach spektroskopowych (UV-Vis, FC), co pozwoliło na powiązanie obserwowanych sygnałów z procesami zachodzącymi w czasie kondycjonowania. Zastosowano dwa warianty przygotowania mieszaniny TA-SC: w temperaturze pokojowej oraz w warunkach syntezy (100 °C), a także układ koloidalny zawierający AgNPs, dla którego obecność srebra mogła wpływać na przebieg reakcji. Dodatkowo wykonano analizy kontrolne dla samego kwasu taninowego przygotowanego w obu wariantach. Wyniki zestawiono na Rysunku 57. Dla układu zawierającego nanocząstki srebra (TA-AgNPs) od samego początku (t_0) obserwowano intensywną strefę sygnału pozostającą na linii startu, co wskazuje na obecność struktur niemigrujących – nanocząstek srebra pokrytych warstwą organiczną. Równocześnie widoczne były sygnały przypisane do 1,2,3,4,6-penta-O-galloilo- β -D-glukozy oraz kwasu galusowego, zgodnie z porównaniem do próbek odniesienia. Wraz z upływem czasu (t_7 , t_{14}) intensywność tych sygnałów ulegała stopniowemu osłabieniu, a pojawiał się sygnał odpowiadający kwasowi elagowemu. Zmiana ta pozostaje w zgodzie z wynikami metody Folina–Ciocâlțeu, wskazującymi na sukcesywny ubytek wolnych grup hydroksylowych i potwierdzając, że układ nie pozostaje chemicznie niezmienny, lecz ulega transformacjom w czasie przechowywania. W mieszaninie kwasu taninowego z cytrynianem sodu przygotowanej w warunkach syntezy (TA-SC, 100 °C) początkowy profil sygnałów był zbliżony, choć nie obserwowano sygnału na linii startu w t_0 . Dopiero w kolejnych punktach czasowych pojawiła się nieruchoma strefa, której intensywność narastała, co sugeruje spontaniczne tworzenie się struktur o wysokiej masie cząsteczkowej. Zjawisko to zachodziło nawet w przypadku braku srebra, jednak przebiegało wyraźnie wolniej, co może świadczyć o katalitycznym wpływie AgNPs na przebieg przemian. W przypadku próbek zawierających jedynie kwas taninowy (TA, przygotowany zarówno w temperaturze pokojowej, jak i w warunkach syntezy) profil sygnałów pozostawał stabilny w całym okresie analizy (t_0 – t_{14}), co wskazuje, że sam kwas taninowy nie ulegał istotnym transformacjom pod wpływem warunków termicznych w badanym przedziale czasowym. Natomiast mieszanina TA-SC przygotowana w temperaturze pokojowej

początkowo wykazywała profil zbliżony do TA, jednak już po 7 dniach (t_7) pojawiły się pierwsze dodatkowe strefy migracyjne oraz sygnał na linii startu. Zmiany te sugerują, że nawet bez udziału srebra oddziaływania pomiędzy taniną a cytrynianem sodu prowadzą do powstawania produktów o zmodyfikowanej polarności i ograniczonej ruchliwości chromatograficznej.

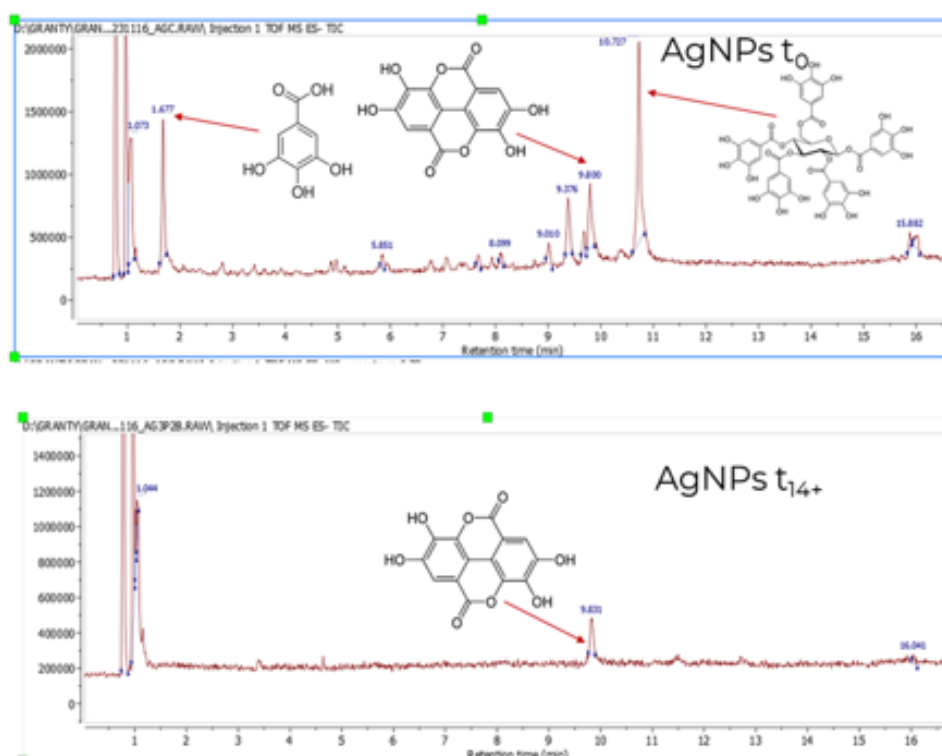


Rysunek 57. Płytki chromatograficzne układów: 1. koloid nanocząstek srebra AgNPs; 2. mieszanina kwasu taninowego z cytrynianem sodu otrzymana w warunkach syntezy; 3. kwas taninowy przygotowany w warunkach syntezy; 4. mieszanina kwasu taninowego z cytrynianem sodu przygotowaną w temperaturze pokojowej; 5. kwas taninowy przygotowany w temperaturze pokojowej.

W układzie TA-AgNPs zanik sygnałów odpowiadających wolnym formom taniny koreluje z pojawieniem się sygnałów kwasu elagowego i struktur niemigrujących, co wskazuje na postępujące procesy kondensacji i transformacji polifenoli. W mieszaninach TA-SC przygotowanych bez srebra podobne zjawiska również zachodzą, lecz z mniejszą intensywnością i opóźnieniem czasowym. Wyniki te potwierdzają, że srebro może pełnić rolę katalizatora przemian, przyspieszając tworzenie nowych produktów i struktur w układzie koloidalnym.

Analiza widm LC-MS (Rysunek 58) dla próbki AgNPs to dominowały sygnały odpowiadające obecności niskocząsteczkowych fenoli, przede wszystkim kwasu galusowego (GA), kwasu elagowego (EA) oraz większego związku – 1,2,3,4,6-penta-O-galloilo- β -D-glukozy (PGG). Związki zostały zidentyfikowane na podstawie charakterystycznych jonów

molekularnych oraz porównania z widmami referencyjnymi. Obecność tych produktów we wczesnej fazie przechowywania wskazuje, że już na etapie syntezy może dochodzić do częściowych przemian kwasu taninowego, obejmujących hydrolizę lub degradację.

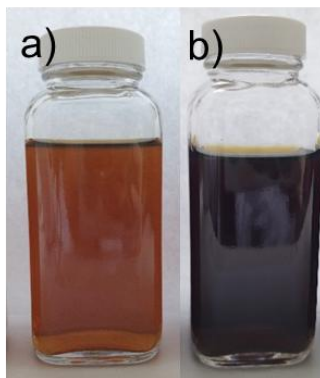


Rysunek 58. Widma LC-MS koloidu nanocząstek srebra w czasie t_0 i t_{14} .

Po 14 dniach kondycjonowania ($\text{AgNPs } t_{14+}$) zaobserwowano istotne zmiany w profilu chromatograficznym – sygnały odpowiadające kwasowi galusowemu oraz pentagaloilowej glukozie zanikły, a dominującym związkiem pozostał kwas elagowy. Wynik ten, w zestawieniu z analizami TLC, potwierdza, że w układzie koloidalnym zachodzą przemiany prowadzące do stopniowego zaniku prostszych form galoilowych i powstawania bardziej stabilnych produktów, takich jak kwas elagowy. Uzyskane dane wskazują więc na postępującą transformację komponentów organicznych w czasie przechowywania koloidu, co znajduje odzwierciedlenie także w obserwacjach dotyczących wytrącania się osadu.

8.3.5. Analiza wytrąconych kryształów w układzie koloidalnym TA-AgNPs

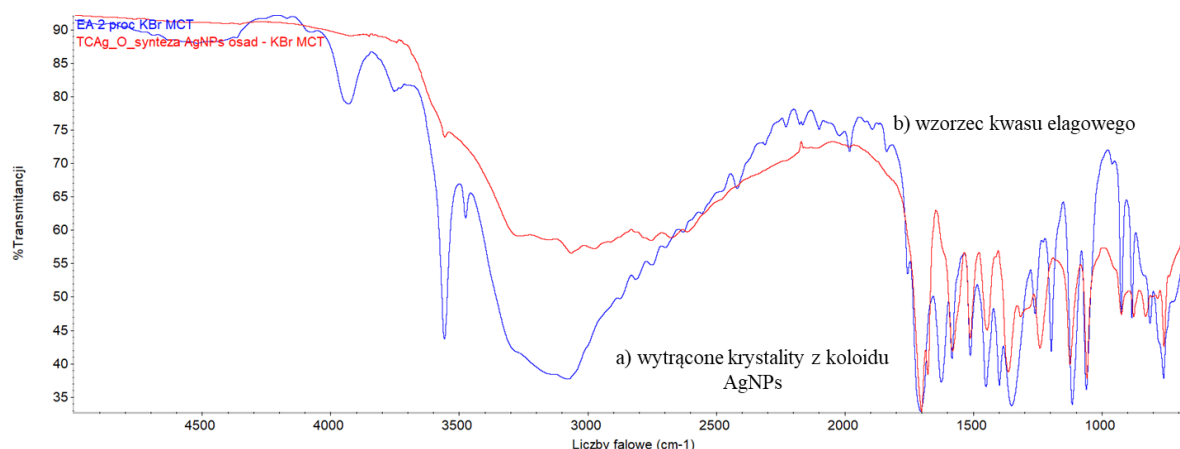
W trakcie przechowywania układu koloidalnego AgNPs zaobserwowano wyraźną zmianę barwy roztworu (Rysunek 59) – od jasnobrązowej w momencie syntezy (t_0) do ciemnobrązowej po 30 dniach (t_{30}). Zmiana ta wskazuje na zachodzące w czasie przemiany w strukturze i/lub otoczeniu nanocząstek.



Rysunek 59. Koloid nanocząstek srebra w czasie; a) od momentu wytworzenia t_0 , b) w czasie kondycjonowania t_{30} .

