

TỔNG HỢP VÀ THỬ NGHIỆM KHẢ NĂNG KHÁNG KHUẨN CỦA VẬT LIỆU TỪ TÍNH NANO COMPOZIT $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CuO}/\text{CHITOSAN}$

Đến toà soạn 05-05-2022

Nguyễn Ngọc Sơn, Nguyễn Thị Hương

Viện Hoá học - Vật liệu, Viện Khoa học và Công nghệ Quân sự

Lê Thu Thủy, Mai Thái Sơn, Đoàn Thị Trà My

Đại học Tài nguyên Môi trường Hà Nội

Email: lethuthuy7983@gmail.com

SUMMARY

SYNTHESIS AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF NANOCOMPOSITE $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CuO}/\text{CHITOSAN}$

The $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CuO}/\text{Chitosan}$ ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CuO}/\text{CS}$) nanocomposite was synthesized from Fe_3O_4 nanoparticles, CuO nanoparticles and Chitosan using ultrasound assisted method. The Fe_3O_4 nanoparticles were prepared by co-precipitation method. The CuO nanoparticles were green-synthesized by the assistance of Mangosteen extract. The final nanocomposite was characterized using X-ray powder diffraction (XRD), field emission scanning electron microscopy (FeSEM), fourier transform infrared (FT-IR) and vibrating sample magnetometer (VSM) techniques. The antibacterial efficacy of the $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CuO}/\text{CS}$ nanocomposites was tested against *Saccharomyces cerevisiae* along with gram-positive (*Bacillus subtilis*) and gram-negative (*Escherichia coli*) bacteria using the disc diffusion method and determined the minimum inhibitory concentration (MIC).

Keywords: $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CuO}$, chitosan, nanocomposite, MIC.

1. MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây, các hạt nano oxit kim loại được quan tâm nghiên cứu tổng hợp bằng nhiều phương pháp khác nhau. Do các đặc tính hóa lý đặc biệt của chúng như tính nhiệt, quang, điện và cơ học khác nhau nên chúng được sử dụng trong nhiều lĩnh vực như: vật liệu trong xử lý môi trường, vật liệu kháng khuẩn [1-2], vật liệu từ tính - cảm biến [3], pin lithium-ion [4],... Hiện nay, ngoài các phương pháp tổng hợp đồng kết tủa [5], thủy nhiệt [6], sol-gel [7], plasma [8] được nghiên cứu phát triển thì phương pháp tổng hợp xanh sử dụng dịch chiết từ các loại lá cây, quả-vỏ quả [9], vi khuẩn [10], vitamin [11], một số loại nấm có chứa các hoạt chất oxy-khử đã được nghiên cứu thử nghiệm

làm chất phản ứng, chất bền hoá trong quá trình tổng hợp.

Tác giả Yue Wu đã tổng hợp hệ Fe_3O_4 -chitosan/TPP bằng phương pháp đồng kết tủa trong môi trường kiềm, sục khí N_2 ở điều kiện 60°C trong 2 giờ. Sự hình thành của liên kết chéo giữa Chitosan và natri tripolyphosphate (TPP) với nhân nano sắt từ Fe_3O_4 tạo thành hệ lỗ xốp siêu nhỏ của gel chitosan. Sản phẩm thu được có từ tính bão hòa cao tại 60°C , đây được xem là nhiệt độ tốt nhất cho cả liên kết ngang của CS và TPP và quá trình oxy hóa $\text{Fe}(\text{OH})_2$ do đảm bảo được khả năng hình thành liên kết mà không làm cho sắt bị mất đi từ tính [12]. Yang-Chuang Chang và cộng sự, tổng hợp Chitosan- Fe_3O_4 bằng phương pháp thủy nhiệt ở 80°C ứng dụng để hấp phụ ion Cu^{2+} trong môi trường

nước. Trong đó, vai trò của chitosan làm tăng diện tích bề mặt riêng của hệ và thay đổi điểm đẳng điện từ đó làm thúc đẩy nhanh chóng quá trình hấp phụ Cu^{2+} [13]. Chính vì vậy, CS trong các hệ nanocomposit có vai trò là tác nhân tạo liên kết chéo giúp phân tán tốt các oxit kim loại trong hệ, thay đổi điện tích của bề mặt hệ, kết hợp với khả năng thu hồi nhờ từ trường ngoài của nano oxit sắt từ đặc biệt được nghiên cứu trong các năm gần đây [13, 14].

