

UNIVERSITATEA TITU MAIORESCU BUCUREȘTI

IOSUD

Domeniul MEDICINĂ

TEZĂ DE DOCTORAT

**STUDII PRIVIND EFECTUL ANTIMICROBIAN ȘI ANTIOXIDANT AL UNOR
COMPUȘI NATURALI BIOACTIVI; REALIZAREA DE COMPLEXE PE
BAZĂ DE NANOPARTICULE DE AUR ȘI ARGINT PRIN SINTEZĂ
VERDE CU COMPUȘI BIOACTIVI DIN EXTRACTE VEGETALE**

Rezumat

Conducător științific

Prof. univ. dr. habil. CRISTIANA TĂNASE

Doctorand

Daniel CORD

BUCUREȘTI

2025

CUPRINS

CUPRINS.....	2
Listă abrevieri	4
INTRODUCERE.....	1
PARTEA GENERALĂ.....	2
1. ROLUL COMPUȘILOR NATURALI ÎN TERAPIILE MODERNE	2
1.1. ȚINTE MOLECULARE ALE COMPUȘILOR BIOACTIVI CU EFECT ANTIPROLIFERATIV	2
1.2. MECANISMELE RĂSPUNSULUI IMUNOLOGIC ANTIMICROBIAN.....	15
2. COMPUȘI BIOACTIVI DIN PLANTE	20
2.1. <i>ARTEMISIA ANNUA</i> (PELINIȚA).....	20
2.2. <i>SILYBUM MARIANUM</i> (ARMURARIUL).....	23
2.3. <i>CHELIDONIUM MAJUS</i> (ROSTOPASCA)	Error! Bookmark not defined.
2.4. <i>TARAXACUM OFFICINALE</i> (PĂPĂDIA)	26
2.5. <i>SALIX ALBA</i> (SALCIA ALBĂ).....	28
3. NANOPARTICULE DE AUR (AuNPs)	Error! Bookmark not defined.
3.1. SINTEZA CHIMICĂ ȘI FIZICĂ A NANOPARTICULELOR DE AUR.....	31
3.2. BIOSINTEZA NANOPARTICULELOR DE AUR (SINTEZA VERDE)	32
PARTEA SPECIALĂ.....	40
4. STUDII PRIVIND EFECTUL ANTIMICROBIAN SI ANTIOXIDANT AL EXTRACTELOR DIN <i>SILYBUM MARIANUM</i> , <i>ARTEMISIA ANNUA</i> , <i>TARAXACUM OFFICINALE</i> ȘI <i>CHELIDONIUM MAJUS</i>	Error! Bookmark not defined.
4.1 INTRODUCERE.....	40
4.2. MATERIAL ȘI METODĂ.....	42
A. CAPACITATEA ANTIOXIDANTA	42
4.2.1 DETERMINAREA CONȚINUTULUI TOTAL DE POLIFENOLI.....	42
4.2.2 DETERMINAREA ACȚIUNII ANTIOXIDANTE	42
B. CAPACITATEA ANTIMICROBIANĂ.....	44
4.2.3 EVALUAREA CALITATIVĂ A ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE	46
4.2.4 DETERMINAREA CANTITATIVĂ A ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE.....	47
4.2.5 EVALUAREA <i>IN VITRO</i> A ACTIVITĂȚII ANTIBIOFILM	48
4.3. REZULTATE SI DISCUȚII.....	50
A. EVALUAREA CAPACITĂȚII ANTIOXIDANTE	50
4.3.1 EVALUAREA CONȚINUTULUI TOTAL DE POLIFENOLI.....	50
4.3.2 EVALUAREA ACȚIUNII ANTIOXIDANTE.....	51
B. CAPACITATEA ANTIMICROBIANA.....	53
4.3.4 REZULTATELE EVALUĂRII CALITATIVE A ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE.....	53

4.3.5 REZULTATELE DETERMINĂRII CANTITATIVE A ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE	58
4.3.6 REZULTATELE EVALUĂRII <i>IN VITRO</i> A ACTIVITĂȚII ANTIBIOFILM	66
4.4 CONCLUZII.....	69
5. SISTEME AVANSATE DE ADMINISTRAE A MEDICAMENTELOR ANTIMICROBIENE SI ANTITUMORALE: NANO PARTICULE DE AUR SI ARGINT REALIZATA PRIN SINTEZA VERDE CU COMPUSI BIOACTIVI DIN EXTRACTE VEGETALE.....	71
5.1 INTRODUCERE	71
5.2 MATERIALE SI METODE.....	Error! Bookmark not defined.76
5.2.1 SINTEZA EXTRACTE	76
5.2.2 SINTEZA GREEN DE NANOPARTICULE	77
5.2.3 METODE DE CARACTERIZARE FIZICO-CHIMICA A NANOPARTICULELOR GREEN	79
5.2.4. DESCRIEREA PROBELOR FOLOSITE	81
5.2.5 METODE DE EVALUARE A EFECTULUI ANTIMICROBIAN	83
5.2.6 METODE DE EVALUARE A EFECTULUI ANTITUMORAL (ANTIPROLIFERATIV)	87
5.2.7 METODE IN VITRO UTILIZATE PENTRU EVALUAREA ACTIVITĂȚII BIOLOGICE	90
5.2.8 METODE DE ANALIZĂ A DATELOR	91
5.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII	94
5.3.1 CARACTERIZAREA FIZICO - CHIMICĂ A NANOPARTICULELOR	94
5.3.2 EVALUAREA ANTIMICROBIANĂ	124
5.3.3 EVALUAREA IN VITRO AL EFECTULUI CITOTOXIC ȘI SINERGETIC	141
5.4 CONCLUZII.....	152
6. CONCLUZII GENERALE	154
7. ANEXE	157
8. BIBLIOGRAFIE	162
9. LISTA PUBLICAȚIILOR ȘI DISEMINAREA REZULTATELOR	174

Listă abrevieri

NF- κ B = factorul nuclear-kappa
ADN= acid dezoxiribonucleic
REL= virusuri a reticuloendoteliozei
UV= raze ultraviolete
MMP= metaloproteaze matriciale
VEGF= factorul de creștere vascular endothelială
COX-2= ciclooxigenaza-2
I κ B α = Inhibitor al factorului nuclear kappa B, izoforma alpha
JAK=janus kinază
CAPE= esterul fenetil al acidului cafeic
TNF= factor de necroză tumorală
TNF α = casectina
TNF- β = limfotoxina
IL-1= interleukina-1
IL-8= interleukina-8
LOX-2= lipoxigenaza-2
uPA= activatorul de plasminogen de tip urokinază
JNK= kinaza N-terminală c-Jun
MEK= Kinaza mitogen-activată a proteinei kinază extracelulare
Cdk-4= kinază dependentă de ciclină 4
Cdk-6= kinază dependentă de ciclină 6
Cdk-7= kinază dependentă de ciclină 7
Cdc2= iclu de diviziune celulară 2
NO=oxid de azot
ROS= specii reactive de oxigen
RNS= specii reactive de azot
HIF= factorul inductibil prin hipoxie
PAMP= modele moleculare asociate agenților patogeni
iNOS= oxid de azot sintază inductibil
Cdk= Ciclin dependent kinază
EGF= factorul de creștere epidermal
PDGF=factorul de creștere derivat din trombocite
factorii de creștere fibroblastici (FGF),
Epo=eritropoietină
IGF=factor de creștere insulin-like
IL=interleukine
AP-1=proteina activator 1
AuNPs= nanoparticule de aur
AgNps=nanoparticule argint
SAgNPs-WT = nanoparticule de argint obținute din Salix alba
AuNPsE_{ETOH} =nanoparticule de aur obținute din extract etanoic de peliniță
AuNPsEaqSW=nanoparticule de aur obținute prin extract apos de peliniță
E_{ETOH}-SW =extract etanolic de peliniță
Eaq-SW = extract apos peliniță
IMTB=imatinib
SNTB= sunitinib

INTRODUCERE

În ultimele decenii, interesul pentru utilizarea compușilor naturali bioactivi în terapiile moderne a crescut semnificativ datorită proprietăților biologice remarcabile, printre care se numără activitatea antiproliferativă, antimicrobiană, antioxidantă și antiinflamatorie. Plantele medicinale reprezintă o sursă importantă de metaboliți secundari cu potențial terapeutic, iar numeroase studii au demonstrat eficiența acestora în prevenirea și tratamentul unor afecțiuni severe, inclusiv cancerul și bolile infecțioase.

În contextul creșterii rezistenței microbiene la antibiotice și al limitărilor convenționale împotriva cancerului, dezvoltarea unor noi abordări terapeutice bazate pe compuși naturali devine o necesitate. Mecanismele răspunsului imun la infecțiile microbiene și strategiile pentru intensificarea acestuia sunt aspecte esențiale în descoperirea unor agenți antimicrobieni eficienți. În acest sens, plante precum *Artemisia annua*, *Silybum marianum*, *Chelidonium majus*, *Taraxacum officinale* și *Salix alba* au fost intens studiate pentru compoziția fitochimică și capacitatea acestora de a modula procesele biologice critice.

Nanotehnologiile oferă o nouă dimensiune în valorificarea potențialului terapeutic al acestor compuși naturali. Nanoparticulele, în special cele de aur și argint, au demonstrat proprietăți antimicrobiene și antitumorale excepționale, iar sinteza lor prin metode „verzi” utilizând extracte vegetale reduce toxicitatea și impactul negativ asupra mediului. Sinergismul dintre nanoparticulele biosintetizate și terapiile antitumorale pot duce la crearea unor sisteme avansate de administrare a medicamentelor, care să permită o țintire selectivă și eficientă a celulelor tumorale.

Partea experimentală a acestei lucrări conține studii *in vitro* a activității antimicrobiene și tumorale a extractelor vegetale și a nanoparticulelor biosintetizate, evidențiind impactul acestora asupra liniilor tumorale. De asemenea, sunt evaluate proprietățile fizico-chimice ale nanoparticulelor și efectele lor antibiofilm împotriva bacteriilor rezistente la antibiotice.

În final, această teză își propune să contribuie la dezvoltarea unor produse farmaceutice inovatoare bazate pe combinația compușilor bioactivi din plante și nanotehnologii, având ca scop îmbunătățirea terapiilor actuale pentru infecții microbiene și afecțiuni oncologice. Studiile viitoare vor fi direcționate către optimizarea formulărilor, evaluarea siguranței acestora și brevetarea compozițiilor dezvoltate, deschizând noi perspective naturale în medicina modernă.

PARTEA SPECIALĂ

4. STUDII PRIVIND EFECTUL ANTIMICROBIAN SI ANTIOXIDANT AL EXTRACTELOR DIN *SILYBUM MARIANUM*, *ARTEMISIA ANNUA*, *TARAXACUM OFFICINALE* ȘI *CHELIDONIUM MAJUS*

4.1 INTRODUCERE

Scopul acestui capitol este studiul activității antimicrobiene si antioxidante a unor extracte de *Taraxacum officinale* (tinctură), *Chelidonium majus* (tinctură), *Silybum marianum* (tinctură) și *Artemisia annua* (extracte alcoolice). Pentru îndeplinirea acestui scop au fost propuse următoarele obiective:

A. Capacitatea antioxidanta

1. determinarea conținutului total de polifenoli
2. determinarea conținutului total de flavonoide
3. determinarea acțiunii antioxidante

B. Capacitatea antimicrobiana

1. Evaluarea calitativa a activității antimicrobiene
2. Determinarea cantitativă a activității antimicrobiene
3. Investigarea *in vitro* a proprietăților anti-biofilm

O nouă direcție de cercetare este reprezentată de exploatarea proprietăților antimicrobiene a unor mari varietăți de plante, acestea reprezentând un rezervor ce furnizează numeroși compuși utili în lupta împotriva microorganismelor multi-rezistente [206].

Taraxacum officinale, cunoscută în mod obișnuit sub numele de păpădie, este o plantă medicinală utilizată de secole pentru beneficiile aduse în tratamentul unor afecțiuni precum cele ale vezicii biliare, pentru îmbunătățirea funcției ficatului, scăderea tensiunii arteriale și a nivelului de colesterol din sânge sau pentru efectul diuretic. În plus, studii din literatura de specialitate au arătat că infuzia realizată din această plantă prezintă efecte benefice asupra calculilor renali [207].

Chelidonium majus, rostopasca, reprezintă una dintre cele mai vechi și mai utilizate plante în medicina tradițională. Beneficiile acesteia sunt multiple, fiind adesea folosită în tratarea eczemelor și condiloamele produse de infecția cu Virusul Papiloma Uman (HPV), bolilor hepatice și gastrice, având de asemenea efecte antiinflamatoare și analgezice [208-210].

Proprietățile terapeutice ale extractelor obținute din *Silybum marianum* (armurariu) sunt cunoscute de secole datorită folosirii frecvente a acesteia în medicina tradițională pentru tratarea diferitelor afecțiuni hepatice, precum icterul. În prezent, numeroase studii clinice și experimentale

au demonstrat că *S. marianum* reprezintă un agent hepatoprotector, cu funcții antiinflamatorii și antioxidante datorate prezenței silimarinei, fiind utilizat de asemenea în tratamentul intoxicațiilor cu *Amanita muscaria* [211-212].

Artemisia annua reprezintă una dintre cele mai renumite plante medicinale utilizate în prezent, proprietatea principală a acesteia fiind reprezentată de activitatea antimalarică, descoperire ce a fost onorată cu Premiul Nobel pentru Medicină în anul 2015.

Mai mult decât atât, studiile de specialitate au demonstrat eficacitatea acesteia în tratamentul unor multiple afecțiuni, precum astmul, artrita reumatoidă, tuberculoza, herpesul sau virusurile hepatice B și C. În plus, o alte funcții farmacologice importante sunt reprezentate de proprietățile anti-cancerigene și anti-tumorale [213-214].

4.2. MATERIAL ȘI METODĂ

A. CAPACITATEA ANTIOXIDANTA

4.2.1 DETERMINAREA CONȚINUTULUI TOTAL DE POLIFENOLI

Determinarea conținutului total de polifenoli a fost realizată utilizând metoda spectrofotometrică Singleton, bazată pe măsurarea absorbantei soluției obținute prin reacția dintre polifenoli și reactivul Folin-Ciocalteu, la o lungime de undă de **765 nm**. Acidul galic a fost utilizat ca standard pentru cuantificare.

Pentru această analiză, s-au preparat **extracte etanolice (50%)** din materialul vegetal uscat, în concentrație de **1%**. Probele analizate au inclus: *Chelidonium majus*, *Artemisia annua*, *Taraxacum officinale*, *Silybium marianum*, *Salix alba*

Materialul vegetal a fost supus extracției prin reflux timp de **30 de minute** pe baie de apă, urmată de filtrare și completarea volumului până la semn într-un balon cotate. Pentru analiză, **1 mL de extract etanolic** a fost amestecat cu **5 mL de reactiv Folin-Ciocalteu** (dilat de **10 ori** cu apă distilată) și **4 mL de soluție de carbonat de sodiu 7,5%**.

Reproductibilitatea metodei a fost verificată prin linearitatea curbei de regresie și valoarea coeficientului de determinare r^2 (0,999439), calculate cu ajutorul programului software Analyst al spectrofotometrului. Toți reagenții au fost de calitate analitică, iar solvenții au fost de calitate HPLC.

4.2.2 DETERMINAREA ACȚIUNII ANTIOXIDANTE

Metoda de determinare a acțiunii antioxidante a extractelor de plante are la bază captarea radicalului 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Pentru aceasta, s-au obținut extracte etanolice (50%) în concentrație de 1% din produsele vegetale uscate prin refluxare pe baie de apă, timp de 30 minute, filtrare și completare la semn în balon cotate.

B. CAPACITATEA ANTIMICROBIANĂ

În cadrul acestui studiu s-au analizat un număr de **6 extracte**: tinctură de *Taraxacum officinale* (păpădie); tinctură de *Chelidonium majus* (rostopască); tinctură de *Silybum marianum* (armurariu); extract alcoolic din plantă matură cu semințe *Artemisia annua* (peliniță); extract alcoolic din plantă în timpul înfloririi *Artemisia annua* (peliniță); extract alcoolic din plantă înainte de înflorire *Artemisia annua* (peliniță).

Au fost testate microorganisme de referință, două tulpini bacteriene Gram-negative: *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, două tulpini Gram-pozitive: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 și o tulpină de fungi: *Candida albicans* ATCC 10231.

Medii de cultură și reactivi

➤ Mediu PCA (Plate Count Agar)

Digest enzimatic de cazeină.....	5,0g
Extract de drojdie.....	2,5g
Dextroză (Glucoză).....	1,0g
Agar.....	15,0g

pH 7,0±0,2 la 25°C

➤ Mediu Tryptic Soy Broth (TSB); Bulion de soia triptic

Peptonă de cazeină.....	17,0g
Peptonă de soia.....	3,0g
Clorură de sodiu.....	5,0g
Fosfat dipotasic.....	2,5g
Dextroză (Glucoză).....	2,5g

pH 7,3±0,2 la 25°C

➤ Apă fiziologică sterilă (AFS)

NaCl.....	8,5g
Apă distilată.....	1000mL

➤ Cristal violet 1%

Cristal violet.....	1g
Apă distilată.....	100 mL

➤ Acid acetic 33%

Acid acetic.....	33 mL
Apă distilată.....	100 mL

4.2.3 EVALUAREA CALITATIVĂ A ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE

Evaluarea calitativă a extractelor vegetale s-a realizat prin metoda în picătură, pe mediu solid cu agar. **Principiul metodei:** Pe suprafața unui mediu PCA, inoculat cu o suspensie microbiană standardizată obținută din tulpina de testat prin tehnica însămânțării în pânză, s-a depus în picătură, la distanțe egale, un volum de 5μl din fiecare extract vegetal. Sensibilitatea la un anumit extract vegetal poate fi observată prin inhibiția creșterii microbiene în jurul picăturii depuse. **Interpretarea rezultatelor:** activitatea antimicrobiană a extractelor s-a determinat prin evaluarea formării unui halou de inhibiție în jurul picăturii de extract depuse, și măsurarea diametrului acesteia cu ajutorul unei rigle.

4.2.4 EVALUAREA CANTITATIVĂ A ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE

Evaluarea cantitativă a activității antimicrobiene a extractelor vegetale s-a realizat prin metoda microdiluțiilor în mediu lichid. **Principiul metodei:** În microplăci ELISA cu 96 de godeuri în care este repartizat mediu de cultură lichid, sunt inoculate suspensii microbiene diluate 1/100, cu densitatea inițială de 0,5 McFarland, ale tulpinilor testate într-un gradient de concentrații ale extractelor vegetale. Valorile concentrației minime inhibitorii (CMI) și a concentrației minime bactericide (CMB) sunt determinate prin însămânțarea în picătură pe mediu agar a primelor 8 godeuri corespunzând concentrațiilor 50%- 0,39% ale fiecărui extract vegetal. **Interpretarea rezultatelor:** activitatea antimicrobiană a extractelor s-a determinat prin evaluarea dezvoltării culturilor microbiene pe mediu agar. Valoare CMI reprezintă concentrația la care extractul vegetal inhibă creșterea și multiplicarea microorganismelor, având efect bacteriostatic, iar valoarea CMB reprezintă concentrația la care extractul vegetal are acțiune letală asupra microorganismelor, având efect bactericid.

4.2.5 EVALUAREA *IN VITRO* A ACTIVITĂȚII ANTIBIOFILM

Evaluarea activității antibiofilm a extractelor vegetale a fost testată prin metoda microtitrării cu cristal violet 1%. **Principiul metodei:** În urma incubării de microplăci sterile ELISA cu 96 de godeuri cu mediu de cultură lichid în care sunt inoculate suspensii microbiene într-un gradient de concentrații ale extractelor vegetale testate, activitatea antibiofilm *in vitro* a diferitelor concentrații de tincturi și extracte alcoolice este analizată pe baza valorilor absorbției colorantului cristal violet 1%, la 492 nm. **Interpretarea rezultatelor:** activitatea antibiofilm a extractelor vegetale a putut fi evaluată prin determinarea valorii absorbanței în urma citirii spectrofotometrice la 492 nm. Concentrația extractelor vegetale necesară inhibării dezvoltării de biofilme corespunde ultimului godeu la nivelul căruia valoarea absorbanței este mai mică decât jumătatea valorii absorbantei controlului pozitiv corespunzând aceluiași extract vegetal.

4.3. REZULTATE SI DISCUTII

A. EVALUAREA CAPACITĂȚII ANTIOXIDANTE

4.3.1 EVALUAREA CONȚINUTULUI TOTAL DE POLIFENOLI

Cantitatea de polifenoli găsită în extractele studiate este prezentată în tabelul de mai jos:

Tabel I Cantitatea de polifenoli a extractelor

Denumire plantă	Polifenoli totali (mg GAE/g PV uscat)
<i>Chelidonium majus</i>	13,41
<i>Artemisia annua</i>	16,82
<i>Taraxacum officinale</i>	31,56
<i>Silybium marianum</i>	15,70
<i>Salix alba</i>	33,37

Dintre cele cinci specii analizate, *Salix alba* (33,37 mg GAE/g) prezintă cea mai mare concentrație de polifenoli, urmată îndeaproape de *Taraxacum officinale* (31,56 mg GAE/g). Aceste niveluri ridicate sugerează că aceste plante ar putea avea proprietăți antioxidante și antiinflamatorii puternice, ceea ce le face valoroase în fitoterapie, în special pentru tratarea afecțiunilor inflamatorii.

Pe de altă parte, *Chelidonium majus* (13,41 mg GAE/g) are cel mai scăzut conținut de polifenoli, ceea ce poate indica un potențial antioxidant mai scăzut în comparație cu celelalte specii. Aceste rezultate nu implică în mod evident o eficacitate terapeutică mai scăzută, deoarece alți compuși bioactivi, cum ar fi alcaloizii, ar putea contribui la proprietățile sale farmacologice.

Artemisia annua (16,82 mg GAE/g) și *Silybium marianum* (15,70 mg GAE/g) se încadrează într-un interval intermediar, sugerând un conținut moderat de polifenoli.

Rezultatele indică o variabilitate semnificativă a conținutului de polifenoli între plantele studiate, care poate influența proprietățile lor medicinale. În timp ce concentrația de polifenoli este un factor important în determinarea potențialului antioxidant al acestor plante, valoarea lor terapeutică este influențată de asemenea și de alți compuși bioactivi.

4.3.2 EVALUAREA ACȚIUNII ANTIOXIDANTE

Evaluarea capacității de captură a radicalilor liberi în rândul plantelor medicinale selectate relevă o variație semnificativă, sugerând diferențe în potențialul lor antioxidant.

Cea mai mare capacitate de absorbție a radicalilor liberi a fost observată la *Artemisia annua* (65,44%), urmată îndeaproape de *Taraxacum officinale* (59,34%).

Tabel II Acțiunea antioxidantă a extractelor

Denumire plantă	Capacitate de captare a radicalilor liberi
<i>Chelidonium Majus</i>	27,13 %
<i>Artemisia Annua</i>	65,44 %
<i>Taraxacum Officinale</i>	59,34 %
<i>Silybium Marianum</i>	21,30 %
<i>Salix Alba</i>	40,54 %

Aceste rezultate indică faptul că aceste specii posedă un potențial antioxidant puternic, datorită conținutului lor bogat de polifenoli, flavonoide și alți compuși bioactivi care contribuie la activitatea lor de anihilare a radicalilor. Pe de altă parte, *Silybium marianum* (21,30%) a prezentat cea mai scăzută capacitate antioxidantă dintre plantele testate, urmată de *Chelidonium majus* (27,13%).

În ciuda capacității lor antioxidante mai scăzute în acest test, aceste plante sunt cunoscute pentru alte proprietăți farmacologice. De exemplu, *Silybium marianum* este bine cunoscută pentru efectele sale hepatoprotectoare, atribuite în principal silimarinei, un complex de flavonolignani cu proprietăți antioxidante și antiinflamatorii.

Salix alba (40,54%) a demonstrat o capacitate antioxidantă moderată, care ar putea fi asociată cu prezența sa bine documentată de glicozide fenolice, flavonoide și taninuri. Rezultatele indică o variabilitate semnificativă a activității de absorbție a radicalilor liberi în rândul speciilor de plante analizate.

În timp ce conținutul de polifenoli pare să joace un rol în potențialul antioxidant, alți factori precum **structura chimică a polifenolilor, prezența altor compuși bioactivi și interacțiunile acestora** pot influența rezultatele observate. Investigații suplimentare, inclusiv identificarea compușilor specifici și studii *in vivo*, ar putea oferi o perspectivă mai profundă asupra mecanismelor antioxidante ale acestor plante medicinale.

Extraktele plantelor cercetate prezintă o acțiune antioxidantă importantă, datorită conținutului mare în polifenoli, ceea ce le imprimă un mare potențial de utilizare și valorificare în terapeutică.

B. EVALUAREA CAPACITĂȚII ANTIMICROBIENE

4.3.4 REZULTATELE EVALUARII CALITATIVE A ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE

În acest studiu s-a urmărit investigarea proprietăților antimicrobiene ale unor extracte vegetale de *Taraxacum officinale* (tinctură), *Chelidonium majus* (tinctură), *Silybum marianum* (tinctură) și *Artemisia annua* (extracte alcoolice).

