



**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL FARMACIE**

*Valorificarea superioară a resurselor vegetale indigene în
aplicații biomedicale*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. Cristina Elena Dinu-Pîrvu

Student-doctorand:

Ioana-Cătălina Fierăscu

2023

Cuprins

Lista figurilor și a tabelor

Lista publicațiilor și a prezentărilor în cadrul conferințelor internaționale

Lista abrevierilor

Introducere	Pag.	1
1. Nanotehnologia	Pag.	4
1.1. Nanomateriale și nanomedicină	Pag.	4
1.2. Dezvoltarea de nanoparticule metalice	Pag.	7
1.2.1. Metode de sinteză a nanoparticulelor	Pag.	7
1.2.2. Metode “verzi” de sinteză a nanoparticulelor	Pag.	11
2. Extractele naturale	Pag.	13
2.1. Metode de obținere a extractelor naturale	Pag.	15
2.2. Metode de separare și analiză	Pag.	19
2.2.1. Cromatografia de gaze cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS)	Pag.	19
2.2.2. Cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC)	Pag.	19
2.2.3. Cromatografia de partiție centrifugală (CPC)	Pag.	20
2.3. Teste fitochimice	Pag.	21
2.4. Aplicarea extractelor naturale în nanotehnologie	Pag.	22
2.4.1. Fitosinteza nanoparticulelor metalice	Pag.	22
2.4.2. Metode de caracterizare a nanoparticulelor fitosintetizate	Pag.	26
2.4.2.1. Metode bazate pe radiații ionizante	Pag.	26
2.4.2.2. Determinarea dimensiunii particulelor, greutatea moleculară și potențialului Z prin difuzia dinamică a luminii (DLS)	Pag.	27
2.4.2.3. Metode de microscopie electronică	Pag.	27
3. <i>Echinacea purpurea</i> L. și <i>Leonurus Cardiaca</i> L. - proprietăți și utilizări	Pag.	28
3.1. <i>Echinacea purpurea</i> L.	Pag.	28
3.1.1. Caracteristici	Pag.	28
3.1.2. Compoziție generală	Pag.	28
3.1.3. Aplicații medicale	Pag.	29
3.2. <i>Leonurus cardiaca</i> L.	Pag.	31

3.2.1. Caracteristici	Pag.	31
3.2.2. Compoziție generală	Pag.	32
3.2.3 Aplicații medicale	Pag.	32
4. Fitosinteza nanomaterialelor – principii și aplicații	Pag.	37
PARTE EXPERIMENTALĂ		
5. Materiale și metode	Pag.	45
5.1. Materiale vegetale utilizate	Pag.	45
5.2. Reactivi utilizați	Pag.	45
5.3. Obținerea extractelor naturale	Pag.	46
5.4. Fitosinteza nanoparticulelor de argint	Pag.	48
5.5. Obținerea formulărilor conținând nanoparticule de argint	Pag.	49
5.6. Tehnici de caracterizare	Pag.	49
5.7. Evaluarea proprietăților antioxidante	Pag.	55
5.8 Determinarea activității antimicrobiene	Pag.	56
5.9. Analiza statistică	Pag.	57
6. Caracterizarea extractelor și a nanoparticulelor de argint fitosintetizate	Pag.	58
6.1. Caracterizarea extractelor naturale	Pag.	58
6.2. Caracterizarea nanoparticulelor de argint fitosintetizate	Pag.	60
7. Evaluarea proprietăților biologice ale nanoparticulelor fitosintetizate	Pag.	90
7.1. Evaluarea activității antioxidante a nanoparticulelor de argint	Pag.	90
7.2. Evaluarea activității antimicrobiene a nanoparticulelor de argint	Pag.	93
8. Obținerea și caracterizarea unor formulări conținând nanoparticule fitosintetizate pentru aplicații topice	Pag.	100
8.1. Metode de obținere	Pag.	100
8.2. Caracterizarea formulărilor	Pag.	101
9. Concluzii și contribuții personale	Pag.	107
9.1. Concluzii	Pag.	107
9.2. Contribuții personale	Pag.	110
9.3. Direcții viitoare de cercetare	Pag.	111
Bibliografie	Pag.	112

Lista lucrărilor științifice publicate

Articole în reviste cotate ISI

a. Articole publicate în zona roșie (Q1)

- **Fierăscu I.C.**, Fierăscu I., Fierăscu R.C., Velescu B.Ș., Dinu-Pârvu C.E., *Phytosynthesis of Silver Nanoparticles using Leonurus Cardiac L. extracts*, *Materials*, 2023, 16(9), 3472; <https://doi.org/10.3390/ma16093472> (Q1, conform AIS publicat de UEFISCDI - <https://uefiscdi.gov.ro/resource-866361-cuartile.ais.jcr.19.oct.2022.zone.pdf>) – *AUTOR PRINCIPAL*;
- **Fierăscu I.C.**, Fierăscu I., Baroi A.M., Ungureanu C., Ortan A., Avramescu S.M., Somoghi R., Fierăscu R.C., Dinu-Pârvu C.E., *Phytosynthesis of biological active nanoparticles using Echinacea purpurea L. extracts*, *Materials*, 2022, 15(20), 7327; <https://doi.org/10.3390/ma15207327> (Q1, conform AIS publicat de UEFISCDI - <https://uefiscdi.gov.ro/resource-866361-cuartile.ais.jcr.19.oct.2022.zone.pdf>) – *AUTOR PRINCIPAL*; 4 citări (SCOPUS).
- Fierăscu I., **Fierăscu I.C.**, Brazdis R., Baroi A., Fistos T., Fierăscu R., *Phytosynthesized Metallic Nanoparticles- between Nanomedicine and Toxicology. A Brief Review of 2019's Findings*, *Materials*, 2020, 13(3), 574; <https://doi.org/10.3390/ma13030574> (Q1, conform IF - <https://uefiscdi.gov.ro/resource-820921-if2021.pdf> și AIS - <https://uefiscdi.gov.ro/resource-820923-ais2021.pdf>, liste publicate de UEFISCDI); 30 citări (SCOPUS).
- Fierăscu R., Orțan A., **Fierăscu I.C.**, Fierăscu I., *In vitro and in vivo evaluation of antioxidant properties of wild-growing plants. A short review*, *Current Opinion in Food Science*, 2018, Volume 24, Pages 1-8, <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.08.006> (Q1, conform IF - <https://uefiscdi.gov.ro/resource-822843> și AIS - <https://uefiscdi.gov.ro/resource-822841>, liste publicate de UEFISCDI); 37 citări (SCOPUS).

b. Articole publicate în zona galbenă (Q2)

- Fierăscu R., Fierăscu I., Orțan A., Fierăscu I.C., Anuța V., Velescu B., Pituru S., Dinu-Pirvu C., *Leonurus cardiaca L. as a Source of Bioactive Compounds: An update of the European Medicines Agency Assessment Report*, *BioMed Research International*, 2019, <https://doi.org/10.1155/2019/4303215> (Q2, conform AIS - <https://uefiscdi.gov.ro/resource->

[821878-clasament2020.ais.pdf](#) publicat de UEFISCDI) – *AUTOR CU CONTRIBUȚIE EGALĂ* (conform Acknowledgement lucrare); 6 citări (SCOPUS).

- Fierăscu I., **Fierăscu I.C.**, Dinu-Pârvu C., Fierăscu R., Anuța V., Velescu B., Jinga M., Jinga V., *A Short Overview of Recent Developments on Antimicrobial Coatings Based on Phytosynthesized Metal Nanoparticles*, *Coatings*, 2019, 9(12), 787; <https://doi.org/10.3390/coatings9120787> (Q2, conform AIS - <https://uefiscdi.gov.ro/resource-821878-clasament2020.ais.pdf>, publicat de UEFISCDI); 21 citări (SCOPUS).

c. Articole publicate în zona gri (Q3 & Q4)

- Fierăscu R., Fierăscu I.C., Dinu-Pârvu C., Fierăscu I., Paunescu A., *The application of essential oils as a next-generation of pesticides: recent developments and future perspectives*, *Zeitschrift fur Naturforschung C*, 2019, Jul 28;75(7-8):183-204, <https://doi.org/10.1515/znc-2019-0160>; 33 Citări (SCOPUS)

Mulțumiri

Aș dori să încep această pagină de mulțumiri exprimându-mi recunoștința și aprecierea profundă pentru toți cei care au contribuit la reușita acestei teze de doctorat. Procesul de cercetare și scriere a acestei lucrări a fost lung și provocator, iar fără sprijinul și îndrumarea acestor persoane, această realizare nu ar fi fost posibilă.