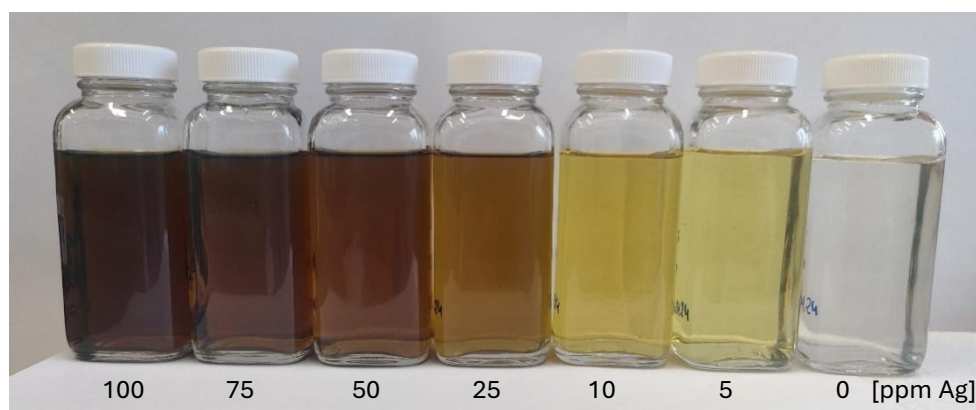
Ponieważ pomiary UV-Vis oraz STEM potwierdziły brak zmian morfologii rdzenia nanocząstek, obserwowana zmiana barwy wskazuje na modyfikacje zachodzące w medium koloidalnym otaczającym nanocząstki. Proces ten może obejmować utlenianie grup fenolowych, powstawanie sprzężonych układów wiązań podwójnych lub generowanie wtórnych produktów polifenolowych, takich jak chinony, znanych z silnych właściwości chromoforowych. Zmiana barwy koreluje z wynikami metody Folina–Ciocâlțeu oraz analiz TLC, co jednoznacznie potwierdza, że układ TA-AgNPs ulega istotnym przemianom chemicznym w czasie przechowywania, mimo zachowania morfologii rdzenia nanocząstek srebra. Analogicznie do obserwacji prowadzonych dla mieszaniny kwasu taninowego z cytrynianem sodu, w układzie koloidalnym AgNPs po około 14 dniach przechowywania zaobserwowano wytrącanie się osadu w postaci dobrze wykształconych kryształitów. W celu ich identyfikacji wykonano analizę FT-IR, a uzyskane widmo porównano z widmem próbki odniesienia – czystego kwasu elagowego. Jak przedstawiono na Rysunku 60, profile obu widm wykazują zgodność w zakresie charakterystycznych pasm absorpcyjnych, m.in. w obszarze drgań grup hydroksylowych (ok. 3400 cm^{-1}) oraz pasm odpowiadających wiązaniom C=O i C=C w strukturze aromatycznej ($1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$). Obecność tych sygnałów w osadzie potwierdza, że jednym z głównych produktów przemian zachodzących w czasie kondycjonowania koloidu jest kwas elagowy. Wynik ten jest spójny z wcześniejszymi

obserwacjami metodą TLC i LC-MS, wskazującymi na stopniową degradację taniny i powstawanie wtórnych produktów fenolowych, w tym właśnie kwasu elagowego.

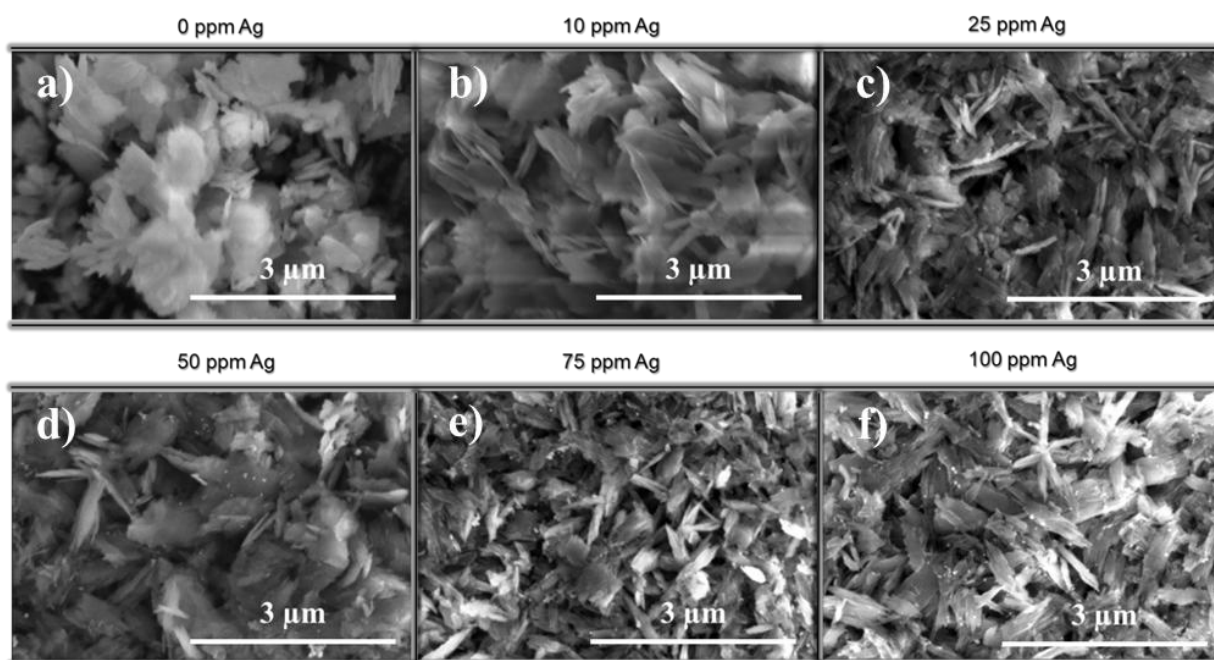


Rysunek 60. Widmo FT-IR wytrąconych krystalitów z koloidu AgNPs z próbką odniesienia kwasu elagowego.

Pomimo obecności srebra w układzie, podjęto dodatkowe badania w celu określenia, czy ilość dodanego srebra wpływa na morfologię oraz charakter powstających krystalitów. W tym celu przygotowano serię układów o stałym stężeniu kwasu taninowego i cytrynianu sodu, lecz o zmiennej zawartości azotanu srebra: 0, 5, 10, 25, 50, 75 oraz 100 ppm (Rysunek 61). Próbkę o skrajnych stężeniach (0 i 100 ppm) odpowiadają wcześniej scharakteryzowanym układom TA-SC (0 ppm - warunki syntezy) oraz TA-AgNPs (100 ppm srebra), natomiast pozostałe układy pozwoliły na prześledzenie zależności pomiędzy stężeniem srebra a strukturą powstających osadów.



Rysunek 61. Mieszaniny kwasu taninowego i cytrynianu sodu (o stałym stężeniu TA-SC 315:1672ppm), ale o zmiennej ilości azotanu srebra 0, 5, 10, 25, 50, 75 oraz 100.

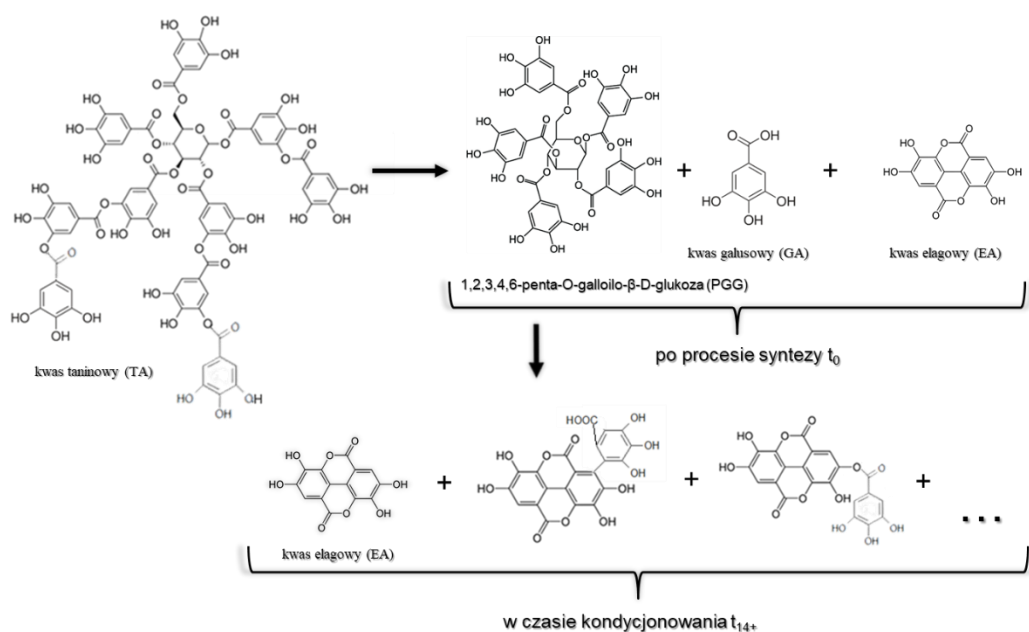


Rysunek 62. Zdjęcia SEM wytrąconych krystalitów przy zmiennym stężeniu srebra: srebra 0, 5, 10, 25, 50, 75 oraz 100 ppm.

Analiza morfologii wytrąconych krystalitów z układów zawierających kwas taninowy i cytrynian sodu przy zmiennej zawartości azotanu srebra (0–100 ppm) pozwoliła uchwycić wpływ obecności srebra na morfologię powstających osadów (Rysunek 62). W układzie TA-SC (0 ppm, bez srebra) krystality przyjmowały postać dużych, nieregularnych i liściastych struktur o stosunkowo znacznych rozmiarach (Rysunek 62a). Tworzyły one zwarte agregaty o słabo zróżnicowanej geometrii, co wskazuje, że w warunkach braku jonów Ag^+ procesy krystalizacji zachodzą w sposób niekontrolowany, prowadząc do powstawania masywnych form. Dodatek srebra zmieniał istotnie morfologię krystalitów. Już przy 25 ppm Ag^+ obserwowano bardziej podzielone i niejednorodne struktury, o powierzchni mniej regularnej niż w przypadku TA-SC (Rysunek 62b). Wzrost zawartości srebra do 50 ppm skutkował wyraźnym przeorganizowaniem – pojawiały się drobniejsze formy, często o charakterze igiełkowatym i bardziej uporządkowanej orientacji (Rysunek 62c). Jeszcze silniejszy efekt uzyskano przy 75 ppm Ag^+ (Rysunek 62d), gdzie krystality były wyraźnie mniejsze, gęściej upakowane i o zarysowanej geometrii, co wskazuje na udział srebra w procesie nukleacji większej liczby ośrodków krystalizacji. Najbardziej jednorodną i drobnoziarnistą strukturę zaobserwowano w układzie AgNPs (100 ppm Ag^+) (Rysunek 62e–f). Krystality miały tam postać równomiernie uformowanych, igiełkowatych struktur o wyraźnie mniejszych rozmiarach niż w próbkach o niższym stężeniu srebra. Co istotne, w osadach uzyskanych przy 50–100 ppm (szczególnie w Rysunek 62d–f) widoczne były również nanocząstki srebra

wbudowane w krystalicy, co sugeruje ich aktywny udział w procesie tworzenia fazy stałej. Zaobserwowana zależność wskazuje jednoznacznie, że obecność srebra sprzyja powstawaniu drobnoziarnistych i bardziej jednorodnych krystalitów. Można to interpretować jako efekt katalitycznej roli srebra, które przyspiesza przemiany fenoli (zgodnie z obserwacjami TLC i spadkiem zawartości wolnych grup hydroksylowych oznaczanych metodą FC) oraz pełni funkcję dodatkowych centrów nukleacji. W rezultacie zwiększona liczba ośrodków krystalizacji prowadzi do zmniejszenia rozmiaru pojedynczych krystalitów oraz do powstania bardziej uporządkowanych struktur. Podsumowując, wraz ze wzrostem stężenia Ag^+ od 0 do 100 ppm dochodzi do przejścia od masywnych, liściastych struktur o dużych rozmiarach (TA-SC) do drobnoziarnistych, igielkowatych i uporządkowanych krystalitów zawierających AgNPs. wpływa zatem na dalsze losy chemiczne składników organicznych układu, determinując zarówno morfologię powstających kryształów, jak i ich zdolność do wbudowywania nanocząstek srebra w strukturę fazy stałej.