În studiul prezent, evaluarea calitativă a activității antimicrobiene a extractului vegetal de *T. officinale* a determinat o inhibiție a creșterii microbiene față de tulpinile *E. faecalis* ATCC 29212, *P. aeruginosa* ATCC 27853 și *C. albicans* ATCC 10231, prezentând valori ale haloului de inhibiție de 9 mm, 8 mm cu o slabă creștere microbiană în interiorul zonei de inhibiție microbiană și respectiv 8 mm cu prezența unui număr mare de colonii în interiorul haloului de inhibiție. A fost înregistrată o rezistență la acțiunea extractului vegetal în cazul tulpinilor de *S. aureus* ATCC 25923 și *E. coli* ATCC 25922, prezența tincturii de *T. officinale* neinhibând creșterea microbiană a acestora.

Chelidonium majus este o plantă medicinală aparținând familiei *Papaveraceae* ce este întâlnită în flora spontană a Europei, Asiei, Americii de Nord, precum și în anumite regiuni din Africa. La nivelul compoziției extractelor obținute din această plantă se regăsesc alcaloizi cuaternari (cheleritrină, sanguinarină), alcaloizi terțiari (chelidonină), proptopină, coptizină, berberină, acizi precum acidul malic, citric și hidrobenzoic, compuși polifenolici, dar și derivați ai acidului hidroxicinamic [218,219].

Creșterea microbiană a tulpinii fungice a fost inhibată în prezența extractului vegetal din *C. majus*, determinând o valoare a zonei de inhibiție de 7 mm. Același diametru al zonei de inhibiție a creșterii a fost înregistrat și în cazul tulpinii de *E. coli* ATCC 25922, iar o valoare de 11 mm a fost observată la tulpina Gram pozitivă *E. faecalis* ATCC 29212 (Tabel VI). Acest extract nu a manifestat activitate antimicrobiană față de tulpinile *S. aureus* ATCC 25923 și *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Silybum marianum este o plantă anuală sau bianuală din familia *Asteraceae* ce, în prezent, reprezintă una dintre cele mai cultivate plante medicinale din Europa. Silibina prezintă proprietăți antioxidante puternice, modulând numeroase de căi de semnalizare celulară ce determină reducerea mediatorilor proinflamatori, iar în studiile recente a fost descoperită capacitatea acestui flavonolignan de a inhiba serin proteazele implicate în coagularea sângelui [220-222].

Studiul determinării calitative a activității antimicrobiene a tincturii din *S. marianum* asupra tulpinilor de referință relevă faptul că atât asupra tulpinilor Gram-negative, *E. coli* ATCC 25922 și *P. aeruginosa* ATCC 27853, cât și a tulpinii fungice, *C. albicans* ATCC 10231, extractul vegetal nu a manifestat activitate antimicrobiană (Tabel VI). Inhibarea creșterii microbiene a putut fi însă observată în cazul tulpinilor Gram-pozitive *S. aureus* ATCC 25923 și *E. faecalis* ATCC 29212, fiind înregistrate valori ale zonei de inhibiție a creșterii de 9 mm și respectiv 8 mm.

Artemisia annua este o plantă anuală originară de pe continentul asiatic ce este în prezent întâlnită și în Europa, Australia și Statele Unite ale Americii. Proprietățile antimicrobiene, antiinflamatorii și antiparazitare sunt determinate de prezența, în concentrații variate la nivelul fiecărui exemplar datorită modul de cultivare și de localizare a acestora, a metaboliților secundari:

compuși flavonoizi, monoterpenoide, sesquiterpenoide, cumarine și compuși alifatici și lipidici [223-225].

Evaluarea calitativă a activității antimicrobiene a extractelor vegetale din *A. annua* s-a realizat utilizând extracte alcoolice realizate din plante în 3 stadii diferite de dezvoltare: înainte de înflorire, în timpul înfloririi și în stadiu matur, cu semințe.

O valoare constantă de 10 mm a diametrului haloului de inhibiție a creșterii microbiene a fost observată în cazul tuturor extractelor atât la tulpina *E. faecalis* ATCC 29212, cât și *P. aeruginosa* ATCC 27853. Similar, cele 3 extracte alcoolice au inhibat creșterea tulpinii *C. albicans* ATCC 10231, determinând o valoare a zonelor de inhibiție a creșterii de 11 mm (Tabel VI).

Extractele alcoolice din plantă înainte de înflorire, în timpul înfloririi și cu semințe au manifestat activitate antimicrobiană față de tulpina Gram-negativă *E. coli* ATCC 25922, prezentând valori ale zonei de inhibiție de 11 mm, 10 mm și respectiv 9 mm (Figura 6). Activitatea antibacteriană a extractelor nu a fost observată în cazul tulpinii *S. aureus* ATCC 25923.

Analiza rezultatelor obținute în urma testării activității antimicrobiene au arătat faptul că creșterea tulpinii de *S. aureus* ATCC 25923 nu este inhibată de majoritatea extractelor vegetale, o inhibiție a creșterii putând fii înregistrată doar în prezența tincturii din *S. marianum*, în timp ce tulpina de *E. faecalis* ATCC 29212 a fost inhibată de toate extractele vegetale.

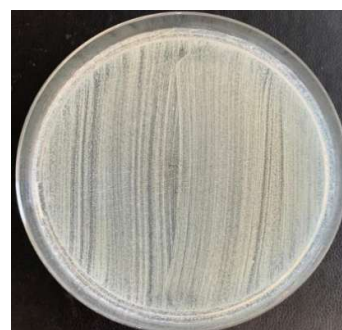
Tinctura de *S. marianum* nu a prezentat activitate antimicrobiană asupra tulpinilor Gram negative și fungice, însă a determinat inhibiția creșterii tulpinilor Gram pozitive. Extractele alcoolice din *A. annua* utilizate în cadrul acestui studiu au prezentat cea mai mare activitate antimicrobiană, determinând un efect inhibitor asupra tuturor tulpinilor microbiene, cu excepția tulpinii de *S. aureus* ATCC 25923 (Figura 7).



1a verso



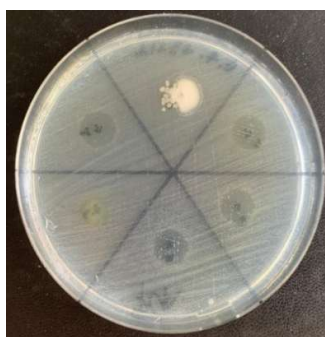
1b fața



1c



2a verso



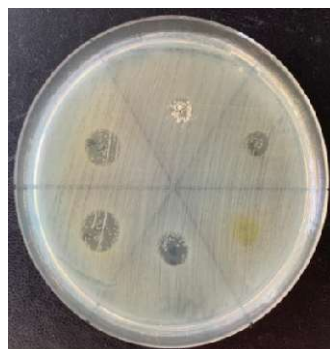
2b fața



2c



3a verso



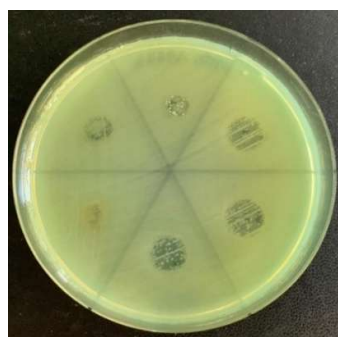
3b fața



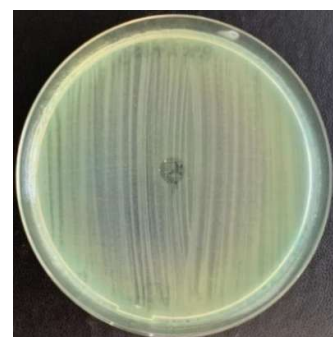
3c



4a verso



4b fața



4c



5a verso



5b fața



5c

Figură 1 Rezultate ale evaluării calitative a activității antimicrobiene a produselor vegetale pentru tulpini de *S. aureus* (poziția 1a,1b,1c), *E. faecalis* (poziția 2a,2b,2c), *E.coli* (poziția 3a,3b,3c), *P. aeruginosa* (poziția 4a,4b,4c) și *C. albicans* (poziția 5a,5b,5c) după incubare, 18-24h la 37°C.

Tabel III Determinarea calitativă a activității antimicrobiene a produselor vegetale

Tulpina Testată	Diametrul zonei de inhibiție a creșterii (mm)					
	<i>T. officinale</i> (tinctură)	<i>C. majus</i> (tinctură)	<i>S.marianum</i> (tinctură)	<i>A.annua</i> (extract alcoolic)		
				semințe	înflorire	înainte de înflorire
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0	0	9*	0	0	0
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	9*	11	8	10*	10*	10*
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0	7*	0	9*	11*	10*
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	8*	0	0	10*	10*	10*
<i>C.albicans</i> ATCC 10231	8*	7*	0	11	11*	11*

Legendă: * slabă/ușoară creștere microbiană în interiorul zonei de inhibiție.

* prezența unui număr mare de colonii în interiorul zonei de inhibiție.

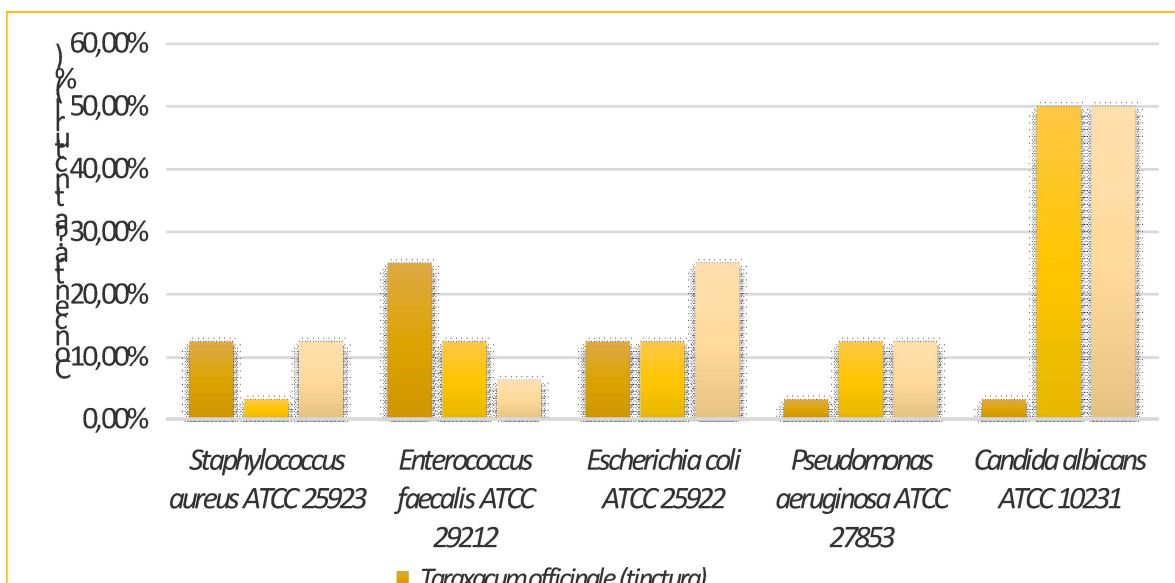
4.3.5 REZULTATELE DETERMINĂRII CANTITATIVE A ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE

Metoda de determinare cantitativă a activității antimicrobiene a permis evidențierea concentrațiilor extractelor vegetale la care are loc inhibarea creșterii și dezvoltării tulpinilor de referință testate, cât și concentrațiile ce determină acțiunea bactericidă.

Extractul vegetal de *T. officinale* prezintă un efect puternic inhibitor asupra tulpinii Gram-negative *P. aeruginosa* ATCC 27853 și fungice, efectul bacteriostatic fiind atins la concentrația de 3,13%, în timp ce asupra tulpinilor Gram-pozitive și tulpinii de *E. coli* ATCC 25922 concentrația extractului vegetal necesară inhibării creșterii microbiene este de 12,5-25%.

Asupra tulpinilor Gram-negative și tulpinii *E. faecalis* ATCC 29212, concentrația de 12,5% a extractului din *C. majus* are efect bacteriostatic, fiind înregistrat astfel un efect inhibitor mediu, însă a fost observat un slab și un puternic efect inhibitor al acestui extract asupra tulpinilor *C. albicans* ATCC 10231 și *S. aureus* ATCC 25923, înregistrându-se valori CMI de 50% și respectiv 3,13% (figura 10).

În cazul tincturii de *S. marianum*, concentrațiile minime ce au indus inhibarea creșterii și dezvoltării bacteriene pentru tulpinile *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 și *C. albicans* ATCC 10231 au atins valorile de 12,5%, 6,25%, 25%, 12,5% și respectiv 50% (Figura 8).

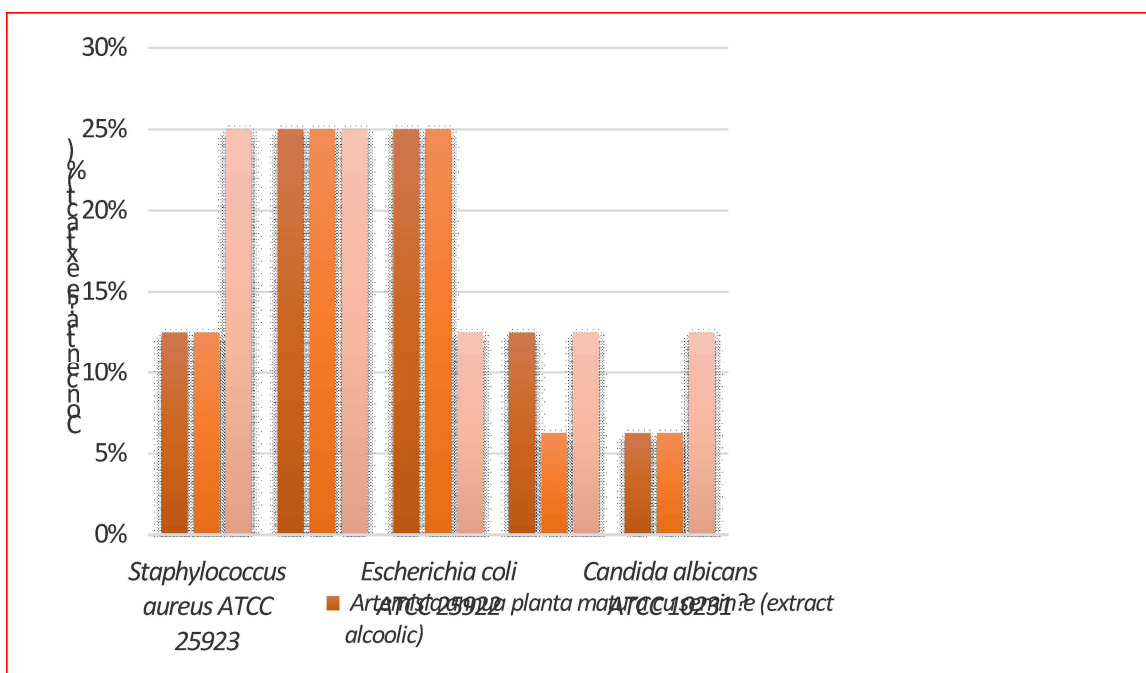


Figură 2 Reprezentarea grafică a valorilor concentrației minime inhibitori ale tincturilor de *T. officinale*, *C. majus* și *S. marianum*, exprimate în procente

În prezența extractul alcoolic din *A. annua* înainte de înflorire, inhibarea creșterii și dezvoltării tulpinilor Gram-pozitive a fost înregistrată la o concentrație de 25%, iar pentru tulpinile Gram-negative și tulpina fungică a fost observată la concentrația de 12,5%.

Activitatea puternic antimicrobiană a extractelor alcoolice din *A. annua* matură cu semințe și în timpul înfloririi a fost înregistrată în prezența tuturor tulpinilor de referință testate, efectul bacteriostatic pentru tulpinile *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922 și *C. albicans* ATCC 10231 fiind atins la valori C.M.I. de 12,5%, 25%, 25% și respectiv 6,25%.

Activitatea microbiană a tulpinii *P. aeruginosa* ATCC 27853 este inhibată în prezența extractelor alcoolice din *A. annua* matură cu semințe și în timpul înfloririi la concentrații de 12,5% și 6,25% (Figura 9).

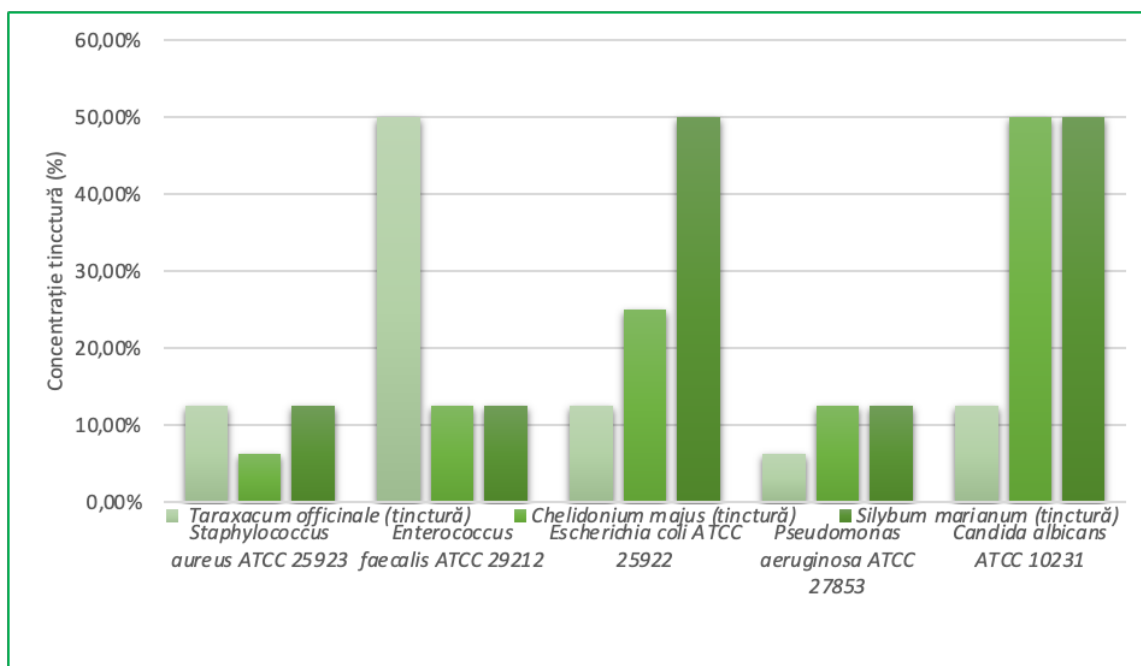


Figură 3 Reprezentarea grafică a valorilor concentrației minime inhibitorii a extractelor alcoolice de *A. annua*, exprimate în procente.

Tincturile testate în cadrul studiului au prezentat acțiune letală asupra tulpinilor microbiene de referință la o concentrație medie de 20,8%. Pentru extractul vegetal de *T. officinale* a fost necesară o concentrație de 12,5% pentru obținerea efectului bactericid asupra tulpinilor *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 și *C. albicans* ATCC 10231, iar pentru tulpinile *E. faecalis* ATCC 29212 și *P. aeruginosa* ATCC 27853 au fost necesare concentrații de 50% și respectiv, 6,25% (figura 10). În prezența tincturii de *C. majus*, cea mai mică valoarea CMB înregistrată a fost de 6,25%, pentru tulpina de *S. aureus* ATCC 25923.

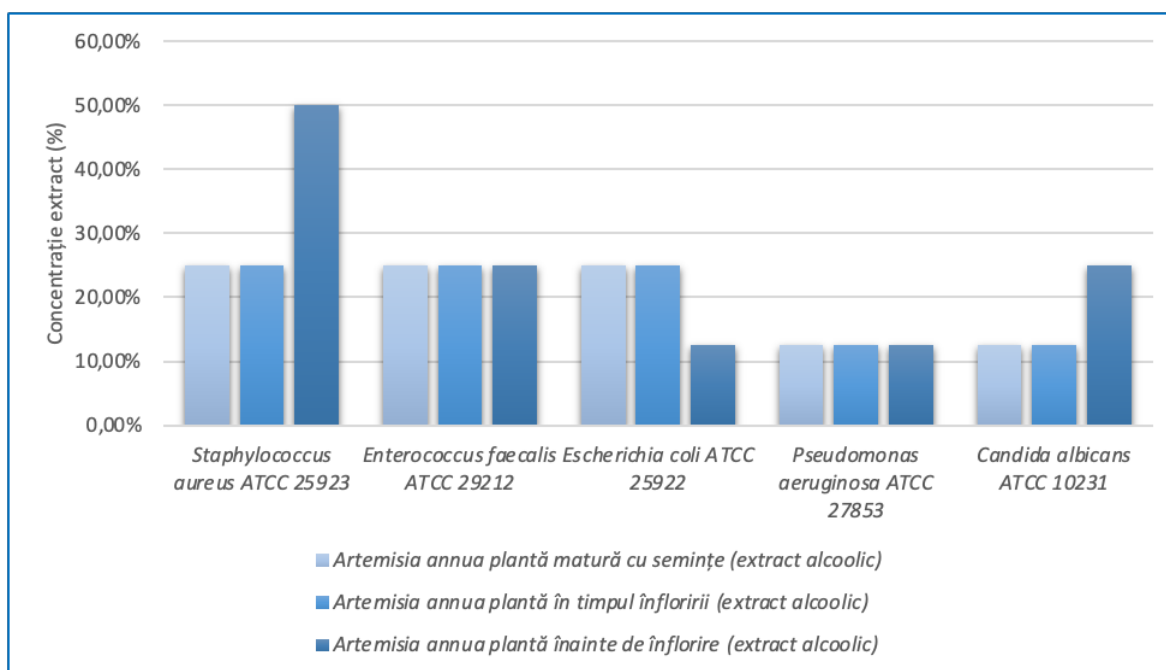
Acțiunea bactericidă asupra tulpinilor *E. faecalis* ATCC 29212 și *P. aeruginosa* ATCC 27853 a fost observată la o concentrație de 12,5% a extractului vegetal, în timp ce pentru tulpina Gram-pozitivă *E. coli* ATCC 25922 și cea fungică au fost necesare concentrații de 25% și respectiv, 50%.

Testarea acțiunii bactericide a tincturii de *S. marianum* relevă faptul că este necesară o concentrație de 12,5% pentru obținerea acestui efect asupra tulpinilor Gram-negative și *P. aeruginosa* ATCC 27853, în timp ce pentru tulpinile *E. coli* ATCC 25922 și *C. albicans* ATCC 10231 acest efect este obținut al o concentrație mult mai mare, de 50% (Figura 10).



Figură 4 Reprezentarea grafică a valorilor concentrației minime bactericide a tincturilor de *T. officinale*, *C. majus* și *S. marianum*, exprimate în procente

Prin analiza rezultatelor obținute, a fost observată o aceeași eficiență din punctul de vedere al concentrației la care se produce efectul bactericid pentru extractele alcoolice din plantă matură cu semințe și plantă în timpul înfloririi de *A. annua* (Figura 11).



Figură 5 Reprezentarea grafică a valorilor concentrației minime bactericide a extractelor alcoolice de *A. annua*, exprimate în procente.

Acestea au prezentat acțiune letală asupra tulpinilor Gram-pozitive și a tulpinii *E. coli* ATCC 25922 la o concentrație de 25% , iar pentru tulpina fungică și *P. aeruginosa* ATCC 27853 efectul bactericid a fost observat la o concentrație de 12,5%. În condițiile testate, extractul alcoolic din plantă înainte de înflorire *A. annua* își exercită efectul bactericid asupra tulpinilor *E. faecalis* ATCC 29212 și *C. albicans* ATCC 10231 la o concentrație de 25%, pentru tulpinile Gram-negative la o concentrație de 12,5%, iar pentru tulpina de *S. aureus* ATCC 25923 a fost observată o concentrație de 50% (Figura 12).



Staphylococcus aureus ATCC
25923



Enterococcus faecalis ATCC
29212



Escherichia coli ATCC
25922



Pseudomonas aeruginosa ATCC
27853



Candida albicans ATCC
10231

Figura 6 Rezultate ale determinării cantitative a activității antimicrobiene a produselor vegetale prin metoda microdiluțiilor. Microplăci cu 96 de godeuri însămânțate cu tulpini de *S. aureus*, *E. faecalis*, *E.coli*, *P. aeruginosa* și *C. albicans* dezvoltate în prezența extractelor vegetale, după incubare 18-24h la 37°C.