În primul rând, aș dori să îi mulțumesc doamnei Prof. Dr. Cristina-Elena Dinu-Pîrvu, pentru că a fost o sursă inestimabilă de cunoștințe, înțelepciune și îndrumare pe parcursul întregului meu program de doctorat. Cu răbdare și dedicație, ați ghidat fiecare etapă a cercetării mele și m-ați încurajat să depășesc limitele mele intelectuale. Sunt profund recunoscătoare pentru încrederea pe care ați avut-o în mine și pentru că ați fost un exemplu inspirațional.

De asemenea, aș dori să mulțumesc doamnelor Prof. Dr. Lăcrămioara Popa, Prof. Dr. Mihaela Ghica și Conf. Dr. Andreea Arsene, care în calitate de membri ai comisiei de îndrumare, mi-au oferit evaluarea atentă a muncii mele și feedback constructiv. Opiniile voastre au fost esențiale în îmbunătățirea calității tezei mele.

În plus, doresc să mulțumesc colaboratorilor Radu-Claudiu Fierăscu, Irina Fierăscu, Alina Orțan, Camelia Ungureanu, Sorin Marius Avramescu, Anda-Maria Baroi, Raluca Somoghi, Simona Spinu, Simona-Georgiana Burlacu și Daniela Ionescu, pentru resursele puse la dispoziție și pentru mediu propice cercetării.

Nu aș fi reușit să duc la bun sfârșit acest proiect fără sprijinul familiei și prietenilor mei. În mod special, aș dori să îi mulțumesc fratelui meu, Radu, pentru încurajarea oferită pe parcursul acestei călătorii academice. Vă mulțumesc pentru susținerea voastră necondiționată și pentru că ați fost alături de mine în momentele dificile.

Acest proiect a fost o experiență de învățare profundă și m-a ajutat să mă dezvolt ca individ și ca cercetător. Sunt profund recunoscătoare pentru toți cei care au contribuit la această realizare și pentru că au fost alături de mine în această călătorie academică.

Introducere

Ultimele decenii au fost martorii unui interes ridicat din partea comunității științifice privind obținerea și caracterizarea nanoparticulelor metalice prin metodele chimiei verzi, având drept scop final eliminarea sau reducerea utilizării și generării de substanțe periculoase pentru sănătatea umană și pentru mediu [1].

În cadrul programului de studii doctorale au fost efectuate cercetări cu privire la utilizarea eficientă a resurselor vegetale autohtone pentru fitosinteza de nanoparticule de argint, în contextul aplicațiilor biomedicale. Scopul principal al acestei teze a fost dezvoltarea unei metodologii care să permită utilizarea resurselor vegetale autohtone în domeniul nanotehnologiei, cu aplicabilitate practică în domeniul biomedicinii. În cadrul acestui studiu, a fost demonstrată capacitatea extractelor de *L. cardiaca* și *E. purpurea* de a fitosinteza nanoparticule de argint cu activități biologice relevante.

Stadiul actual al cunoașterii

1. Nanotehnologia

În anul 1974 Norio Taniguchi, de la Tokyo Science University, a definit termenul de „nanotehnologie” ca fiind prelucrarea, separarea, consolidarea și deformarea materialelor de către un atom sau o moleculă. Utilizarea nanotehnologiei în tratamentul, diagnosticarea și controlul bolilor poartă denumirea de „nanomedicină” [2].

Din categoria clasei de metode de sinteză a nanoparticulelor asociate „chimiei verzi”, fitosinteza reprezintă una dintre cele mai promițătoare alternative. Această metodă presupune utilizarea extractelor de plante și biocomponentelor acestora (în special compuși fenolici) ca agenți reducători în reacțiile de formare a nanoparticulelor, precum și ca agenți de stabilizare a nanoparticulelor formate.

2. Extracte naturale

De-a lungul timpului, plantele au fost valorificate într-o varietate de domenii, datorită prezenței substanțelor biologic active în compoziția lor. De-a lungul evoluției umanității,

numeroși autori au investigat atât capacitățile antioxidante, cât și cele antimicrobiene ale plantelor, avansând ideea utilizării lor în diverse industrii, cum ar fi industria alimentară sau farmaceutică [3].

Proprietățile fizico-chimice și opto-electronice ale nanoparticulelor metalice sunt strâns dependente de morfologia și dimensiunile particulelor, fiind determinate de acestea. În ultimele decenii, au fost dezvoltate nanoparticule cu diferite compoziții, forme, mărimi și polidispersie. [4].

Metalele nobile, în mod special Au și Ag, au fost testate intens în procesele de fitosinteză pentru a se obține nanoparticule metalice cu formă și mărime controlabilă [5].

3. *Echinacea purpurea* L. și *Leonurus cardiaca* L. – proprietăți și utilizări

În ciuda faptului că izolarea cât și structura compușilor principali ai *Echinacea purpurea* L. au fost intens studiate, legat de mecanismul de acțiune nu există un consens general în rândul cercetătorilor. Principalii constituenți ai plantei sunt considerați derivații de acid cafeic, alcamidele și polizaharidele. Studiile au sugerat că alcamidele au rol principal în proprietățile imunomodulatoare ale extractelor de *E. purpurea*, iar acidul cafeic poate fi utilizat atât pentru identificarea cât și pentru controlul calității extractelor [6].

Compoziția *Leonurus cardiaca* L. este formată din diterpene furanice, alcaloizi, sterol, iridoizi, flavonoide, minerale și altele [7]. Rusch și colab. au identificat în extractul de *Leonurus cardiaca* L. prezența unui glucozid iridoid major clorurat [8]. Kuchta și colab. au cuantificat utilizând RP-HPLC prezența acidului ferulic, acidului clorogenic, acidului cafeic, rutozidei, lavandulifoliosidei, verbacozidei și izoquercitrinei în extractul de *Leonurus cardiaca* L., precum și stachidrina în diferite părți ale plantei [9, 10].

4. Fitosinteza nanomaterialelor – principii și aplicații

Nanotehnologia reprezintă știința care se ocupă cu obținerea de particule, dispozitive și sisteme la scară nano. Aceste materiale și dispozitive pot fi proiectate pentru a interacționa cu celulele și țesuturile la nivel molecular cu un grad ridicat de specificitate funcțională, permițând astfel integrarea dintre dispozitiv și sistemul biologic [11]. Domeniul emergent al

nanotehnologiei nu este o singură disciplină științifică, implicând oameni de știință din mai multe domenii diferite, inclusiv fizicieni, chimiști, ingineri și biologi. În prezent, nanotehnologia câștigă importanță în biologie datorită dimensiunilor sale mici și a efectelor vizate. Nanoparticulele pot fi realizate dintr-o gamă largă de materiale, cum ar fi metalele (aur, argint), oxizi de metal, dioxid de siliciu, materiale anorganice, materiale polimerice și lipide. [12].

Contribuții personale

5. Materiale și metode

Uscarea materialului vegetal, flori pentru Echinacea (*Echinacea purpurea* L.) și respectiv partea aeriană pentru Talpa găștei (*Leonurus cardiaca* L.) s-a realizat ferit de acțiunea directă a soarelui, uscarea fiind considerată finalizată la atingerea unei mase constante. O dată uscat, materialul vegetal a fost mărunțit și păstrat la întuneric și în mediu cu umiditate controlată, în vederea folosirii ulterioare.

Pentru obținerea extractelor naturale au fost selectate două metode de extracție, care, în conformitate cu datele de literatură, asigură atât extracția principiilor active, cât și posibilități de ridicare la scară, în vederea unor aplicații la nivel industrial [13].