Chitosan (CS) là một loại polyamino saccharit với cấu trúc là poly(1-4)-2-amino-2-deoxy-d-glucan, đồng thời cũng là một polyme sinh học có khả năng khử khuẩn [12], hấp phụ các kim loại nặng, cố định các enzyme, phân phối thuốc và tương thích sinh học tốt. Vì vậy, nghiên cứu biến tính hệ nano $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CuO}$ với chitosan sẽ thu được một hệ vật liệu hứa hẹn có nhiều ứng dụng đáng kể trong lĩnh vực y dược và môi trường.

Kế thừa các kết quả của những nghiên cứu trên, trong công bố này, hệ nanocomposit $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CuO}/\text{CS}$ được tổng hợp bằng phương pháp đồng kết tủa - tổng hợp xanh, dưới sự hỗ trợ của sóng âm. Trong đó, nano CuO được tổng hợp bằng phương pháp xanh thông qua quá trình đốt cháy hệ dung dịch chứa $[\text{Cu}^{2+}$ - ellagate complex] được tạo thành từ muối đồng và dịch chiết của vỏ quả măng cụt. Dịch chiết từ vỏ quả măng cụt chủ yếu chứa các hợp chất xanthone, bên cạnh là các garcinon trioxyanthone, pyranoxanthone, pyrano xanthenon,... trong đó hợp chất α - mangostin có hàm lượng cao nhất chiếm khoảng đến 0,2 % và đã được chứng minh là hoạt tính kháng khuẩn, chống viêm, chống oxy hóa và chống ung thư. Tuy nhiên, để hạn chế sự kết tụ của các hạt nano từ tính Fe_3O_4 và nano CuO trong hệ và tăng khả năng thu hồi của chúng khi ứng dụng làm vật liệu xử lý môi trường, chitosan đã được sử dụng làm chất phân tán trong hệ.

Mục tiêu của nghiên cứu này là tổng hợp vật liệu nanocomposit từ tính $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CuO}/\text{CS}$ và đánh giá đặc trưng cấu trúc của hệ và xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) đối với vi khuẩn gram âm, gram dương và nấm men.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hoá chất và thiết bị

* Hoá chất: $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, NH_3 28%, Etanol 96% của

hãng Merck hoặc Macklin

* Thiết bị dùng trong chế tạo vật liệu: thiết bị siêu âm VCX500 (Sonics & Materials Inc.; 500 W, 20 kHz), bếp khuấy từ gia nhiệt, máy đo pH, tủ sấy, các dụng cụ thủy tinh dùng để thực hiện phản ứng.

Thiết bị dùng trong đánh giá đặc trưng cấu trúc của vật liệu: máy đo nhiễu xạ tia X (PANalytical), thiết bị đo phổ hồng ngoại FT-IR (Bruker), kính hiển vi điện tử quét-tán xạ năng lượng tia X (Jeol-JMS 6490), thiết bị từ kết mẫu rung Magnet B-10 Vibrating (IRD Balancing).

2.2. Chế tạo vật liệu nano composit $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CuO}/\text{CS}$

Vật liệu nanocomposit $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CuO}/\text{CS}$ được tổng hợp theo quy trình 2 giai đoạn:

Giai đoạn 1: Tổng hợp nano sắt từ nano Fe_3O_4 và nano CuO, trong đó quá trình tổng hợp nano sắt từ được tiến hành bằng phương pháp đồng kết tủa trong môi trường N_2 trên cơ sở các công bố đã xuất bản của nhóm tác giả [16, 17]. Quá trình tổng hợp nano CuO bằng phương pháp xanh trên cơ sở tham khảo nghiên cứu của tác giả Udayabhanu và cộng sự [18].