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że kwas taninowy po procesie syntezy ulega przemianom do kwasu galusowego, kwasu elagowego i 1,2,3,4,6-penta-O-galloilo- β -D-glukozy, a w czasie kondycjonowania następują dalsze przemiany prowadzące do kwasu elagowego i jego pochodnych. Na Rysunku 63 przedstawiono schematyczne przedstawienie procesu przemian kwasu taninowego w koloidzie AgNPs.



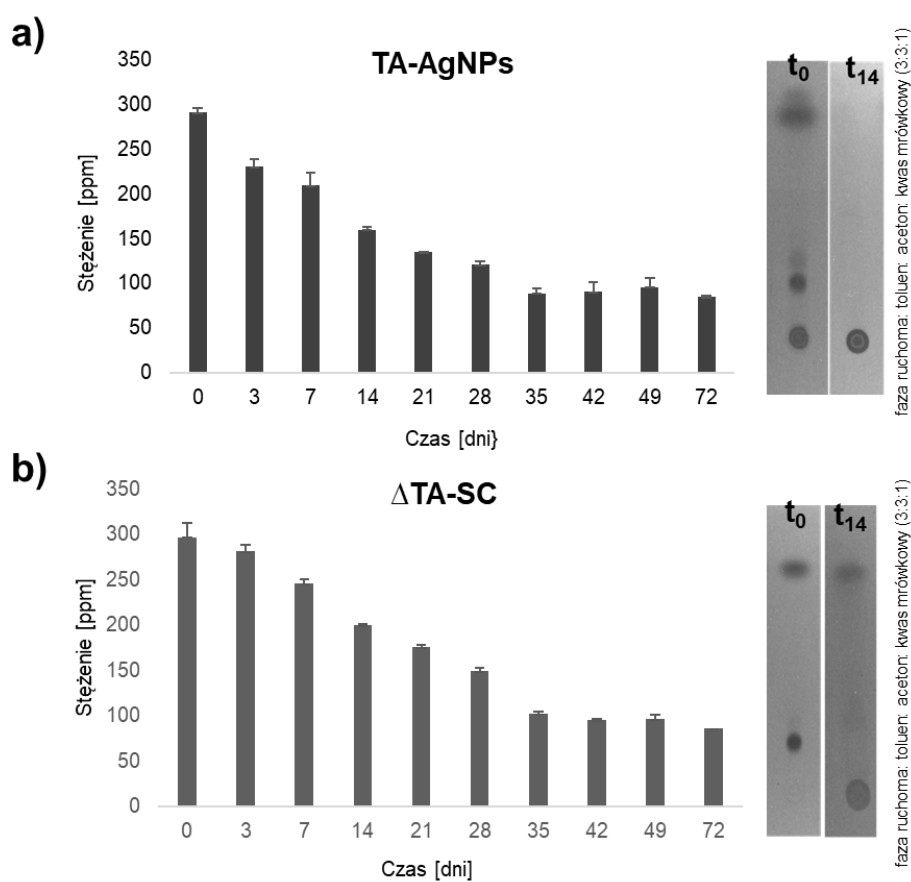
Rysunek 63. Schematyczne przedstawienie procesu przemian polifenoli w koloidzie nanocząstek srebra.

9. Aktywność biologiczna nanocząstek funkcjonalnych w postaci nanocząstek srebra

Badania aktywności biologicznej otrzymanych układów koloidalnych nanocząstek srebra przeprowadzono we współpracy z Wojskowym Instytutem Higieny i Epidemiologii im. Generała Karola Kaczkowskiego w Warszawie. Prace naukowe były realizowane w ramach projektu badawczego „*Sfunkcjonalizowane nanocząstki metali szlachetnych jako stymulatory odpowiedzi immunologicznej w zakażeniu herpeswirusem typu 1 i 2*” (NCN-OPUS, 2018/31B/NZ6/02606). Celem tych badań była ocena aktywności wirusobójczej nanocząstek srebra wytworzonych w obecności kwasu taninowego i cytrynianu sodu oraz ustalenie zależności pomiędzy właściwościami fizykochemicznymi badanych układów a ich potencjałem biologicznym.

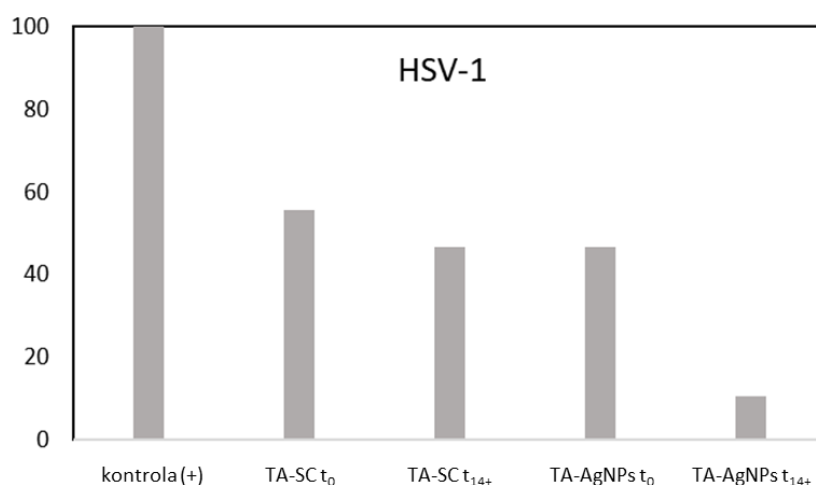
Rozdział ten stanowi powiązanie uzyskanych wyników charakterystyki fizykochemicznej nanocząstek z obserwowanymi efektami biologicznymi. Przeprowadzona korelacja pozwala na określenie, w jaki sposób procesy przemian kwasu taninowego w obecności nanocząstek srebra oraz proces kondycjonowania koloidów wpływają na ich aktywność wirusobójczą.

Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że w badanych układach TA-SC oraz TA-AgNPs (Rysunek 64) zachodzą przemiany w czasie kondycjonowania, co potwierdzają analizy metodą Folina–Ciocâlțu oraz chromatografii cienkowarstwowej (Rysunek 64). W obu przypadkach obserwuje się systematyczny spadek stężenia wolnych grup hydroksylowych w czasie kondycjonowania, a także pojawianie się nowych sygnałów w chromatografii po procesie syntezy. W przypadku koloidu TA-AgNPs zmiany te są wyraźniej widoczne, a po 14 dniach kondycjonowania obserwuje się pasma odpowiadające strukturom niemigrującym (TLC), co sugeruje powstawanie produktów o większej masie cząsteczkowej i odmiennych właściwościach fizykochemicznych.



Rysunek 64. Zmiany stężenia wolnych grup hydroksylowych oznaczonych metodą Folina–Ciocâlțu (po lewej) oraz wyniki analizy TLC (po prawej) dla układów: a) TA-AgNPs i b) Δ TA-SC od momentu przygotowania próbki (t_0) oraz w czasie kondycjonowania (t_{14+}).

Badania aktywności wirusobójczej prowadzono na liniach komórkowych Vero, zakażonych wirusem opryszczki pospolitej typu 1 (HSV-1). Komórki inkubowano w obecności badanych układów (TA-SC oraz TA-AgNPs) pobranych po procesie syntezy (t_0) oraz po okresie kondycjonowania (t_{14+}). Następnie oceniano stopień infekcji wirusowej w stosunku do kontroli dodatniej (komórki zakażone bez dodatku próbki). Korelacja wcześniej przeprowadzonej charakterystyki fizykochemicznej koloidów TA-AgNPs z wynikami testów wirusobójczych (Rysunek 65) pozwala jednoznacznie wskazać, że obecność nanocząstek srebra istotnie wpływa na aktywność biologiczną układu.

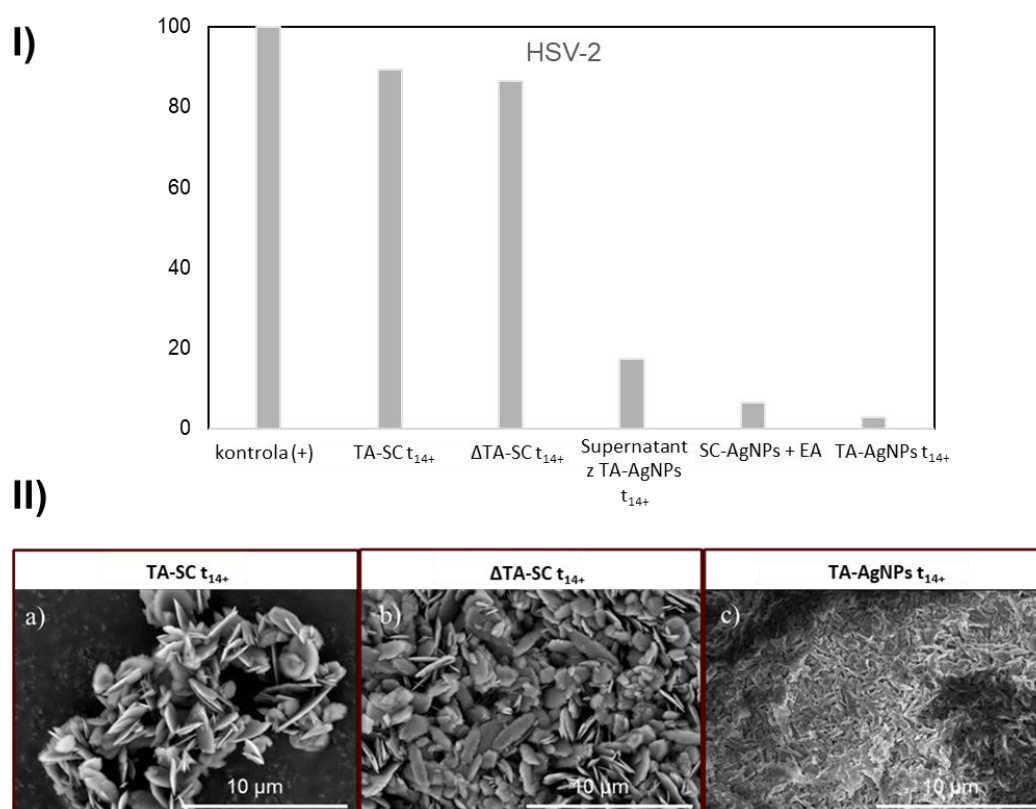


Rysunek 65. Aktywność wirusobójcza wobec HSV-1 dla próbek TA-SC oraz TA-AgNPs pobranych po procesie syntezy (t_0) oraz w czasie kondycjonowania (t_{14+}).

