

УДК 620.3: 66.061.34 + 543.9  
DOI <https://doi.org/10.32782/2663-5941/2023.5/50>

**Воробйова В.І.**

Національний технічний університет України  
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

**Хрокало Л.А.**

Національний технічний університет України  
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

**Віннічук Е.В.**

Національний технічний університет України  
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

**Кравченко Ф.Е.**

Національний технічний університет України  
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

**Федулова В.С.**

Національний технічний університет України  
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

**Васильєв Г.С.**

Національний технічний університет України  
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

**Скиба М.І.**

ДВНЗ «Український державний хіміко-технологічний університет»

## **СИНТЕЗ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА З ВИКОРИСТАННЯМ ЕКСТРАКТУ ПРОДУКТІВ ПЕРЕРОБКИ ВИНОГРАДУ НА ОСНОВІ НИЗЬКОТЕМПЕРАТУРНОГО ЕВТЕКТИЧНОГО РОЗЧИННИКА, ЇХ АНТИБАКТЕРІАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ТА ТОКСИЧНІСТЬ**

У статті представлено новий спосіб синтезу наночастинок золота з використанням екстракту вижимок винограду, отриманого низькотемпературним евтектичним розчинником – суміші проліну та молочної кислоти у молярному співвідношенні 1:2. Даний спосіб є екологічно безпечним та не передбачає використання токсичних реагентів. Утворення наночастинок та їх оцінку їх властивостей проводили за допомогою сканувальної електронної мікроскопії, спектрометричного елементного аналізу, методом інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є та ультрафіолетової спектроскопії. Встановлено, що розмір наночастинок варіюється в межах 6,5–9,1 нм, з середнім 7,4 нм. На УФ-спектрі спостерігається поверхневий плазмонний резонанс, що підтверджує присутність наночастинок. Методом інфрачервоної спектроскопії встановлено функціональні групи органічних природних сполук, що присутні в екстракті вижимки винограду та беруть участь у синтезі наночастинок золота. Зменшення інтенсивності поглинання в області 1600–1400 см<sup>-1</sup> вказує на залучення ОН – груп у стабілізацію наносистеми.

Проведено дослідження антибактеріальних властивостей наносистеми диско-дифузійним методом на поживному агарі з використанням культур бактерій: грамнегативної палички *Escherichia coli*, грампозитивної спороутворюючої палички *Bacillus subtilis* та дріжджового грибка *Candida albicans*. Система показала інгібуючу дію на усі три досліджені культури з чітко вираженими зонами інгібування 4–7 мм. Найбільше пригнічення спостерігали на культурі *B. subtilis*. Фітотоксичність системи була оцінена на корінцях цибулі *Allium* сера, причому найвищі її прояви були зафіксовані в концентрації 500 ррт. Показники цитотоксичності за аналізу мітотичного індексу знижувались від 65% (контроль – дистильована вода) до 35 % в наносистемі золота за розведення до 500 ррт.

**Ключові слова:** наночастинок золота, «зелений» синтез, низькотемпературні евтектичні розчинники, пролін, екстракт вижимки винограду, антибактеріальні властивості, фітотоксичність.

**Постановка проблеми.** В останні роки нанотехнології були темою інтенсивних досліджень і посиленого інтересу серед дослідників. Виробництво та використання наночастинок різко розширилося в результаті швидкого розвитку нанотехнологій. Наночастинки золота (AuNP) – це унікальний матеріал, який може застосовуватись у багатьох галузях, в тому числі медицині. Вони є очевидним вибором для біомедичних застосувань завдяки функціональності та легкості синтезу. AuNP є перспективними для діагностичного та терапевтичного використання, включаючи біосенсиори та здатність націлюватися на ракову пухлину з точною доставкою ліків нанотранспортними засобами до хворих тканин (таргетна протиракова терапія) [1–4]. Класичні методи синтезу наносистем золота передбачають використання наступних речовин-відновників: тетрагідроборат натрію, гідразин, фосфор та дихлорид олова. Ці хімічні сполуки часто використовують для отримання наноформ металів, що передбачає необхідність введення стабілізаторів – полівінілпіролідону, поліетиленгліколю та цетилтриметиламоній броміду. Однак, подальше використання таких систем у косметичній галузі або медицині обмежене, оскільки вони містять шкідливі речовини, які залишаються у колоїдному розчині після синтезу. Тому розробка нових способів одержання AuNP із залученням «зелених» реагентів є актуальною задачею.