Tổng hợp nano Fe_3O_4 : Hỗn hợp hai muối $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ và $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (tỉ lệ phần mol $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}=1/2$) được hoà tan bằng 100 mL nước cất trong bình phản ứng. Gia nhiệt cho hệ phản ứng tới nhiệt độ 80 °C và giữ nguyên trong suốt thời gian phản ứng. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trộn 10 phút, sau đó được siêu âm với đầu dò cường độ 500W, biên độ 40%, 5s/xung, đồng thời sục khí nitơ và nhỏ từ từ dung dịch NH_3 25-28% vào bình phản ứng sao cho dung dịch luôn duy trì pH=9-10 (kiểm soát bằng giấy chỉ thị pH). Hệ phản ứng tiếp tục được siêu âm thêm 15 phút, sau khi bổ sung đủ lượng NH_3 . Hỗn hợp phản ứng sau đó được đổ ra cốc thủy tinh, sản phẩm kết tủa màu đen được thu lại bằng cách sử dụng nam châm. Sản phẩm được rửa bằng nước cất nhiều lần cho đến khi môi trường trung tính, rửa thêm 2 lần bằng etanol. Sản phẩm nano Fe_3O_4 sau cùng được sấy qua đêm bằng tủ sấy tại 60°C.

Tổng hợp nano CuO:

* Dịch chiết vỏ quả măng cụt được chuẩn bị theo quy trình sau: Vỏ quả Măng cụt thô (*Garcinia mangostana* L.) được thu hái từ các

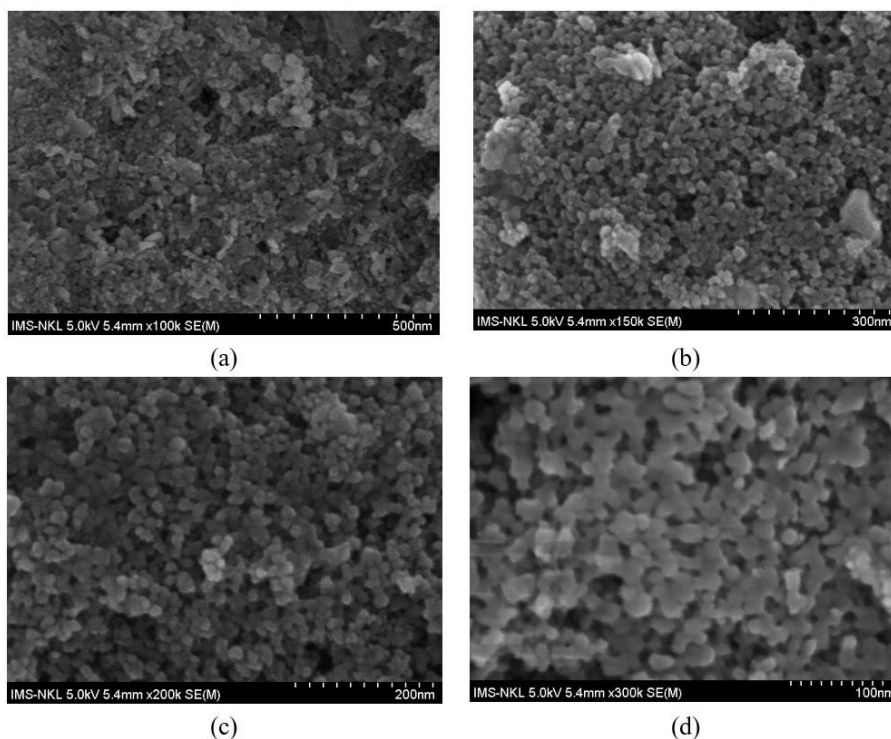
Kết quả phổ x-ray tại hình 1a cho thấy, đã có sự hình thành các pha tinh thể của Fe_3O_4 và CuO , đồng thời có sự xuất hiện của các pic đặc trưng cho cấu trúc của nano Fe_3O_4 trên tại góc 2θ lần lượt là: 30,2; 35,4; 59,2 và 62,6 tương ứng với các mặt mạng (200), (103), (321), (400). Các pic đặc trưng cho cấu trúc của CuO tại góc 2θ là: 31,6; 35,5; 39,9; 49,7; 61,4 và 75,2 tương ứng với các mặt mạng (110), (002), (111), (202), (220), (004), chứng tỏ đã có sự hình thành pha tinh thể của Fe_3O_4 [16, 17], CuO [20, 21] trong hệ. Ngoài ra, có hai pic đặc trưng tại góc 2θ ở 10,1 và 19,6 chứng tỏ sự có mặt của chitosan trong hệ vật liệu nghiên cứu [22].