Extracția clasică – produsul vegetal, care anterior a fost mărunțit, a fost supus extracției clasice la temperatură, utilizând ca solvent un amestec hidroalcoolic, în raport etanol:apă = 1:1; pentru extracție a fost utilizată etuva Memmert UN 110, timp de extracție 3 ore la o temperatură de 70°C. Extractul obținut a fost în final filtrat utilizând hârtie de filtru.

Extracția asistată de microunde – produsul vegetal mărunțit împreună cu solventul hidroalcoolic, etanol:apă = 1:1, au fost încălzite împreună utilizând energia microundelor, folosind un echipament Ethos Easy Advanced Microwave Digestion System, probele fiind în final filtrate.

După obținerea și filtrarea extractelor, acestea au fost reduse. După îndepărtarea a peste 90% din solvent, extractul a fost uscat prin liofilizare în vederea conservării proprietăților extractului, pe de o parte, și pentru prelungirea duratei de păstrare a acestuia, pe de altă parte. Extractele astfel uscate au fost păstrate la congelator în vederea utilizării ulterioare.

Pentru obținerea dispersiilor de nanoparticule de argint fitosintetizate, au fost utilizate extractele uscate realizate anterior, redizolvate în apă purificată la diverse

concentrații (5, 2,5, 2, 1,25, respectiv 1 mg/mL) și mixate cu soluția de azotat de argint, în raport extract/sare metalică 1:1.

Tabel 5.2. Codificarea probelor de nanoparticule de argint fitosintetizate

Extract (cf. tabel 7.1)	Concentrație extract (mg/mL)	Codificare
E _c	5.00	EE5
	2.50	EE2.5
	2.00	EE2
	1.25	EE1.25
	1.00	EE1
E _{mw}	5.00	EM5
	2.50	EM2.5
	2.00	EM2
	1.25	EM1.25
	1.00	EM1
L _c	5.00	LE5
	2.50	LE2.5
	2.00	LE2
	1.25	LE1.25
	1.00	LE1
L _{mw}	5.00	LM5
	2.50	LM2.5
	2.00	LM2
	1.25	LMI.25
	1.00	LMI

Gelul care a servit ca vehicul pentru încorporarea extractelor conținând nanoparticule, precum și gelul-martor au fost preparate din Carbopol 940 (Sigma-Aldrich).

6. Caracterizarea extractelor și a nanoparticulelor de argint fitosintetizate

Conținutul total de compuși fenolici și flavonoide în extractele obținute sunt redate în tabelul 6.1.

Tabelul 6.1. Conținutul total de compuși fenolici și flavonoide în extractele analizate. Valorile reprezintă media a cinci determinări ± SE; valorile din aceeași coloană fără o literă superscriptă comună diferă din punct de vedere statistic (P<0,05), așa cum au fost analizate prin metoda ANOVA unidirecțională și testul TUKEY.

crt.	xtract	Conținut total de compuși fenolici (μg GAE/g)	Conținut total flavonoide (mg RE/g)
1	E _c	790,23±12,51 ^a	71,54±0.53 ^a

2	E_{mw}	$672,25 \pm 14,83^b$	$72,82 \pm 0,44^a$
3	L_e	$537,75 \pm 15,44^c$	$40,80 \pm 0,29^b$
4	L_{mw}	$422,13 \pm 14,15^d$	$40,91 \pm 0,17^b$

Conform rezultatelor prezentate, metoda clasică de extracție (utilizând extracția la temperatură) reprezintă o metodă mai eficientă pentru extracția compușilor fenolici, față de extracția cu microunde. De asemenea, Echinacea prezintă, în ambele metode de extracție, un conținut mai ridicat de compuși fenolici, în comparație cu Talpa-gâștei.

În ceea ce privește determinarea conținutului total de flavonoide, se poate observa absența unor diferențe statistice semnificative între cele două metode de extracție, extractele de Echinacea fiind mai bogate în flavonoide, comparativ cu cele de Talpa gâștei; de asemenea, conținutul de flavonoide este mai ridicat în extractele de Echinacea, comparativ cu datele de literatură iar în extractele de Talpa gâștei conținutul total de flavonoide este comparabil cu datele obținute pentru extracte purificate [14].

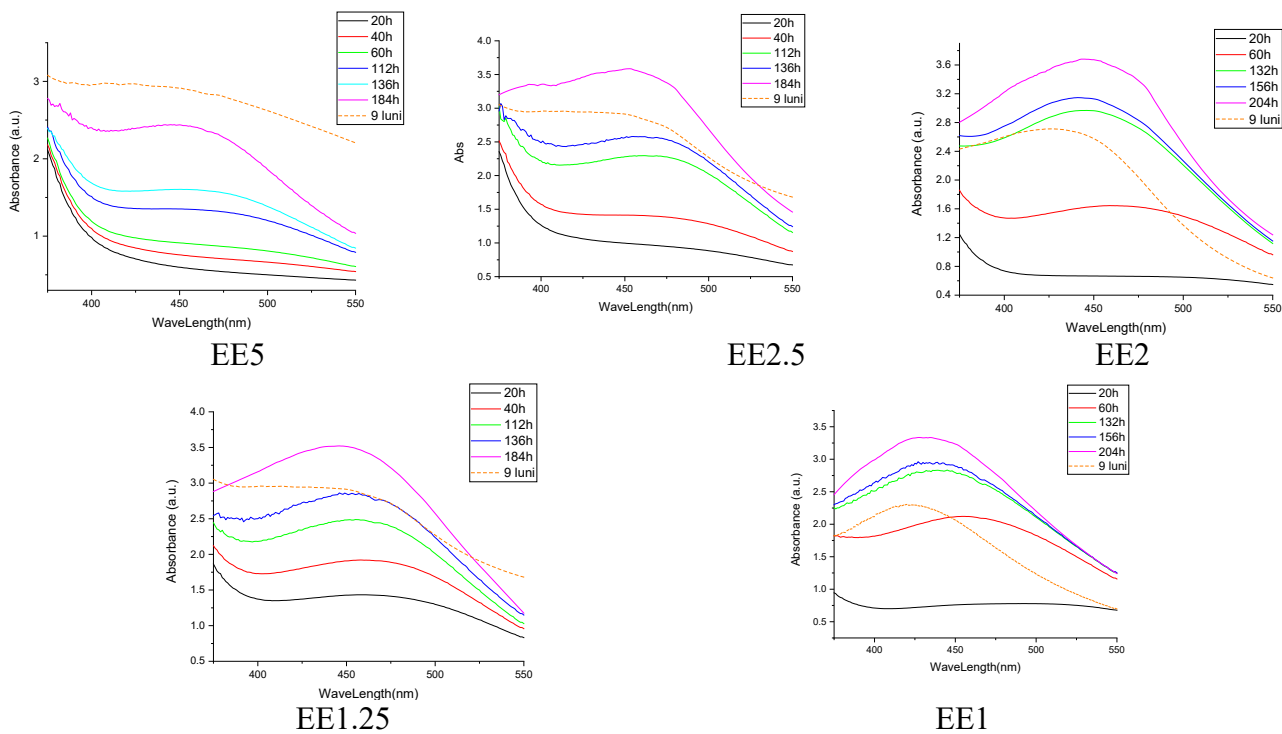


Figura 6.2. Spectrele UV-Vis pentru fitosinteza nanoparticulelor de argint utilizând extractele de Echinacea obținute prin metoda de extracție clasică