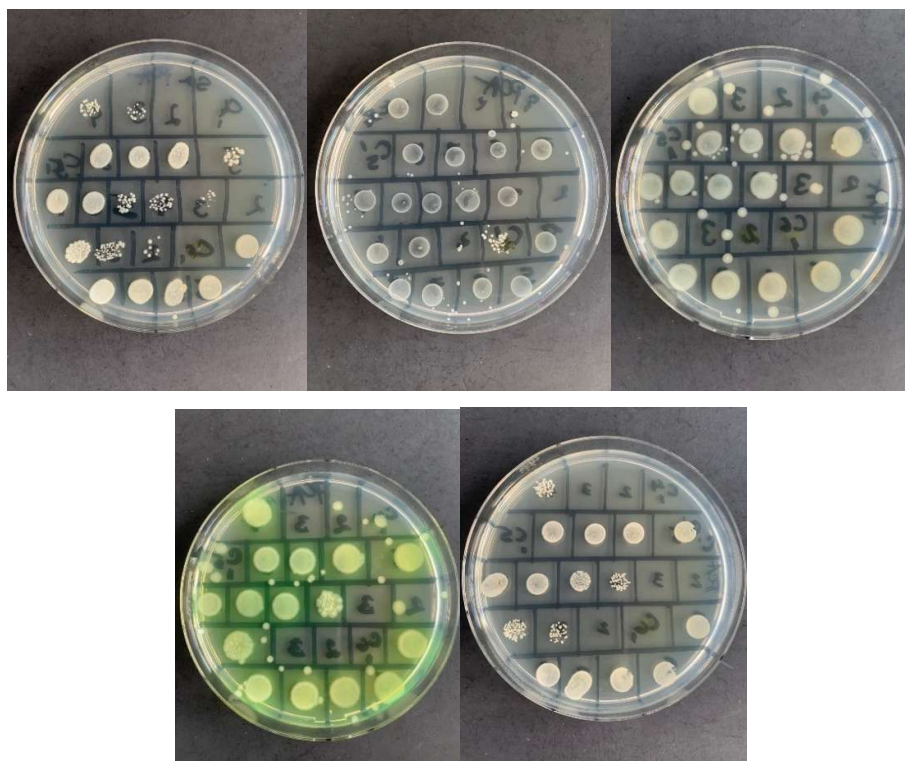


Figura 7 Rezultate ale testării activității antimicrobiene. Mediu agarizat, însămânțat în picătură din microplăci cu 96 de godeuri cu tulpini de *S. aureus*, *E. faecalis*, *E.coli*, *P. aeruginosa* și *C. albicans*, după incubare timp de 18-24h la 37°C.

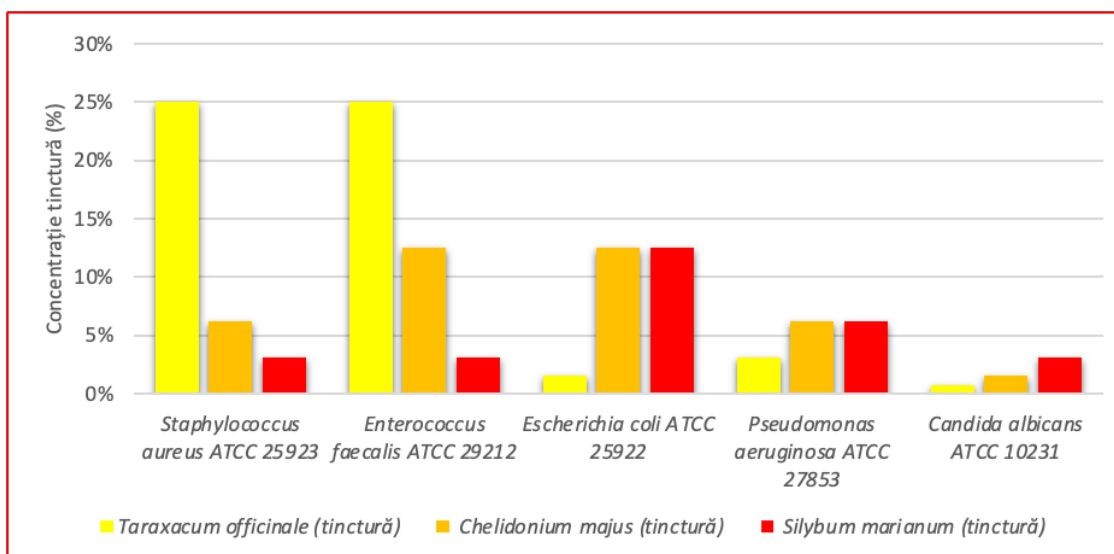


Figura 8 Reprezentarea grafică a valorilor concentrației minime inhibitorii a tincturilor de *T. officinale*, *C. majus* și *S. marianum* pentru inhibarea dezvoltării biofilmelor, exprimate în procente.

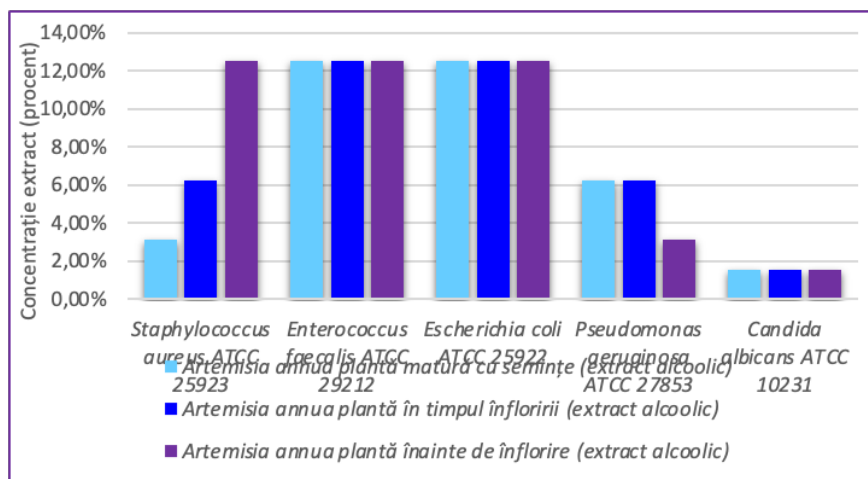
4.3.6 REZULTATELE EVALUĂRII *IN VITRO* A ACTIVITĂȚII ANTIBIOFILM

Analiza datelor spectrofotometrice a relevat faptul că tinctura de *T. officinale* prezintă un efect redus asupra tulpinile Gram-pozitive, inhibând dezvoltarea biofilmului la o concentrație de 25%. Efectul acestei tincturi a fost mai crescut asupra tulpinilor Gram-negative și celei de fungi, fiind observată o inhibiție a dezvoltării biofilmului la concentrații de 0,78%, 1,56% și 3,13% pentru *C. albicans* ATCC 10231, *E. coli* ATCC 25922 și respectiv *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Figura 16).

Activitatea antibiofilm a extractului vegetal din *S. marianum* a fost atinsă la o concentrație minimă de 3,13% pentru tulpinile bacteriene Gram-pozitive și cea fungică, iar pentru tulpinile Gram-negative *E. coli* ATCC 25922 și *P. aeruginosa* ATCC 27853 au fost înregistrate concentrații minime de 12,5% și 6,25%.

Concentrația minimă a tincturii de *C. majus* necesară pentru inhibarea dezvoltării biofilmului tulpinii de *C. albicans* ATCC 10231 este de 1,56%, în timp ce pentru *E. faecalis* ATCC 29212 și *E. coli* ATCC 25922 activitatea antibiofilm a fost atinsă la o concentrație de 12,5%, iar pentru *S. aureus* ATCC 25923 și *P. aeruginosa* ATCC 27853 la 6,25% (Figura 15).

În prezența tuturor extractelor alcoolice din *A. annua* utilizate în acest studiu, inhibarea dezvoltării biofilmelor bacteriene pentru tulpinile *E. faecalis* ATCC 29212 și *E. coli* ATCC 25922 s-a realizat la o concentrație minimă de 12,5%, iar pentru tulpina fungică a fost observată o eficacitate mai mare a acestor trei extracte, acțiunea antibiofilm fiind înregistrată la o concentrație minimă de 1,56% (Figura 15).



Figură 9 Reprezentarea grafică a valorilor concentrației minime de inhibiție a biofilmului ale extractelor alcoolice de *A. annua*, exprimate în procente.

Extractul alcoolic din *A. annua* matură cu semințe a prezentat o inhibiție a dezvoltării biofilmelor la o concentrație de 3,13% pentru tulpina de *S. aureus* ATCC 25923 și de 6,25% pentru *P. aeruginosa* ATCC 27853. Dezvoltarea biofilmului bacterian în prezența extractului alcoolic din

A. annua în timpul înfloririi a tulpinilor de *S. aureus* ATCC 25923 și *P. aeruginosa* ATCC 27853 a fost inhibată la o concentrație minimă de 6,25% , iar în prezența extractul alcoolic din *A. annua* înainte de înflorire au fost înregistrate valori de 12,5% și respectiv 3,13% (Figura 16).

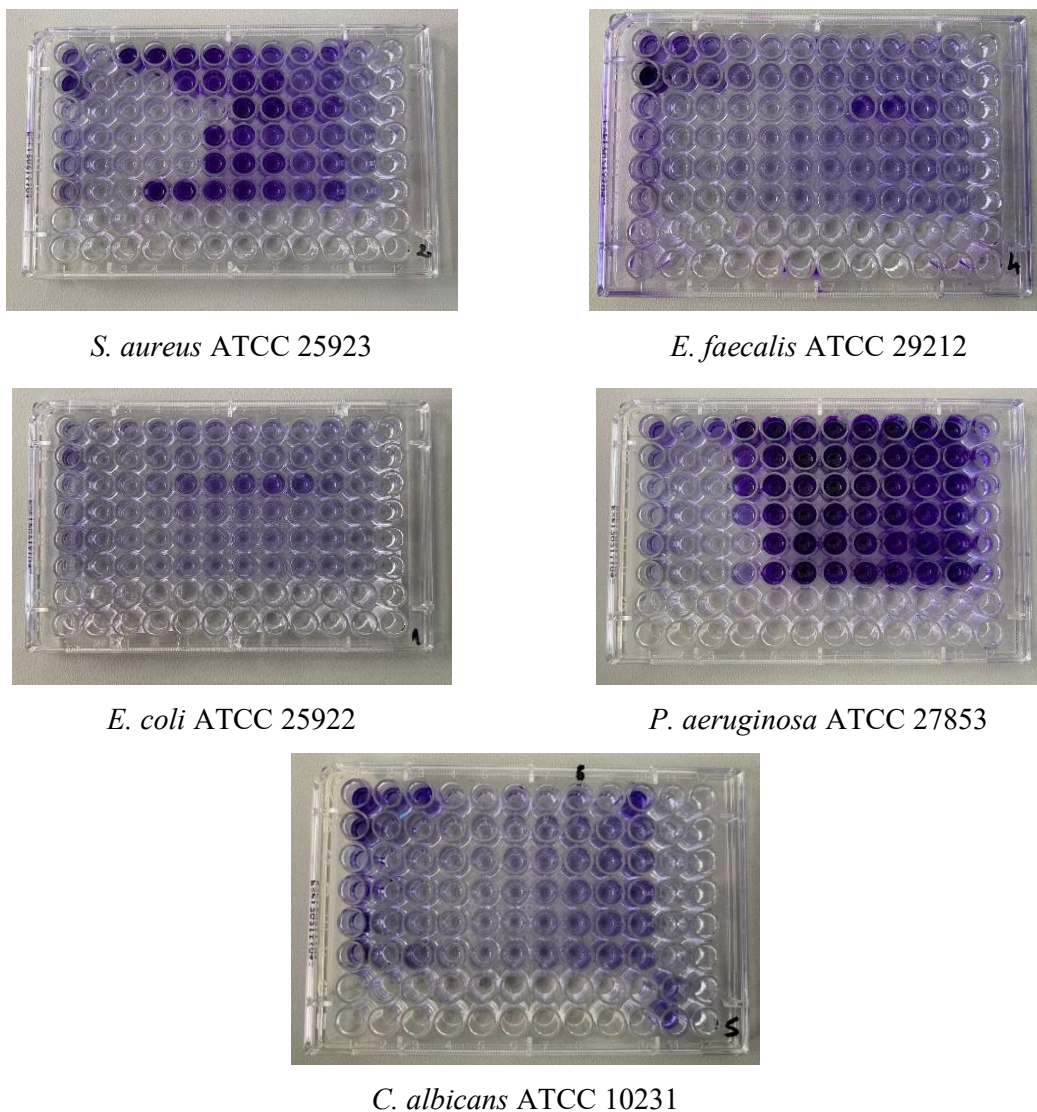


Figura 10 Rezultate ale determinării activității antibiofilm a extractelor vegetale testate- aspectul plăcilor cu 96 de godeuri după solubilizarea cu acid acetic 33%.

4.4 Concluzii

Cea mai mare capacitate de absorbție a radicalilor liberi a fost observată la *Artemisia annua* (65,44%), urmată îndeaproape de *Taraxacum officinale* (59,34%). Pe de altă parte, *Silybium marianum* (21,30%) a prezentat cea mai scăzută capacitate antioxidantă dintre plantele testate, urmată de *Chelidonium majus* (27,13%). În ciuda capacității lor antioxidante mai scăzute în acest test, aceste plante sunt cunoscute pentru alte proprietăți farmacologice.

Salix alba (40,54%) a demonstrat o capacitate antioxidantă moderată, care ar putea fi asociată cu prezența sa bine documentată de glicozide fenolice, flavonoide și taninuri. Rezultatele

indică o variabilitate semnificativă a activității de absorbție a radicalilor liberi în rândul speciilor de plante analizate.

În plus, în cadrul acestei lucrări au fost studiate proprietățile antimicrobiene a 6 extracte vegetale de *Taraxacum officinale* (tinctură), *Chelidonium majus* (tinctură), *Silybum marianum* (tinctură) și *Artemisia annua* (extract alcoolic din plantă matură cu semințe; extract alcoolic din plantă în timpul înfloririi; extract alcoolic din plantă înainte de înflorire) asupra a 5 tulpini bacteriene de referință, două Gram-pozitive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), două Gram-negative (*Escherichia coli* ATCC 25922 și *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) și o tulpină fungică, *Candida albicans* ATCC 10231.

Testarea calitativă a activității antimicrobiene a pus în evidență că extractele vegetale au inhibat creșterea și dezvoltarea tulpinilor microbiene testate, tinctura de *S. marianum* având un efect antimicrobian mai mare față de tulpinile Gram-pozitive testate, în timp ce extractele alcoolice din *A. annua* prezintă o acțiune antimicrobiană cu spectru larg, fiind activă față de toate tulpinile microbiene de referință testate, cu excepția *S. aureus* ATCC 25923.

Determinările cantitative ale activității antimicrobiene a permis stabilirea concentrațiilor de extracte vegetale responsabile de efectului bacteriostatic și bactericid, putând fi observată o sensibilitate mai ridicată a tulpinilor microbiene în prezența tincturilor comparativ cu prezența extractelor alcoolice de *A. annua*.

Evaluarea *in vitro* a activității antibiofilm a produselor vegetale a pus în evidență capacitatea acestora de a inhiba dezvoltarea de biofilme la substrat inert; extractele vegetale de *C. majus*, *S. marianum* și *A. annua* au fost determinat inhibarea formării de biofilme în cazul tuturor tulpinilor bacteriene testate, în timp ce tinctura de *T. officinale* a prezentat o activitate foarte bună asupra tulpinilor Gram-negative și a celei de fungi.

Rezultatele obținute sunt promițătoare, susținând cercetarea mai îndeaproape a caracteristicilor biochimice a acestor extracte, în scopul formulării unor strategii pentru controlul infecțiilor bacteriene și fungice la om.

Rezultatele acestui capitol au fost publicate în articolele:

1. **Daniel Cord**, Mirela Claudia Rimbu, Liliana Popescu, *New prospects in oncotherapy: bioactive compounds from Taraxacum officinale*, Medicine and Pharmacy Reports, <https://doi.org/10.15386/mpr-2875>

5. SISTEME AVANSATE DE ADMINISTRARE A MEDICAMENTELOR ANTIMICROBIENE SI ANTITUMORALE: NANO PARTICULE DE AUR SI ARGINT REALIZATA PRIN SINTEZA VERDE CU COMPUSI BIOACTIVI DIN EXTRACTE VEGETALE

5.1 INTRODUCERE

În contextul actual marcat de creșterea alarmantă a infecțiilor cu bacterii multirezistente, plantele medicinale reprezintă o sursă promițătoare de compuși bioactivi cu potențial antimicrobial, antiinflamator și antioxidant. Utilizarea extractelor vegetale pentru sinteza de nanoparticule prin metode verzi a atras un interes semnificativ în ultimele decenii.

Plantele studiate – *Taraxacum officinale* (pădărie), *Artemisia annua* (peliniță), *Melisa officinalis* (roiniță) și *Salix alba* (salcie) – sunt recunoscute pentru multiplele lor aplicații terapeutice în medicina tradițională și modernă. Compușii activi extrași din acestea prezintă proprietăți antioxidante, antibacteriene, antifungice și chiar antitumorale.

Scopul general al acestui studiu a fost sinteza ecologică a nanoparticulelor din extracte vegetale (*Melissa officinalis*, *Artemisia annua*, *Salix alba*) și evaluarea potențialului lor terapeutic, farmaceutic și antimicrobial prin metode avansate de caracterizare fizico-chimică și biologică. Totodată, studiul a urmărit investigarea efectelor sinergice ale nanoparticulelor derivate din *Melissa officinalis* în asociere cu agenți chimioterapici convenționali utilizați în tratamentul carcinomului hepatic, în vederea dezvoltării unor sisteme eficiente de administrare a terapiei antitumorale.

5.2 MATERIALE SI METODE

5.2.2 SINTEZA GREEN DE NANOPARTICULE

5.2.2.1 SINTEZA NANOPARTICULELOR DIN OBȚINUTE DIN EXTRACTUL SALIX ALBA

Formarea Ag-NPs în timpul biosintezei a fost confirmată de schimbarea culorii soluției de la galben la maro închis după adăugarea a 18 mL de extract de *Salix alba*. O proprietate unică a Ag-NPs sferice este că lungimile de undă în rezonanța plasmatică de suprafață (SPR) pot fi modificate de la 400 nm (lumină violetă) la 530 nm (lumină verde) prin modificarea dimensiunii particulei și a indicelui de refracție în apropierea suprafeței particulei [240].

Pentru a determina dimensiunile Ag-NP, a fost utilizată spectrometria UV-Vis pentru a înregistra lungimile de undă ale acestora și a le corela cu dimensiunea nanoparticulelor obținute după sinteza lor. Absorbția UV-Vis și lungimea de undă maximă a Ag-NP sunt date de dimensiunea, forma și mediul în care sunt dispersate, de densitatea de electroni liberi și de interacțiunile lor cu alți compuși chimici din mediu [241].

5.2.2.3 SINTEZA NANOPARTICULELOR DIN ARTEMISIA ANNUA

În mod similar, nanoparticulele de aur au fost obținute folosind doar extractul apos de pelin. Nanoparticulele de aur obținute din extractul apos de pelin au fost abreviate ca AuNPsEaqSW.

5.2.2.4 SINTEZA NANOPARTICULELOR DIN MELISSA OFFICINALIS

S-a verificat sinteza vizual, prin schimbarea culorii soluției, iar probele au fost colectate pentru analiza spectroscopică UV-Vis, confirmând formarea nanoparticulelor.

5.2.5.METODE DE EVALUARE A EFECTULUI ANTIMICROBIAN

5.2.5.1 Evaluarea efectului antimicrobian a extractului de Salix alba și a nanoparticulelor obținute

Au fost alese specii reprezentative pentru principalele grupe de bacterii patogene (cele mai frecvente în patologia infecțioasă umană și veterinară, în flora spitalicească, în infecțiile nosocomiale și în infecțiile multidrog-rezistente): *Staphylococcus aureus* (*S.a*), pentru cocci gram-pozitivi; *Escherichia coli* (*E.c*), pentru bacili gram-negativi, enterobacterii; *Pseudomonas aeruginosa* (*P.a*), pentru bacili gram-negativi, non-enterobacterii.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	SAMPLES		
													Nanoparticles	Hydrogels	Ointments (Ont)
A	PS 200 μl	MHB: 100 μl PS: 50 μl S1-D1: 50 μl	MHB: 100 μl PS: 50 μl Bacteria: S1-D1: 50 μl	MHB: 100 μl Bacteria: S1-D1: 50 μl	Idem 4	Idem 4	MHB: 100 μl Bacteria: S1-D2: 50 μl	Idem 7	Idem 7	MHB: 100 μl Bacteria: S1-D3: 50 μl	Idem 10	Idem 10	SaNP ₈ -WT 1S	Hydrogels Control	Tween 20
B	PS 200 μl	MHB: 100 μl PS: 50 μl S2-D1: 50 μl	MHB: 100 μl PS: 50 μl Bacteria: S2-D1: 50 μl	MHB: 100 μl Bacteria: S2-D1: 50 μl	Idem 4	Idem 4	MHB: 100 μl Bacteria: S2-D2: 50 μl	Idem 7	Idem 7	MHB: 100 μl Bacteria: S2-D3: 50 μl	Idem 10	Idem 10	SaNP ₈ -WT 1S	AgNO ₃ +P VP+PEG	Ont 1+SaNP ₈ -WT 10S+1% tween 20
C	PS 200 μl	MHB: 100 μl PS: 50 μl S3-D1: 50 μl	MHB: 100 μl PS: 50 μl Bacteria: S3-D1: 50 μl	MHB: 100 μl Bacteria: S3-D1: 50 μl	Idem 4	Idem 4	MHB: 100 μl Bacteria: S3-D2: 50 μl	Idem 7	Idem 7	MHB: 100 μl Bacteria: S3-D3: 50 μl	Idem 10	Idem 10	Salix alba Extract	Hydrogel A	Ont 1+SaNP ₈ -WT 10S+1% tween 20 (1:1:1)
D	PS 200 μl	MHB: 100 μl PS: 50 μl S4-D1: 50 μl	MHB: 100 μl PS: 50 μl Bacteria: S4-D1: 50 μl	MHB: 100 μl Bacteria: S4-D1: 50 μl	Idem 4	Idem 4	MHB: 100 μl Bacteria: S4-D2: 50 μl	Idem 7	Idem 7	MHB: 100 μl Bacteria: S4-D3: 50 μl	Idem 10	Idem 10	Salix alba Extract	AgNO ₃ +P VP+Gly	Ont 1+SaNP ₈ -WT 10S+1% tween 80 (1:1:1)
E	PS 200 μl	MHB: 100 μl PS: 50 μl S5-D1: 50 μl	MHB: 100 μl PS: 50 μl Bacteria: S5-D1: 50 μl	MHB: 100 μl Bacteria: S5-D1: 50 μl	Idem 4	Idem 4	MHB: 100 μl Bacteria: S5-D2: 50 μl	Idem 7	Idem 7	MHB: 100 μl Bacteria: S5-D3: 50 μl	Idem 10	Idem 10	SaNP ₈ -WT 7S	Hydrogel B	Ont 2+SaNP ₈ -WT 10S+1% tween 80
F	PS 200 μl	MHB: 100 μl PS: 50 μl S6-D1: 50 μl	MHB: 100 μl PS: 50 μl Bacteria: S6-D1: 50 μl	MHB: 100 μl Bacteria: S6-D1: 50 μl	Idem 4	Idem 4	MHB: 100 μl Bacteria: S6-D2: 50 μl	Idem 7	Idem 7	MHB: 100 μl Bacteria: S6-D3: 50 μl	Idem 10	Idem 10	SaNP ₈ -WT 10S	AgNO ₃ +P EG ₂ Gly	Ont 2+SaNP ₈ -WT 10S+1% tween 20 (1:1:1)
G	PS 200 μl	MHB: 100 μl PS: 50 μl S7-D1: 50 μl	MHB: 100 μl PS: 50 μl Bacteria: S7-D1: 50 μl	MHB: 100 μl Bacteria: S7-D1: 50 μl	Idem 4	Idem 4	MHB: 100 μl Bacteria: S7-D2: 50 μl	Idem 7	Idem 7	MHB: 100 μl Bacteria: S7-D3: 50 μl	Idem 10	Idem 10	SaNP ₈ -WT 7S	Hydrogel C	Ont 2+SaNP ₈ -WT 10S+1% tween 80 (1:1:1)
H	PS 200 μl	MHB: 100 μl PS: 50 μl S8-D1: 50 μl	MHB: 100 μl PS: 50 μl Bacteria: S8-D1: 50 μl	MHB: 100 μl Bacteria: S8-D1: 50 μl	Idem 4	Idem 4	MHB: 100 μl Bacteria: S8-D2: 50 μl	Idem 7	Idem 7	MHB: 100 μl Bacteria: S8-D3: 50 μl	Idem 10	Idem 10	SaNP ₈ -WT 10S	AgNO ₃ 1N	Tween 80

5.2.5.2 Evaluarea efectului activității a extractului de Artemisia annua

Pentru activitatea antibacteriană, tulpinile bacteriene patogene oportuniste selectate, și anume *Staphylococcus aureus* un cocc Gram-pozitiv; *Escherichia coli* un bacil Gram-negativ, familia *Enterobacteriaceae*; *Pseudomonas aeruginosa* un bacil Gram-negativ, din familia *non-Enterobacteriaceae* și *Bacillus subtilis* un bacil Bacillaceae

Pentru activitatea antifungică, au fost testate mai multe specii de agenți patogeni fungici emergenți, inclusiv drojdii, precum *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* și ciuperci filamentoase precum *Penicillium sp.* și *Aspergillus sp.*, utilizând un mediu Sabouraud Agar.

Activitatea citotoxică potențială a extractelor studiate a fost evaluată pe două linii celulare canceroase umane aderente standardizate împotriva celulelor endoteliale umane normale și comparată cu citotoxicitatea medicamentelor oncologice utilizate în mod obișnuit pentru tratamentul cancerului.