Kết quả phổ hồng ngoại tại hình 1b cho thấy, có sự xuất hiện của các pic tại các số sóng khác nhau đặc trưng cho sự có mặt của các dao động của các liên kết, nhóm chức có mặt trong hệ vật liệu nano composít $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CuO}/\text{CS}$ gồm: pic đặc trưng tại số sóng 3423 cm^{-1} , 1625 cm^{-1} của mẫu (1-CS) và các pic tại số sóng 3420 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} của mẫu (2- $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CuO}/\text{CS}$), đặc trưng cho dao động của nhóm $-\text{OH}$ và $-\text{NH}_2$ có mặt trong vật liệu CS. Thêm vào đó có hai pic tại

vùng số sóng 1010 cm^{-1} thể hiện cho sự có mặt của nhóm $\beta(1-4)$ glycosidic và liên kết C-O-C trong vòng glucose [20]. Sự có mặt của các pic tại số sóng trong vùng 2924 cm^{-1} đặc trưng cho dao động của liên liên C-H có mặt trong phân tử CS ở mẫu (1), trong khi mẫu (2) không xuất hiện pic đặc trưng tại bước sóng này, điều này là do hàm lượng CS trong mẫu (2) nhỏ.

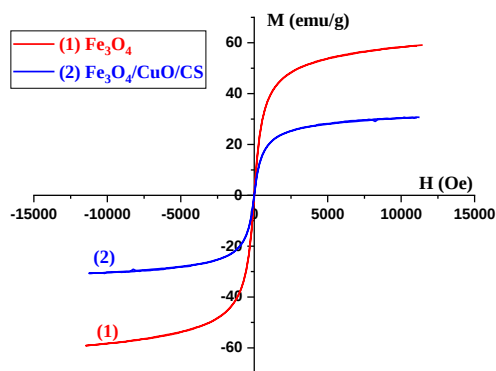
Trong dải số sóng từ $600-400\text{ cm}^{-1}$, phổ IR của mẫu (2) cho thấy có sự xuất hiện các pic tại số sóng đặc trưng. Tại số sóng 576 cm^{-1} và 483 cm^{-1} tương ứng đặc trưng của cho dao động của liên kết Fe-O [15] và Cu-O [20], chứng tỏ đã có sự hình thành Fe_3O_4 và CuO trong hệ vật liệu nanocomposít tổng hợp được.

Đối với khả năng kháng khuẩn của các hệ nanocomposít, thì sự phân bố của các nano oxít trong hệ ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng kháng khuẩn của vật liệu, khi đó các phản ứng oxy hoá (ROS- reactive oxygen species) xảy ra giữa các nano oxít kim loại với màng tế bào của vi khuẩn [23]. Hình 2 là ảnh FESEM của mẫu vật liệu nanocomposít $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CuO}/\text{CS}$ tại các độ phóng đại khác nhau.