W próbkach zawierających jedynie mieszaninę kwasu taninowego i cytrynianu sodu (TA-SC) efekt wirusobójczy wobec HSV-1 był umiarkowany zarówno w t_0 , jak i po 14 dniach kondycjonowania, ograniczając zakażenie do około 45–55% w stosunku do kontroli. Podobny efekt obserwowano dla koloidu TA-AgNPs po procesie syntezy (t_0). Natomiast po okresie kondycjonowania (t_{14+}) koloid TA-AgNPs wykazywał zdecydowanie silniejsze działanie wirusobójcze, redukując infekcję HSV-1 do poziomu kilku procent w stosunku do próby kontrolnej. Zestawienie wyników fizykochemicznych i biologicznych wskazuje, że obecność nanocząstek srebra moduluje przemiany całego układu w czasie, prowadząc do powstawania produktów o wysokiej aktywności wirusobójczej. Moment pojawienia się sygnałów niemigrujących w TLC i spadek zawartości wolnych grup hydroksylowych w FC (Rysunek 64a) jest zbieżny z obserwacją maksymalnego efektu wirusobójczego, co jednoznacznie sugeruje, że powstające w obecności AgNPs produkty kondycjonowania są odpowiedzialne za zahamowanie replikacji HSV-1.

W przypadku HSV-2 wyniki jednoznacznie pokazują, że o skuteczności decyduje konkretny skład układu koloidalnego, a nie samo współwystępowanie „polifenol + srebro” (Rysunek 66-I). Po 14 dniach kondycjonowania mieszaniny TA-SC przygotowanej w temperaturze pokojowej oraz w warunkach syntezy (Δ TA-SC) poziom zakażenia pozostaje zbliżony do

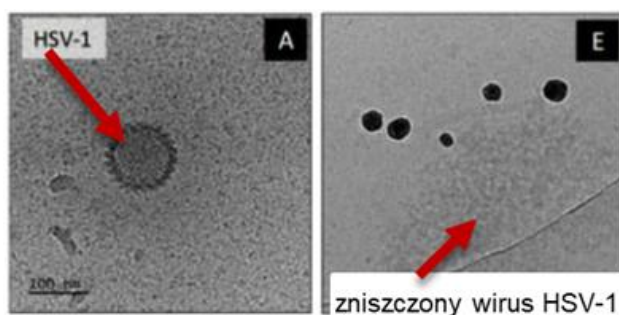
kontroli dodatniej, co potwierdza, że same przemiany polifenoli bez obecności srebra nie są wystarczające do inaktywacji wirusa. Częściowe obniżenie zakaźności obserwujemy dla supernatantu z syntezy TA-AgNPs – obecne w nim rozpuszczalne produkty przemian TA wpływają na replikację wirusa, lecz brak obecności metalu ogranicza ten efekt. Dodanie czystego kwasu elagowego do nanocząstek otrzymanych metodą cytrynianową (SC-AgNPs + EA) nie odtwarza wysokiej aktywności. W tym układzie EA występuje w pierwotnej postaci, a nie jako produkt przemian jak w koloidzie TA-AgNPs t_{14+} . Skutkiem jest słabsza interakcja z wirusem i niższa aktywność niż w TA-AgNPs t_{14+} . Podsumowując, samo dodanie EA do cytrynianowo-stabilizowanych AgNPs nie tworzy takiego samego układu, która powstaje w obecności TA i podczas kondycjonowania koloidu TA-AgNPs. Najsilniejszy efekt wirusobójczy wykazuje TA-AgNPs t_{14+} – niemal całkowite zahamowanie infekcji HSV-2.



Rysunek 66. Aktywność wirusobójcza wobec HSV-2 dla badanych układów TA-SC, SC-AgNPs+EA, supernatantu z TA-AgNPs oraz TA-AgNPs pobranych po 14 dniach kondycjonowania (I) oraz obrazy SEM krystalitów (II): (a) TA-SC, (b) Δ TA-SC, (c) TA-AgNPs.

Dodatkowo, morfologia krystalitów powstałych w badanych układach (Rysunek 66-II a–c) pozwala wskazać różnice, które mogą dodatkowo tłumaczyć obserwowany efekt. W próbkach TA-SC t_{14+} i Δ TA-SC t_{14+} dominowały duże, płytkowe krystality, łatwo wytrącające się z roztworu, co ograniczało ich biodostępność i tym samym możliwość interakcji z wirusem.

W przeciwieństwie do nich, w układzie TA-AgNPs t_{14}^+ powstawały drobnoziarniste, igłowe formy utrzymujące się w zawieszynie, o znacznie większej powierzchni właściwej. Taka morfologia sprzyjała bezpośredniemu kontaktowi z wirionami, co znajduje potwierdzenie w obserwacjach mikroskopowych cryo-TEM (Rysunek 67), wskazujących na destrukcję otoczek wirusowych w obecności kondycjonowanego koloidu TA-AgNPs (Rysunek 67E).



Rysunek 67. Obrazy Cryo-TEM wirusa HSV-1: (A) nienaruszony wirion z widoczną otoczką; (E) zdegradowany wirion HSV-1 po inkubacji z TA-AgNPs t_{14}^+ , z widoczną utratą integralności strukturalnej i uwolnieniem materiału genetycznego [28].

Korelacja danych morfologicznych i biologicznych jednoznacznie wskazuje, że o aktywności wirusobójczej badanych układów decyduje nie sama ilość wytrąconych pochodnych kwasu taninowego, lecz również charakter powstających w czasie kondycjonowania struktur. Choć podobne przemiany obserwowane są zarówno w koloidzie zawierającym nanocząstki srebra, jak i w mieszaninach kwasu taninowego z cytrynianem sodu, to jednak obecność AgNPs wyraźnie ukierunkowuje proces przemian w stronę drobnokrystalicznych form, które pozostają stabilne w zawieszynie i charakteryzują się znacznie większą powierzchnią czynną dostępną do interakcji z wirusem. W próbkach pozbawionych srebra dominują natomiast duże, płytkowe krystality, łatwo opadające z roztworu i pozostające w ograniczonym kontakcie z wirusami. Co istotne, analizy mikroskopowe wykazały obecność nanocząstek srebra na powierzchni form krystalicznych, co może dodatkowo wzmacniać efekt synergiczny – nanocząstki działają nie tylko jako katalizatory przemian chemicznych kwasu taninowego, ale także jako aktywne centra oddziaływania z wirionami. Dzięki temu struktury powstające w obecności srebra mogą skutecznie destabilizować strukturę wirusów, prowadząc do uszkodzenia ich otoczki i utraty zakaźności.

10. Podsumowanie i wnioski

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej dotyczyły charakterystyki przemian chemicznych i fizykochemicznych zachodzących w układach koloidalnych nanocząstek srebra stabilizowanych kwasem taninowym i cytrynianem sodu. Realizacja celu pracy umożliwiła zarówno uchwycenie dynamiki przemian kwasu taninowego w środowisku koloidalnym, jak również określenie ich wpływu na stabilność w czasie kondycjonowania i właściwości biologiczne badanych układów.

W toku badań wykazano, że koloidy TA–AgNPs ulegają złożonym, wieloetapowym procesom przemian w trakcie kondycjonowania, w których kluczową rolę odgrywają zarówno reakcje utleniania i transformacji polifenoli, jak i procesy nukleacji i krystalizacji prowadzące do wytrącania kryształów. Zmiany te prowadzą do powstawania nowych produktów – od niskocząsteczkowych pochodnych (m.in. kwasu galusowego i elagowego), aż po struktury polimeryczne i krystaliczne o odmiennych morfologiach. Nanocząstki srebra, obecne w układzie, katalizowały przemiany fenoli, jak również determinowały morfologię powstających krystalitów, w tym obecność drobnokrystalicznych, stabilnych form zawierających AgNPs.

Uzyskane wyniki potwierdziły słuszność postawionej tezy – wykazano, że przemiany kwasu taninowego w koloidach nanocząstek srebra mają bezpośredni wpływ na ich właściwości bioaktywne. Szczególnie istotna okazała się korelacja pomiędzy TA-AgNPs_{t14+} i morfologią wytrącających się struktur a aktywnością wirusobójczą wobec HSV-1 i HSV-2. Wzrost aktywności biologicznej wraz z czasem kondycjonowania nanocząstek srebra dowodzi, że to nie jedynie obecność srebra, lecz efekt synergistyczny między nanocząstkami a produktami przemian kwasu taninowego odpowiada za unikalne właściwości badanych układów. Uzyskane wyniki wskazują, iż naturalne polifenole, w odpowiednio zaprojektowanych warunkach syntezy i przechowywania, mogą pełnić rolę ligandów funkcjonalnych, które poprzez kontrolowane przemiany nadają nanocząstkom metali szlachetnych nowe, pożądane właściwości. Tym samym przedstawione wyniki stanowią podstawę do dalszych badań nad projektowaniem biomateriałów o wysokim potencjale przeciwwirusowym i immunomodulacyjnym.

Wnioski końcowe z pracy:

- układ koloidalny zawierający nanocząstki srebra stabilizowane kwasem taninowym i cytrynianem sodu podlega dynamicznym przemianom chemicznym i fizykochemicznym w czasie kondycjonowania,
- kwas taninowy ulega stopniowej transformacji prowadzącej do powstawania kwasu galusowego, kwasu elagowego oraz 1,2,3,4,6-penta-O-galloilo- β -D-glukozy, a następnie produktów o wysokiej masie cząsteczkowej,
- zastosowanie metody Folina–Ciocâlțu wykazało sukcesywny spadek zawartości wolnych grup hydroksylowych w badanych koloidach z 315 ppm do około 90 ppm po dwóch miesiącach,
- chromatografia cienkowarstwowa oraz analizy LC-MS potwierdziły obecność 1,2,3,4,6-penta-O-galloilo- β -D-glukozy, kwasu galusowego oraz kwasu elagowego przy czym w późniejszych etapach dominującym składnikiem stał się kwas elagowy,
- w układach zawierających srebro powstają drobnokrystaliczne, igiełkowate formy stabilne w zawiesinie, często z wbudowanymi nanocząstkami srebra, podczas gdy w próbach bez srebra dominują duże kryształy o morfologii liściastej,
- nanocząstki srebra pełnią podwójną rolę: katalityczną – poprzez przyspieszanie przemian polifenoli, oraz strukturotwórczą – poprzez udział w nukleacji i wzroście kryształów,
- aktywność wirusobójcza układu TA–AgNPs wobec HSV-1 i HSV-2 wzrasta wraz z czasem kondycjonowania i jest istotnie wyższa niż w układach pozbawionych srebra,
- najwyższa aktywność biologiczna korelowała z pojawieniem się drobnokrystalicznych form zawierających srebro oraz ze spadkiem zawartości wolnych grup hydroksylowych,

Uzyskane wyniki potwierdzają, że synergiczne oddziaływanie nanocząstek srebra i polifenoli może być wykorzystane do projektowania biomateriałów o wysokim potencjale przeciwwirusowym.