5.2.6 Metode de evaluare a efectului antitumoral (antiproliferativ)

5.2.6.1 Evaluarea activității antiproliferative a extractului de Salix alba și a nanoparticulelor sintetizate

Viabilitatea celulară a fost determinată utilizând testul colorimetric MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu bromură). După tratament, celulele au fost incubate timp de 24 și 48 de ore, respectiv, cu diferite concentrații (5, 10, 25, 50 și 100 μg/mL) de nanoparticule [50]. Ulterior, mediul de cultură a fost îndepărtat, iar fiecare godeu a fost spălat cu soluție tampon

5.2.6.2 Evaluarea activității antiproliferative a extractului de Artemisia annua și a nanoparticulelor sintetizate

Activitatea citotoxică potențială a extractelor studiate din peliniță a fost evaluată pe două linii celulare canceroase umane aderente standardizate împotriva celulelor endoteliale umane normale și comparată cu citotoxicitatea medicamentelor oncologice utilizate în mod obișnuit pentru tratamentul cancerului.

5.2.6.3 Evaluarea activității antiproliferative a extractului de Melisa officinalis și al nanoparticulelor sintetizate

Potențialul citotoxic al extractelor vegetale investigate, al combinației acestora cu nanoparticule, medicamente antitumorale și medicamente anticancer utilizate ca grupuri de control (sunitinib și imatinib) a fost evaluat pe o linie celulară umană standardizată, aderentă, de cancer, și comparat cu efectele asupra celulelor endoteliale umane normale, utilizând un medicament oncolitic frecvent folosit în terapia cancerului ca etalon.

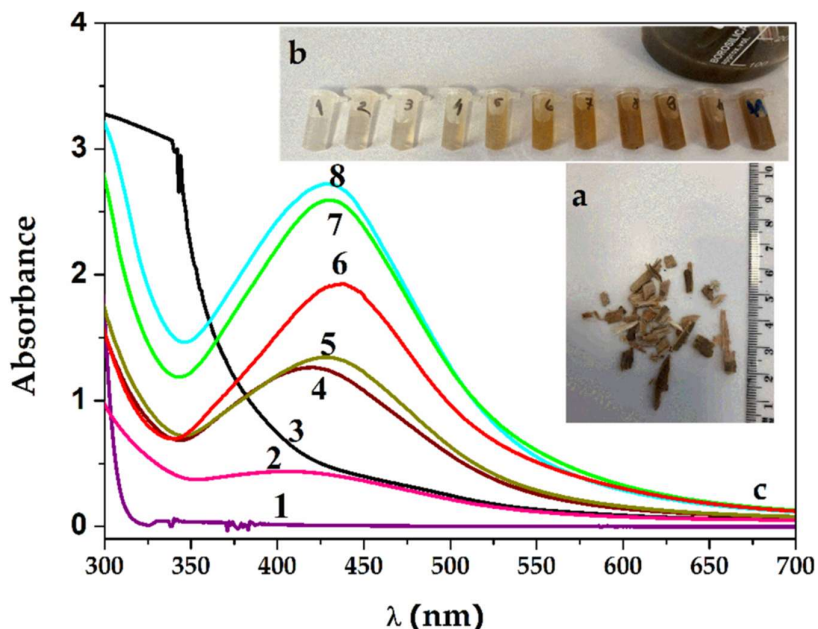
Linia celulară de adenocarcinom hepatic uman (HepG2, HB-8065) și celulele endoteliale ale venei ombilicale umane (HUVEC, CRL-1730) au fost obținute de la **American Type Culture Collection** (ATCC, Manassas, WV, SUA). Au fost utilizate capsule de Sunitinib 50 mg (Sunitinib® — Accord, Barcelona, Spania) și comprimate de Imatinib 100 mg (Imakrebin® — Alvogen, Luxemburg) ca agenți clasici anticancer pentru tratarea grupurilor de control celular. Soluțiile de lucru au fost preparate proaspăt pentru fiecare experiment prin diluții în serie ale soluțiilor stoc în mediul de cultură.

5.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

5.3.1 CARACTERIZAREA FIZICO - CHIMICĂ A NANOPARTICULELOR

5.3.1.1 CARACTERIZAREA OPTICĂ ȘI STRUCTURALĂ A NANOPARTICULELOR OBTINUTE DIN *SALIX ALBA* PRIN UV-VIS, FLUORESCENȚĂ ȘI DIFRAȚIE DE RAZE X

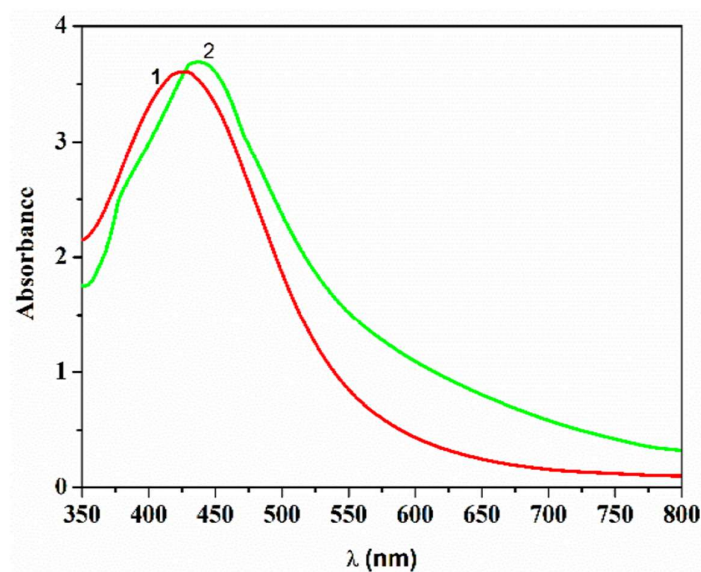
Compușii fitochimici din extractul de scoarță de *Salix alba* au fost reducători și stabilizatori ai argintului, iar adăugarea unor volume repetate de extract a dus la creșterea concentrației de nanoparticule de argint.



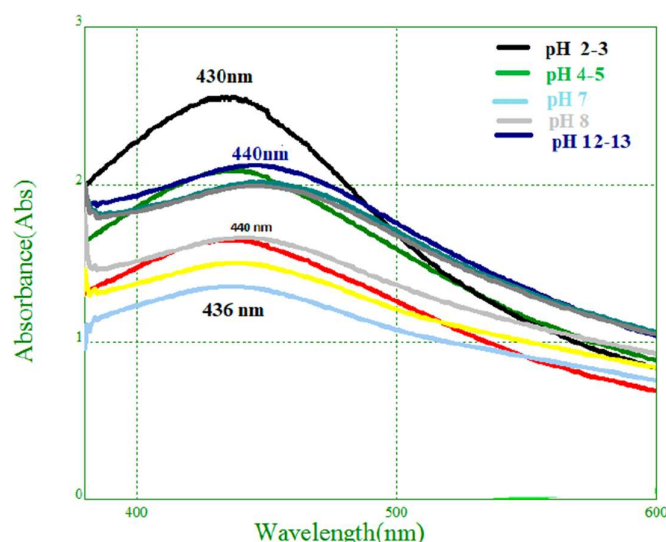
Figură 11 (a) Scoarța de *Salix alba* L. a fost colectată în județul Dâmbovița, România, de la arbori de salcie. (b) Schimbarea culorii soluției de la galben la maro închis. (c) Spectre UV-Vis ale probelor SAgNP-WT obținute prin reducere în timp cu extract apos de salcie: 1- AgNO_3 0,5 mM; 2-SAgNPs-WT 1S (după 5 min); 3-extract de salcie; 4-SAgNPs-WT 4S (după 10 min); 5-SAgNPs-WT 5S; 6-SAgNPs-WT 7S; 7-SAgNPs-WT 9S; și 8-SAgNPs-WT 10S.

Spectrele din Figura 18c reprezintă apariția unui maxim inițial de absorbție după 5 min de reacție la o lungime de undă de 409 nm (spectrele 2), manifestându-se ca o bandă care se lărgeste și, astfel, arată o polidispersie a nanoparticulelor de argint formate. Această bandă se îngustează și atinge o lungime de undă de 420 nm după 10 minute (spectrele 4).

Stabilitatea SAgNPs-WT a fost, de asemenea, evaluată spectrofotometric după un an de la sinteză. Spectrele UV-Vis prezentate în Figura 19 nu arată modificări notabile în banda maximă de absorbție după stocarea soluțiilor timp de un an la temperatura camerei.



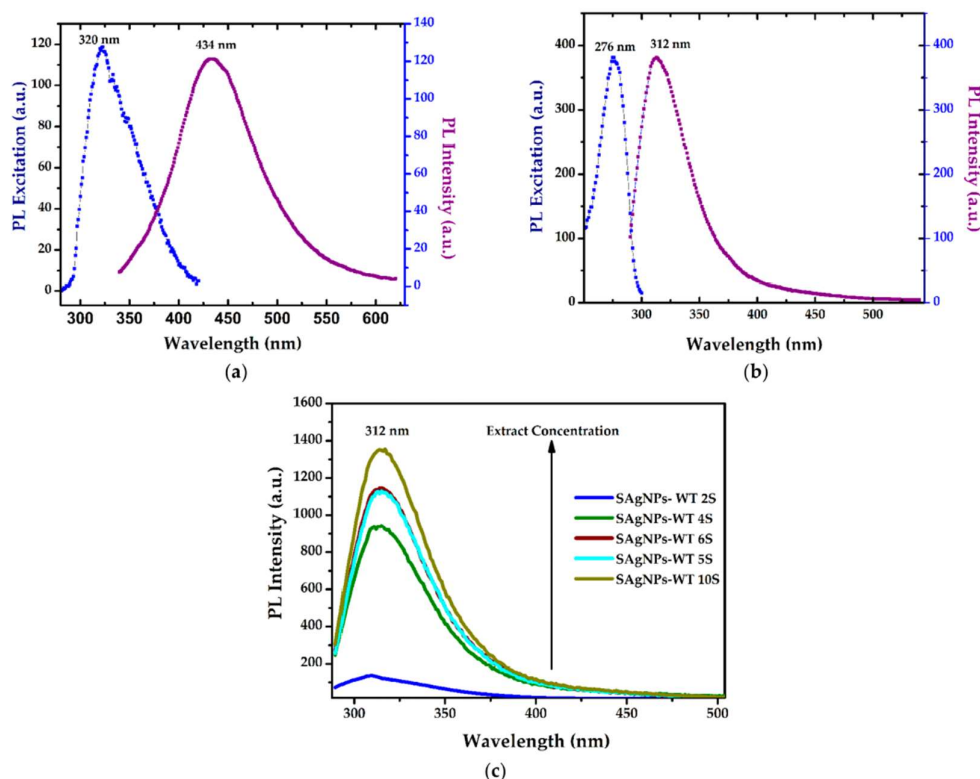
Figură 12 Spectre UV-VIS ale: Soluției coloidale inițială cu SAgNPs-WT; 2. după un an de depozitare la temperatura camerei la adăpost de lumină



Figură 13 Spectre UV-Vis care arată efectul variației pH-ului asupra stabilității SAgNPs-WT

Posibilitatea utilizării SAgNPs-WT în medii cu pH diferit a fost, de asemenea, evaluată prin caracterizare UV-Vis, Figura 31 prezentând spectrele caracteristice ale soluțiilor coloidale cu SAgNPs-WT modificate prin ajustarea pH-ului cu soluții 1 M de NaOH sau 1 M de HCl. Putem observa stabilitatea acestora într-un interval de pH cuprins între 2 și 8; benzile încep să se lărgescă odată cu creșterea valorilor pH-ului. Soluțiile au prezentat o stabilitate foarte bună în medii acide, dar, de asemenea, nu au prezentat modificări majore ale lungimii de undă inițiale atunci când au avut un pH ușor bazic.

Prezența unor cantități mici de aminoacizi a fost evidențiată de spectrul de emisie obținut la 280 nm, cu un maxim la 312 nm, și de spectrul de excitare cu un maxim la 276 nm, care sunt benzile caracteristice ale tirozinei Figura 21b.



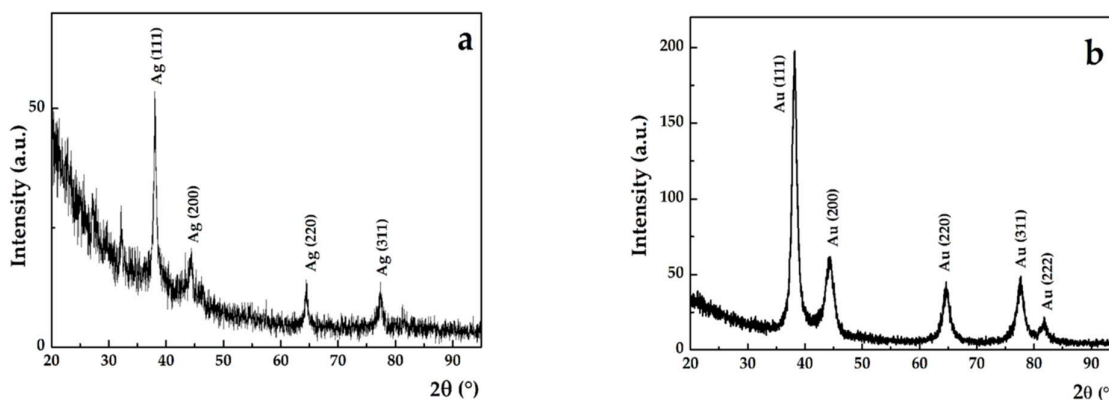
Figură 14 Spectrele de excitație (PLE) și emisie (PL) de fotoluminescență înregistrate pentru dispersia coloidală SAgNPs-WT la (a) excitație de 320 nm; (b) caracteristicile benzii de tirozină la $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 276/312$ nm; și (c) creșterea benzii de tirozină (312 nm) cu concentrația extractului în timpul biosintezei.

O ușoară deplasare spre roșu a fost identificată în comparație cu tirozina liberă a cărei fluorescență este localizată la $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 274/310$ nm. În plus, a fost analizată emisia PL a opt probe de SAgNPs-WT extrase în timpul sintezei la intervale de 3-5 minute și sunt prezentate în Figura 21c.

Intensitatea peak-ului PL de 312 nm arată că concentrația de tirozină crește semnificativ în funcție de timpul de reacție odată cu creșterea cantității de extract adăugate în timpul sintezei. Aceasta poate fi o altă confirmare a existenței compușilor polifenolici care prezintă fluorescență și a căror fluorescență crește odată cu formarea nanoparticulelor de argint.

Din punct de vedere cantitativ, scăderea lățimii peak-ului este corelată cu o creștere a dimensiunii medii a cristalitelor, conform ecuației Debye-Scherrer. O dimensiune de 5,67 nm a

fost găsită pentru Au-NPs, în timp ce Ag-NPs au prezentat dimensiuni medii ale cristalitelor mai mari (16,12 nm). Prezența peak-urilor XRD și dimensiunile medii ale cristalitelor de câțiva nm indică faptul că NP-urile sintetizate au fost nanocristaline.

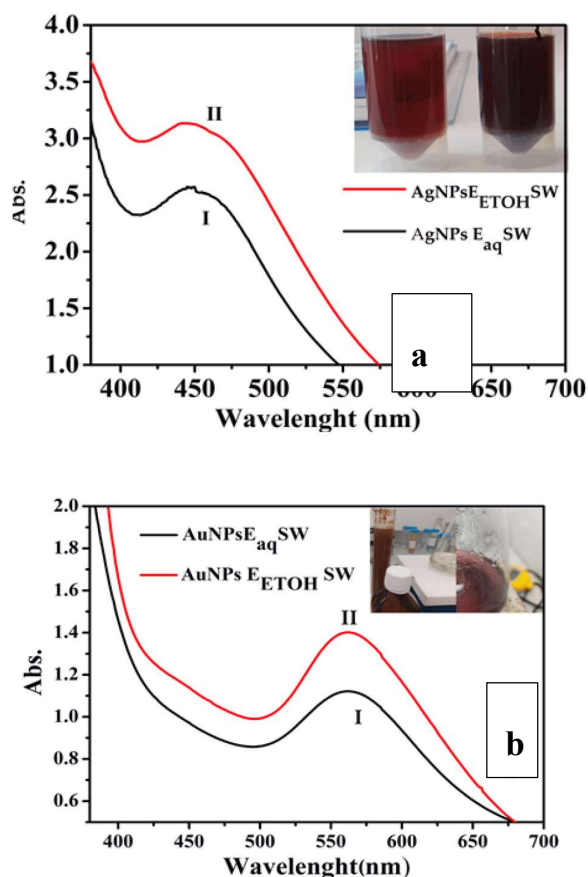


Figură 15 Model de difracție de raze X cu incidență razantă (GIXRD) pentru (a) SAgNPs-WT și (b) SAuNPs-WT. Picurile au fost indexate în conformitate cu baza de date ICDD

5.3.1.2 CARACTERIZARE UV-VIS SI DETERMINAREA CONTINUTULUI DE POLIFENOLI DIN PROBELE EXTRACTELE ȘI NANOPARTICULELE PE BAZĂ DE ARTEMISIA ANNUA

Analiza spectrofotometrică UV-VIS a monitorizat formarea de nanoparticule de argint și aur reduse de extractele *Artemisia annua*. Spectrele de absorbție ale extractelor au fost înregistrate la 200-700 nm.

Figura 23 prezintă spectrele UV-VIS obținute pentru soluțiile de nanoparticule formate prin bioreducere cu extracte apoase sau alcoolice. Figura 18(a) prezintă spectrele UV-VIS pentru nanoparticulele de argint reduse cu extractul apos de peliniță, AgNP_sEaqSW (I), și extractul alcoolic, AgNP_sE_{ETOH}SW (II). Pentru nanoparticulele de aur din *Artemisia annua*, spectrele sunt prezentate în figura 1(b), cu extractul apos indicat ca AuNP_sEaqSW (I) și extractul alcoolic ca AuNP_sE_{ETOH}SW (II).

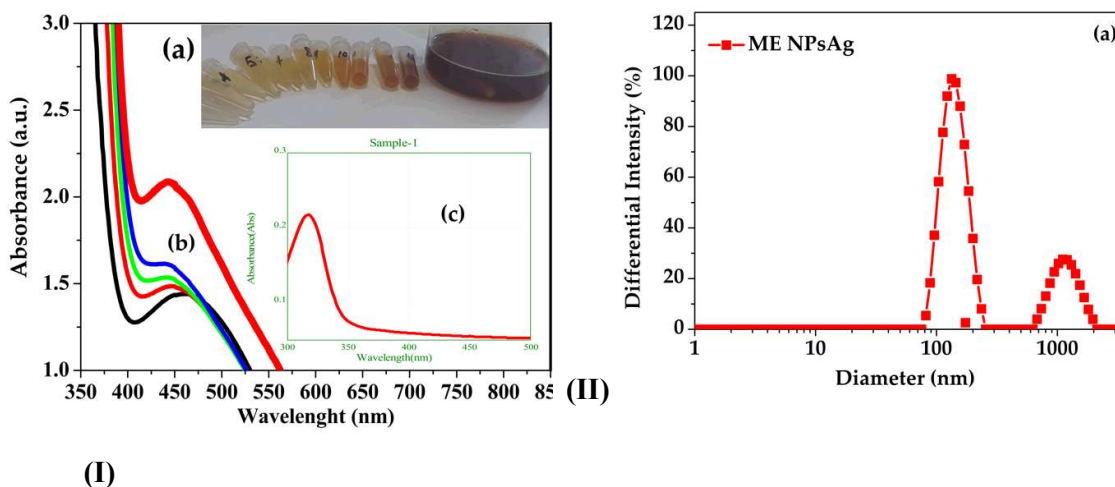


Figură 16 Spectrele UV-VIS obținute pentru soluțiile de nanoparticule formate prin bioreducere cu extracte apoase sau alcoolice

Bioreducerea aurului din peliniță a dus la formarea unei absorbante maxime la 563 nm pentru AuNPs EaqSW, corespunzătoare unei dimensiuni a nanoparticulelor de aproximativ 105,67 nm (ecuația Haiss), după cum se arată în spectrele din Figura 18 fiind spectrele UV-VIS ale AuNPs E_{ETOH}SW, care are o absorbantă maximă la 557 nm și o dimensiune calculată corespunzătoare de 111,12 nm. Inserția din Figura 23 (b) prezintă o schimbare de culoare de la maro la roșu-violet, confirmând formarea nanoparticulelor de aur.

5.3.1.3 Caracterizareaa uv-vis a extractului și nanoparticulelor pe bază de *Melissa officinalis*

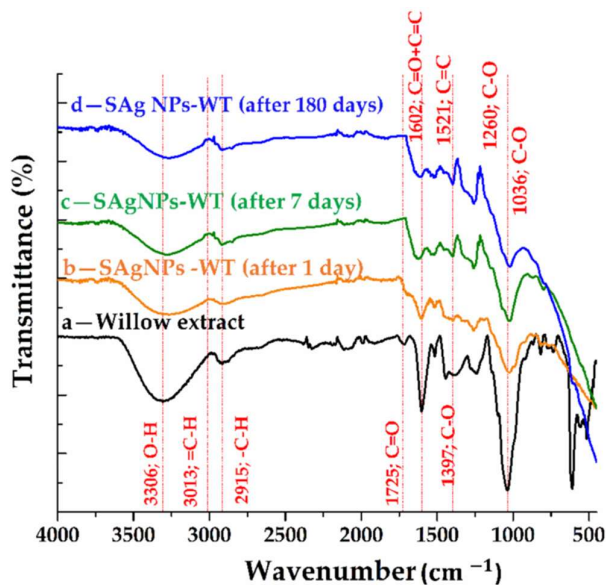
Schimbarea culorii soluției de la roșu-marونیu la maro-închis confirmă reducerea ionilor de argint de către extractul de *Melissa officinalis*. Spectrul UV-Vis (Figura 24) a indicat un maxim inițial de absorbție la 453 nm, care s-a stabilizat la 440 nm după 30 de minute, indicând formarea stabilă a nanoparticulelor. Raportul final volumetric între AgNO₃ 0.5 mM și extractul de roiniță a fost 3,2:1 (v:v).



Figură 17 Distribuția dimensiunilor măsurată prin DLS prezentată în Figura 24 a arătat două populații: Particule cu dimensiuni între 75 nm – 255 nm, cu un maxim la 143 nm.

5.3.1.4 Caracterizarea FTIR a extractului și nanoparticulelor pe bază de *Salix alba*

Spectrele ATR-FTIR înregistrate pentru extractul de salcie și probele de SAgNPs-WT înregistrate la 1 zi, 7 zile și, respectiv, 180 de zile după sinteză sunt prezentate în Figura 25.

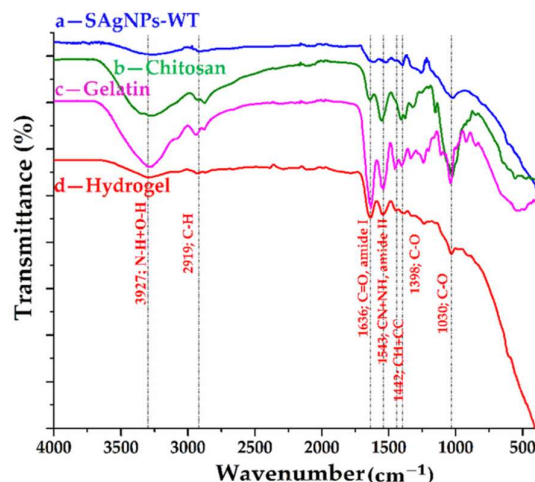


Figură 18 Spectre ATR-FTIR pentru (a) extract de salcie și nanoparticule de argint, (b) 1 zi, (c) 7 zile și (d) 180 de zile de la sinteză.

Comparând spectrele probelor de sinteză de nanoparticule de argint (Figura 25 b-d) cu spectrul extractului de salcie, s-a observat o modificare a spectrului sub 700 cm⁻¹, confirmând astfel formarea de nanoparticule de Ag la care sunt ancorate grupările de salcie.

5.3.1.5 Caracterizare FTIR a formulărilor pe bază de *Salix alba*

Principala compoziție structurală a materiilor prime (chitosan, gelatină și nanoparticule de argint) și a hidrogelurilor cu conținut de nanoparticule de argint, obținute conform protocolului biogenic prezentat anterior, poate fi dedusă din spectrele FT-IR prezentate în Figura 26.



Figură 19 Spectre ATR-FTIR pentru (a) nanoparticule de argint din salcie; (b) chitosan; (c) gelatină; și (d) hidrogel cu nanoparticule de argint.

În funcție de parametrii procesului, s-a constatat că hidrogelurile pe bază de gelatină și chitosan pot conduce la diferite tipuri de interacțiuni (electrostatice, legături de hidrogen, Van der Waals, ionice sau covalente), cu formarea unei rețele tridimensionale datorită gelatinei. În spectrul hidrogelului prezentat în Figura 9 se poate observa un amestec de benzi caracteristice nu numai grupelor amină ale chitosanului, ci și grupelor carboxil ale gelatinei.

Interacțiunea dintre nanoparticulele de argint și componentele hidrogelului este susținută de deplasarea benzilor care pot fi asociate cu legăturile C-O din grupa carboxil (până la 1398, 1197, 1156 și 1030 cm^{-1}), precum și de lipsa benzilor spectrale sub 900 [246,247].