Hình 2. Ảnh FESEM của vật liệu nanocomposít $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CuO}/\text{CS}$ tại các độ phóng đại khác nhau (a-100K; b-150K; c-200K; d-300K)

Ảnh FESEM của mẫu vật liệu nanocomposit $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CuO}/\text{CS}$ ở các độ phóng đại khác nhau cho thấy, các hạt $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CuO}$ tổng hợp được trong khoảng 20-50nm, các hạt phân bố tương đối đồng đều. Đặc biệt khi ảnh chụp ở độ phóng đại 300K cho thấy rõ hơn sự hình thành lớp màng chitosan trong hệ, vì vậy việc biến tính hệ $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CuO}$ với chitosan được cho là giảm sự co cụm của các hạt nano sắt. Theo các kết quả công bố gần đây cho thấy [12], việc biến tính các nano oxit kim loại với CS giúp tăng khả năng kháng khuẩn của vật liệu khi ứng dụng làm vật liệu xử lý môi trường do tính kháng khuẩn vốn có của chitosan. Ngoài ra, các loại vật liệu có từ tính như các hệ nanocomposit có chứa nano Fe_3O_4 hứa hẹn là loại vật liệu dễ dàng thu hồi sau xử lý và đáp ứng được tính kháng khuẩn trong điều kiện có từ trường ngoài [24]. Hình 3 là đường cong từ hoá của vật liệu nano Fe_3O_4 và nanocomposit $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CuO}/\text{CS}$ với điều kiện đo ở nhiệt độ phòng.

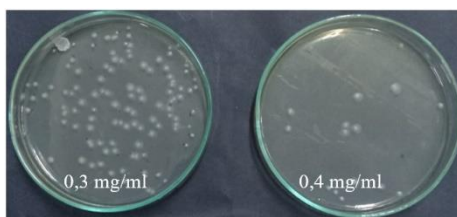


Hình 3. Đường cong từ hoá của vật liệu nano Fe_3O_4 (1) và nanocomposit $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CuO}/\text{CS}$ (2). Kết quả nghiên cứu tính chất từ của vật liệu tại hình 3, đã chứng tỏ rằng hệ vật liệu nano nền Fe_3O_4 có độ từ hoá tương đối lớn đạt 58,84 emu/g. Hệ vật liệu sau biến tính $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CuO}/\text{CS}$ có độ từ hoá bão hoà của hệ giảm xuống còn 30,54 emu/g tương ứng giảm gần 50 %, tuy nhiên đối với kết quả thu được vật liệu nanocomposite $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CuO}/\text{CS}$ vẫn có độ từ hoá tương đối cao, thuận lợi cho việc khử khuẩn trong điều kiện có từ trường ngoài [24].

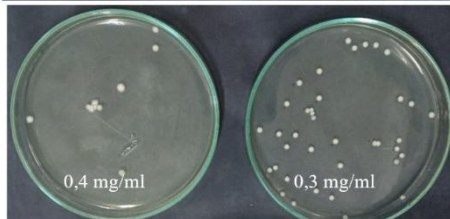
3.2. Nồng độ ức chế tối thiểu vật liệu $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CuO}/\text{CS}$ (MIC)

Hình 4 là kết quả thử nghiệm khả năng kháng khuẩn và giá trị MIC của hệ vật liệu nanocomposit. $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CuO}/\text{CS}$ tổng hợp được. Giá trị MIC đối với *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae* của hệ vật cho giá trị tương ứng lần lượt là 0,3; 0,3 và 0,4 mg/mL.

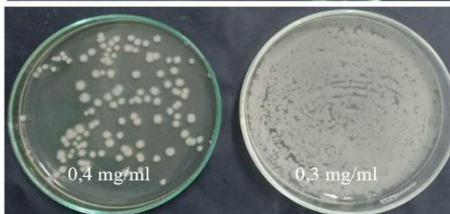
E. coli
(ATCC 25.922)



Bacillus subtilis
(ATCC 9/58)



S. cerevisiae



Hình 4. Khả năng kháng khuẩn của $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CuO}/\text{CS}$ ở các nồng độ khác nhau

Khả năng kháng khuẩn của hệ nanocomposit $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CuO}/\text{CS}$ được kết hợp từng thành phần có trong hệ gồm hệ nano oxit kim loại và chitosan. Trong đó, các nano oxit Fe_3O_4 , CuO sẽ tương tác với màng tế bào vi sinh vật, làm gián đoạn quá trình sao chép DNA, phân chia tế bào và hô hấp tế bào, khiến diện tích bề mặt tế bào vi khuẩn mở rộng và bị tiêu diệt [25]. Một số công bố trước đây [26, 12] đã cho thấy, khả năng kháng khuẩn tốt của chitosan đối với cả vi khuẩn gram âm và gram dương trong môi trường axit. Đối với vật liệu nano composit $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CuO}/\text{CS}$ thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với *B.subtilis* mạnh hơn đối với *E.coli*, và ức chế cả sự phát triển của nấm men *S.cerevisiae*.