**Аналіз останніх досліджень та публікацій.** Одним із «зелених» методів синтезу наночастинок є використання рослинних екстрактів, як джерело органічних сполук, які здатні відновити солі металів з утворенням наноформ. Цей спосіб доволі активно розглядається та в наукових публікаціях [5–8]. Навіть для «зеленого» синтезу металічних, металооксидних наноматеріалів, дослідники продовжують використовувати «традиційні» метанольні, ацетонові, толуолові, ефірні рослинні екстракти, що суттєво обмежує та галузі їх подальшого використання. На сьогоднішній день замало модернізувати технології синтезу, потрібно застосувати альтернативні, біосумісні та ефективні «зелені» розчинники/реакційні середовища з подальшим їх вивченням і удосконаленням. Таким чином, привабливими є низькотемпературні евтектичні розчинники (НЕР), що відповідають принципам зеленої хімії. Водночас збільшується і кількість досліджень екстракції рослинної сировини глибоко евтектичними розчинниками, які є новим типом іонних рідин, що містять сполуки які виступають доно-

ром та акцептором водневих зв'язків і утворюють розчини з надзвичайно низькими точками плавлення. Такі розчинники мають низку переваг – легкість приготування, хімічна інертність, низька ціна, більшість із них біологічно розкладаються і мають невисоку токсичність. НЕР в'язкі, тому екстракти на їх основі не лише відновлюють іони металів, а й додатково стабілізують утворену колоїдну систему [9–10]. Дослідження показують, що змінюючи кількість води у такому розчиннику, можна отримати наночастинки різної форми, що може призвести до прогресу синтезу і набутих властивостей [11]. Незважаючи на всі переваги НЕР, публікацій щодо їх використання в синтезі нанозолота доволі мало.

**Метою роботи** є розробка способу одержання колоїдних розчинів наночастинок золота з використанням екстракту рослинної сировини отриманого низькотемпературним евтектичним розчинником, вивчення їх фізико-хімічних характеристик, функціональних властивостей, антибактеріальної дії, фіто та цитотоксичності.

**Виклад основного матеріалу.**

**Методика експериментальних досліджень**

Для синтезу НЕР були використані дві хімічні сполуки, які мають наступну дію: одна – акцептор, а друга – донор водневого зв'язку. Низькотемпературний евтектичний розчинник приготували наступним чином. Молочну кислоту та пролін зважували, щоб досягти молярного співвідношення 2:1, і змішували в колбі на 200 мл. НЕР синтезували нагріванням на водяній бані за 60°C. Отриману НЕР використовували як екстрагент для екстракції органічних сполук із виноградних вичавок із подальшим використанням у синтезі без додаткового очищення. Для приготування екстракту порошок з виноградних вижимок додавали в НЕР у співвідношенні розчинник-тверда речовина 10:1, яке було підібране і відпрацьоване експериментально. Суміш поміщали в ультразвукову ванну зі вхідною потужністю 40 Вт і частотою 30 кГц. Параметри екстракції: температура 65°C, тривалість 60 хв. Потім екстракт декантували і фільтрували через паперовий фільтр.