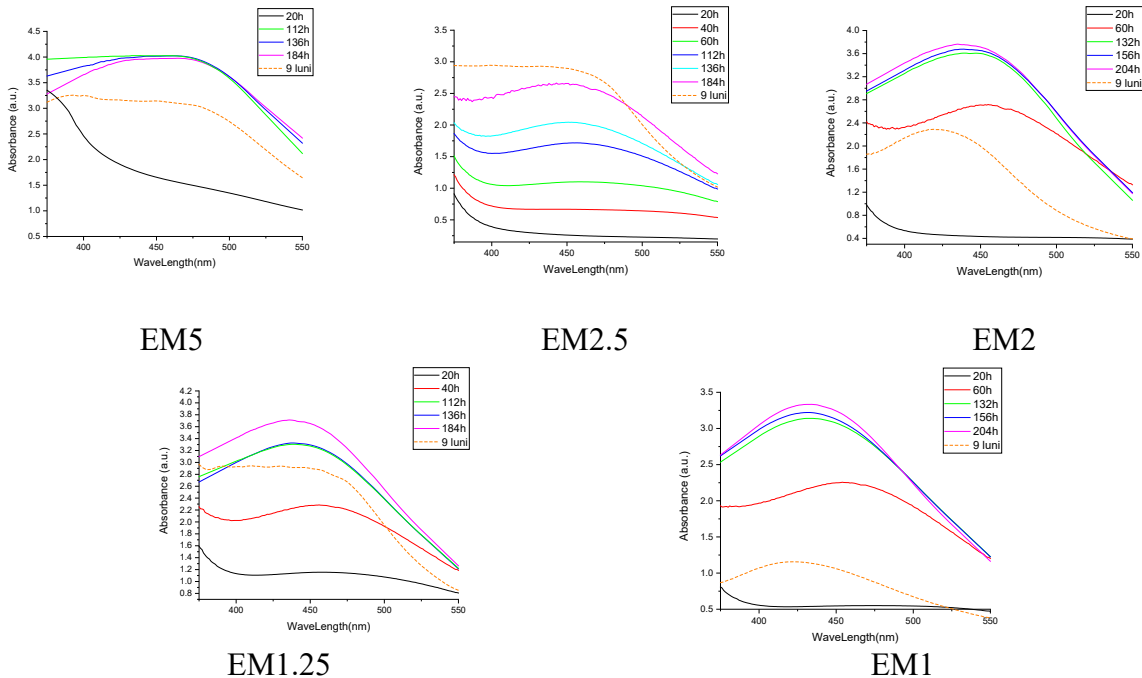


Figura 6.3. Spectrele UV-Vis pentru fitosinteza nanoparticulelor de argint utilizând extractele de Echinacea obținute prin metoda de extracție asistată microunde

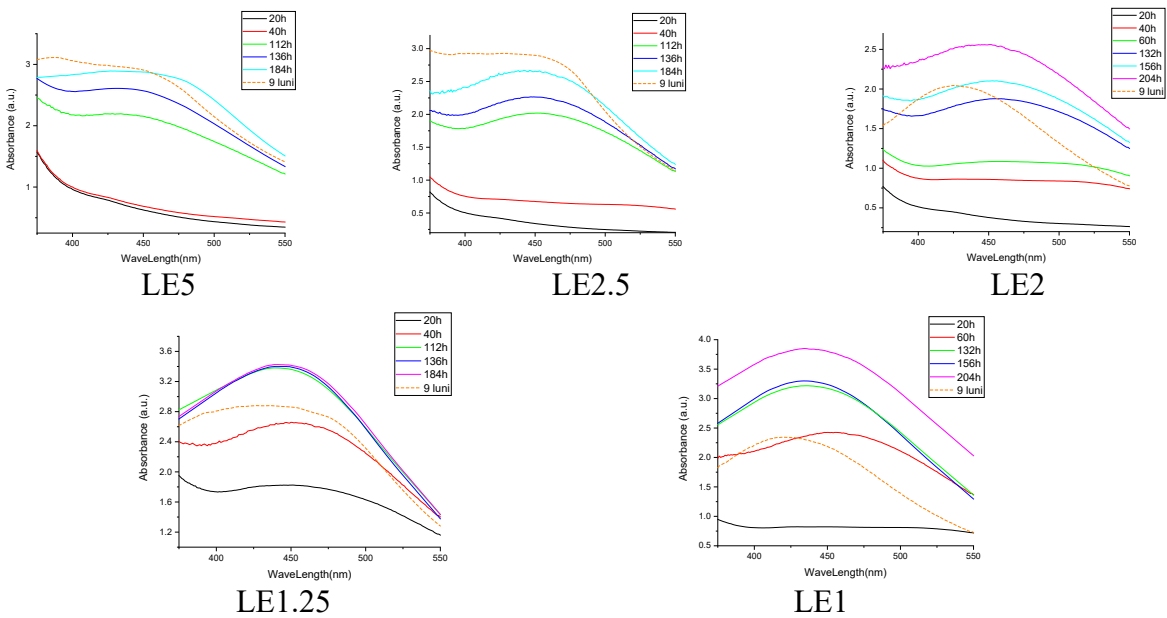


Figura 6.4. Spectrele UV-Vis pentru fitosinteza nanoparticulelor de argint utilizând extractele de Talpa găștei obținute prin metoda de extracție clasică

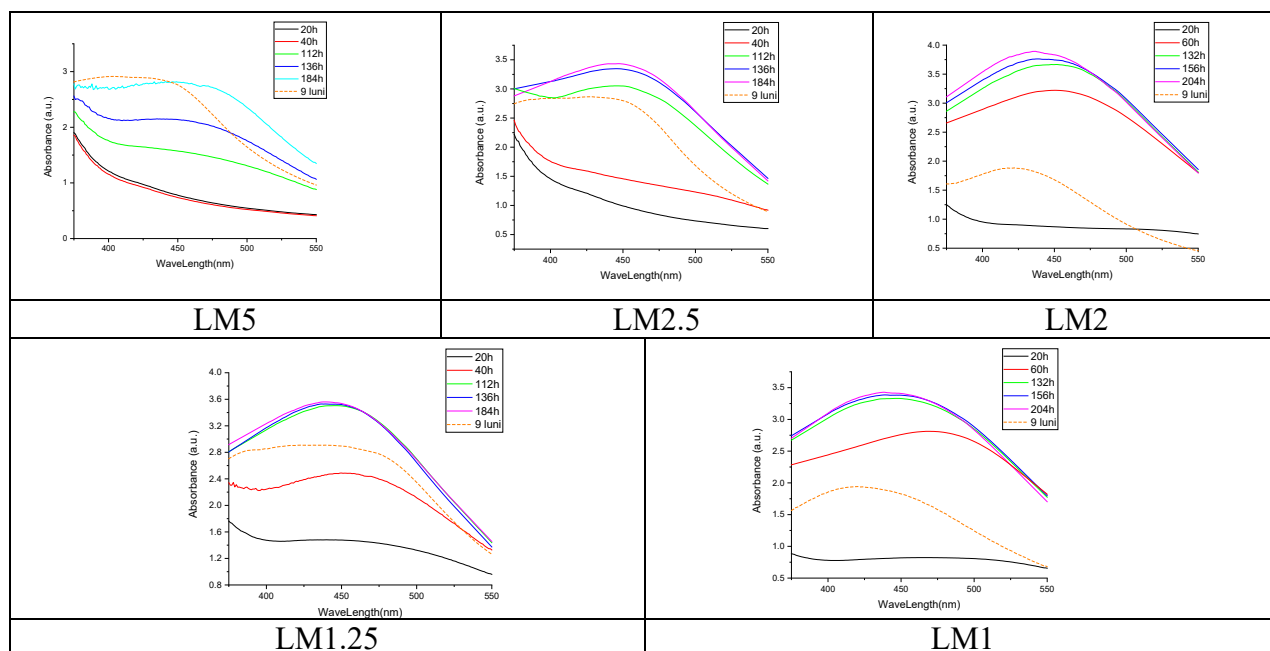


Figura 6.5. Spectrele UV-Vis pentru fitosinteza nanoparticulelor de argint utilizând extractele de Talpa gâștei obținute prin metoda de extracție asistată microunde

Acest studiu investighează procesul de sinteză a nanoparticulelor de argint utilizând extracte din două plante diferite, Echinacea și Talpa gâștei. Sinteza are loc prin diverse metode de extracție și implică variate concentrații de extracte din plante. Rezultatele obținute arată că parametrii critici, precum concentrația de extract și metoda de extracție, au un impact semnificativ asupra formării și stabilității nanoparticulelor rezultate.