Wykaz dorobku naukowego

Publikacje naukowe:

1. E. Tomaszewska, **K. Bednarczyk**, M. Janicka, M. Chodkowski, M. Krzyżowska, G. Celichowski, J. Grobelny, K. Ranoszek-Soliwoda, The influence of the AgNPs surface chemical modifiers on the antiviral activity against HSV-2, *International Journal of Nanomedicine*, (2025)
2. E. Tomaszewska, A. Stępiak, D. Wróbel, **K. Bednarczyk**, J. Mały, M. Krzyżowska, G. Celichowski, J. Grobelny, K. Ranoszek-Soliwoda, Quantification of the Surface Coverage of Gold Nanoparticles with Mercaptosulfonates Using Isothermal Titration Calorimetry (ITC), *The Journal of Physical Chemistry B*. (2024)
3. E. Tomaszewska, K. Ranoszek-Soliwoda, **K. Bednarczyk**, A. Lech, M. Janicka, M. Chodkowski, M. Psarski, G. Celichowski, M. Krzyżowska, J. Grobelny, Anti-HSV Activity of Metallic Nanoparticles Functionalized with Sulfonates vs. Polyphenols, *Int. J. Mol. Sci.*, (2022) 23(21), 13104
4. M. Krzyżowska, M. Chodkowski, Martyna Janicka, D. Dmowska, E. Tomaszewska, K. Ranoszek-Soliwoda, **K. Bednarczyk**, G. Celichowski, J. Grobelny, Lactoferrin-Functionalized Noble Metal Nanoparticles as New Antivirals for HSV-2 Infection, *Microorganisms*, (2022) 10(1), 110

Doniesienia konferencyjne:

1. Katarzyna Bednarczyk, Emilia Tomaszewska, Grzegorz Celichowski, Jarosław Grobelny, Katarzyna Ranoszek-Soliwoda, *Antiviral potential of metallic nanoparticles functionalized with tannic acid*, 22nd International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies (NN25) 8 - 11 lipca, Saloniki, Grecja (komunikat ustny),
2. Katarzyna Bednarczyk, Emilia Tomaszewska, Grzegorz Celichowski, Jarosław Grobelny, Katarzyna Ranoszek-Soliwoda, *Tannic acid as a natural compound in the synthesis of silver nanoparticles*, 19th International Summer Schools on "Nanosciences & Nanotechnologies, Organic Electronics & Nanomedicine" (ISSON25) 5 – 12 lipca, Saloniki, Grecja (prezentacja posterowa)

3. Katarzyna Bednarczyk, Emilia Tomaszewska, Grzegorz Celichowski, Jarosław Grobelny, Katarzyna Ranoszek-Soliwoda, *Badanie przemian kwasu taninowego w koloidach nanocząstek srebra*, XII Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii, 22-23 maja 2025 r., Łódź, Polska (komunikat ustny),
4. Katarzyna Bednarczyk, Emilia Tomaszewska, Grzegorz Celichowski, Jarosław Grobelny, Katarzyna Ranoszek-Soliwoda, *Tannic acid modified metallic nanoparticles for antiviral applications*, IEEE International Conference on Nanotechnology, 5-11 lipca 2024 r., Gijón, Hiszpania (prezentacja posterowa),
5. Katarzyna Bednarczyk, Emilia Tomaszewska, Grzegorz Celichowski, Jarosław Grobelny, Katarzyna Ranoszek-Soliwoda, *Wykorzystanie metody Folina-Ciocalteu do oznaczania całkowitej zawartości polifenoli w układach koloidalnych zawierających związki pochodzenia naturalnego*, XI Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii, 16-17 maja 2024 r., Łódź, Polska (prezentacja posterowa),
6. Katarzyna Bednarczyk, Katarzyna Ranoszek-Soliwoda, Emilia Tomaszewska, Grzegorz Celichowski, Jarosław Grobelny, wykład jako gość zaproszony, IX Sympozjum Młodych Naukowców Uniwersytet Warszawski, 18 września 2023, Warszawa, Polska,
7. Katarzyna Bednarczyk, Katarzyna Ranoszek-Soliwoda, Emilia Tomaszewska, Grzegorz Celichowski, Jarosław Grobelny, *Metallic nanoparticles modified with tannic acid for antiviral applications*, 20th International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies (NN23), 4-7 lipca 2023, Saloniki, Grecja (prezentacja posterowa),
8. Katarzyna Bednarczyk, Katarzyna Ranoszek-Soliwoda, Emilia Tomaszewska, Grzegorz Celichowski, Jarosław Grobelny, *The use of compounds of natural origin in the synthesis of silver nanoparticles*, 17th Int. Summer Schools on Nanotechnologies, Organic Electronics & Nanomedicine (ISSON23), 1-8 lipca 2023, Saloniki, Grecja (prezentacja posterowa),
9. Katarzyna Bednarczyk, Katarzyna Ranoszek-Soliwoda, Emilia Tomaszewska, Grzegorz Celichowski, Jarosław Grobelny, *Metaliczne nanocząstki modyfikowane kwasem taninowym do zastosowań biomedycznych*, X Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii UŁ, 18-19 maja 2022, Łódź, Polska (prezentacja posterowa),
10. Katarzyna Bednarczyk, Katarzyna Ranoszek-Soliwoda, Emilia Tomaszewska, Grzegorz Celichowski, Jarosław Grobelny, *Characterization of aqueous colloids of*

silver nanoparticles functionalized with tannic acid with IR spectroscopy, 1st Baltic Symposium on Polymer and (Bio)Materials Science, 22-23 września 2022, Szczecin, Polska (prezentacja posterowa),

11. Katarzyna Bednarczyk, Katarzyna Ranoszek-Soliwoda, Emilia Tomaszewska, Grzegorz Celichowski, Jarosław Grobelny, *Charakterystyka układu koloidalnego w postaci nanocząstek srebra funkcjonalizowanych kwasem taninowym o działaniu przeciwwirusowym*, X Krajowa Konferencja Nanotechnologii Uniwersytet Jagielloński, 3-8 lipca 2022, Kraków, Polska (prezentacja posterowa),
12. Katarzyna Bednarczyk, Katarzyna Ranoszek-Soliwoda, Emilia Tomaszewska, Grzegorz Celichowski, Jarosław Grobelny, *Wytwarzanie oraz charakterystyka nanocząstek srebra modyfikowanych kwasem taninowym*, XIII Sesja Magistrantów i Doktorantów Łódzkiego Środowiska Chemików PŁ, 24 czerwca 2022, Łódź, Polska (prezentacja posterowa),
13. Katarzyna Bednarczyk, Katarzyna Ranoszek-Soliwoda, Emilia Tomaszewska, Grzegorz Celichowski, Jarosław Grobelny, *Wykorzystanie techniki FT-IR do ilościowego oznaczania polifenoli*, IX Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii UŁ, 19 - 20 maja 2022, Łódź, Polska (prezentacja posterowa).

Granty naukowe:

01/01/2021 – 01/02/2023 Tytuł projektu: „Struktury włókniste z hybrydową powłoką metaliczno ceramiczną” (nr grantu: 2018/29/B/ST8/02016) , źródło finansowania: Narodowe Centrum Nauki, rola w projekcie: wykonawca

Staże naukowe i mobilność zagraniczna:

1. Program PROM – krótkookresowa wymiana akademicka – udział w Szkole Letniej oraz Konferencjach naukowych w Salonikach, w Grecji – 5-12 lipca 2025 r.,
2. Faculty of Health Sciences, University of Ljubljana, Ljubljana, Słowenia, 1-30 czerwca 2024 r., staż naukowy w ramach programu CEEPUS – Central European Exchange Program for University Studies.

Nagrody i wyróżnienia:

1. Nagroda za prezentację wyników pracy doktorskiej podczas XII Łódzkiego Sympozjum Doktorantów Chemii, przyznanego Polskie Towarzystwo Chemiczne, Oddział Łódzki, 2025 r.,
2. Nagroda Zespołowa Rektora Uniwersytetu Łódzkiego stopnia pierwszego za cykl publikacji monotematycznych oraz patent, 2023 r.,
3. Wyróżnienie za działalność doktorancką na rzecz i dla dobra Uniwersytetu Łódzkiego, 2023r.,
4. Nagroda za prezentację wyników pracy doktorskiej podczas XIII Sesji Magistrantów i Doktorantów Łódzkiego Środowiska Chemików przy wsparciu Oddziału Łódzkiego PTChem, 2022 r.

Działalność organizacyjna i samorządowa:

1. Organizacja ogólnopolskiej konferencji naukowej (Przewodnicząca Komitetu Organizacyjnego) pn. „XI Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii”, 16-17 maja 2024 r., Łódź, Polska.
2. Współorganizacja ogólnopolskiej konferencji naukowej (Zastępca Przewodniczącego Komitetu Organizacyjnego) pn. „X Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii”, 18-19 maja 2023 r., Łódź, Polska.
3. Współorganizacja ogólnopolskiej konferencji naukowej (Członek Komitetu Organizacyjnego) pn. „IX Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii”, 19-20 maja 2022r., Łódź, Polska.
4. Funkcja Sekretarza w Radzie Samorządu Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Łódzkiego (kadencja 2022-2024).
5. Członek Komisji Dyscyplinarnej dla Doktorantów Uniwersytetu Łódzkiego (kadencja 2022-2024).
6. Członek Odwoławczej Komisji Stypendialno-Socjalnej (kadencja 2022-2024).

Szkolenia:

1. Szkolenie warsztatowe Anton Paar z zakresu wielkości cząstek i spektroskopii Ramana (DLS, LD, ELS, DIA, SR), 4 czerwca 2025 r., Katedra Technologii i Chemii Materiałów, Uniwersytet Łódzki.
2. Szkolenie warsztatowe „Nowoczesna analityka chemiczna z wykorzystaniem techniki LC-MS/MS”, 12-13 grudnia 2024 r., Wrocławski Park Technologiczny, Wrocław.
3. Szkolenie warsztatowe „Praktyczne zastosowanie metod chromatografii gazowej oraz GC-MS. Warsztaty laboratoryjne”, 20-22 marca 2024 r., Uniwersytet Warszawski, Warszawa.
4. Szkolenia warsztatowe „Basic Principles of Machine Learning and Artificial Intelligence”, Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych UŁ 2023/2024.
5. Szkolenie warsztatowe Anton Paar z zakresu analizy wielkości cząstek (DLS, LD, DIA), 25 kwietnia 2024 r., Politechnika Łódzka.
6. Szkolenie "Podstawowe wymagania normy PN-EN ISO/IEC 17025:2018-02 i polityk PCA opisanych w dokumentach: DA-02, DA-05, DA-06 i DA-08 oraz praktyczne aspekty ich wdrożenia do stosowania w Laboratoriach akredytowanych/ubiegających się o akredytację", 27-28 listopada 2023 r., Lublin.