5.3.1.6 Caracterizarea FTIR a extractului și nanoparticulelor pe bază de *Artemisia annua*

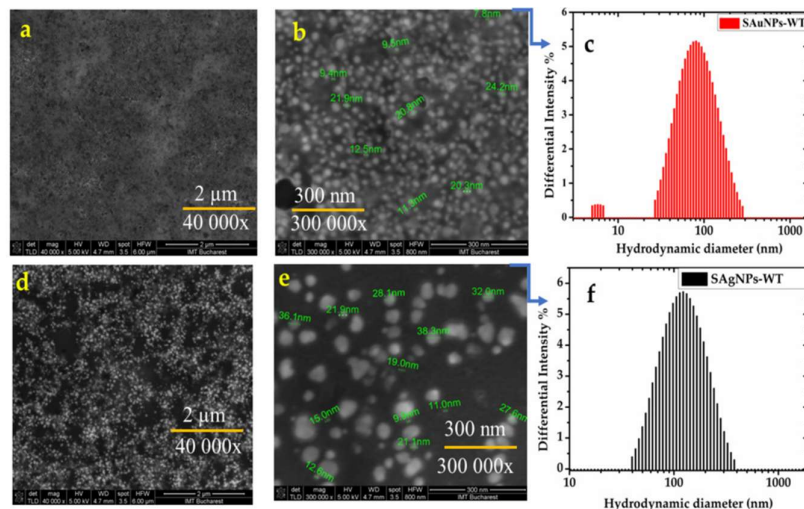
Artemisia annua are ca fitoconstituenți, cis-epoxiocimena, cis-crisantenolul, tuhona, acetatul de bornil sau de crisantenil, crisantenolul, camazulenul, sabinilul, 1,8-cineolul, cariofilenul, mirenul, sabinenul, linalolul, acetatul de crisantenil și acetatul de trans-sabinil pot fi izolate din peliniță.

5.3.1.7.1 Caracterizarea dimensională și morfologică a nanoparticulelor obținute din *Salix alba* prin DLS, PDI, potențial zeta, SEM și TEM

S-au efectuat măsurători de dispersie hidrodinamică și electroforetică a luminii (DLS/ELS) pentru a obține informații privind diametrul hidrodinamic (d_h) și potențialul zeta (ζ) pentru a

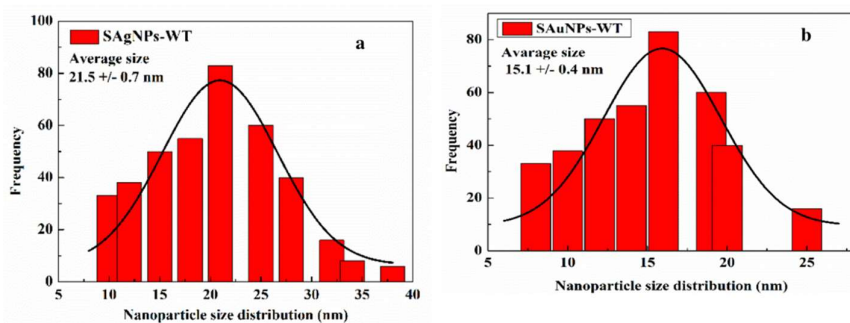
prezice stabilitatea pe termen lung a soluțiilor coloidale SAg/AuNP-WT obținute după bioreducere în extractul apos de *Salix alba*.

Imaginile SEM înregistrate pentru SAu/AgNPs-WT sunt prezentate în Figura 27 a,b pentru SAuNPs-WT și Figura 4 d,e pentru SAgNPs-WT, cu nanoparticule sferice de aur/argint cu o distribuție medie a dimensiunilor de 8-25 nm (dimensiune medie, $19,5 \pm 0,7$ nm) observate pentru SAuNPs-WT, în timp ce cele pentru AgNPs-WT au fost mai mari, de 10-38 nm (dimensiune medie, $21,5 \pm 0,7$ nm).



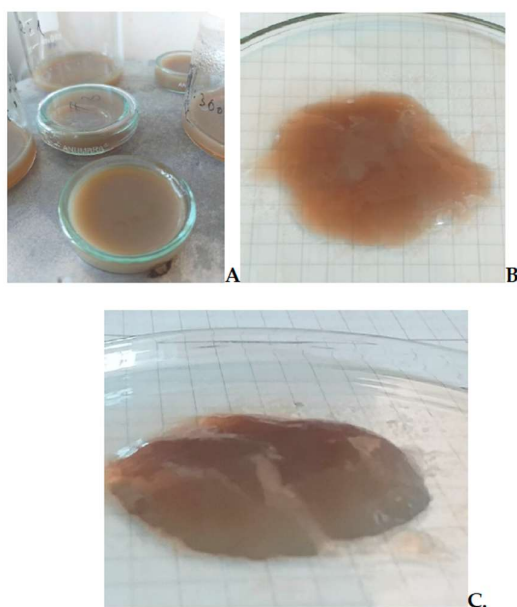
Figură 20 Imagini SEM la diferite mărimi și diametre hidrodinamice determinate prin DLS: (a)-SAuNPs-WT (40,000 $\times$); (b)-SAuNPs-WT (300,000 $\times$); (c)-DLS de SAuNPs-WT; (d)-SAgNPs-WT (40,000 $\times$); (e)-SAgNPs-WT (300,000 $\times$); și (f)-DLS de SAgNPs-WT.

Histogramele distribuțiilor dimensiunilor Sau/AgNPs-WT au fost ajustate prin funcții gaussiene și sunt prezentate în Figura 28. Valorile obținute sunt în concordanță cu datele colectate anterior pentru nanoparticulele *Salix alba* (aur/argint) extrase din frunzele și, respectiv, scoarța sa.



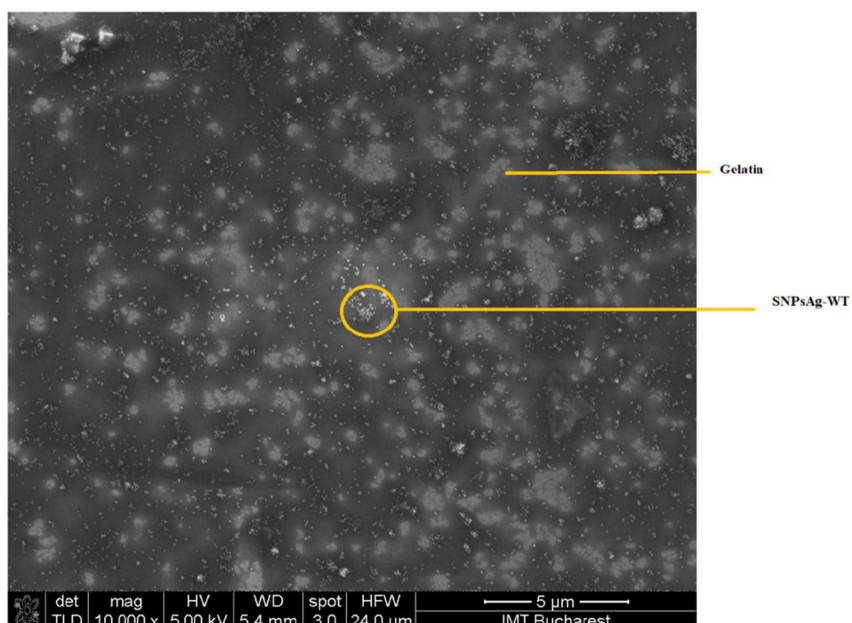
Figură 21 (a) Distribuția SAgNPs-WT cu N=389 și (b) Distribuția SAuNPs-WT cu N=375

5.3.1.7.2 Hidrogel pe bază de SAgNPs-WT



Figură 22 Hidrogeluri cu: A. raport volum chitosan-gelatină-SAgNPs-WT = 3:7 și 5 ml SAgNPs-WT; B. raport = 5:5 (v/v) ; C. raport = 1:9

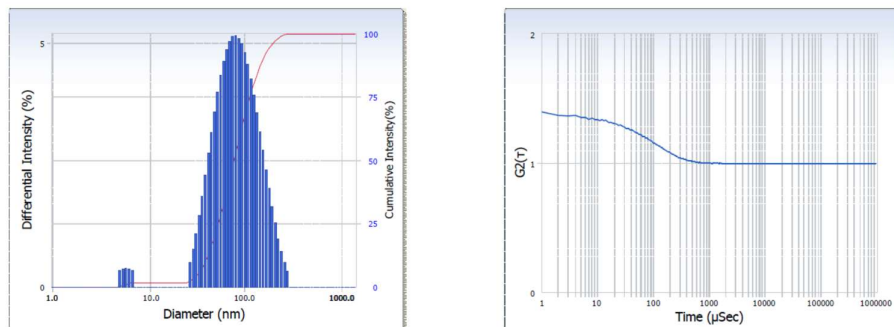
Hidrogelurile obținute au fost inodore, brun-roșcate și omogene, după cum se observă în Figura 29. Principalul avantaj al hidrogelului, bazat pe nanoparticulele green din *Salix alba* este că s-a obținut o uniformitate a SAgNPs-WT în structura sa fără adăugarea unui stabilizator suplimentar. Acest lucru poate fi confirmat într-o imagine SEM din Figura 30, în care pot fi observate nanoparticule distribuite uniform între rețelele de lanțuri polimerice.



Figură 23 Imagine SEM a hidrogelului pe bază de CS/G și SAgNPs-WT

5.3.1.7.3 Caracterizarea dimensională și morfologică a nanoparticulelor pe bază de Artemisa annua prin DLS, PDI, potențial zeta

Indicele de polidispersitate (PDI) reprezintă raportul dintre particulele de dimensiuni diferite și numărul total de particule. O valoare scăzută a IDP ($<0,1$) indică o probă mai monodispersată. Spectrele DLS și potențialul zeta corespunzător pentru toate probele sunt prezentate în Figura 31* (a1-d2) și Figura 32** (a1-d2).



Distribution Results (Contin)

Peak	Diameter (nm)	Std. Dev.

Cumulants Results

Diameter (d) : 71.1 (nm)

Polydispersity Index (P.I.) : 0.267

Figure S31*(a1) Diametrul hidrodinamic, indicele de polidispersitate pentru AgNPsEaqSW

Version 3.73 / 2.30

Measurement Condition

Sampling Time	: 400	(µs)	Correlation Method	: TD	
Correlation Channel	: 512	(ch)	Accumulation times	: 10	(times)
Scattering Angle	: 15.0	(°)	Temperature	: 25.0	(°C)
Intensity	: 66084	(cps)	Attenuator 1	: 1.12	(%)
Cell Center	: X: 6.710	(mm)	Attenuator 2	: 4.420	(%)
	: Z: 6.825	(mm)	Pinhole	: 50	(µm)
Cell Constant	: 105.530	(1/cm)			
Cell Type	: Flow Cell				
Apply Voltage Type	: NEGATIVE				

Electric Field

Avg. Electric Field	: -10.82	(V/cm)	Avg. Current	: -0.10	(mA)
---------------------	----------	--------	--------------	---------	------

Diluent Properties

Diluent Name	: WATER		Dielectric Constant	: 78.2	
Refractive Index	: 1.3328		Viscosity	: 0.8878	(cP)

Analysis Results

Zeta Potential	: -41.95	(mV)	Zeta Potential of Cell (Upper)	: -29.64	(mV)
----------------	----------	------	--------------------------------	----------	------

Figura 31*(a2)Potențialul zeta pentru AgNPsEaqSW

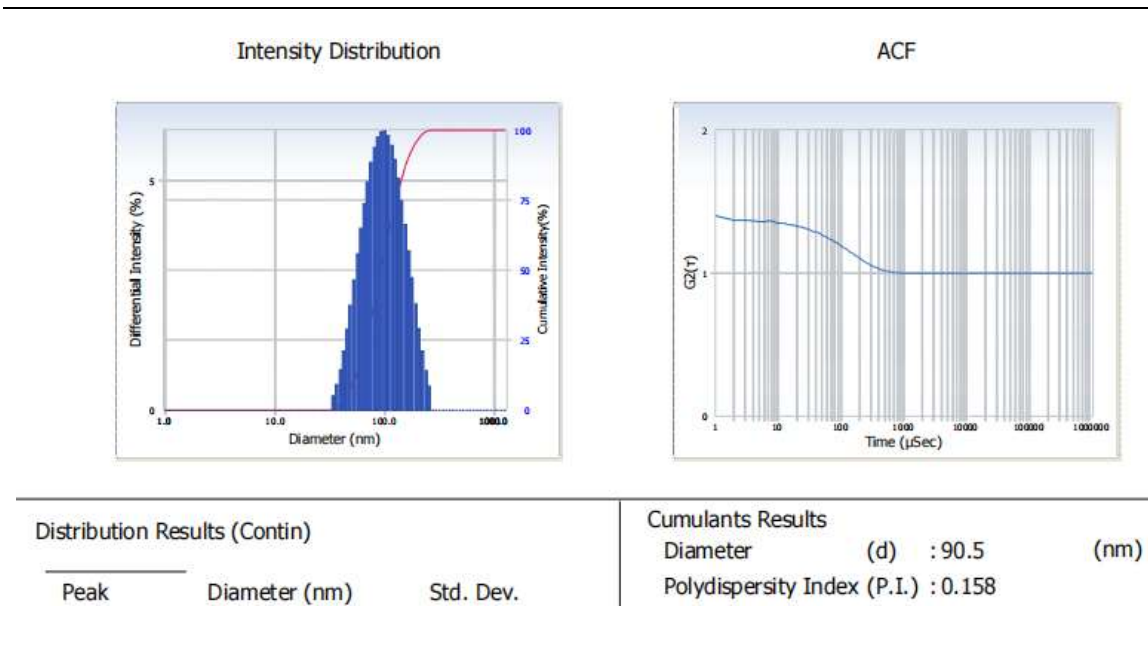


Figure S31*(b1) Diametrul hidrodinamic, indicele de polidispersitate pentru AgNPsEtoHSW

Version 3.73 / 2.30

Measurement Condition

Sampling Time	: 400	(μs)	Correlation Method	: TD	
Correlation Channel	: 512	(ch)	Accumulation times	: 10	(times)
Scattering Angle	: 15.0	(°)	Temperature	: 25.1	(°C)
Intensity	: 78454	(cps)	Attenuator 1	: 4.2	(%)
Cell Center	: X: 6.710	(mm)	Attenuator 2	: 5.510	(%)
	: Z: 6.945	(mm)	Pinhole	: 50	(μm)
Cell Constant	: 187.620	(1/cm)			
Cell Type	: Flow Cell				
Apply Voltage Type	: NEGATIVE				

Electric Field

Avg. Electric Field	: -6.06	(V/cm)	Avg. Current	: -0.32	(mA)
---------------------	---------	--------	--------------	---------	------

Diluent Properties

Diluent Name	: WATER		Dielectric Constant	: 78.2	
Refractive Index	: 1.3328		Viscosity	: 0.8858	(cP)

Analysis Results

Zeta Potential	: -57.14	(mV)	Zeta Potential of Cell (Upper)	: -64.73	(mV)
----------------	----------	------	--------------------------------	----------	------

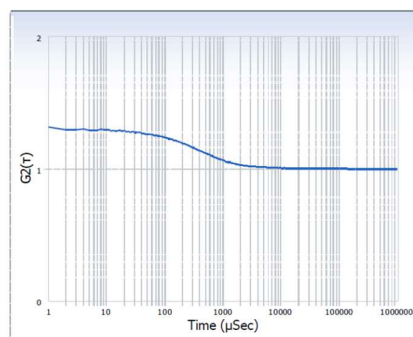
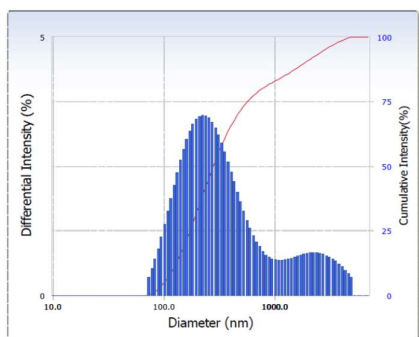
Figure 31*(b2) Potențialul zeta pentru AgNPs_{ETOH}SW

Figură 24 Diametrul hidrodinamic, indicele de polispersitate și potențialul Zeta (mV) al nanoparticulelor "green" în soluție coloidală

Version 3.73 / 2.30

Intensity Distribution

ACF



Distribution Results (Contin)

Peak	Diameter (nm)	Std. Dev.
1	436.5	100.0

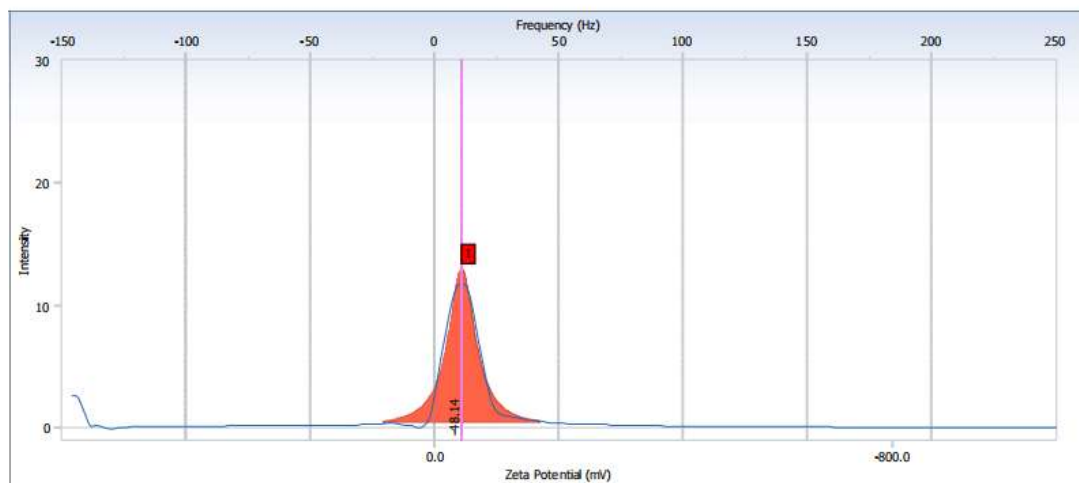
Cumulants Results

Diameter (d)	436.5	(nm)
Polydispersity Index (P.I.)	0.197	

Figură 31 (c1) Indicele de polidispersitate AuNPs_{Eaq}SW

Version 3.73 / 2.30

Mobility Distribution



Measurement Results

Zeta Potential	-48.14	(mV)	Doppler shift	11.11	(Hz)
----------------	--------	------	---------------	-------	------

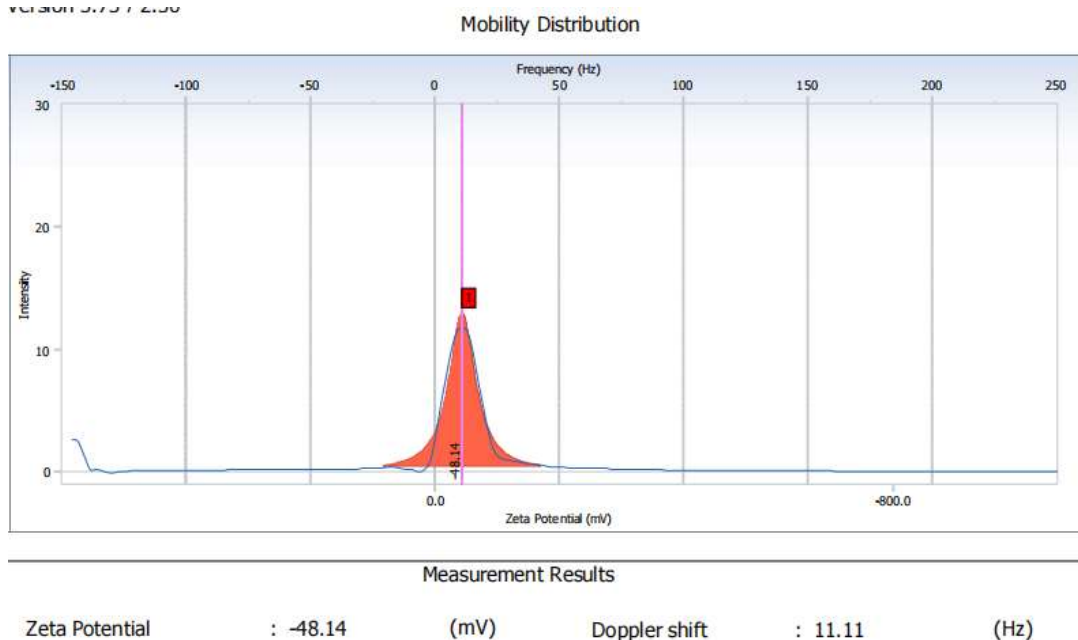
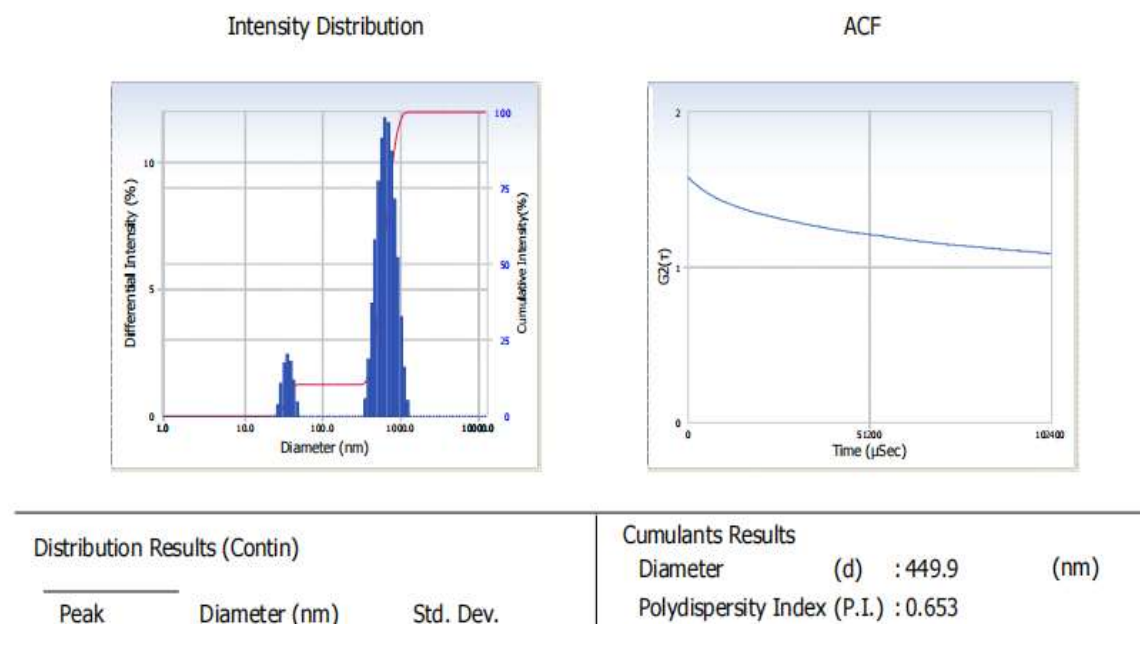