În linii generale, majoritatea nanoparticulelor produse au manifestat o bună stabilitate, fără a prezenta tendințe semnificative de agregare sau modificări majore ale proprietăților lor la supravegherea în timp. Cu toate acestea, s-au observat câteva excepții în ceea ce privește comportamentul nanoparticulelor, în special în cazul unor concentrații foarte scăzute de extracte sau în anumite condiții experimentale.

Concluzia principală a studiului este că procesul de fitosinteză a nanoparticulelor de argint poate fi controlat și optimizat prin ajustarea concentrației de extract din plante și a metodei de extracție în funcție de tipul de plantă utilizat și de scopul sintezei.

Având în vedere toate rezultatele obținute, pentru evaluarea morfologiilor nanoparticulelor au fost selectate câte două probe pentru fiecare set de nanoparticule fitosintetizate (cea de concentrație maximă, respectiv o concentrație medie – 2 mg/mL).

Pentru analiză, o picătură de extract conținând dispersia de nanoparticule a fost plasată în centrul unei grile de cupru, uscată și supusă analizei microscopice.

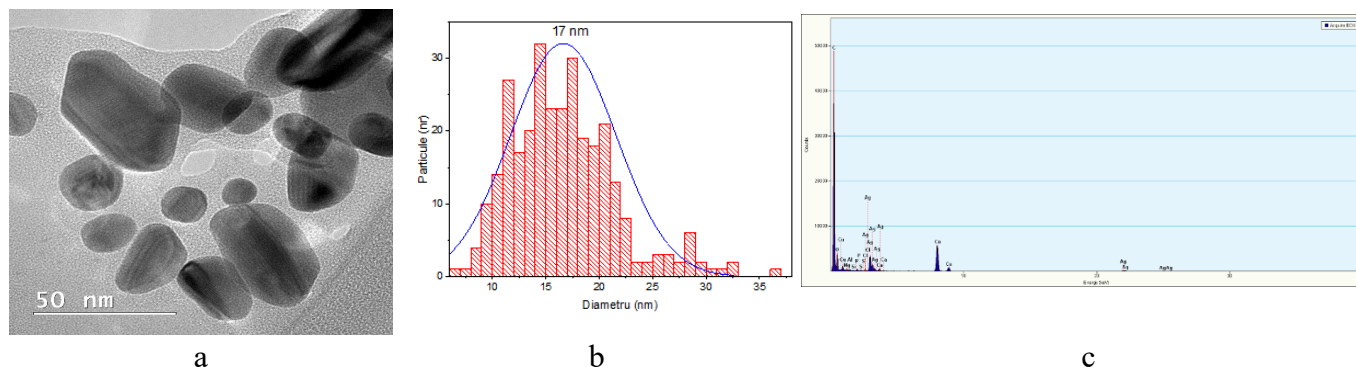


Figura 6.18 Rezultatele TEM obținute pentru proba EE5: a) imagine TEM reprezentativă pentru morfologia nanoparticulelor, b) distribuția dimensiunilor AgNP, determinată din 150 de măsurători, c) spectrul EDX al probei analizate

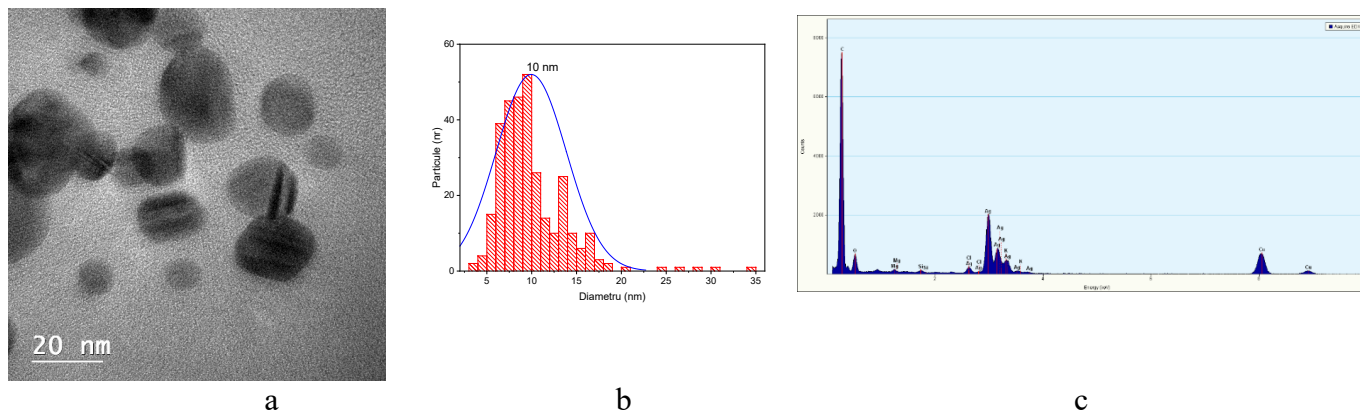


Figura 6.19. Rezultatele TEM obținute pentru proba EE2: a) imagine TEM reprezentativă pentru morfologia nanoparticulelor, b) distribuția dimensiunilor AgNP, determinată din 150 de măsurători, c) spectrul EDX al probei analizate

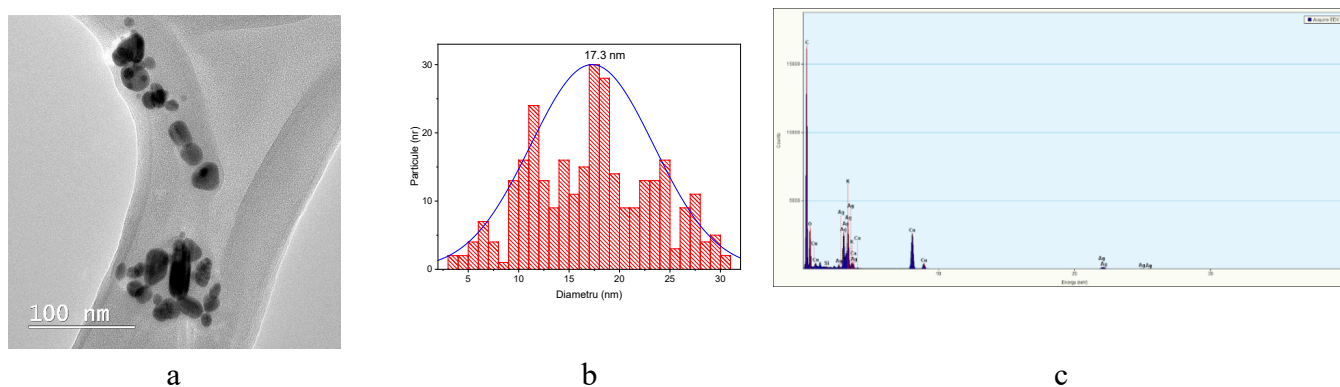


Figura 6.20. Rezultatele TEM obținute pentru proba EM5: a) imagine TEM reprezentativă pentru morfologia nanoparticulelor, b) distribuția dimensiunilor AgNP, determinată din 150 de măsurători, c) spectrul EDX al probei analizate