Literatura

- [1] S. Dhir, S. Bhatt, M. Chauhan, V. Garg, R. Dutt, and R. Verma, "An Overview of Metallic Nanoparticles: Classification, Synthesis, Applications, and their Patents," *Recent Pat Nanotechnol*, vol. 18, no. 4, pp. 415–432, Sep. 2023, doi: 10.2174/1872210517666230901114421/CITE/REFWORKS.
- [2] N. Wang, J. Y. H. Fuh, S. T. Dheen, and A. Senthil Kumar, "Synthesis methods of functionalized nanoparticles: a review," Jun. 01, 2021, *Springer*. doi: 10.1007/s42242-020-00106-3.
- [3] M. J. Ndolomingo, N. Bingwa, and R. Meijboom, "Review of supported metal nanoparticles: synthesis methodologies, advantages and application as catalysts," *J Mater Sci*, vol. 55, no. 15, pp. 6195–6241, May 2020, doi: 10.1007/S10853-020-04415-X/METRICS.
- [4] J. R. Choi, D. M. Shin, H. Song, D. Lee, and K. Kim, "Current achievements of nanoparticle applications in developing optical sensing and imaging techniques," *Nano Converg*, vol. 3, no. 1, pp. 1–13, Dec. 2016, doi: 10.1186/S40580-016-0090-X/FIGURES/9.
- [5] E. Sánchez-López *et al.*, "Metal-based nanoparticles as antimicrobial agents: An overview," Feb. 01, 2020, *MDPI AG*. doi: 10.3390/nano10020292.
- [6] C. Bankier, R. K. Matharu, Y. K. Cheong, G. G. Ren, E. Cloutman-Green, and L. Ciric, "Synergistic Antibacterial Effects of Metallic Nanoparticle Combinations," *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-52473-2.
- [7] P. Kalakonda *et al.*, "Comparison of Multi-metallic Nanoparticles-Alternative Antibacterial Agent: Understanding the Role of Their Antibacterial Properties," *J Inorg Organomet Polym Mater*, vol. 34, no. 5, pp. 2203–2218, May 2024, doi: 10.1007/S10904-023-02960-X/METRICS.
- [8] S. Ying *et al.*, "Green synthesis of nanoparticles: Current developments and limitations," May 01, 2022, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.eti.2022.102336.
- [9] R. Abbas *et al.*, "Silver Nanoparticles: Synthesis, Structure, Properties and Applications," Sep. 01, 2024, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/nano14171425.
- [10] B. Tim, P. Błaszkiwicz, and M. Kotkowiak, "Recent advances in metallic nanoparticle assemblies for surface-enhanced spectroscopy," Jan. 01, 2022, *MDPI*. doi: 10.3390/ijms23010291.
- [11] M. Muzzio, J. Li, Z. Yin, I. M. Delahunty, J. Xie, and S. Sun, "Monodisperse nanoparticles for catalysis and nanomedicine," Nov. 07, 2019, *Royal Society of Chemistry*. doi: 10.1039/c9nr06080d.
- [12] G. Habibullah, J. Viktorova, and T. Ruml, "Current Strategies for Noble Metal Nanoparticle Synthesis," 2021, *Springer*. doi: 10.1186/s11671-021-03480-8.
- [13] V. Dzyhovskiy *et al.*, "Characterization Methods for Nanoparticle–Skin Interactions: An Overview," May 01, 2024, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/life14050599.

- [14] J. Polte *et al.*, “Mechanism of gold nanoparticle formation in the classical citrate synthesis method derived from coupled in situ XANES and SAXS evaluation,” *J Am Chem Soc*, vol. 132, no. 4, pp. 1296–1301, Feb. 2010, doi: 10.1021/ja906506j.
- [15] S. H. Lee and B. H. Jun, “Silver nanoparticles: Synthesis and application for nanomedicine,” Feb. 02, 2019, *MDPI AG*. doi: 10.3390/ijms20040865.
- [16] H. Liang, W. Wang, Y. Huang, S. Zhang, H. Wei, and H. Xu, “Controlled synthesis of uniform silver nanospheres,” *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 114, no. 16, pp. 7427–7431, Apr. 2010, doi: 10.1021/jp9105713.
- [17] B. R. Karimadom and H. Kornweitz, “Mechanism of producing metallic nanoparticles, with an emphasis on silver and gold nanoparticles, using bottom-up methods,” May 02, 2021, *MDPI AG*. doi: 10.3390/molecules26102968.
- [18] N. Abid *et al.*, “Synthesis of nanomaterials using various top-down and bottom-up approaches, influencing factors, advantages, and disadvantages: A review,” *Adv Colloid Interface Sci*, vol. 300, p. 102597, Feb. 2022, doi: 10.1016/J.CIS.2021.102597.
- [19] X. Hu, P. Wang, C. Huang, C. Fang, F. Li, and D. Ling, “The role of ligands on synthesis, functional control, and biomedical applications of near-infrared light-responsive metal-based nanoparticles,” *Coord Chem Rev*, vol. 502, p. 215632, Mar. 2024, doi: 10.1016/J.CCR.2023.215632.
- [20] R. Khursheed *et al.*, “Biomedical applications of metallic nanoparticles in cancer: Current status and future perspectives,” *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 150, p. 112951, Jun. 2022, doi: 10.1016/J.BIOPHA.2022.112951.
- [21] K. McNamara and S. A. M. Tofail, “Nanoparticles in biomedical applications,” 2017, *Taylor and Francis Ltd*. doi: 10.1080/23746149.2016.1254570.
- [22] R. Subbiah, M. Veerapandian, and K. S. Yun, “Nanoparticles: Functionalization and Multifunctional Applications in Biomedical Sciences,” 2010.
- [23] A. Heuer-Jungemann *et al.*, “The role of ligands in the chemical synthesis and applications of inorganic nanoparticles,” Apr. 24, 2019, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00733.
- [24] T. R. Dhakal, S. R. Mishra, Z. Glenn, and B. K. Rai, “Synergistic effect of pvp and peg on the behavior of silver nanoparticle-polymer composites,” in *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, Aug. 2012, pp. 6389–6396. doi: 10.1166/jnn.2012.6561.
- [25] E. Tomaszewska *et al.*, “The Influence of the AgNPs Ligand on the Antiviral Activity Against HSV-2,” *Int J Nanomedicine*, vol. 20, pp. 2659–2671, 2025, doi: 10.2147/IJN.S496050.
- [26] A. R. Akbarzadeh, I. Mesgarzadeh, and R. Eshaghi Malekshah, “Solution-phase polyol synthesis and coadsorption MD calculations from faceted platinum nanoparticles: NOVEL NPs–polymer morphology controlling,” *Chemical Papers*, vol. 76, no. 9, pp. 5761–5774, Sep. 2022, doi: 10.1007/s11696-022-02272-3.
- [27] M. Rambukwella, N. A. Sakthivel, J. H. Delcamp, L. Sementa, A. Fortunelli, and A. Dass, “Ligand structure determines nanoparticles’ atomic structure, metal-ligand interface and properties,” Aug. 01, 2018, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fchem.2018.00330.

- [28] E. Tomaszewska *et al.*, “Anti-HSV Activity of Metallic Nanoparticles Functionalized with Sulfonates vs. Polyphenols,” *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 21, Nov. 2022, doi: 10.3390/ijms232113104.
- [29] E. Tomaszewska *et al.*, “Quantification of the Surface Coverage of Gold Nanoparticles with Mercaptosulfonates Using Isothermal Titration Calorimetry (ITC),” *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 128, no. 44, pp. 10904–10914, Nov. 2024, doi: 10.1021/acs.jpcc.4c03365.
- [30] V. Cagno *et al.*, “Broad-spectrum non-toxic antiviral nanoparticles with a virucidal inhibition mechanism,” *Nat Mater*, vol. 17, no. 2, pp. 195–203, Feb. 2018, doi: 10.1038/NMAT5053.
- [31] D. Baram-Pinto, S. Shukla, A. Gedanken, and R. Sarid, “Inhibition of HSV-1 attachment, entry, and cell-to-cell spread by functionalized multivalent gold nanoparticles,” *Small*, vol. 6, no. 9, pp. 1044–1050, May 2010, doi: 10.1002/sml.200902384.
- [32] B. M. Sperry, N. A. Kukhta, Y. Huang, and C. K. Luscombe, “Ligand Decomposition during Nanoparticle Synthesis: Influence of Ligand Structure and Precursor Selection,” *Chemistry of Materials*, vol. 35, no. 2, pp. 570–583, Jan. 2023, doi: 10.1021/acs.chemmater.2c03006.
- [33] K. Ranošek-Soliwoda *et al.*, “The role of tannic acid and sodium citrate in the synthesis of silver nanoparticles,” *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 19, no. 8, Aug. 2017, doi: 10.1007/s11051-017-3973-9.
- [34] M. Wuthschick *et al.*, “Turkevich in New Robes: Key Questions Answered for the Most Common Gold Nanoparticle Synthesis,” *ACS Nano*, vol. 9, no. 7, pp. 7052–7071, Jul. 2015, doi: 10.1021/ACS.NANO.5B01579.
- [35] B. Bartosewicz *et al.*, “Effect of citrate substitution by various α -hydroxycarboxylate anions on properties of gold nanoparticles synthesized by Turkevich method,” *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, vol. 549, pp. 25–33, Jul. 2018, doi: 10.1016/J.COLSURFA.2018.03.073.
- [36] M. Tran, R. DePenning, M. Turner, and S. Padalkar, “Effect of citrate ratio and temperature on gold nanoparticle size and morphology,” *Mater Res Express*, vol. 3, no. 10, p. 105027, Oct. 2016, doi: 10.1088/2053-1591/3/10/105027.
- [37] X. C. Jiang, C. Y. Chen, W. M. Chen, and A. B. Yu, “Role of Citric Acid in the Formation of Silver Nanoplates through a Synergistic Reduction Approach,” *Langmuir*, vol. 26, no. 6, pp. 4400–4408, Mar. 2009, doi: 10.1021/LA903470F.
- [38] J. Park, S. H. Cha, S. Cho, and Y. Park, “Green synthesis of gold and silver nanoparticles using gallic acid: catalytic activity and conversion yield toward the 4-nitrophenol reduction reaction,” *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 18, no. 6, pp. 1–13, Jun. 2016, doi: 10.1007/S11051-016-3466-2/METRCS.
- [39] B. Badhani, N. Sharma, and R. Kakkar, “Gallic acid: A versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications,” *RSC Adv*, vol. 5, no. 35, pp. 27540–27557, Mar. 2015, doi: 10.1039/c5ra01911g.
- [40] D. Alhyari, N. A. Qinna, H. M. Sheldrake, S. Kantamneni, B. Y. Ghanem, and K. J. Paluch, “Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Oral Bioavailability of Novel Sulfonamide

Derivatives of Gallic Acid,” *Antioxidants*, vol. 14, no. 4, Apr. 2025, doi: 10.3390/antiox14040374.