Для синтезу нанозолота еквівалентні об'єми екстракту та 0,01 М  $\text{HAuCl}_4$  окремо нагрівали у скляних стаканах на водяній бані до температури 50°C. Потім екстракт додали до  $\text{HAuCl}_4$  і залишили на водяній бані на 45 хв. Біосинтезовані AuNP ідентифікувались за допомогою спектроскопічного дослідження. Для вимірювання UV-Vis використовували спектрофотометр Hitachi U-2900. Морфологію поверхні підготов-

лених AuNP оцінили за допомогою скануючої електронної мікроскопії (SEM). Для цього краплю колоїдної системи наносили на мідну пластину з вуглецевим покриттям і знімали при напрузі прискорення 10 кВ (CamScan з рентгєнівською приставкою для мікроаналізу енергії INCA-200).

Оцінку антибактеріальних властивостей проводили дисково-дифузійним методом на поживному агарі в чашках Петрі. За добу до випробування одержали інокулят: добові культури бактерій на мясо-пептонному бульйоні. Перед посівом густину інокуляту доводили до показника 0,5 за шкалою МакФарланда шляхом розведення поживним середовищем та стерильним фізіологічним розчином. В якості тест-культур були вироблені наступні мікроорганізми: *Escherichia coli* УКМ В-906 (грамнегативна паличкоподібна бактерія), *Bacillus subtilis* УКМ В-5006Т (грампозитивна спороутворююча паличкоподібна бактерія), *Candida albicans* D-6 (патогенний дріжджеподібний грибок). В чашки Петрі в стерильних умовах вносили по 15–20 г поживного агару. Після застигання агару щільно засівали його поверхню інокулятом методом широкого штриха за допомогою стерильного свабу. Попередньо простерилізовані диски з фільтрувального паперу, діаметром 5 мм занурили в розчин наносистеми на кілька секунд. Після цього диски розклали на поверхню вже інокульованого агару в кількості 5–6 шт на одну чашку Петрі. Чашки культивували в термостаті за температури 37°C. Огляд проводили через 1 та 5 діб культивування із заміром і описом зон інгібування росту мікроорганізмів у вигляді прозорих концентричних кол або просвітлених розводів навколо дисків. Тест на фітотоксичність був проведений на корінцях цибулі. Для досліду були відібрані цибулини *Allium cepa* без пошкоджень шкідниками та бактеріальними чи грибковими хворобами. Цибулини росли в пластикових склянках, наповнених розчинами дослідженої системи золота, впродовж 6 діб. В якості контролю була використана дистильована вода. Для оцінки повної біологічної дії наносистеми рекомендовано проводити визначення її потенційної цитотоксичності та генотоксичності. В якості критерію використовують мітотичний індекс, який є показником активності ділення соматичних клітин для оцінки швидкості росту та розмноження [12, 13]. За використання стандартного *Allium* тесту на клітинах меристеми корінців цибулі було випробувано одержану наносистему золота в концентраціях 5 ppm, 50 ppm та 500 ppm

#### Отримані експериментальні результати.

Утворення колоїдного розчину наночастинок

золота було підтверджено за допомогою спектрофотометричних методів (рис. 1). Частота абсорбції, яка відповідає плазмонному резонансу наночастинок золота, залежить від розміру, морфології та концентрації наночастинок у розчині. Зазвичай пік спостерігається в діапазоні від 500 до 600 нм, що відповідає видимій частині спектру. Зображений на рисунку пік УФ-спектру плазмонного резонансу колоїдного розчину наночастинок золота за  $\lambda = 570$  нм свідчить про формування кластерів золота різної структури.

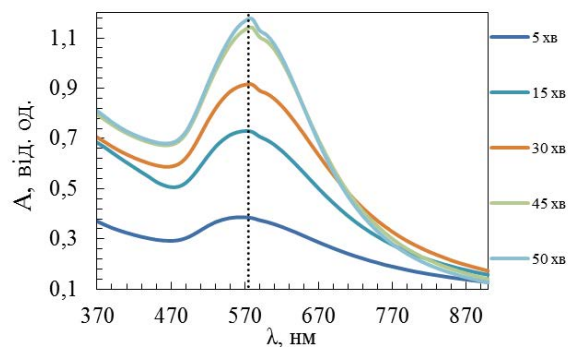


Рис. 1. Результати УФ-спектрофотометрії, які підтверджують утворення колоїдної системи золота після 45 хв.