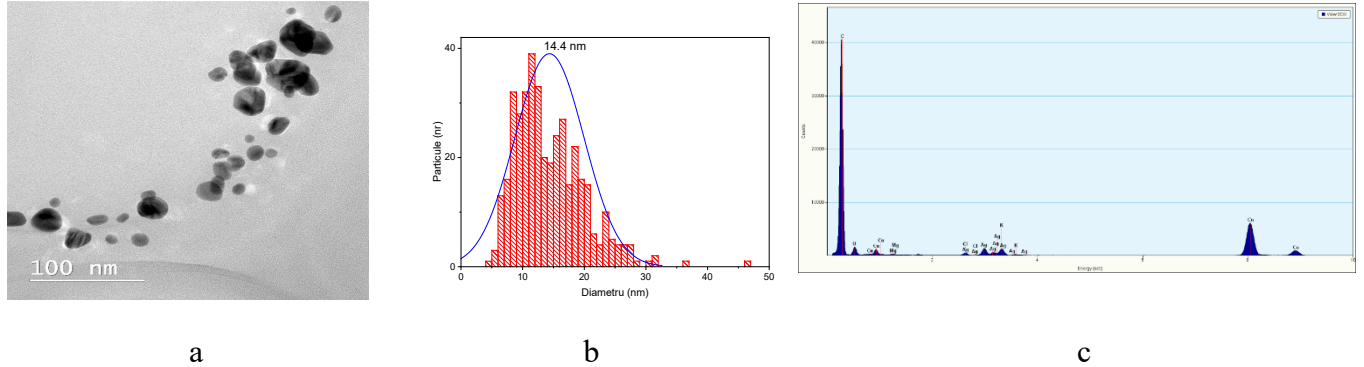


Figura 6.21. Rezultatele TEM obținute pentru proba EM2: a) imagine TEM reprezentativă pentru morfologia nanoparticulelor, b) distribuția dimensiunilor AgNP, determinată din 150 de măsurători, c) spectrul EDX al probei analizate

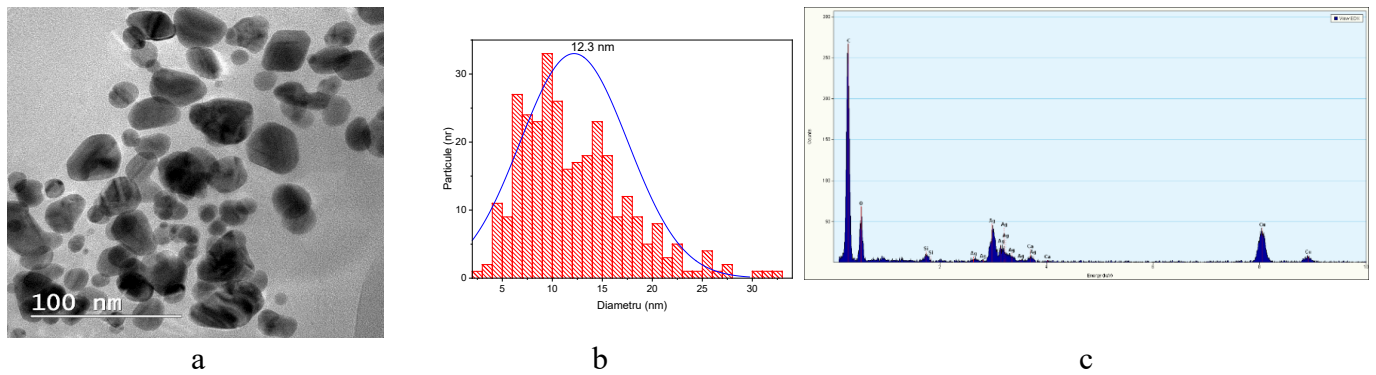


Figura 6.22. Rezultatele TEM obținute pentru proba LE5: a) imagine TEM reprezentativă pentru morfologia nanoparticulelor, b) distribuția dimensiunilor AgNP, determinată din 150 de măsurători, c) spectrul EDX al probei analizate

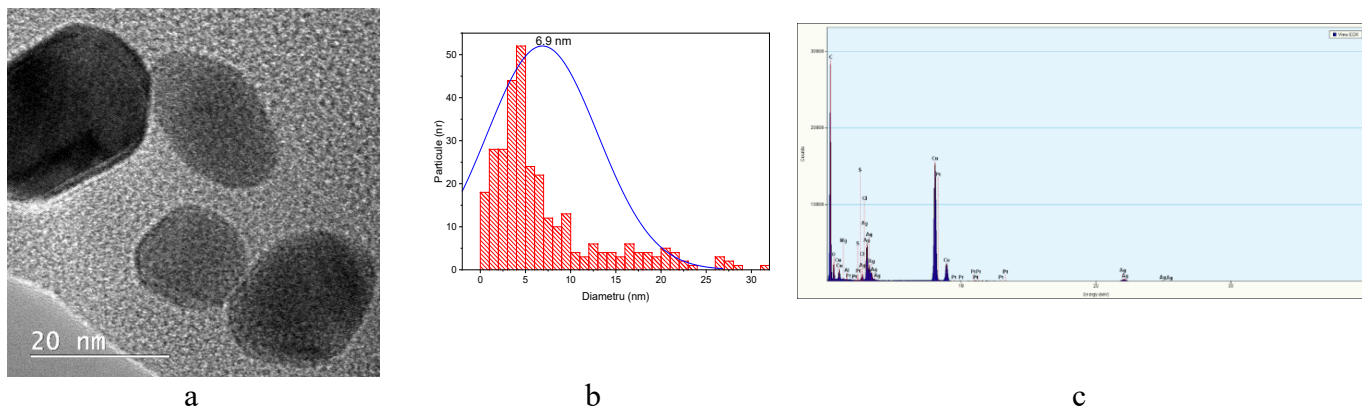


Figura 6.23. Rezultatele TEM obținute pentru proba LE2: a) imagine TEM reprezentativă pentru morfologia nanoparticulelor, b) distribuția dimensiunilor AgNP, determinată din 150 de măsurători, c) spectrul EDX al probei analizate

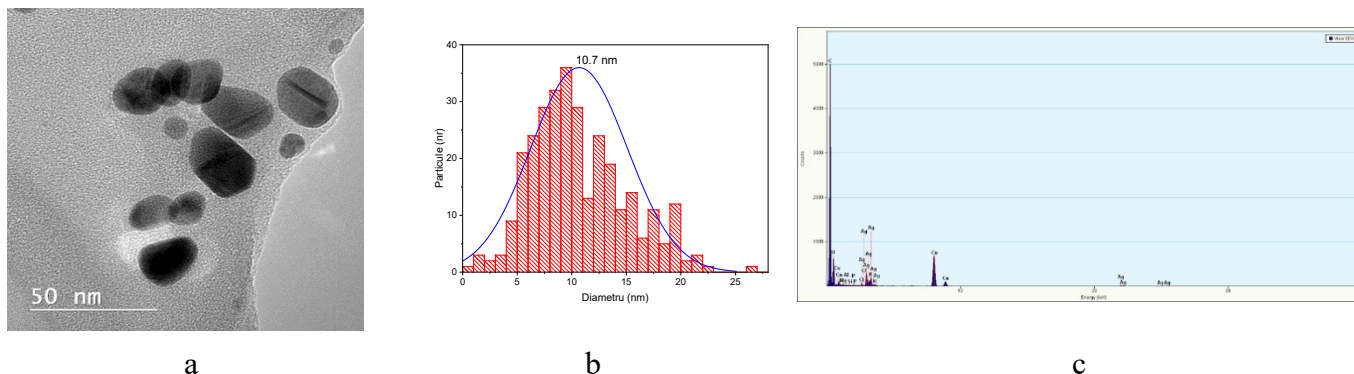


Figura 6.24. Rezultatele TEM obținute pentru proba LM5: a) imagine TEM reprezentativă pentru morfologia nanoparticulelor, b) distribuția dimensiunilor AgNP, determinată din 150 de măsurători, c) spectrul EDX al probei analizate