- [41] M. Hadidi, R. Liñán-Atero, M. Tarahi, M. C. Christodoulou, and F. Aghababaei, “The Potential Health Benefits of Gallic Acid: Therapeutic and Food Applications,” Aug. 01, 2024, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/antiox13081001.
- [42] S. Sutriyo, R. Iswandana, and M. D. Hafshari, “Synthesis and stability test of resveratrol-conjugated gold nanoparticle with polyvinyl alcohol stabilization,” *International Journal of Applied Pharmaceutics*, vol. 12, no. Special Issue 1, pp. 221–229, Mar. 2020, doi: 10.22159/ijap.2020.v12s1.FF049.
- [43] T. Meng, D. Xiao, A. Muhammed, J. Deng, L. Chen, and J. He, “Anti-Inflammatory Action and Mechanisms of Resveratrol,” Jan. 01, 2021, *MDPI*. doi: 10.3390/MOLECULES26010229.
- [44] S. Das and D. K. Das, “Anti-Inflammatory Responses of Resveratrol,” *Inflammation & Allergy - Drug Targets (Discontinued)*, vol. 6, no. 3, pp. 168–173, Sep. 2007, doi: 10.2174/187152807781696464.
- [45] M. Krzyzowska *et al.*, “Lactoferrin-Conjugated Nanoparticles as New Antivirals,” Sep. 01, 2022, *MDPI*. doi: 10.3390/pharmaceutics14091862.
- [46] Y. Chen *et al.*, “Establishment and Characterization of Stable Zein/Glycosylated Lactoferrin Nanoparticles to Enhance the Storage Stability and in vitro Bioaccessibility of 7,8-Dihydroxyflavone,” *Front Nutr*, vol. 8, Jan. 2022, doi: 10.3389/fnut.2021.806623.
- [47] J. K. Yan, W. Y. Qiu, Y. Y. Wang, and J. Y. Wu, “Biocompatible Polyelectrolyte Complex Nanoparticles from Lactoferrin and Pectin as Potential Vehicles for Antioxidative Curcumin,” *J Agric Food Chem*, vol. 65, no. 28, pp. 5720–5730, Jul. 2017, doi: 10.1021/acs.jafc.7b01848.
- [48] E. Akdaşçi, F. Eker, H. Duman, P. Singh, M. Bechelany, and S. Karav, “Lactoferrin as a Versatile Agent in Nanoparticle Applications: From Therapeutics to Agriculture,” Dec. 01, 2024, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/nano14242018.
- [49] M. Krzyzowska *et al.*, “Lactoferrin-Functionalized Noble Metal Nanoparticles as New Antivirals for HSV-2 Infection,” *Microorganisms*, vol. 10, no. 1, Jan. 2022, doi: 10.3390/microorganisms10010110.
- [50] A. Galiyeva, A. Daribay, T. Zhumagaliyeva, L. Zhaparova, D. Sadyrbekov, and Y. Tazhbayev, “Human Serum Albumin Nanoparticles: Synthesis, Optimization and Immobilization with Antituberculosis Drugs,” *Polymers (Basel)*, vol. 15, no. 13, Jul. 2023, doi: 10.3390/polym15132774.
- [51] C. Lei *et al.*, “Hyaluronic acid and albumin based nanoparticles for drug delivery,” Mar. 10, 2021, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.jconrel.2021.01.033.
- [52] D. Kim, K. Shin, S. G. Kwon, and T. Hyeon, “Synthesis and Biomedical Applications of Multifunctional Nanoparticles,” Dec. 06, 2018, *Wiley-VCH Verlag*. doi: 10.1002/adma.201802309.
- [53] A. F. Burlec *et al.*, “Current Overview of Metal Nanoparticles’ Synthesis, Characterization, and Biomedical Applications, with a Focus on Silver and Gold Nanoparticles,” Oct. 01, 2023, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/ph16101410.

- [54] D. Kalyane, N. Raval, R. Maheshwari, V. Tambe, K. Kalia, and R. K. Tekade, "Employment of enhanced permeability and retention effect (EPR): Nanoparticle-based precision tools for targeting of therapeutic and diagnostic agent in cancer," May 01, 2019, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/j.msec.2019.01.066.
- [55] M. Janicka *et al.*, "Functionalized Noble Metal Nanoparticles for the Treatment of Herpesvirus Infection," Nov. 01, 2022, *MDPI*. doi: 10.3390/microorganisms10112161.
- [56] M. Karimi *et al.*, "Smart micro/nanoparticles in stimulus-responsive drug/gene delivery systems," Mar. 07, 2016, *Royal Society of Chemistry*. doi: 10.1039/c5cs00798d.
- [57] E. Tomaszewska *et al.*, "Systematic Studies of Gold Nanoparticles Functionalised with Thioglucose and its Cytotoxic Effect," *ChemistrySelect*, vol. 6, no. 6, pp. 1230–1237, Feb. 2021, doi: 10.1002/slct.202100034.
- [58] N. H. Goradel *et al.*, "Nanoparticles as new tools for inhibition of cancer angiogenesis," *J Cell Physiol*, vol. 233, no. 4, pp. 2902–2910, Apr. 2018, doi: 10.1002/JCP.26029.
- [59] P. Orlowski *et al.*, "Tannic acid-modified silver nanoparticles for wound healing: The importance of size," *Int J Nanomedicine*, vol. 13, pp. 991–1007, Feb. 2018, doi: 10.2147/IJN.S154797.
- [60] Y. A. Selim, M. A. Azb, I. Ragab, and M. H. M. Abd El-Azim, "Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using Aqueous Extract of *Deverra tortuosa* and their Cytotoxic Activities," *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-60541-1.
- [61] J. Jiang, J. Pi, and J. Cai, "The Advancing of Zinc Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications," 2018, *Hindawi Limited*. doi: 10.1155/2018/1062562.
- [62] A. Salleh *et al.*, "The potential of silver nanoparticles for antiviral and antibacterial applications: A mechanism of action," Aug. 01, 2020, *MDPI AG*. doi: 10.3390/nano10081566.
- [63] T. Bruna, F. Maldonado-Bravo, P. Jara, and N. Caro, "Silver nanoparticles and their antibacterial applications," Jul. 01, 2021, *MDPI*. doi: 10.3390/ijms22137202.
- [64] S. Sanyasi *et al.*, "Polysaccharide-capped silver Nanoparticles inhibit biofilm formation and eliminate multi-drug-resistant bacteria by disrupting bacterial cytoskeleton with reduced cytotoxicity towards mammalian cells," *Sci Rep*, vol. 6, Apr. 2016, doi: 10.1038/srep24929.
- [65] R. M. Goda, A. M. El-Baz, E. M. Khalaf, N. K. Alharbi, T. A. Elkhooly, and M. M. Shohayeb, "Combating Bacterial Biofilm Formation in Urinary Catheter by Green Silver Nanoparticle," *Antibiotics*, vol. 11, no. 4, Apr. 2022, doi: 10.3390/antibiotics11040495.
- [66] A. S. Joshi, P. Singh, and I. Mijakovic, "Interactions of gold and silver nanoparticles with bacterial biofilms: Molecular interactions behind inhibition and resistance," *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 20, pp. 1–24, Oct. 2020, doi: 10.3390/ijms21207658.
- [67] L. Wang, C. Hu, and L. Shao, "The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future," Feb. 14, 2017, *Dove Medical Press Ltd.* doi: 10.2147/IJN.S121956.
- [68] K. Skłodowski, S. J. Chmielewska-Deptuła, E. Piktel, P. Wolak, T. Wollny, and R. Bucki, "Metallic Nanosystems in the Development of Antimicrobial Strategies with High

Antimicrobial Activity and High Biocompatibility,” Feb. 01, 2023, *MDPI*. doi: 10.3390/ijms24032104.

- [69] Y. N. Slavin and H. Bach, “Mechanisms of Antifungal Properties of Metal Nanoparticles,” Dec. 01, 2022, *MDPI*. doi: 10.3390/nano12244470.
- [70] P. Orłowski *et al.*, “Polyphenol-conjugated bimetallic au@agnps for improved wound healing,” *Int J Nanomedicine*, vol. 15, pp. 4969–4990, Jan. 2020, doi: 10.2147/IJN.S252027.
- [71] B. H. J. Gowda *et al.*, “Nanoparticle-based therapeutic approaches for wound healing: a review of the state-of-the-art,” *Mater Today Chem*, vol. 27, p. 101319, Jan. 2023, doi: 10.1016/J.MTCHEM.2022.101319.
- [72] N. K. Rajendran, S. S. D. Kumar, N. N. Houreld, and H. Abrahamse, “A review on nanoparticle based treatment for wound healing,” *J Drug Deliv Sci Technol*, vol. 44, pp. 421–430, Apr. 2018, doi: 10.1016/J.JDDST.2018.01.009.
- [73] A. Gupta and S. Singh, “Multimodal Potentials of Gold Nanoparticles for Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Avenues and Prospects,” Jul. 01, 2022, *John Wiley and Sons Inc.* doi: 10.1002/sml.202201462.
- [74] S. R. Kannan *et al.*, “Mutations in the monkeypox virus replication complex: Potential contributing factors to the 2022 outbreak,” *J Autoimmun*, vol. 133, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.jaut.2022.102928.
- [75] P. Orłowski *et al.*, “Antiviral activity of tannic acid modified silver nanoparticles: Potential to activate immune response in herpes genitalis,” *Viruses*, vol. 10, no. 10, Oct. 2018, doi: 10.3390/v10100524.
- [76] S. Quideau, D. Deffieux, C. Douat-Casassus, and L. Pouységu, “Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis,” Jan. 17, 2011. doi: 10.1002/anie.201000044.
- [77] N. V. Zagorskina *et al.*, “Polyphenols in Plants: Structure, Biosynthesis, Abiotic Stress Regulation, and Practical Applications (Review),” Sep. 01, 2023, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/ijms241813874.
- [78] A. Rana, M. Samtiya, T. Dhewa, V. Mishra, and R. E. Aluko, “Health benefits of polyphenols: A concise review,” Oct. 01, 2022, *John Wiley and Sons Inc.* doi: 10.1111/jfbc.14264.
- [79] A. Gasmi *et al.*, “Polyphenols in Metabolic Diseases,” Oct. 01, 2022, *MDPI*. doi: 10.3390/molecules27196280.
- [80] T. F. Rambaran, “Nanopolyphenols: a review of their encapsulation and anti-diabetic effects,” Aug. 01, 2020, *Springer Nature*. doi: 10.1007/s42452-020-3110-8.
- [81] M. Fraga-Corral *et al.*, “Traditional applications of tannin rich extracts supported by scientific data: Chemical composition, bioavailability and bioaccessibility,” Feb. 01, 2021, *MDPI AG*. doi: 10.3390/foods10020251.
- [82] A. Janošević *et al.*, “Simultaneous oxidation of aniline and tannic acid with peroxydisulfate: Self-assembly of oxidation products from nanorods to microspheres,”

Synth Met, vol. 162, no. 9–10, pp. 843–856, Jun. 2012, doi:
10.1016/j.synthmet.2012.03.009.