**Морфологічна характеристика наночастинок.** SEM-аналіз (рис. 2) показав утворення наночастинок переважно сферичної, місцями трикутної (нанополігони) форм та дозволив виміряти їх розмір. Розбіг розмірів частинок для одержаної системи знаходиться у межах від 6,5 до 7,6 нм, при чому середній становить 7,2–7,6 нм. Наночастинкам саме сферичної форми (які суттєво переважають в нашій системі) властиві потенційні антимікробні та каталітичні властивості. Наночастишки золота однорідно дисперговані, відсутня явно виражена агломерація, що свідчить про стабільність отриманої системи.

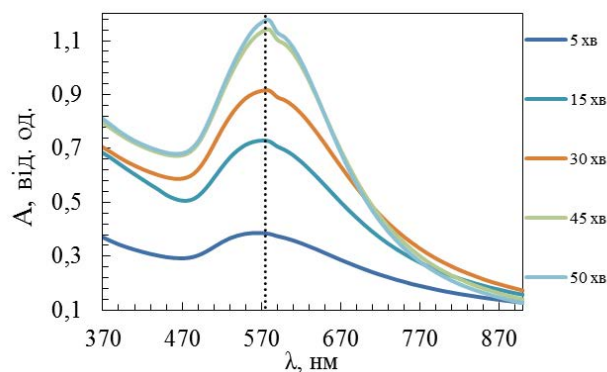


Рис. 2. SEM-зображення наночастинок золота, синтезованих з використанням екстракту вичавок винограду, отриманого НЕР на основі проліну та молочної кислоти

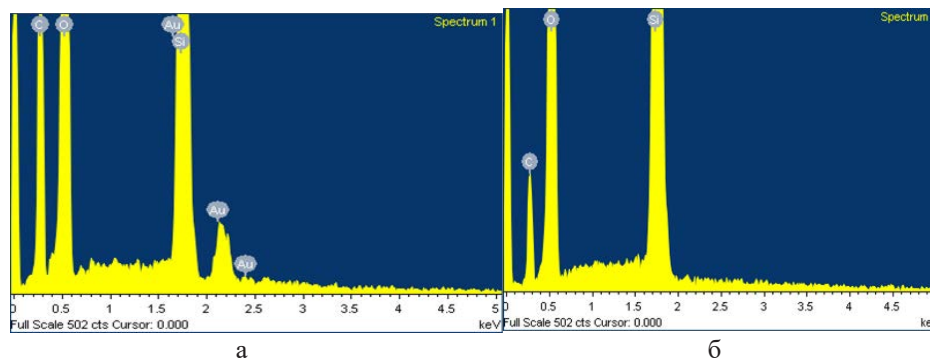


Рис. 3. EDAX-профіль синтезованих наночастинок золота (а) та екстракту вижимок винограду (б)

Елементний склад синтезованих AuNP, отриманий зі спектру енергодисперсійної спектроскопії на рис. 2 (а), демонструє три основні піки в межах 1,7–2,4 keV. Це підтвердило наявність синтезованих наночастинок золота. Для порівняння був також знятий аналіз чистого екстракту (рис. 2 (б)), де відповідно пік золота відсутній. Крім того, також були виявлені сигнали карбону та кисню, що підтверджує присутність органічних сполук, які виступають стабілізаторами системи. Наявність сигналу силіцію пов'язана з покриттям пластинки кремнієм відповідно до стандартної методики підготовки зразку до електронно-скануючого мікроскопіювання.

**Інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є (FTIR).** Методом інфрачервоної спектроскопії встановлено функціональні групи органічних природних сполук, що присутні в екстракті вижимок винограду та беруть участь у синтезі наночастинок золота. Для ІЧ-спектру екстракту (рис. 4 крива 1) притаманні піки поглинання при  $895\text{ cm}^{-1}$ ,  $980\text{ cm}^{-1}$ ,  $1126\text{ cm}^{-1}$ ,  $1333\text{ cm}^{-1}$ ,  $1474\text{ cm}^{-1}$ ,  $3357\text{ cm}^{-1}$ , які відповідають -C-H, -CH=CH-, -C-O-, -C=C- (ароматичні), -ОН функціональним групам. Зникнення деяких піків (рис. 4 крива 2) і зміна довжини хвилі поглинання функціональних груп при дослідженні зразка дисперсної системи вказує на те, що екстракт вижимок винограду містить вторинні метаболіти, які діють як відновлюючі і стабілізуючі агенти для синтезу AuNP.

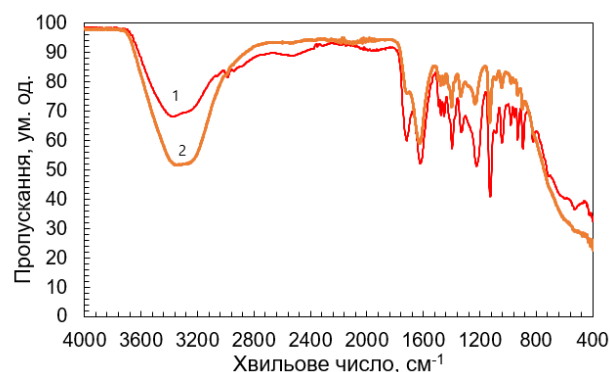


Рис. 4. ІЧ-спектри екстракту вижимки винограду (1) та синтезованих наночастинок золота (2)

Яскраво помітна зміна інтенсивності поглинання за  $3357\text{ cm}^{-1}$  вказує на те, що частина гідроксильних груп -ОН бере участь у відновленні та стабілізації наночастинок золота.

**Антибактеріальні властивості наночастинок золота.** Одержані розчини наночастинок золота, стабілізованих НЕР, виявляють дезінфекційні (антимікробні) властивості щодо грам негативної палички *Escherichia coli*, грам позитивної спороутворюючої палички *Bacillus subtilis* та патогенного дріжджового грибка *Candida albicans*. (рис. 5) Наносистема показала інгібуючу дію на усі три культури, за рахунок чітко виражених зон інгібування розміром від

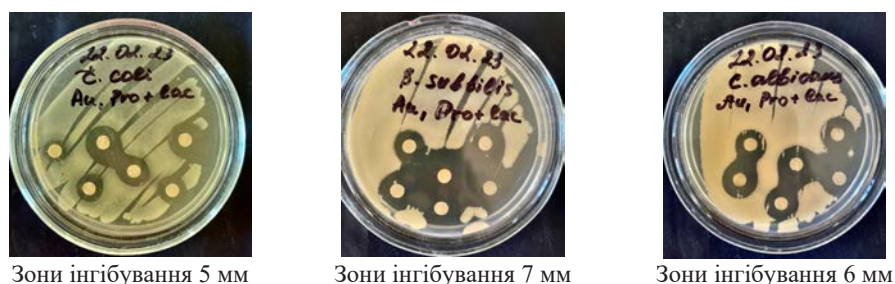


Рис. 5. Оцінка антибактеріальної властивості наносистеми золота на поживному агарі дисково-дифузійним методом



## Оцінка фітотоксичності наносистеми золота за кількістю і довжиною корінців

Параметри для оцінки фітотоксичності	контроль	Наносистема золота		
		5 ppm	50 ppm	500 ppm
Середня довжина корінців	5.6	2	1.5	0,9
Індекс фіто токсичності, %		64	73	84
		висока	висока	надзвичайно висока
Індекс Кабірова (фіто токсичність за шкалою Кабірова)		0,36	0,27	0,15
		висока	висока	висока

4 до 7 мм. Найсильніше пригнічення росту спостерігали на культурі *B. subtilis*.