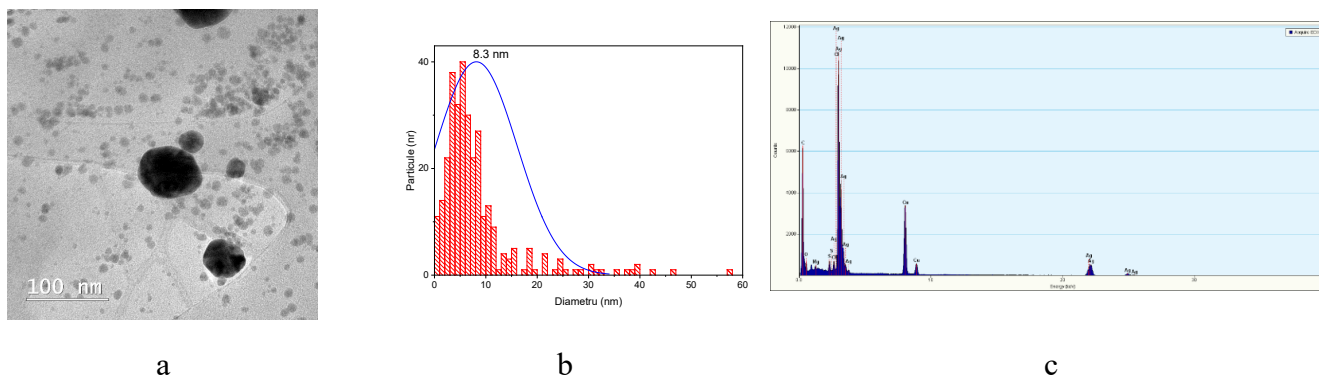


Figura 6.25. Rezultatele TEM obținute pentru proba LM2: a) imagine TEM reprezentativă pentru morfologia nanoparticulelor, b) distribuția dimensiunilor AgNP, determinată din 150 de măsurători, c) spectrul EDX al probei analizate

Analizele TEM confirmă sinteza de nanoparticule cu morfologii sferice sau semi-sferice, cu dimensiuni sub 15 nm în general, cu tendința de a forma nanoparticule cu dimensiuni mai mici la utilizarea unor soluții de extract cu concentrație mai mică. Spectrele EDX confirmă în toate cazurile sinteza nanoparticulelor de argint, elementele suplimentare prezente în spectru fiind datorate fie grilelor de analiză TEM, fie elementelor prezente în fitocompnenți.

7. Evaluarea proprietăților biologice ale nanoparticulelor fitosintetizate

Grafic, rezultatele evaluării activității antioxidante ale nanoparticulelor fitosintetizate, comparativ cu rezultatele obținute pentru extractele corespunzătoare sunt prezentate în figura 7.1.

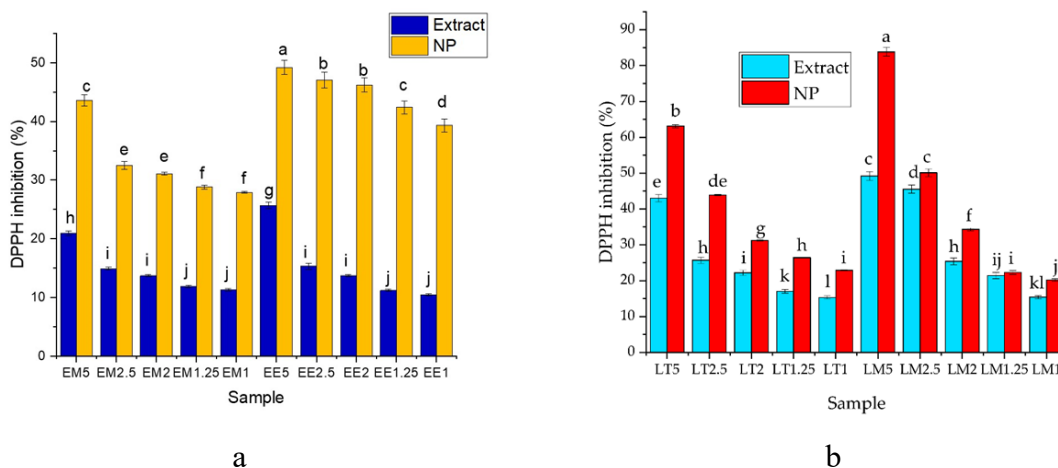
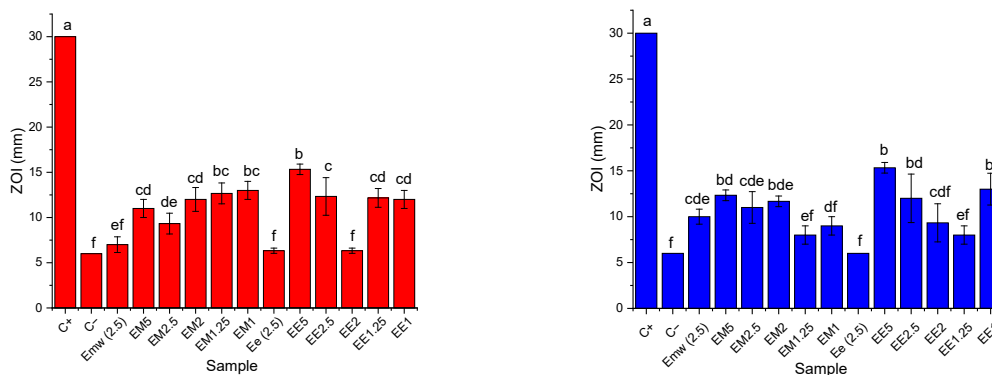


Figura 7.1. Rezultatele activității antioxidante pentru probele de nanoparticule fitosintetizate utilizând extracte de Echinacea (a), respectiv Talpa Gâștei (b), comparativ cu extractele naturale corespunzătoare. Rezultatele reprezintă media a cinci determinări \pm SD; valorile fără o literă superscriptă comună diferă din punct de vedere statistic ($P < 0,05$), așa cum au fost analizate prin metoda ANOVA unidirecțională și testul TUKEY.

În studiul analizat, se investighează activitatea antioxidantă a extractelor vegetale obținute din plante precum Echinacea și Talpa gâștei, prin utilizarea diferitelor metode de extracție. Rezultatele principale includ creșterea activității antioxidante odată cu concentrarea extractelor și variații semnificative în activitatea antioxidantă după fitosinteza [15, 16]. Interesant este faptul că nu se poate stabili o corelație clară între activitatea antioxidantă și conținutul de compuși fenolici sau flavonoide. De asemenea, se sugerează că extracția asistată de microunde poate fi mai eficientă în obținerea de extracte bogate în compuși.



(a)

(b)

Figura 7.3 Activitatea antimicrobiană a nanoparticulelor de argint fitosintetizate utilizând extracte de Echinacea, testate împotriva: a) *Candida albicans* ATCC 64548 și b) *Escherichia coli* ATCC 64548; C+ - control pozitiv; C- - control negativ (apă); Emw (2,5)—extract asistat de microunde la 2,5 mg/mL; Ee (2,5)—extract clasic la temperatură la 2,5 mg/mL. Valorile reprezintă media \pm SE, n = 3 per grup de tratament; valorile fără o literă superscriptă comună diferă statistic ($p < 0,05$), așa cum sunt analizate prin ANOVA unidirecțională și testul TUKEY

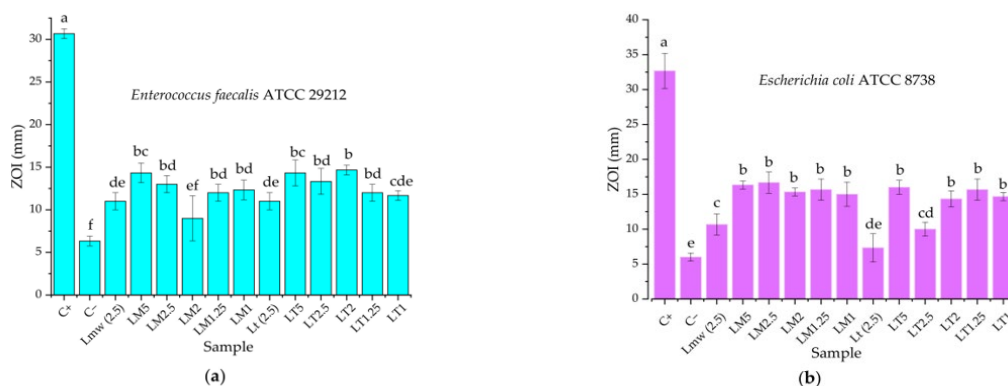


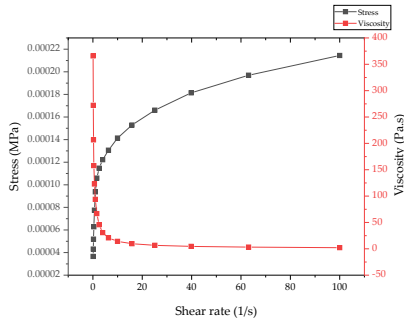
Figura 7.4 Activitatea antimicrobiană a nanoparticulelor de argint fitosintetizate utilizând extracte de Talpa Gâștei, testate împotriva: a) *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 și b) *Escherichia coli* ATCC 64548; C+ - control pozitiv; C- - control negativ (apă); Emw (2,5)—extract asistat de microunde la 2,5 mg/mL; Ee (2,5)—extract clasic la temperatură la 2,5 mg/mL. Valorile reprezintă media \pm SE, n = 3 per grup de tratament; valorile fără o literă superscriptă comună diferă statistic ($p < 0,05$), așa cum sunt analizate prin ANOVA unidirecțională și testul TUKEY