Figura 31* (c2) Potențialul zeta pentru AuNPsEaqSW



Figură 31 *(d1) Hydrodynamic diameter, polydispersity index for AuNPsEtoHSW

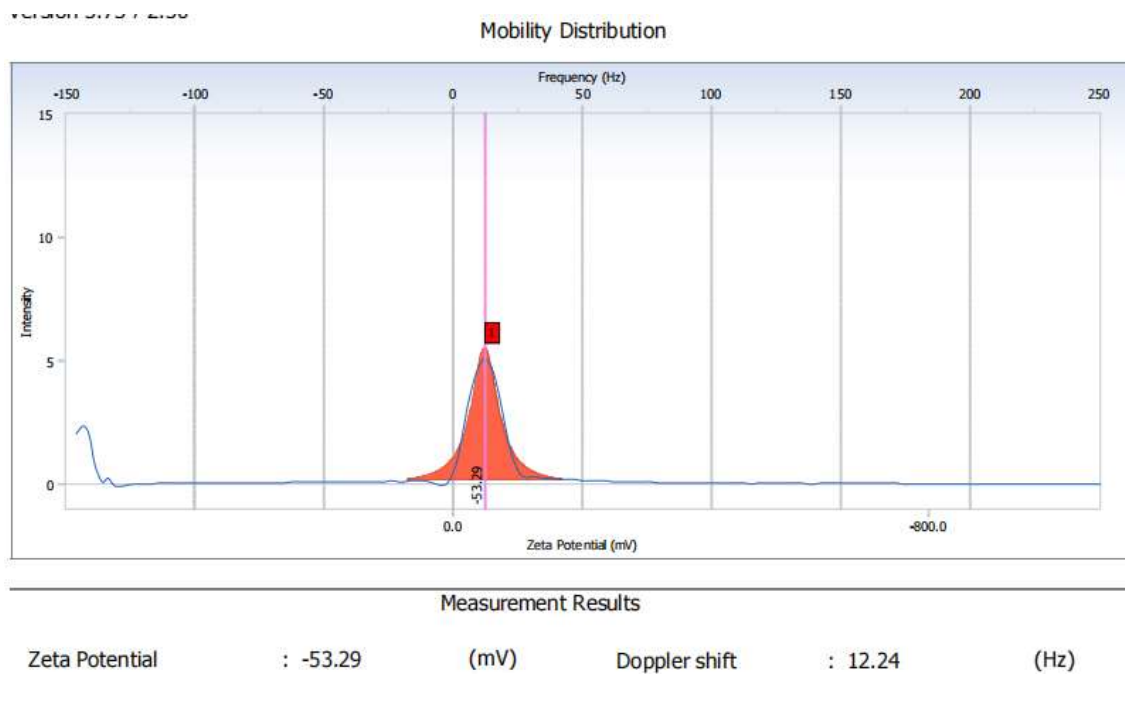
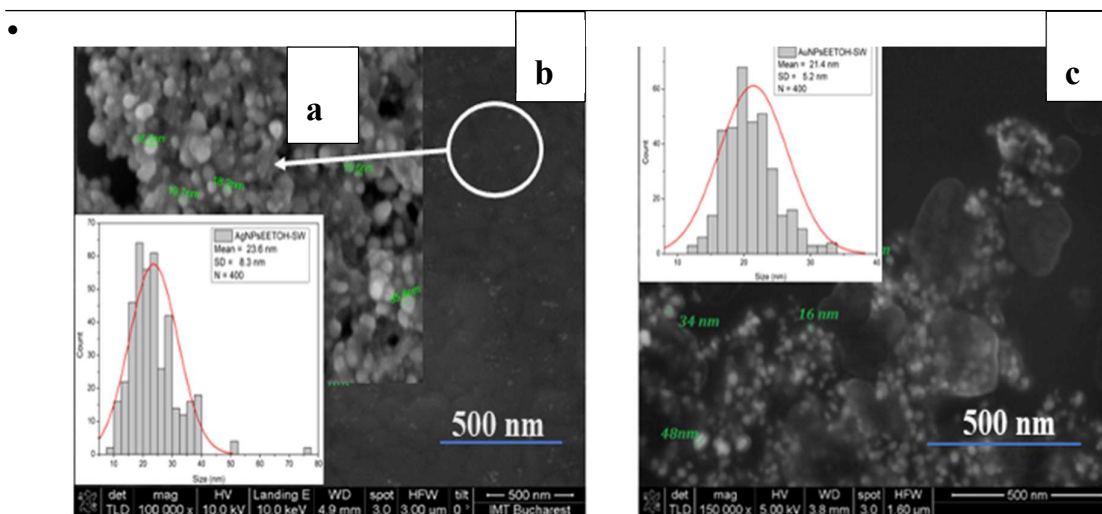
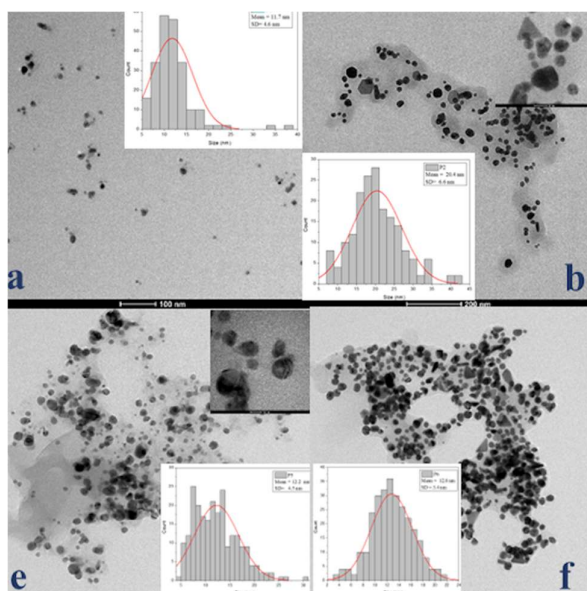


Figure 31 (d2) Zeta Potential for AuNPsE_{TOH}SW



Figură 25 Imagini SEM la diferite mărimi **a.** AgNPsE_{TOH}SW (100 000x); **b.** AgNPsE_{TOH}SW (300 000x); **c.** AuNPsE_{TOH}SW (150 000x).

Figura 33 (a-d) prezintă imagini TEM pentru toate probele analizate.

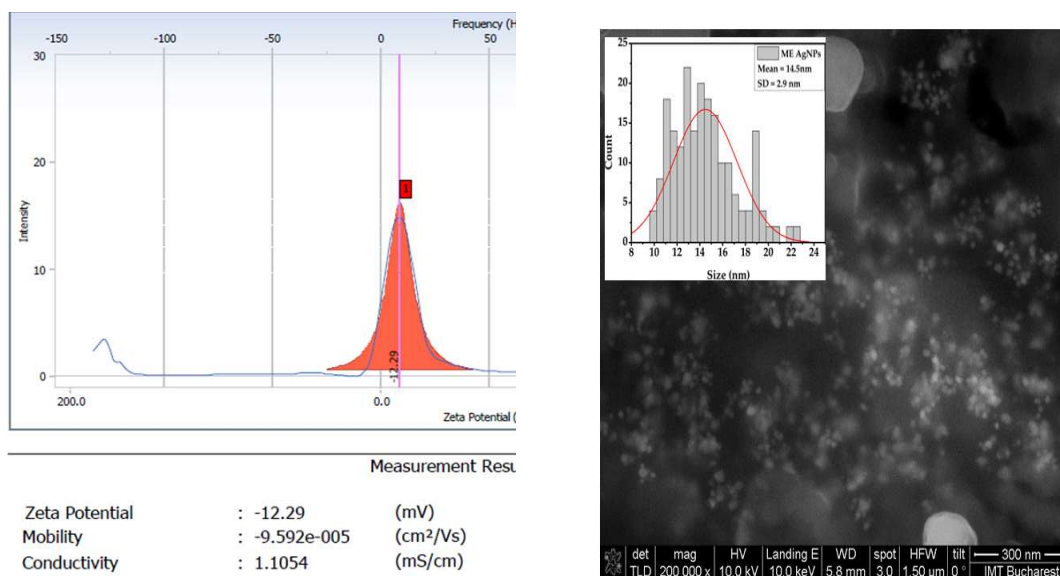


Figură 26 - imagini TEM pentru toate probele analizate

Din analiza TEM a tuturor probelor, nanoparticulele de Au și Ag au prezentat predominant o morfologie sferică.

5.3.1.7.4 Caracterizarea dimensională și morfologică a nanoparticulelor pe bază de *Melissa officinalis* prin DLS și PDI

Distribuția dimensiunilor măsurată prin DLS prezentată în Figura 34 a arătat două populații: particule cu dimensiuni între 75 nm – 255 nm, cu un maxim la 143 nm; particule mai mari cu un centru la 1108 nm, probabil atribuite resturilor de extract vegetal.



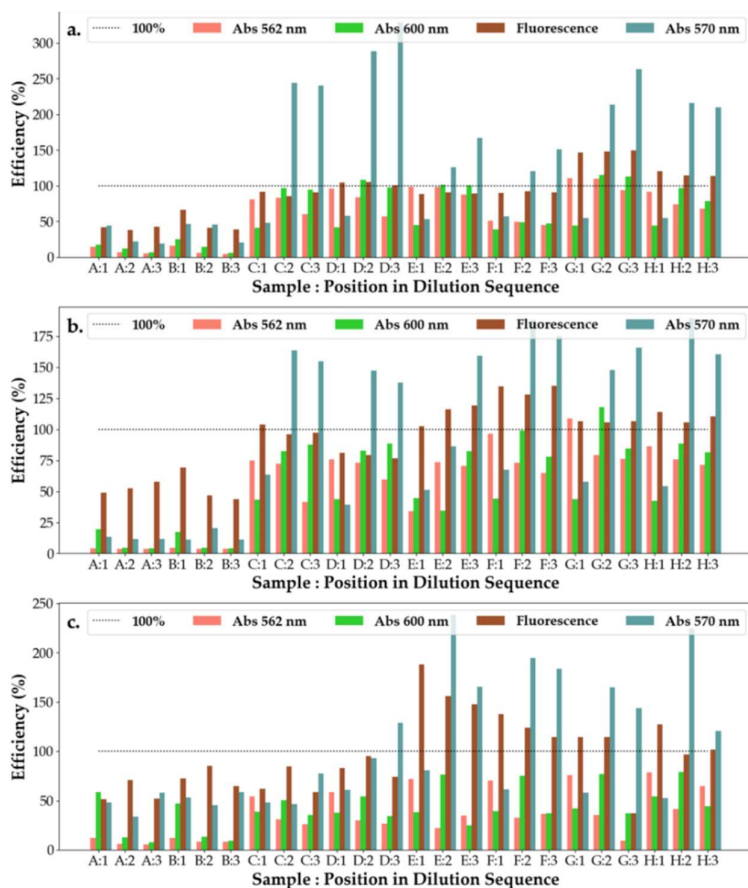
Figură 27 (a) Schimbarea culorii soluției de la roșu-marooniu la maro-închis ca urmare a bioreducerii Ag de către extractul de *Melissa officinalis*; - Figura 1(a)- DLS înregistrat pentru ME AgNPs; (b) Spectrele UV-Vis Spectrele UV-Vis ale probelor ME AgNPs obținute prin reducerea în timp cu extractul de *Melissa officinalis*(c) Spectrul UV-Vis al soluției de AgNO₃ 0,5mM- Figura 1(b). Potentialul zeta pentru ME AgNPs

Microscopia electronică cu scanare (SEM) prezentată a confirmat că nanoparticulele reale sunt mult mai mici decât cele observate prin **Dynamic Light Scattering (DLS)** la, datorită acoperirii lor cu compuși bioactivi din extract. Extractul de *Melissa officinalis* a fost utilizat cu succes pentru biosinteza nanoparticulelor de argint, generând nanoparticule relativ stabile și cu dimensiuni controlabile. Nanoparticulele ME AgNPs au demonstrat caracteristici optice și structurale bine definite, având un potențial ridicat pentru utilizare în aplicații terapeutice și farmacologice.

5.3.2 Evaluarea antimicrobiană

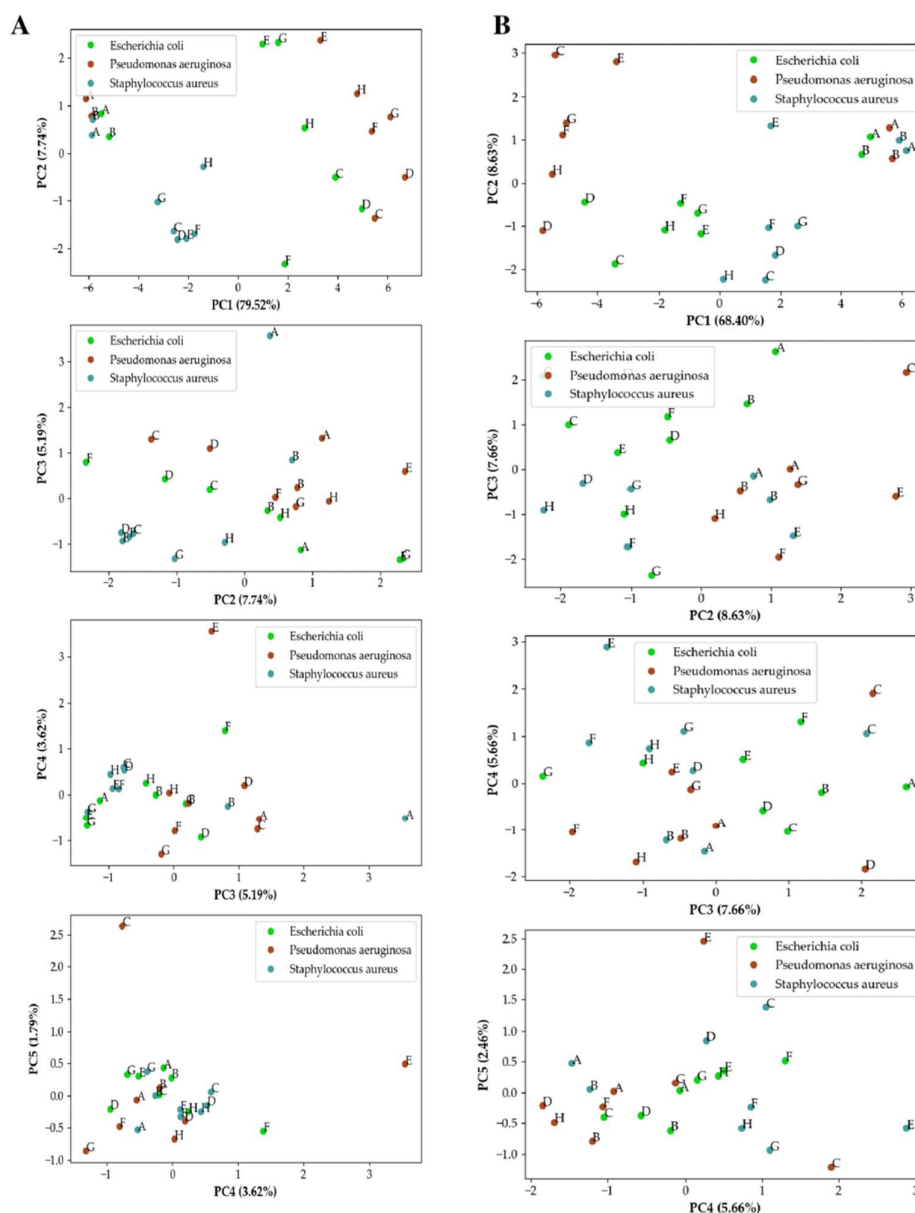
5.3.2.1 Evaluarea activității antimicrobiene a nanoparticulelor sintetizate cu *Salix alba*

SAgNPs-WT obținute prin „sinteză verde” din scoarță de salcie au fost testate comparativ cu diferite forme farmaceutice, cu și fără substanțe active, pentru a evidenția posibilul efect de control pozitiv și negativ, observându-se un efect antibacterian asupra tuturor celor trei bacterii testate. Pentru *E.c* și *P.a*, eficiența soluțiilor crește odată cu diluarea (la 600 nm), în timp ce pentru *S.a*, soluțiile de nanoparticule par să aibă doar un efect redus asupra modificării eficienței, aceasta variind în jurul valorii de 50%, dar prezentând o tendință redusă de scădere.



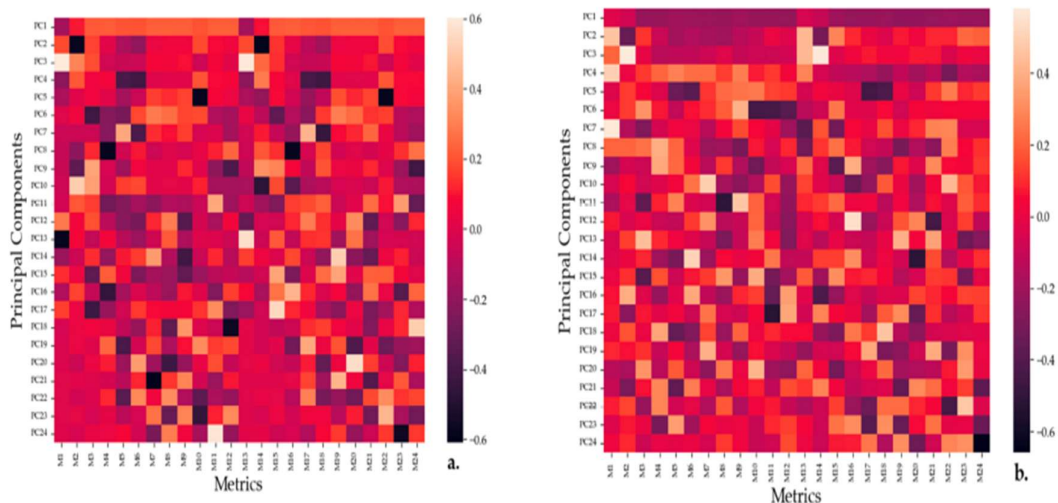
Figură 28 Eficiența răspunsului antibacterian (η) al probelor SAg/AuNP-WT la trei niveluri de diluție testate împotriva (a) *Escherichia coli*, (b) *Pseudomonas aeruginosa* și (c) *Staphylococcus aureus*. Probele A–H reprezintă următoarele soluții testate împotriva bacteriilor: A—SAuNPs-WT 1S; B—SagNPs-WT 1S; C—Extract de *Salix Alba*; D—Extract de *Salix Alba*; E—SAuNPs-WT 7S; F—SAuNPs-WT 10S; G—SAuNPs-WT 7S; și H—SAuNPs-WT 10S

Componentele PCA au fost mapate până când o componentă a explicat mai puțin de 5 % din variația datelor, reprezentările 2D ale spațiului caracteristic fiind prezentate în figura 40A pentru măsurătorile fluorescențe și la 570 nm și în figura 40b pentru măsurătorile la 562 nm și 600 nm. În plus, hărțile caracteristice pentru componentele principale (PC) sunt prezentate în Figura 36 a,b.



Figură 29 Reprezentarea PCA pentru măsurătorile pe o singură lungime de undă pentru SAg/AuNPs-WT(a)

(b)



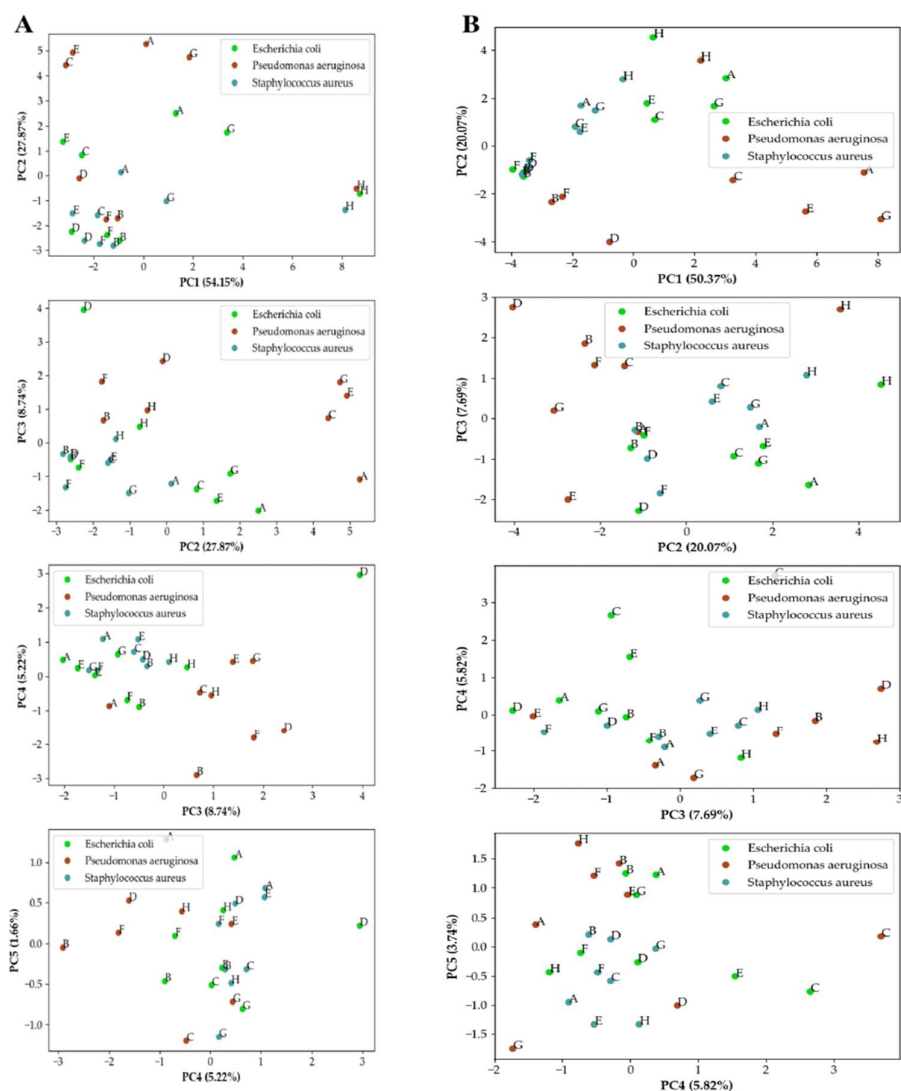
Figură 30 Caracteristici reprezentând corelația dintre informația explicată de componentele principale (PCs) aproximative prin PCA și caracteristicile colectate în timpul analizei probelor Sau/AgNP-WT

Caracteristicile arată corelația dintre PC și o anumită caracteristică, culorile mai închise semnificând o corelație inversă, iar culorile mai deschise semnificând o corelație directă. Faptul că probele A și B sunt substanțele ineficiente pentru măsurători este confirmat în continuare de PCA Figura 38, deoarece toate aceste măsurători sunt grupate împreună, indiferent de bacteria interogată.

5.3.2.1.1 Evaluarea activității antimicrobiene a formulărilor bazate pe *Salix alba*- formulări (hidrogel)

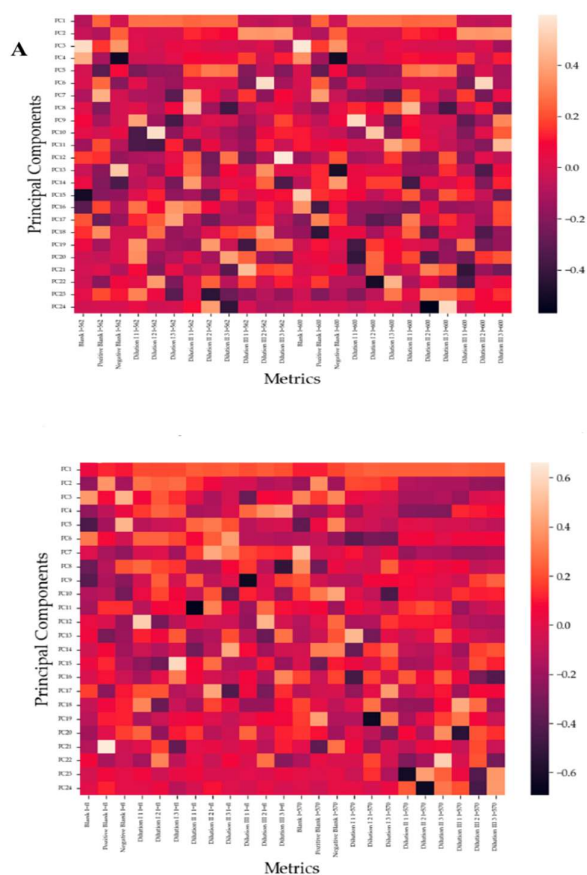
Se poate observa din Figura 42 a, b că soluția H este cea mai receptivă la o modificare a diluției, având cea mai mare variație față de medie, după cum arată prima componentă principală. Cu toate acestea, acest răspuns pentru H pare să vină indiferent de interacțiunea cu o cultură celulară specifică.

În plus, PC2 servește drept clasificator pentru răspunsul soluției de hidrogel la *S.a*, deoarece la a treia diluție, nicio soluție de hidrogel nu are o eficiență semnificativă atunci când este măsurată la 562 nm și 600 nm. PC3 pare, de asemenea, să diferențieze efectele hidrogelului asupra P.a, răspunsurile fiind mai apropiate de alb și de alb negativ, atât sub lumina de 562 nm, cât și sub excitația de 600 nm pentru această interacțiune.



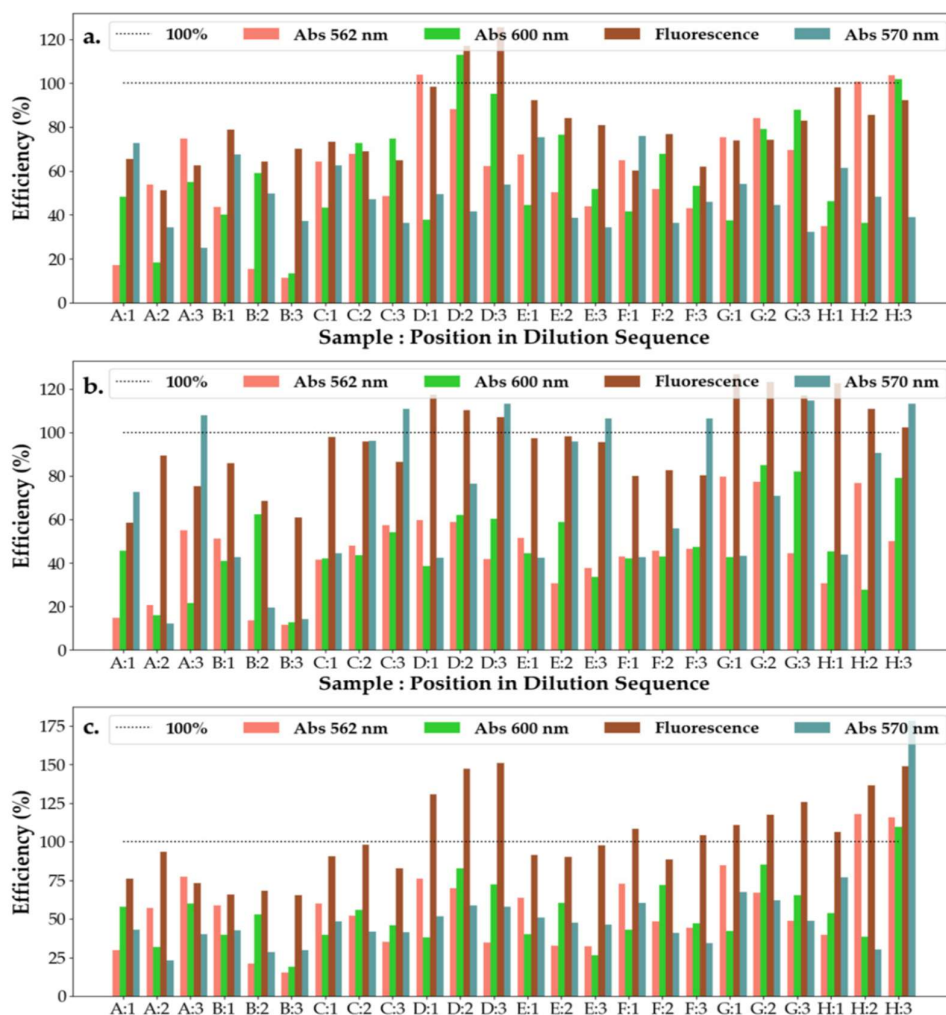
Figură 31 Reprezentarea PCA pentru măsurătorile cu o singură lungime de undă pentru hidrogeluri (a); Reprezentarea PCA a măsurătorilor pe mai multe lungimi de undă pentru hidrogeluri (b)

Din Figura 39 se poate observa din nou că H nu pare să varieze cu cultura celulară; prin urmare, ar putea fi utilizată ca măsurătoare de referință pentru toate celelalte substanțe. PC2 se corelează cu un răspuns puternic la lumina de 570 nm și, astfel, poate fi utilizată pentru a diferenția răspunsul la P.a de toate celelalte culturi celulare.