Проведений у власній модифікації методики Allim test показав, що отримана система нанозолота інгібувала ріст корінців, проявляючи ефекти високої фітотоксичності. Найгірший ріст корінців спостерігали за концентрації 500 ppm (таблиця 1).

Розраховані показники мітотичного індексу демонструють прояв цитотоксичності в усіх досліджених концентраціях AuNP. Якщо в контролі МІ становив 65%, то в наносистемі зі зростанням концентрації спостерігали суттєве його зниження: 5 ppm – 49.6%, 50 ppm – 36,3%, 500 ppm – 34.5%. Одержані дані демонструють суттєве зниження активності поділу і росту клітин меристеми коренів цибулі.

**Висновки.** Використовуючи пролін та молочну кислоту було синтезовано низькотемпературний евтектичний розчинник, за допомогою якого отри-

mano екстракт з вичавок винограду. Використання низькотемпературного евтектичного розчинника мало подвійну дію. По-перше, він виступав як екстрагент та забезпечував багатокомпонентність складу рослинного екстракту. По-друге, був одержаний екстракт високої в'язкості значно уповільнював седиментацію частинок, покращуючи стабільність системи. Використовуючи «зелений» спосіб було одержано колоїдний розчин золота із середнім розміром частинок 7,2–7,5 нм. Нанодисперсність системи було підтверджено УФ-спектроскопією, а саме зафіксовано характерний для наночастинок золота пік поглинання при довжині хвилі 500–600 нм.

Отримана наносистема мала широкий спектр антибактеріальної дії, і ефективно пригнічувала ріст бактерій *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* та дріжджового грибка *Candida albicans*. Наносистема в концентраціях вище 5 ppm продемонструвала високу фіто- та цитотоксичність

## Список літератури:

1. Fan M., Han Y., Gao S., Yan H., Cao L., Li Z., Liang X.J., Zhang J. Ultrasmall gold nanoparticles in cancer diagnosis and therapy. *Theranostics*. 2020. 10 (11) P. 4944–4957. doi:10.7150/thno.42471. <https://www.thno.org/v10p4944.htm>
2. Zhang J., Mou L., Jiang X. Surface chemistry of gold nanoparticles for health-related applications. *Chemical Science*. 2020. 11 (4). P. 923–936. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2020/sc/c9sc06497d>
3. Hammami I., Alabdallah N. M.mGold nanoparticles: Synthesis properties and applications. *Journal of king Saud university-science*. 2021. 33 (7). 101560. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101560>
4. Sathiyaraj S. ., Suriyakala G., Gandhi A., Babujanathanam R., Almaary K., Chen T. W., Kaviyarasu K. Biosynthesis, characterization, and antibacterial activity of gold nanoparticles. *Journal of Infection and Public Health*. 2021. 14 (12). P. 1842–1847. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.007>
5. Bharadwaj K. K., Rabha B., Pati S., Sarkar T., Choudhury B. K., Barman, A., Mohd Noor N. H. Green synthesis of gold nanoparticles using plant extracts as beneficial prospect for cancer theranostics. *Molecules*. 2021. 26 (21). 6389. <https://doi.org/10.3390/molecules26216389>
6. Al-Radadi N. S. Facile one-step green synthesis of gold nanoparticles (AuNp) using licorice root extract: Antimicrobial and anticancer study against HepG2 cell line. *Arabian Journal of Chemistry*. 2021. 14 (2). 102956. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.102956>
7. Akintelu S. A., Yao B., Folorunso A. S. Green synthesis, characterization, and antibacterial investigation of synthesized gold nanoparticles (AuNPs) from *Garcinia kola* pulp extract. *Plasmonics*. 2021.16. P. 157–165. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11468-020-01274-9>
8. Perveen K., Husain F. M., Qais F. A., Khan A., Razak S., Afsar T., Abulmeaty M. M. Microwave-assisted rapid green synthesis of gold nanoparticles using seed extract of *Trachyspermum ammi*: ROS mediated biofilm inhibition and anticancer activity. *Biomolecules*. 2021. 11 (2). 197. <https://doi.org/10.3390/biom11020197>
9. Ling J. K. U., and Hadinoto K. Deep eutectic solvent as green solvent in extraction of biological macromolecules: A review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. 23 (6). 3381. <https://doi.org/10.3390/ijms23063381>