4. KẾT LUẬN

Vật liệu composit $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CuO}/\text{CS}$ được tổng hợp bằng phương pháp đồng kết tủa- tổng hợp xanh, kết hợp với sự hỗ trợ của kỹ thuật sóng âm, các hạt nano $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CuO}$ phân bố tương đối đồng đều trên nền chitosan và có kích thước trong khoảng từ 20-50 nm. Kết quả đánh giá từ độ bão hoà của hệ sau biến tính với chitosan đạt 30,54 emu/g và giảm 50% so với mẫu nano sắt từ Fe_3O_4 . Khả năng kháng khuẩn của hệ vật liệu nanocomposit $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CuO}/\text{CS}$ được thử nghiệm đối với vi khuẩn *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* và nấm men *Sacharomyces cerevisiae* cho nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) lần lượt là 0,3; 0,3 và 0,4 mg/mL.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Y.T.Prabhu and et al. Synthesis of Fe_3O_4 nanoparticles and its antibacterial application. Int Nano Lett, **2015**.
2. Dhaneswar Das, Bikash Chandra Nath, Pinkee Phukon, Swapan Kumar Dolui. Synthesis and evaluation of antioxidant and antibacterial behavior of CuO nanoparticles. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Vol. 101, **2013**, 430-433.
3. Sara Dehashtian, Mohammad Bagher Chohivand, Mojtaba Shamsipur, Samira kariminia. Construction of a sensitive and selective sensor for morphine using chitosan coated Fe_3O_4 magnetic nanoparticle as a modifier. Materials Science and Engineering Vol.58, **2016**, 53–59.

4. Wenjie Han, Xianying Qin, Junxiong Wu, Qing Li, Ming Liu, Yue Xia, Hongda Du, Baohua Li, Feiyu Kang. Electrosprayed porous $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{carbon}$ microspheres as anode materials for high-performance lithium-ion batteries. Nano Research, Vol 11, **2018**, 892-904.
5. Vu Minh Thanh and et al. Synthesis of Ternary $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZnO}/\text{Chitosan}$ magnetic nanoparticles via a Ultrasound-assisted coprecipitation process for antibacterial applications. Journal of Nanomaterials, Vol. 2020, **2020**, 1-9.
6. O.M. Lemine, K. Omri, B.Zhang, L. El Mir, M. Sajieddine, A. Alyamani, M. Bououdina. Sol-gel synthesis of 8 nm (Fe_3O_4) nanoparticles and their magnetic properties. Superlattices and Microstructures 52. **2012**. 793-799.
7. O.M. Lemine, K. Omri, B. Zhang, L. El Mir, M. Sajieddine, A. Alyamani, M. Bououdina. Sol-gel synthesis of 8 nm magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles and their magnetic properties. Superlattices and Microstructures 52. **2012**. 793-799.
8. Genki Saito, Sou Hosokai, Masakatsu Tsubota and Tomohiro Akiyama. Synthesis of copper/copper oxide nanoparticles by solution plasma. Journal of applied physics 110. **2011**. 023302.
9. Pham Thi Mai Huong and et al. Green sonochemical process for preparation of polyethylen glycol - $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZnO}$ magnetic nanocomposite using rambutan peel extract as photocatalyst, for removal of methylene blue in solution. Bull. Mater. Sci, **2022**. Vol 45. 13.
10. Maria Sindhura John. Biogenic Synthesis of Copper Nanoparticles Using Bacterial Strains Isolated from an Antarctic Consortium Associated to a Psychrophilic Marine Ciliate: Characterization and Potential Application as Antimicrobial Agents. Marine drugs, **2021**, 19, 263.
11. Shadpour Mallakpour, Soheila Mansourzadeh. Sonochemical synthesis of PVA/PVP blend nanocomposite containing modified CuO nanoparticles with vitamin B1 and antibacterial activity against *Staphylococcus*

aureus and *Escherichia coli*. Ultrasonics Sonochemistry. **2018**, 43, 91-100.