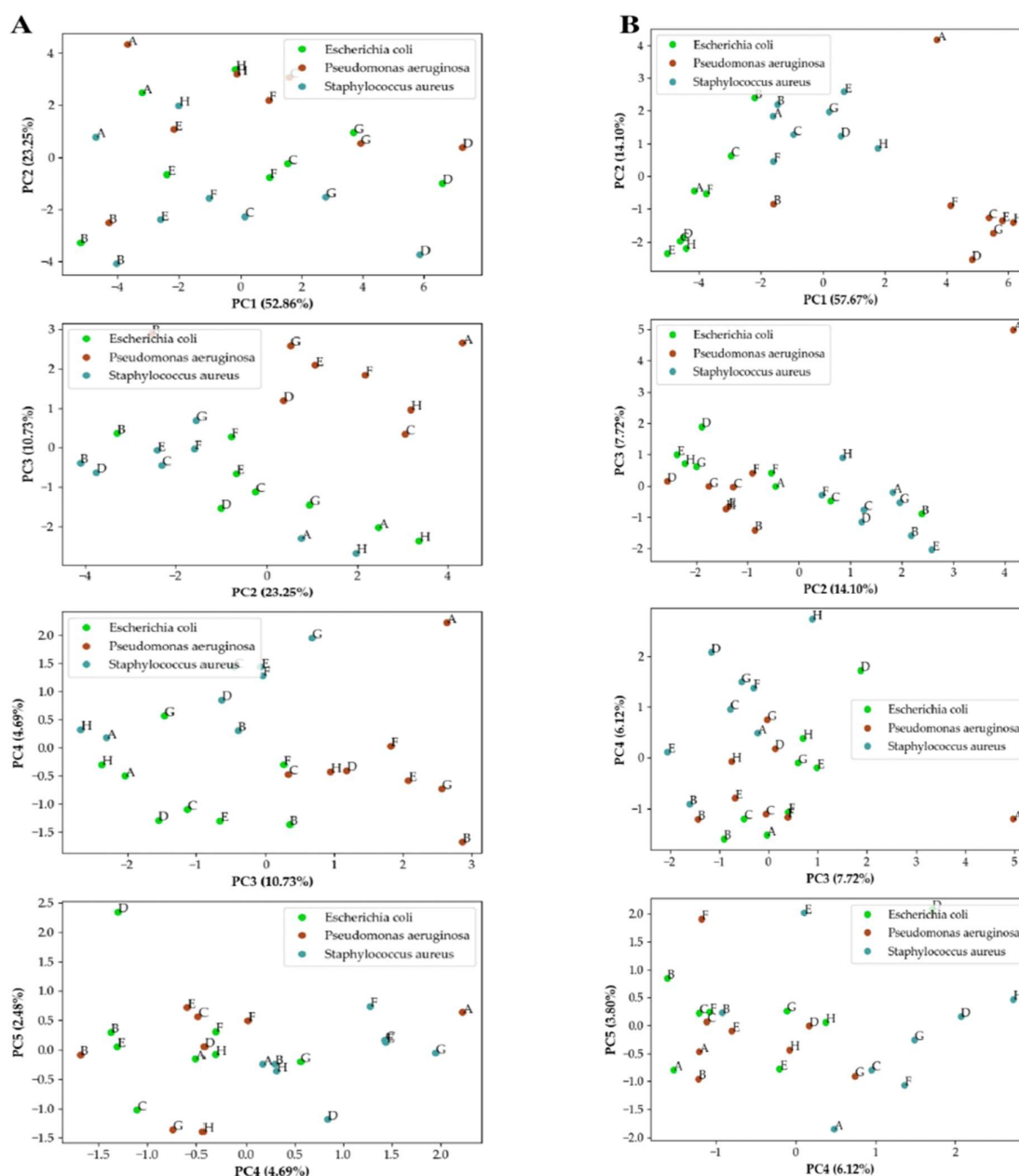
Figură 32 Caracteristicile măsurătorilor pe o singură lungime de undă pentru hidrogeluri (a) pe mai multe lungimi de undă pentru hidrogeluri (b)

În Figura 40 se poate observa că eficiența unguentului măsurată cu ajutorul excitației la 570 nm crește puternic odată cu diluarea substanțelor atunci când interacționează cu *P.a.*, în timp ce nu a existat un răspuns semnificativ la interacțiunea cu celelalte două culturi celulare.



Figură 33 Eficiența răspunsului antibacterian (η) al probelor de unguent SAgNPs-WT la trei niveluri de diluție testate împotriva (a) *Escherichia coli*, (b) *Pseudomonas aeruginosa* și (c) *Staphylococcus aureus*. Probele A-H reprezintă următoarele soluții testate împotriva bacteriilor: A-Tween 20; B-Ont 1 + SAgNPs-WT 10S + 1% tween 20; C-Ont 1 + SAgNPs-WT 10S + 1% tween 20 (1:1:1); D-Ont 1 + SAgNPs-WT 10S + 1% tween 80 (1:1:1); E-Ont 2 + SAgNPs-WT 10S + 1% tween 80; F-Ont 2 + SAgNPs-WT 10S + 1% tween 20 (1:1:1); G-Ont 2 + SAgNPs-WT 10S + 1% tween 80 (1:1:1); și H-Tween 80

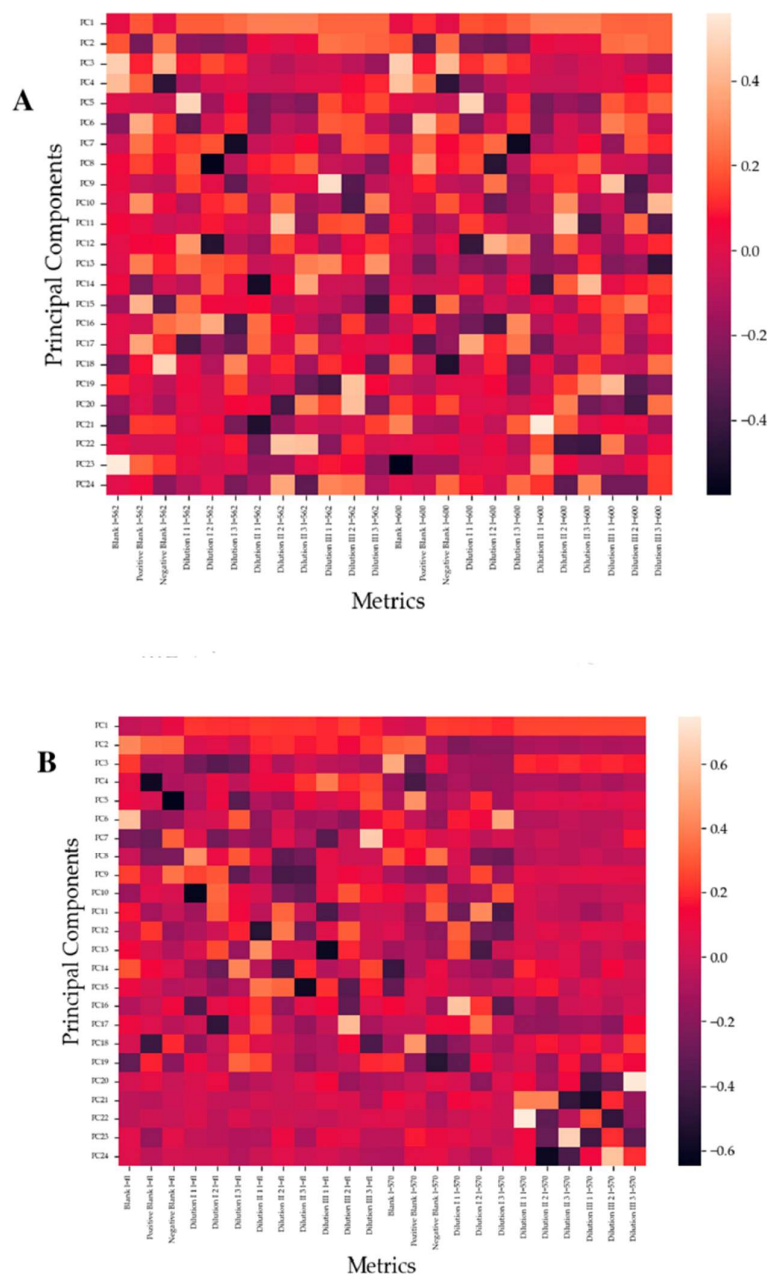
Din măsurarea PCA pentru unguent prezentată în Figura 46 a,b nu pare să existe un grup al tuturor celor trei culturi celulare care să fie suficient de apropiat pentru a sugera o soluție de referință. Cu toate acestea, sub excitație de 562 nm și 600 nm, niciun unguent nu pare să fie foarte selectiv. PC2, care diferențiază între a treia și prima diluție, pare să servească drept un bun indicator al eficienței unguentelor împotriva *P.a*, singura excepție fiind unguentul B.



Figură 34 Reprezentare PCA pentru măsurătorile cu o singură lungime de undă pentru unguente (a), pe mai multe lungimi de undă pentru unguente (b)

Pentru măsurătorile la 570 nm și fluorescență Figura 42 PC1 prezintă o bună împărțire între răspunsul la *P.a* și celelalte culturi celulare datorită creșterii puternice a eficienței odată cu diluția atunci când este expusă la excitația de 570 nm. Singura excepție este unguentul B, care prezintă o scădere a eficienței sub iluminare la 570 nm odată cu diluarea.

În mod similar, PC2, care arată comparația dintre fluorescență și iluminarea la 570 nm, servește ca un bun clasificator pentru răspunsul la *S.a*, fiind caracterizat de diferențe constant ridicate între cele două măsurători în toate diluțiile.

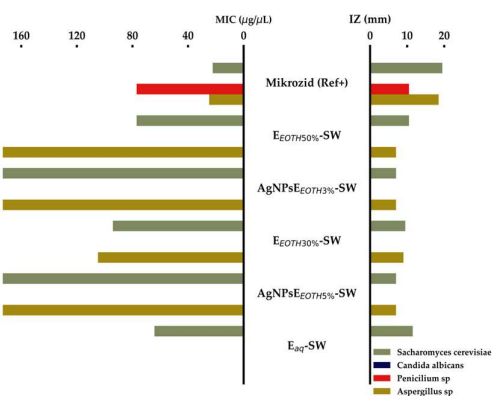


Figură 35 Harta caracteristicilor pentru măsurătorile pe o singură lungime de undă pentru unguente (a); pe mai multe lungimi de undă pentru unguente (b)

5.3.2.2 EVALUAREA ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE A NANOPARTICULELOR SINTETIZATE CU ARTEMISIA ANNUA

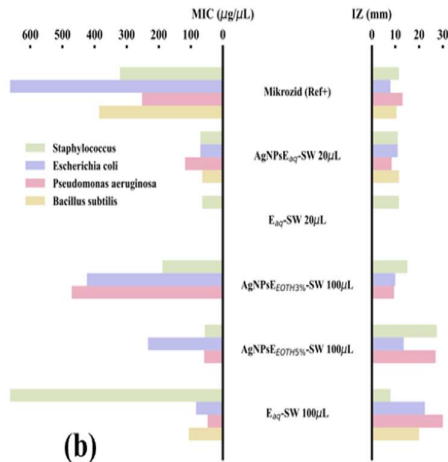
Efectul antifungic a fost evaluat pe *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Penicillium sp* și *Aspergillus sp*, prin incubare pe medii Sabouraud solide timp de 3 zile până la 1 săptămână la 23-26° C, măsurându-se zona de inhibiție ca în cazul bacteriilor.

Figura 43 ilustrează zona de inhibiție în funcție de concentrația de inhibiție calculată pentru eșantioanele de peliniță



Figură 37 Efectul antifungic al extractelor apoase/etanolicе și al nanoparticulelor obținute din *Artemisia Annua*

Legend: Mikroizid – soluție alcoolică 60%; ETOH50%-SW – extract alcoolic 50% din *Artemisia Annua*; ETOH30%-SW- extract alcoolic 30% from din *Artemisia Annua*; AgNPsETOH5%- SW- obținute prin reducerea arginului cu extract 50% ETOH50%-SW (1 :10, extract: AgNO3 1mM – v:v); AgNPsETOH3%- SW- obținut prin reducerea arginului ETOH30%-SW (1 :10, extract: AgNO3 1mM – v:v)



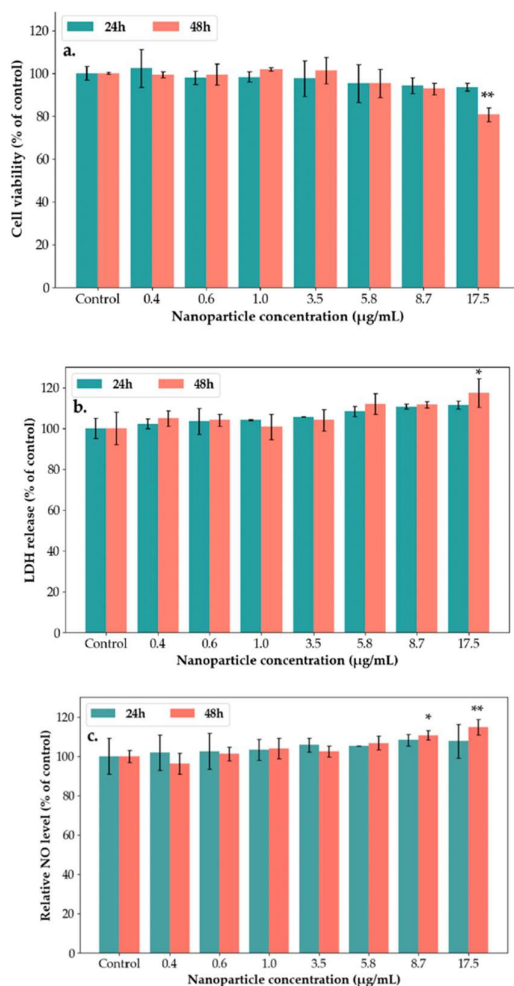
Figură 36 Reprezentarea zonei de inhibiție calculată pentru *Artemisa annua*

Efectul antifungic al nanoparticulelor a fost prezentat în Figura 44 pentru probele de absint dulce.

5.3.3 EVALUAREA IN VITRO AL EFECTULUI CITOTOXIC ȘI SINERGETIC

5.3.3.1 EVALUAREA IN VITRO A EFECTULUI CITOTOXIC ȘI SINERGIC AL EXTRACTULUI ȘI NANOPARTICULELOR PE BAZĂ DE SALIX ALBA

Citotoxicitatea SAgNPs-WT a fost evaluată prin testele MTT și LDH utilizând liniile celulare HaCaT Figura 48 a,b. Răspunsul inflamator a fost analizat utilizând metoda Griess[250]. La 24 și 48 h, după expunerea keratinocitelor la diferite concentrații de NPs (0,4-17,5 $\mu\text{g/mL}$), a fost testată producția de oxid nitric din mediul de cultură, care este prezentată în Figura 45.



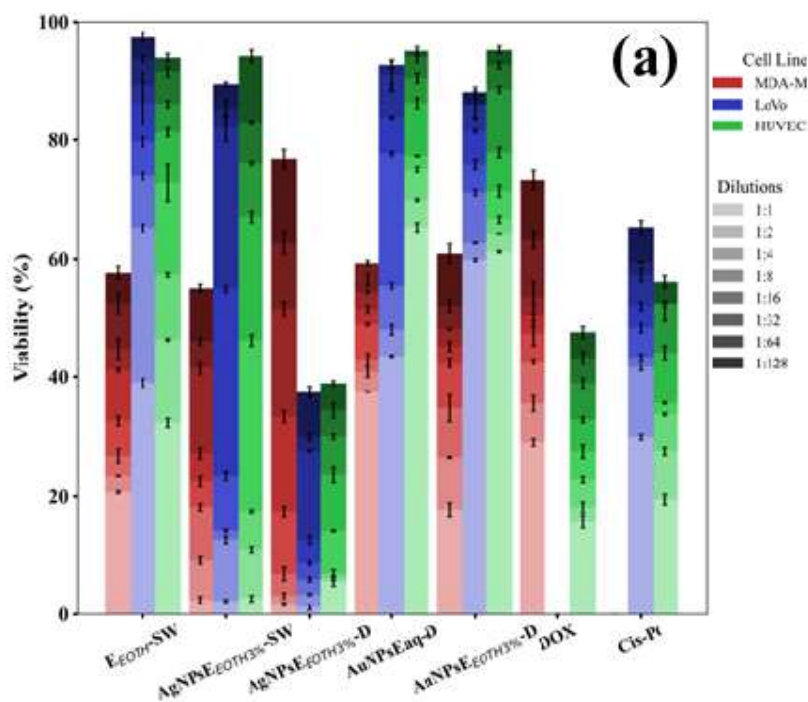
Figură 38 Testele biologice efectuate pe SAg/AuNPs-WT utilizând următoarele tehnici: (a) Testul MTT după 24 h și 48 h de expunere la diferite concentrații de SAgNPs-WT în keratinocite. Viabilitatea celulară a fost normalizată la celulele netratate (fără SAgNPs-WT). Rezultatele sunt exprimate ca medie $\pm$ SD ($n = 3$) și prezentate ca procent (%) față de control. (b) Activitatea lactat dehidrogenazei (LDH) eliberată după 24 h și 48 h de expunere la diferite concentrații de SAgNPs-WT în celule HaCaT. Rezultatele sunt exprimate ca medie $\pm$ SD ($n = 3$) și raportate ca procent (%) față de control. (c) Efectele SAgNPs-WT asupra producției de oxid nitric (NO) în celulele HaCaT. Celulele au fost tratate cu SAgNPs-WT (0.4–17.5 $\mu\text{g/mL}$) timp de 24 h și 48 h. Rezultatele sunt exprimate ca medie $\pm$ SD ($n = 3$) și raportate ca procent (%) față de control. Indicații statistice: $p < 0.01$ (semnificativ ridicat), $*p < 0.05$ (semnificativ moderat)

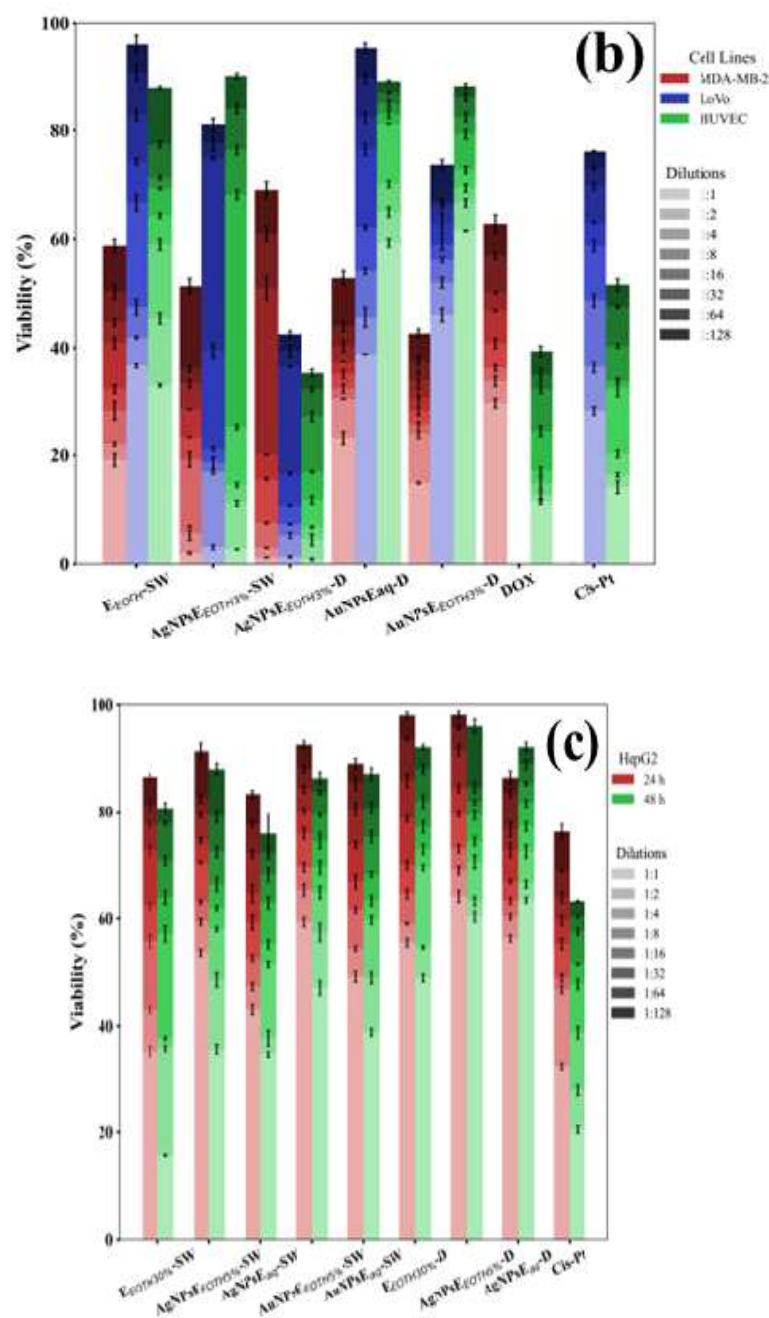
În Figura 45a, rezultatele MTT au arătat o scădere de aproximativ 20% după 48 h la concentrații de 17,5 µg/mL de NP comparativ cu nivelul de control. Nu au fost înregistrate modificări semnificative pentru celelalte concentrații.

5.3.3.2 EVALUAREA IN VITRO A EFECTULUI CITOTOXIC ȘI SINERGIC AL EXTRACTULUI ȘI NANOPARTICULELOR PE BAZĂ DE ARTEMISIA ANNUA

Studiile au fost efectuate in vitro pentru a investiga efectul probelor testate asupra celulelor tumorale umane LoVo (adenocarcinom de colon uman) și MDA-MB-231 (adenocarcinom de sân uman) și asupra liniei tumorale hepatice HepG2 în comparație cu linia celulară normală HUVEC (celule endoteliale din vena ombilicală umană).

Controalele pozitive ale studiului au fost CisPt și DOX, care sunt utilizate în mod obișnuit pentru tratarea cancerului de colon și, respectiv, de sân. Pentru a evalua viabilitatea celulară, au fost realizate diluții ale soluțiilor coloidale inițiale și liniile celulare au fost expuse timp de 24 și 48 de ore. CisPt și DOX par să afecteze liniile tumorale investigate; cu toate acestea, efectele lor s-au extins și la linia celulară normală după 24 de ore [figura 46(a)].

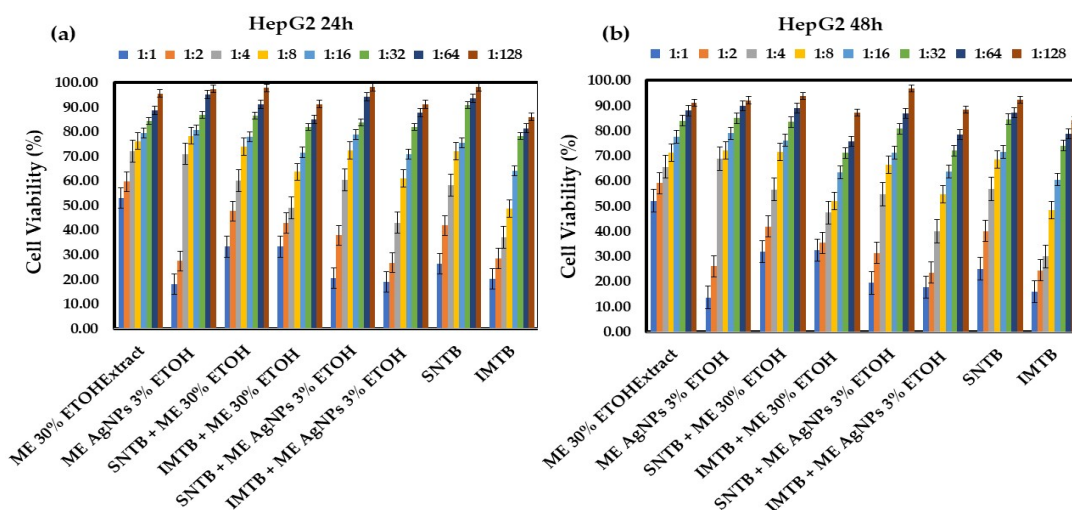




Figură 39 Efectul diferitelor diluții ale probei pe bază de pădăie și peliniță asupra viabilității (%) liniilor de celule canceroase umane: cancer de sân (MDA-MB-231), linia celulară de adenocarcinom colorectal uman LoVo și celulele endoteliale din vena ombilicală umană HUVEC la (a) 24h și (b) 48h ; (Diluțiile sunt date de nuanța graficelor cu bare suprapuse, o nuanță mai deschisă corespunzând unei diluții mai mici); (c) Efectul diferitelor diluții ale probei pe bază de pădăie și pădăie asupra viabilității (%) HepG2 (linie celulară de carcinom hepatic uman) la 24h și 48h. Diluțiile sunt date de nuanța graficelor cu bare suprapuse, o nuanță mai deschisă corespunzând unei diluții mai mici.