- [83] A. Golonko *et al.*, “KWAS TANINOWY-SKŁADNIK PROZDROWOTNY CZY ANTYODŻYWczy?,” 2019.
- [84] M. T. Engström *et al.*, “Structural Features of Hydrolyzable Tannins Determine Their Ability to Form Insoluble Complexes with Bovine Serum Albumin,” *J Agric Food Chem*, vol. 67, no. 24, pp. 6798–6808, Jun. 2019, doi: 10.1021/acs.jafc.9b02188.
- [85] I. Gülçin, Z. Huyut, M. Elmastaş, and H. Y. Aboul-Enein, “Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid,” *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 3, no. 1, pp. 43–53, Jan. 2010, doi: 10.1016/j.arabjc.2009.12.008.
- [86] X. Villanueva *et al.*, “Effect of chemical modifications of tannins on their antimicrobial and antibiofilm effect against Gram-negative and Gram-positive bacteria,” *Front Microbiol*, vol. 13, Jan. 2023, doi: 10.3389/fmicb.2022.987164.
- [87] S. P. Ekambaram, S. S. Perumal, and A. Balakrishnan, “Scope of Hydrolysable Tannins as Possible Antimicrobial Agent,” Jul. 01, 2016, *John Wiley and Sons Ltd*. doi: 10.1002/ptr.5616.
- [88] B. Yan, Z. S. Chen, Y. Hu, and Q. Yong, “Insight in the Recent Application of Polyphenols From Biomass,” Sep. 13, 2021, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fbioe.2021.753898.
- [89] Y. Wang *et al.*, “Innovations and challenges of polyphenol-based smart drug delivery systems,” Sep. 01, 2022, *Tsinghua University*. doi: 10.1007/s12274-022-4430-3.
- [90] L. L. Theisen *et al.*, “Tannins from Hamamelis virginiana bark extract: Characterization and improvement of the antiviral efficacy against influenza A virus and human papillomavirus,” *PLoS One*, vol. 9, no. 1, Jan. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0088062.
- [91] A. K. Farha *et al.*, “Tannins as an alternative to antibiotics,” Dec. 01, 2020, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.fbio.2020.100751.
- [92] Z. Li *et al.*, “Polyphenol-based hydrogels: Pyramid evolution from crosslinked structures to biomedical applications and the reverse design,” Nov. 01, 2022, *KeAi Communications Co.* doi: 10.1016/j.bioactmat.2022.01.038.
- [93] S. S. Naqvi *et al.*, “Novel Synthesis of Maltol Capped Copper Nanoparticles and Their Synergistic Antibacterial Activity with Antibiotics,” *Plasmonics*, vol. 16, no. 6, pp. 1915–1928, Dec. 2021, doi: 10.1007/s11468-021-01452-3.
- [94] G. Yan *et al.*, “The Cross-Linking Mechanism and Applications of Catechol–Metal Polymer Materials,” Oct. 01, 2021, *John Wiley and Sons Inc.* doi: 10.1002/admi.202100239.
- [95] B. Yang, Y. Dong, F. Wang, and Y. Zhang, “Nanoformulations to enhance the bioavailability and physiological functions of polyphenols,” Oct. 01, 2020, *MDPI AG*. doi: 10.3390/molecules25204613.
- [96] S. Oliver, H. Wagh, Y. Liang, S. Yang, and C. Boyer, “Enhancing the antimicrobial and antibiofilm effectiveness of silver nanoparticles prepared by green synthesis,” *J Mater Chem B*, vol. 6, no. 24, pp. 4124–4138, Jun. 2018, doi: 10.1039/C8TB00907D.
- [97] N. H. Rezazadeh, F. Buazar, and S. Matroodi, “Synergistic effects of combinatorial chitosan and polyphenol biomolecules on enhanced antibacterial activity of

biofunctionalized silver nanoparticles,” *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-76726-7.

- [98] S. Mourdikoudis, R. M. Pallares, and N. T. K. Thanh, “Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties,” *Nanoscale*, vol. 10, no. 27, pp. 12871–12934, Jul. 2018, doi: 10.1039/C8NR02278J.
- [99] M. T. Aminzai, M. Yildirim, and E. Yabalak, “Metallic nanoparticles unveiled: Synthesis, characterization, and their environmental, medicinal, and agricultural applications,” *Talanta*, vol. 280, p. 126790, Dec. 2024, doi: 10.1016/J.TALANTA.2024.126790.
- [100] S. Zhang and C. Wang, “Precise Analysis of Nanoparticle Size Distribution in TEM Image,” *Methods Protoc*, vol. 6, no. 4, Aug. 2023, doi: 10.3390/mps6040063.
- [101] B. Lee *et al.*, “Statistical Characterization of the Morphologies of Nanoparticles through Machine Learning Based Electron Microscopy Image Analysis,” *ACS Nano*, vol. 14, no. 12, pp. 17125–17133, Dec. 2020, doi: 10.1021/acsnano.0c06809.
- [102] M. Krzyzowska *et al.*, “Epigallocatechin Gallate-Modified Silver Nanoparticles Show Antiviral Activity against Herpes Simplex Type 1 and 2,” *Viruses*, vol. 15, no. 10, Oct. 2023, doi: 10.3390/V15102024.
- [103] M. Kumar, R. Ranjan, M. P. Sinha, and B. S. Raipat, “Different techniques utilized for characterization of metallic nanoparticles synthesized using biological agents: A review,” Mar. 01, 2023, *Romanian Association of Balneology*. doi: 10.12680/balneo.2023.534.
- [104] S. Bhattacharjee, “DLS and zeta potential - What they are and what they are not?,” Aug. 10, 2016, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017.
- [105] E. Tomaszewska *et al.*, “Detection limits of DLS and UV-Vis spectroscopy in characterization of polydisperse nanoparticles colloids,” *J Nanomater*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/313081.
- [106] A. K. Shukla and S. Iravani, “Metallic nanoparticles: green synthesis and spectroscopic characterization,” Jun. 01, 2017, *Springer Verlag*. doi: 10.1007/s10311-017-0618-2.
- [107] M. J. Baker *et al.*, “Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials,” *Nat Protoc*, vol. 9, no. 8, pp. 1771–1791, 2014, doi: 10.1038/nprot.2014.110.
- [108] J. Coates, “Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach.”
- [109] R. Emam and N. Eassa, “Synthesis, Characterization and Size Evaluation of Biosynthesized Silver Nanoparticles by UV-Vis Spectroscopy,” *African Journal of Engineering & Technology*, vol. 1, no. 1, Jul. 2021, doi: 10.47959/ajet.2021.1.1.5.
- [110] V. Pedan, C. Weber, T. Do, N. Fischer, E. Reich, and S. Rohn, “HPTLC fingerprint profile analysis of cocoa proanthocyanidins depending on origin and genotype,” *Food Chem*, vol. 267, pp. 277–287, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.08.109.
- [111] P. Bernard-Savary and C. F. Poole, “Instrument platforms for thin-layer chromatography,” 2015, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.chroma.2015.08.002.
- [112] K. Wang *et al.*, “TLC separation of catechins and theaflavins on polyamide plates,” *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, vol. 22, no. 2, pp. 97–100, Apr. 2009, doi: 10.1556/JPC.22.2009.2.4.

- [113] A. Marston, "Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry," May 13, 2011. doi: 10.1016/j.chroma.2010.12.068.
- [114] A. Romani, F. Ieri, B. Turchetti, N. Mulinacci, F. F. Vincieri, and P. Buzzini, "Analysis of condensed and hydrolysable tannins from commercial plant extracts," *J Pharm Biomed Anal*, vol. 41, no. 2, pp. 415–420, May 2006, doi: 10.1016/j.jpba.2005.11.031.
- [115] P. Mammela, H. Savolainen, L. Lindroos, J. Kangas, and T. Vartiainen, "Analysis of oak tannins by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry," 2000. [Online]. Available: www.elsevier.com/locate/chroma
- [116] J. Soto-Alvaredo, M. Montes-Bayón, and J. Bettmer, "Speciation of silver nanoparticles and silver(I) by reversed-phase liquid chromatography coupled to ICPMS," *Anal Chem*, vol. 85, no. 3, pp. 1316–1321, Feb. 2013, doi: 10.1021/ac302851d.
- [117] O. Folin and V. Ciocalteu, "ON TYROSINE AND TRYPTOPHANE DETERMINATIONS IN PROTEINS." [Online]. Available: www.jbc.org
- [118] V. L. Singleton, R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventós, "52 POLYPHENOLS AND FLAVONOIDS [14] [14] Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent," 1999.
- [119] M. Pérez, I. Dominguez-López, and R. M. Lamuela-Raventós, "The Chemistry Behind the Folin-Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern," Nov. 22, 2023, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acs.jafc.3c04022.
- [120] T. Margraf, A. R. Karnopp, N. D. Rosso, and D. Granato, "Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue Assays to Estimate The Total Phenolic Content of Juices and Teas Using 96-Well Microplates," *J Food Sci*, vol. 80, no. 11, pp. C2397–C2403, Nov. 2015, doi: 10.1111/1750-3841.13077.
- [121] I. U. Pueyo and M. I. Calvo, "Assay conditions and validation of a new UV spectrophotometric method using microplates for the determination of polyphenol content," *Fitoterapia*, vol. 80, no. 8, pp. 465–467, Dec. 2009, doi: 10.1016/j.fitote.2009.06.008.
- [122] M. Manninen, V. M. Vesterinen, A. K. Vainio, H. Korhonen, M. Karonen, and J. P. Salminen, "Identification of Tree Species by Their Defense Compounds: A Study with Leaf Buds of White and Silver Birches," *J Chem Educ*, vol. 98, no. 3, pp. 973–981, Mar. 2021, doi: 10.1021/acs.jchemed.0c00589.
- [123] Z. Khan, S. A. Al-Thabaiti, A. Y. Obaid, and A. O. Al-Youbi, "Preparation and characterization of silver nanoparticles by chemical reduction method," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 82, no. 2, pp. 513–517, Feb. 2011, doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.10.008.
- [124] C. Quintero-Quiroz *et al.*, "Optimization of silver nanoparticle synthesis by chemical reduction and evaluation of its antimicrobial and toxic activity," *Biomater Res*, vol. 23, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1186/s40824-019-0173-y.
- [125] S. K. Bhangu, R. Singla, E. Colombo, M. Ashokkumar, and F. Cavalieri, "Sono-transformation of tannic acid into biofunctional ellagic acid micro/nanocrystals with distinct morphologies," *Green Chemistry*, vol. 20, no. 4, pp. 816–821, Feb. 2018, doi: 10.1039/C7GC03163G.

- [126] R. A. Youness, R. Kamel, N. A. Elkasabgy, P. Shao, and M. A. Farag, "Recent advances in tannic acid (gallotannin) anticancer activities and drug delivery systems for efficacy improvement; a comprehensive review," Mar. 01, 2021, *MDPI AG*. doi: 10.3390/molecules26051486.
- [127] W. Jing, C. Xiaolan, C. Yu, Q. Feng, and Y. Haifeng, "Pharmacological effects and mechanisms of tannic acid," Oct. 01, 2022, *Elsevier Masson s.r.l.* doi: 10.1016/j.biopha.2022.113561.
- [128] C. Chen, H. Yang, X. Yang, and Q. Ma, "Tannic acid: A crosslinker leading to versatile functional polymeric networks: A review," Mar. 10, 2022, *Royal Society of Chemistry*. doi: 10.1039/d1ra07657d.
- [129] H. Jafari *et al.*, "Tannic acid: a versatile polyphenol for design of biomedical hydrogels," Jul. 13, 2022, *Royal Society of Chemistry*. doi: 10.1039/d2tb01056a.
- [130] J. P. Salminen and M. Karonen, "Chemical ecology of tannins and other phenolics: We need a change in approach," *Funct Ecol*, vol. 25, no. 2, pp. 325–338, Apr. 2011, doi: 10.1111/j.1365-2435.2010.01826.x.
- [131] R. Petry, B. Focassio, G. R. Schleder, D. S. T. Martinez, and A. Fazzio, "Conformational analysis of tannic acid: Environment effects in electronic and reactivity properties," *Journal of Chemical Physics*, vol. 154, no. 22, Jun. 2021, doi: 10.1063/5.0045968.
- [132] G. Ghigo *et al.*, "New insights into the protogenic and spectroscopic properties of commercial tannic acid: The role of gallic acid impurities," *New Journal of Chemistry*, vol. 42, no. 10, pp. 7703–7712, 2018, doi: 10.1039/c7nj04903j.
- [133] M. H. Iqbal *et al.*, "Effect of the Buffer on the Buildup and Stability of Tannic Acid/Collagen Multilayer Films Applied as Antibacterial Coatings," *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 12, no. 20, pp. 22601–22612, May 2020, doi: 10.1021/acsami.0c04475.
- [134] B. Kutus *et al.*, "Equilibria and Dynamics of Sodium Citrate Aqueous Solutions: The Hydration of Citrate and Formation of the Na3Cit0Ion Aggregate," *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 124, no. 43, pp. 9604–9614, Oct. 2020, doi: 10.1021/acs.jpcc.0c06377.