10. Rashid R., Wani S. M., Manzoor S., Masoodi F. A., Dar M. M. Green extraction of bioactive compounds from apple pomace by ultrasound assisted natural deep eutectic solvent extraction: Optimisation, comparison and bioactivity. *Food Chemistry*. 2023. 398. 133871. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133871>
11. Das N., Kumar A., Rayavarapu R. G. The role of deep eutectic solvents and carrageenan in synthesizing biocompatible anisotropic metal nanoparticles. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 2021. 12(1). P. 924–938. <https://doi.org/10.3762/bjnano.12.69>
12. Rajeshwari A., Suresh S., Chandrasekaran N., Mukherjee A., Toxicity evaluation of gold nanoparticles using an *Allium cepa* bioassay. *RSC Advances*. 2016, 6, 29: 24000–24009. <http://dx.doi.org/10.1039/C6RA04712B>
13. Scherer M. D., Sposito J. C., Falco W. F., Grisolia A. B., Andrade L. H., Lima S. M., Caires A. R. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles on meristematic cells of *Allium cepa* roots: A close analysis of particle size dependence. *Science of The Total Environment*. 2019. 660 P. 459–467, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.444>

**Vorobiova V.I., Khrokalo L.A., Vinnichuk E.V., Kravchenko F.E., Fedulova V.S., Vasyliiev H.S., Skyba M.I. SYNTHESIS OF GOLD NANOPARTICLES USING EXTRACT OF GRAPE PROCESSING WASTE BASED ON LOW-TEMPERATURE EUTECTIC SOLVENT, THEIR ANTIBACTERIAL PROPERTIES AND TOXICITY**

*The new method of gold nanoparticles synthesis using grape pomace extract obtained with a low-temperature eutectic solvent as a mixture of proline and lactic acid in a molar ratio of 1:2 is presented. This method is become environmentally safe because hasn't involved toxic reagents. The nanoparticles creation and their properties evaluation were carried out using scanning electron microscopy, spectroscopic elemental analysis, Fourier transform infrared spectroscopy, and ultraviolet spectroscopy. It was established that the size of nanoparticles varies within 6,5–9,1 nm, with an average of 7,4 nm. Surface plasmon resonance is observed in the UV spectrum that confirms the presence of nanoparticles. Using the method of infrared spectroscopy, the functional groups of organic natural compounds present in the grape pomace extract and involved in the synthesis of gold nanoparticles were established. Absorption intensity decreasing in the range of 1600–1400 cm<sup>-1</sup> indicates the involvement of hydroxyl functional groups in the nanosystems stabilization.*

*Antibacterial properties of the nanosystem were studied using the disk diffusion method on nutrient agar on test cultures, such as: gram-negative bacteria *Escherichia coli*, gram-positive spore-forming bacteria *Bacillus subtilis*, and pathogenic yeast *Candida albicans*. The system demonstrated a depressive effect on all microorganisms, with clearly defined inhibition zones ranging in size from 4 to 7 mm. The strongest inhibition was observed on *B. subtilis*. Phytotoxicity of the system was evaluated on *Allium cepa* roots, and its highest expression was recorded at a concentration of 500 ppm. The cytotoxicity indicators, as analyzed by the mitotic index, decreased from 65% (control – distilled water) to 35% in the AuNPs at a dilution of up to 500 ppm.*

**Key words:** gold nanoparticles, “green” synthesis, low-temperature eutectic solvents, proline, grape pomace extract, antibacterial properties, phytotoxicity.