12. Yue Wu, Yujun Wang, Guangsheng Luo, Youyuan Dai. In situ preparation of magnetic Fe₃O₄ - chitosan nanoparticles for lipase immobilization by cross-linking and oxidation in aqueous solution. Bioresource Technology. **2009**, 100, 3459-3464.

13. Yang-Chuang Chang, Dong-Hwang Chen. Preparation and adsorption properties of monodisperse chitosan-bound Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for removal of Cu(II) ions. Journal of Colloid and Interface science. **2005**, 283, 446-451.

14. Nguyen Thi Huong and et al, Synthesis Fe₃O₄/Talc nanocomposite by coprecipitation-ultrasonication method and advances in hexavalent chromium removal from aqueous solution, *Adsorption Science & Technology*, **2020**, 38, 9-10, 483-501.

15. Hong Kynoon No, Na Young Park, Shin Ho Lee, Samuel P Meyers, Antibacterial activity of chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*, **2002**, 74, 1-2, 65-72.

16. Vu Minh Thanh and et al, Modified iron oxide nanoparticles with polyethylene glycol and citric acid for biomedical application, *VietNam J. Chem.* **2019**, 57, 6E1,2. 365-371.

17. Nguyen Thi Huong and et al, Effect of ultrasonication time and PEG content on the crystallite and lattice parameter of PEG-coated Fe₃O₄ nanoparticles synthesized by a ultrasound assisted co-precipitation process, *VietNam J. Chem*, **2019**, 57, 6E1,2. 340-346.

18. Udayabhanu and et al, *Tinospora cordifolia* mediated facile green synthesis of cupric oxide nanoparticles and their photocatalytic,

antioxidant and antibacterial properties. *Materials Science in Semiconductor Processing* Vol. 33, 2015, 81-88.

19. S.M.Magana and et al. Antibacterial activity of montmorillonites modified with silver, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, Vol. 281, **2008**, 192-199.

20. M.I. Amal, H.M. Ghaida, M. Laila, A Copper (II) oxide nanocatalyst preparation and characterization: green chemistry route, *Bull. Natl. Res. Cent*, Vol. 42, **2018**, 6.

21. Muhammad Tariq Saeed Chani, Impedimetric sensing of temperature and humidity by using organic-inorganic nanocomposites composed of chitosan and a CuO-Fe₃O₄ nanopowder. *Micraochim Acta*, Vol. 7, **2017**, 2349-2356.

22. Aarti Sripathi Bhatt, Denthaje Krithhaje Bhat, Mysore Sridhar Santosh and Cheuk-wai Tai, Chitosan/NiO nanocomposites: a potential new dielectric material. *Journal of Materials Chemistry*, **2011**, 21, 13490.

23. Yamamoto, O.: Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide. *Int J Inorg Mater* 3, Vol. 7, **2001**, 643-646.

24. L. Adriani, T. Widjastuti, R. Nurdianti and R. Wiradimadja 2018 3rd International Conference of Integrated Intellectual Community (ICONIC) 10.2139/ssrn.3202918.

25. A. M. Ramadan, Structural and biological aspects of copper (II) complexes with 2-methyl-3-amino-(3 H)-quinazolin-4-one. *J. Inorg. Biochem*, Vol. 65, **1997**, 183-189.

26. Z. Li, X. P. Zhuang, X. F. Liu, Y. L. Guan and K. D. Yao, Study on antibacterial O-carboxymethylated chitosan/cellulose blend film from LiCl/N, N-dimethylacetamide solution. *Polymer*, Vol. 43, **2002**, 1541-1547.