5.3.3.3 EVALUAREA IN VITRO A EFECTULUI CITOTOXIC ȘI SINERGIC AL EXTRACTULUI ȘI NANOPARTICULELOR PE BAZĂ DE MELISSA OFFICINALIS

Combinarea dintre extractul alcoolic și nanoparticulele de argint biogene (ME AgNPs) poate îmbunătăți eficacitatea tratamentului și ar putea fi la fel de eficientă, sau chiar mai eficientă, având efecte toxice minime asupra celulelor normale. Astfel, efectul citotoxic al extractelor derivate din *Melissa officinalis* a fost evaluat la 24 și 48 de ore după tratament. Figurile 47(a) și 25(b) prezintă măsurători ale viabilității celulare la 24, respectiv 48 de ore de tratament cu extracte, comparativ cu medicamentele administrate individual.



Figură 40 Viabilitatea celulară (%) a liniilor HepG2 după: (a) 24 de ore de tratament cu diferite diluții de probe pe bază de *Melissae extractum* și medicamentele chimioterapeutice Sunitinib și Imatinib și (b) prezintă aceleași măsurători după 48 de ore de tratament

5.4 CONCLUZII

În ceea ce privește caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor, nanoparticulele de argint și aur au fost obținute cu succes prin bioreducerea extractelor vegetale (*Salix alba*, *Artemisia annua*, *Melissa officinalis*). Spectroscopia UV-Vis, FTIR, PL, XRD și microscopiile electronice (SEM/TEM) au confirmat formarea nanoparticulelor și compoziția lor.

SAGNPs-WT au demonstrat stabilitate pe termen lung și comportament stabil în medii cu pH variat. Dimensiunea și forma particulelor au fost corelate cu parametrii de sinteză și extractul utilizat, iar nanoparticulele au fost în mare parte sferice, cu distribuții dimensionale între 10–76 nm. Evaluarea antimicrobiană a aratat ca SAGNPs-WT au avut un efect antibacterian semnificativ, în special asupra *Pseudomonas aeruginosa* și *Staphylococcus aureus*.

Formulările precum hidrogeluri și unguente au îmbunătățit activitatea antimicrobiană, în special când au fost combinate cu agenți de dispersie (Tween 20). Comparativ, nanoparticulele

derivate din *Artemisia annua* au arătat o activitate antibacteriană mai redusă și un efect antifungic limitat, posibil din cauza structurii mai complexe a peretelui celular fungic.

Evaluarea in vitro a efectului citotoxic și sinergetic a aratat ca SAgNPs-WT au prezentat citotoxicitate redusă asupra keratinocitelor (HaCaT) până la o anumită concentrație, indicând un potențial sigur pentru aplicații farmaceutice. Extractele și nanoparticulele din *Artemisia annua* și *Melissa officinalis* au prezentat efecte citotoxice selective asupra liniilor tumorale, în special MDA-MB-231 (sân), LoVo (colon) și HepG2 (hepatic).

Efectul sinergic al nanoparticulelor cu medicamente chimioterapice a dus la o eficiență crescută antitumorală și toxicitate scăzută asupra celulelor normale, ceea ce indică un potențial terapeutic ridicat. În concluzie, biosinteza nanoparticulelor din extracte vegetale este o metodă ecologică, eficientă și promițătoare pentru obținerea de nanomateriale funcționale.

SAgNPs-WT se remarcă prin stabilitate crescută, activitate antimicrobiană semnificativă și biocompatibilitate, reprezentând un candidat ideal pentru dezvoltarea de produse farmaceutice topice (geluri, unguente).

Extractele de *Artemisia* și *Melissa*, în combinație cu nanoparticulele, au potențial în tratamente oncologice, datorită efectului sinergic și citotoxicității selective asupra celulelor tumorale. Dimensiunea, morfologia și compoziția superficială a nanoparticulelor sunt esențiale pentru proprietățile lor bioactive, iar caracterizarea completă este crucială pentru aplicații medicale.

În ansamblu, rezultatele susțin utilizarea nanoparticulelor biosintetizate în aplicații biomedicale, oferind o alternativă sigură și eficientă la tratamentele convenționale.

Rezultatele acestui capitol au fost publicate în articolele:

1. Mirela Claudia Rimbu, Liliana Popescu, Mirela Mihăilă, Roxana Colette Sandulovici, **Daniel Cord***-autor corespondent, Carmen Marinela Mihailescu, Mona Luciana Galatanu, Mariana Panturoiu, Carmen Elisabeta Manea, Adina Boldeiu, Oana Brincoveanu, Mihaela Savin, Alexandru Grigoroiu, Florin Dan Ungureanu, Emilia Amzoiu, Mariana Popescu, Elena Truta, *Synergistic Effects of Green Nanoparticles on Antitumor Drug Efficacy in Hepatocellular Cancer*, Biomedicines 2025, 13, 641, <https://doi.org/10.3390/biomedicines13030641> , **FI=3,9**
2. Mirela Claudia Rimbu, **Daniel Cord***-autor corespondent, Mihaela Savin, Alexandru Grigoroiu, Mirela Antonela Mihăilă, Mona Luciana Gălățanu, Viorel Ordeanu, Mariana Panțuroiu, Vasilica Țucureanu, Iuliana Mihalache, Oana Brincoveanu, Adina Boldeiu, Veronica Anăstăsoaie, Carmen Elisabeta Manea, Roxana Colette Sandulovici, Marinela Chirilă, Adina Turcu Știololică, Emilia Amzoiu, Victor Eduard Petcu, Cristiana Tănase, Bogdan Firtat, Carmen Marinela Mihailescu, *Harnessing Plant-Based Nanoparticles for Targeted Therapy: A Green Approach to Cancer and Bacterial Infections*, Int. J. Mol. Sci. **2025**, 26(14), 7022; <https://doi.org/10.3390/ijms26147022> , **FI=4,9**
3. **Daniel Cord**, Mirela Claudia Rimbu, Cristiana Tănase, Cristina Tăbăleț, Gheorghe Duca, *Molecular docking study of some active principles from Silybum marianum, Chelidonium majus, Ginkgo biloba, Gelsemium sempervirens, Artemisia annua and Taraxacum officinale*, Chemistry Journal of Moldova. General, Industrial and Ecological Chemistry. 2025, 20(1), 100-105 <https://doi.org/10.19261/cjm.2025.1337> , **FI=0,5**
4. Mirela Claudia Rimbu, Dan Florin Ungureanu, Cosmin Modovan, Madalina Toba, Marinela Chirila, Elena Truta, **Daniel Cord**, *Cystic Hepatic GIST: A Case Report of Rare Presentation and Long-Term Survival*, Curr. Oncol. 2025, 32, 383 <https://doi.org/10.3390/currncol32070383> , **FI=3,4**

6. CONCLUZII GENERALE

Această lucrare a analizat proprietățile antimicrobiene a extractelor vegetale de *Taraxacum officinale*, *Chelidonium majus*, și *Silybum marianum*, precum și extracte alcoolice din *Artemisia annua*.

Testele calitative au demonstrat că toate extractele vegetale au inhibat creșterea și dezvoltarea tulpinilor microbiene. Extractul de *Silybum marianum* a prezentat cel mai puternic efect antimicrobian asupra tulpinilor gram-pozitive. Extractele alcoolice din *Artemisia annua* au avut un spectru microbial larg, fiind eficiente împotriva tuturor tulpinilor, cu excepția *Staphylococcus aureus*.

Determinările cantitative au stabilit concentrațiile necesare pentru efectele bacteriostatice și bactericide. Tulpinile microbiene au prezentat o sensibilitate mai mare la tincturi, comparativ cu extractele alcoolice de *Artemisia annua*.

Studiile *in vitro* au evidențiat și activitatea antibiofilm a extractelor. *Chelidonium majus*, *Silybum marianum* și *Artemisia annua* au inhibat formarea biofilmelor la toate tulpinile testate. Tinctura de *Taraxacum officinale* a fost eficientă în special împotriva bacteriilor gram-negative și a fungilor.

Rezultatele obținute sunt promițătoare și susțin necesitatea unor studii suplimentare asupra compoziției biochimice a acestor extracte. Cercetările viitoare ar putea facilita dezvoltarea unor strategii eficiente împotriva infecțiilor bacteriene și fungice.

Un alt obiect al studiului a fost dezvoltarea și caracterizarea nanoparticulelor obținute prin sinteză verde folosind extractul de *Artemisia annua*. Acestea au fost testate în formulări farmaceutice topice.

Nanoparticulele de aur au prezentat activitate antimicrobiană, însă tendința lor de floclurare le-a făcut mai puțin potrivite pentru formulările farmaceutice. Toate nanoformulările testate, care conțineau nanoparticule de argint, au demonstrat un potențial ridicat ca agenți antimicrobieni și antiinflamatorii.

Celulele expuse la nanoparticule de argint nu au prezentat semne de citotoxicitate la concentrațiile utilizate pentru teste antimicrobiene. Acești compuși ar putea fi integrați în medicamente antiinfecțioase, produse igienice și cosmetice pentru tratamentul leziunilor provocate de diverse patologii.

Nanoparticulele de argint obținute prin sinteză verde din bioextractele din *Salix alba* au demonstrat o activitate antimicrobiană și antibiofilm. Hidrogelurile formulate cu aceste

nanoparticule au prezentat stabilitate fizico-chimică ridicată și activitate antibacteriană crescută, fiind mai eficiente decât nanoparticulele din aur.

Aceasta lucrare prezintă și o serie de limitări. Studiile au fost realizate doar *in vitro*. Efectele în organismul viu pot fi diferite din cauza biodisponibilității, metabolismului sau răspunsului imun. Extractele vegetale pot avea compoziții chimice variabile în funcție de sezon, zonă geografică, metodă de extracție, ceea ce afectează reproductibilitatea. Testarea antimicrobiană a fost realizată pe un număr restrâns de tulpini bacteriene de referință, fără tulpini clinice sau rezistente la antibiotice.

Rezultatele promițătoare ale acestor extracte susțin continuarea cercetărilor pentru optimizarea formulărilor și testarea stabilității și siguranței acestora. În acest scop, vor fi realizate studii suplimentare în ceea ce privește validarea eficacității formulării-comprimatelor-, urmând inițierea procesului de brevetare.

Această cercetare deschide noi perspective pentru utilizarea compușilor naturali în terapii inovatoare, oferind alternative la tratamentele convenționale.

Studiul de față a demonstrat potențialul ridicat al unor plante medicinale autohtone în generarea de compuși bioactivi cu activitate antioxidantă, antimicrobiană și antitumorală, precum și aplicabilitatea extractelor lor în biosinteza de nanoparticule metalice funcționale. Rezultatele obținute evidențiază contribuții importante în domeniul biotehnologiei verzi, cu implicații directe în dezvoltarea de noi terapii și produse farmaceutice.

Evaluarea capacității antioxidante a extractelor vegetale a indicat diferențe semnificative între speciile analizate, cu *Artemisia annua* și *Taraxacum officinale* prezentând cea mai mare activitate de captare a radicalilor liberi. Această proprietate este corelată cu conținutul ridicat de polifenoli și flavonoide, care pot contribui la prevenirea sau ameliorarea unor afecțiuni asociate cu stresul oxidativ. În ciuda unei capacități antioxidante mai reduse, plante precum *Silybum marianum* și *Chelidonium majus* sunt valoroase din punct de vedere terapeutic, având efecte hepatoprotectoare și antiinflamatorii documentate.

Pe plan antimicrobian, extractele vegetale testate au demonstrat activitate bacteriostatică și bactericidă variabilă în funcție de specie și solvent de extracție. *S. marianum* s-a dovedit eficientă împotriva tulpinilor Gram-pozitive, în timp ce *A. annua* a prezentat un spectru larg de acțiune antimicrobiană. În plus, s-a constatat capacitatea anumitor extracte de a inhiba formarea biofilmelor bacteriene, aspect relevant pentru controlul infecțiilor persistente.

Unul dintre punctele centrale ale lucrării a fost reprezentat de biosinteza nanoparticulelor metalice (Ag și Au) utilizând extracte din *Salix alba*, *Artemisia annua* și *Melissa officinalis*. Caracterizarea fizico-chimică a acestor nanoparticule a confirmat formarea de structuri sferice și stabile, cu dimensiuni cuprinse între 10 și 76 nm. SAgNPs-WT s-au remarcat prin stabilitate

coloidală, potențial antioxidant și activitate antimicrobiană superioară, fiind validate ca ingrediente promițătoare în formulări topice precum hidrogeluri și unguente.

Evaluarea biologică in vitro a arătat că nanoparticulele de argint au o toxicitate redusă asupra keratinocitelor umane, sugerând un profil de siguranță favorabil pentru aplicații dermatologice. Mai mult, combinația extractelor vegetale cu nanoparticule metalice a produs efecte antitumorale semnificative asupra liniilor celulare canceroase (sân, colon, hepatic), depășind în unele cazuri eficiența medicamentelor chimioterapice uzuale. Aceste rezultate subliniază un efect sinergic promițător care ar putea fi exploatat în terapii oncologice alternative, cu toxicitate redusă asupra celulelor sănătoase.

În concluzie, lucrarea susține ferm aplicabilitatea biosintezei verzi în obținerea de nanomateriale funcționale cu valoare terapeutică ridicată. Integrarea extractelor vegetale în procesele de sinteză a nanoparticulelor deschide perspective inovatoare pentru dezvoltarea de produse farmacologice și cosmetice, cu un impact pozitiv asupra sănătății umane și un profil ecologic sustenabil. Continuarea cercetărilor în această direcție ar putea conduce la identificarea unor soluții naturale eficiente împotriva rezistenței antimicrobiene și la optimizarea tratamentelor personalizate în oncologie.

7. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

206. Miethke, M., Pieroni, M., Weber, T., Brönstrup, M., Hammann, P., Halby, L., ... & Müller, R. (2021). Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics. *Nature Reviews Chemistry*, 5(10), 726-749.
207. Stewart-Wade, S. M., Neumann, S., Collins, L. L., & Boland, G. J. (2002). The biology of Canadian weeds. 117. *Taraxacum officinale* GH Weber ex Wiggers. *Canadian journal of plant science*, 82(4), 825-853.
208. Gilca, M., Gaman, L., Panait, E., Stoian, I., & Atanasiu, V. (2010). *Chelidonium majus*—an integrative review: traditional knowledge versus modern findings. *Forschende komplementärmedizin/Research in complementary medicine*, 17(5), 241-248.
209. Ziełńska, S., Jezierska-Domaradzka, A., Wójciak-Kosior, M., Sowa, I., Junka, A., & Matkowski, A. M. (2018). Greater celandine's ups and Downs— 21 centuries of medicinal uses of *chelidonium majus* from the viewpoint of today's Pharmacology. *Frontiers in pharmacology*, 9, 299.
210. Gracz-Bernaciak J., Mazur O., Nawrot R., 2021. Functional Studies of Plant Latex as a Rich Source of Bioactive Compounds: Focus on Proteins and Alkaloids. *Int. J. Mol. Sci.* 22(22), 12427.
211. Bahmani, M., Shirzad, H., Rafieian, S., & Rafieian-Kopaei, M. (2015). *Silybum marianum*: beyond hepatoprotection. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*, 20(4), 292-301.
212. Valková, V., Ďuranová, H., Bilčíková, J., & Habán, M. (2020). Milk thistle (*Silybum marianum*): a valuable medicinal plant with several therapeutic purposes. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(4), 836.
213. Shahrajabian, M. H., Wenli, S. U. N., & Cheng, Q. (2020). Exploring *Artemisia annua* L., artemisinin and its derivatives, from traditional Chinese wonder medicinal science. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 48(4), 1719-1741.
214. Ekiert, H., Świątkowska, J., Klin, P., Rzepiela, A., & Szopa, A. (2021). *Artemisia annua*—importance in traditional medicine and current state of knowledge on the chemistry, biological activity and possible applications. *Planta Medica*, 87(08), 584-599.
218. Móricz, Á. M., Fornal, E., Jesionek, W., Majer-Dziedzic, B., & Choma, I. M. (2015). Effect-directed isolation and identification of antibacterial *Chelidonium majus* L. alkaloids. *Chromatographia*, 78, 707-716
219. Jyoti, B. S. (2013). *Chelidonium majus* L.-a review on pharmacological activities and clinical effects. *Global Journal of Research on Medicinal Plants & Indigenous Medicine*, 2(4), 238.
220. Wianowska, D., & Wiśniewski, M. (2015). Simplified procedure of silymarin extraction from *Silybum marianum* L. Gaertner. *Journal of chromatographic science*, 53(2), 366-372.
221. Bijak, M. (2017). *Silybin*, a major bioactive component of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.)—Chemistry, bioavailability, and metabolism. *Molecules*, 22(11), 1942.
222. Roleira, F. M., Varela, C. L., Costa, S. C., & Tavares-da-Silva, E. J. (2018). Phenolic derivatives from medicinal herbs and plant extracts: anticancer effects and synthetic approaches to modulate biological activity. *Studies in Natural Products Chemistry*, 57, 115-156.
223. Golbarg, H., & Mehdipour Moghaddam, M. J. (2021). Antibacterial Potency of Medicinal Plants including *Artemisia annua* and *Oxalis corniculata* against Multi-Drug Resistance *E. coli*. *BioMed research international*, 2021(1), 9981915.
224. Marinas, I. C., Oprea, E., Chifiriuc, M. C., Badea, I. A., Buleandra, M., & Lazar, V. (2015). Chemical composition and antipathogenic activity of *Artemisia annua* essential oil from Romania. *Chemistry & biodiversity*, 12(10), 1554-1564.
225. Donato, R., Santomauro, F., Bilia, A. R., Flamini, G., & Sacco, C. (2015). Antibacterial activity of Tuscan *Artemisia annua* essential oil and its major components against some foodborne pathogens. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1251-1254
240. Dehelean, C. A., Marcovici, I., Soica, C., Mioc, M., Coricovac, D., Iurciuc, S., ... & Pinzaru, I. (2021). Plant-derived anticancer compounds as new perspectives in drug discovery and alternative therapy. *Molecules*, 26(4), 1109.
241. Sammar, M., Abu-Farich, B., Rayan, I., Falah, M., & Rayan, A. (2019). Correlation between cytotoxicity in cancer cells and free radical-scavenging activity: In vitro evaluation of 57 medicinal and edible plant extracts. *Oncology Letters*, 18(6), 6563-6571.

LISTA PUBLICAȚIILOR ȘI DISEMINAREA REZULTATELOR

Lucrări publicate în extenso ca prim autor în reviste cotate ISI, indexate Web of Science:

1. Mirela Claudia Rimbu, Liliana Popescu, Mirela Mihăilă, Roxana Colette Sandulovici, **Daniel Cord***-autor corespondent, Carmen Marinela Mihailescu, Mona Luciana Galatanu, Mariana Panturoiu, Carmen Elisabeta Manea, Adina Boldeiu, Oana Brincoveanu, Mihaela Savin, Alexandru Grigoroiu, Florin Dan Ungureanu, Emilia Amzoiu, Mariana Popescu, Elena Truta, *Synergistic Effects of Green Nanoparticles on Antitumor Drug Efficacy in Hepatocellular Cancer*, Biomedicines 2025, 13, 641, <https://doi.org/10.3390/biomedicines13030641> , FI=3,9
2. Mirela Claudia Rimbu, **Daniel Cord***-autor corespondent, Mihaela Savin, Alexandru Grigoroiu, Mirela Antonela Mihăilă, Mona Luciana Gălățanu, Viorel Ordeanu, Mariana Panțuroiu, Vasilica Țucureanu, Iuliana Mihalache, Oana Brîncoveanu, Adina Boldeiu, Veronica Anăstăsoaie, Carmen Elisabeta Manea, Roxana Colette Sandulovici, Marinela Chirilă, Adina Turcu Știolică, Emilia Amzoiu, Victor Eduard Peteu, Cristiana Tănase, Bogdan Firtat, Carmen Marinela Mihailescu, *Harnessing Plant-Based Nanoparticles for Targeted Therapy: A Green Approach to Cancer and Bacterial Infections*, Int. J. Mol. Sci. **2025**, 26(14), 7022; <https://doi.org/10.3390/ijms26147022> , FI=4,9
3. **Daniel Cord**, Mirela Claudia Rimbu, Cristiana Tănase, Cristina Tăbleț, Gheorghe Duca, *Molecular docking study of some active principles from Silybum marianum, Chelidonium majus, Ginkgo biloba, Gelsemium sempervirens, Artemisia annua and Taraxacum officinale*, Chemistry Journal of Moldova. General, Industrial and Ecological Chemistry. 2025, 20(1), 100-105 <https://doi.org/10.19261/cjm.2025.1337> , FI=0,5
4. Mirela Claudia Rimbu, Dan Florin Ungureanu, Cosmin Modovan, Madalina Toba, Marinela Chirila, Elena Truta, **Daniel Cord**, *Cystic Hepatic GIST: A Case Report of Rare Presentation and Long-Term Survival*, Curr. Oncol. 2025, 32, 383 <https://doi.org/10.3390/currenocol32070383> , FI=3,4

Lucrări publicate în extenso ca prim autor în reviste indexate PubMed:

5. **Daniel Cord**, Mirela Claudia Rimbu, Liliana Popescu, *New prospects in oncotherapy: bioactive compounds from Taraxacum officinale*, Medicine and Pharmacy Reports, <https://doi.org/10.15386/mpr-2875>

Lucrări publicate în extenso, în calitate de co-autor

6. Sandulovici, Roxana Colette, Mihailescu Carmen-Marinela, Alexandru Grigoroiu, Carmen Aura Moldovan, Mihaela Savin, Viorel Ordeanu, Sorina Nicoleta Voicu, **Daniel Cord**, Gabriela Mariana Costache, Mona Luciana Galatanu, and et al. 2023. "The Physicochemical and Antimicrobial Properties of Silver/Gold Nanoparticles Obtained by "Green Synthesis" from Willow Bark and Their Formulations as Potential Innovative Pharmaceutical Substances" *Pharmaceuticals* 16, no. 1: 48. <https://doi.org/10.3390/ph16010048> FI=4,3

Lucrări prezentate la manifestări științifice naționale și internaționale:

7. **Daniel Cord**, Mirela Claudia Rimbu, Cristiana Tanase, *Alkaloid Constituents of Chelidonium majus L.: An Overview of Their Biological Activity and Toxicity*, Conferința cu participare internațională a Facultății de Medicină a Universității Titu Maiorescu, Abordări inovatoare transdisciplinare în medicina modernă, ediția a VIII-a, București, 16-18 mai 2025
8. Mirela Claudia Rîmbu, **Daniel Cord**, Raluca Neacșa, Cristiana Tănase, Mariana Popescu, *Chemopreventive potential of Taraxacum officinale: a natural approach to cancer prevention* (Abstract), International Conference, Education and creativity for a knowledge based society (18th edition), Universitatea Titu Maiorescu, november 21 - 23, 2024, București
9. Mariana Panțuroiu, Mona Luciana Gălățanu, Luiza Mădălina Cima, Roxana Măriuca Gavriloaia, Roxana Colette Sandulovici, Mariana Popescu, **Daniel Cord**, Mirela Claudia Rîmbu,

Evaluation of antioxidant activity and bioactive compound content in Silybum marianum, Cynara scolymus and Taraxacum officinale: Synergistic potential and therapeutic implications, International Conference, Education and creativity for a knowledge based society (18th edition), Universitatea Titu Maiorescu, november 21 - 23, 2024, București

10. Mirela Mihăilă, Marinela Bostan, Viviana Roman, Camelia Hotnog, Mariana Popescu, Roxana Colette Sandulovici, **Daniel Cord**, Mirela Claudia Rimbu, *Compositional study and evaluation of the antiproliferative action of Chelidonium majus extract on tumor cell lines*, Al 10-lea Congres al Federației Societății Române de Cancer, al 30-lea Congres al Societății Române de Radioterapie și al 35-lea Congres al Societății Române de Radioterapie și Oncologie Medicală, 24-27.10.2024, Sinaia, România (poster)