În acest studiu, s-au investigat proprietățile antimicrobiene ale nanoparticulelor fitosintetizate utilizând extracte de *E. purpurea* și *L. cardiaca*. Pentru nanoparticulele cu extracte de Echinacea, s-a constatat că activitatea antimicrobiană crește odată cu concentrația extractului, atinge un platou și apoi crește din nou, indicând importanța dimensiunilor nanoparticulelor.

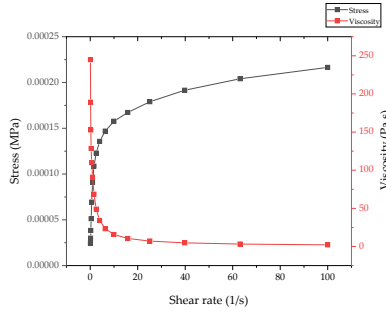
Nanoparticulele obținute cu extracte de Talpa Gâștei au prezentat o activitate antimicrobiană bună împotriva bacteriilor Gram-negative și Gram-pozitive, cu cele mai bune rezultate pentru anumite concentrații ale extractelor. Acest studiu sugerează esențialitatea controlului dimensiunilor nanoparticulelor și că aceste nanoparticule pot fi utile pentru dezvoltarea de agenți antimicrobieni eficienți.

8. Obținerea și caracterizarea unor formulări conținând nanoparticule fitosintetizate pentru aplicații topice

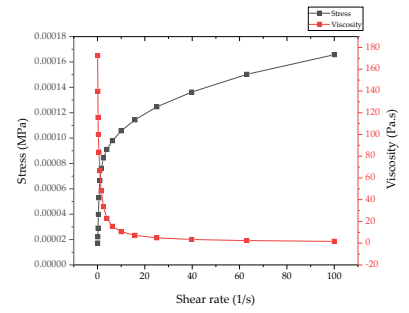
Pentru dezvoltarea formulărilor cu conținut de nanoparticule de argint fitosintetizate au fost selectate nanoparticulele obținute prin intermediul extractelor de Talpa găștei.



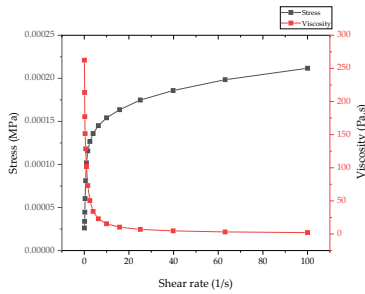
LE1



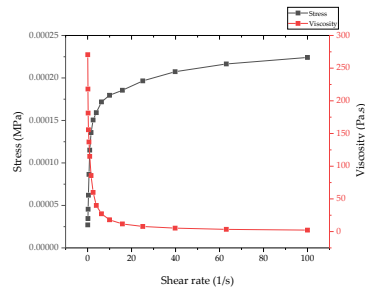
LE1.25



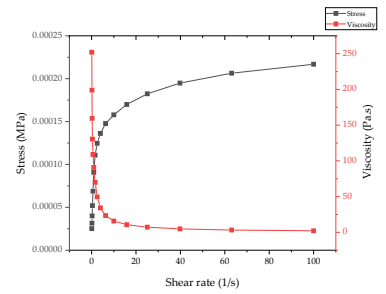
LE2



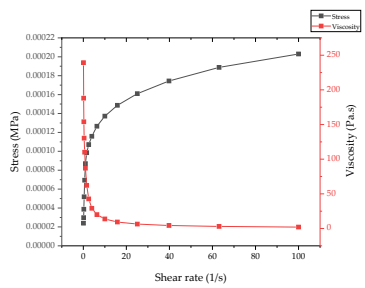
LE2.5



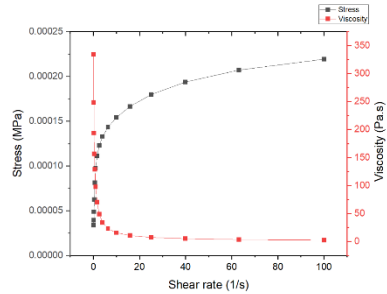
LE5



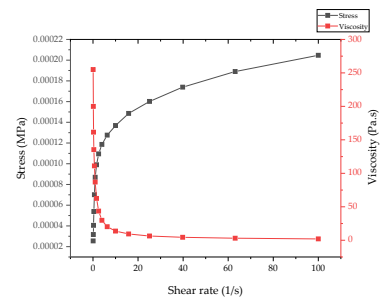
LM1



LM1.25



LM2



LM2.5

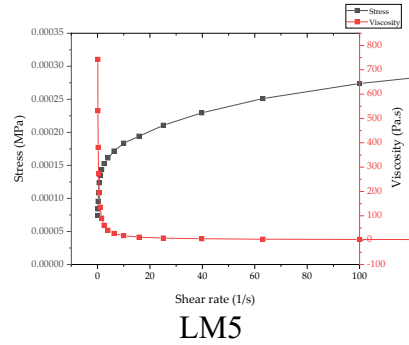


Figura 8.1 Reogramele cumulate tensiune de forfecare în funcție de viteză de forfecare, respectiv vâscozitate în funcție de viteză de forfecare pentru gelurile testate

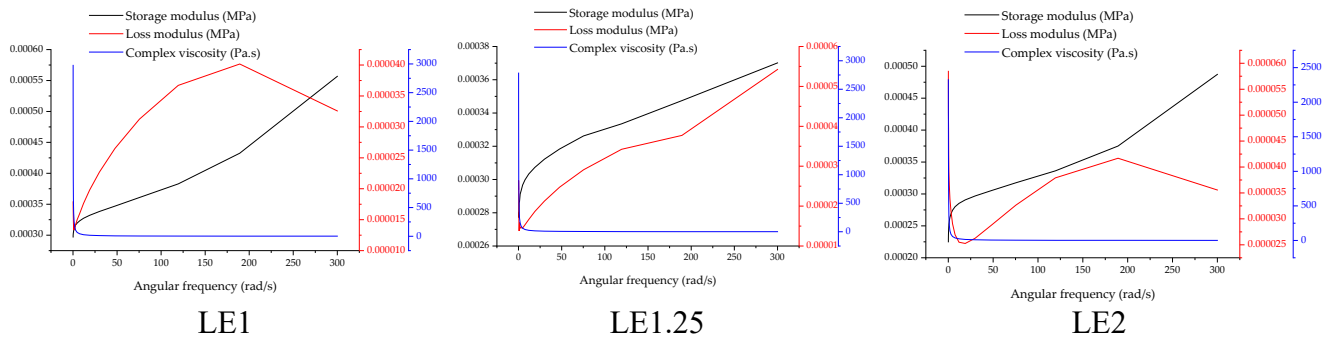
Pentru sistemele nenenewtoniene, vâscozitatea scade (caracter pseudoplastic) sau crește (caracter dilatant) la creșterea vitezei de forfecare, respectiv tensiunii de forfecare.

Din reogramele înregistrate în Figura 8,1 se poate observa că, pentru toate formulările proiectate, tensiunea de forfecare crește la creșterea vitezei de forfecare, în timp ce vâscozitatea scade cu viteza de forfecare, ceea ce indică faptul că sistemele prezintă un caracter pseudoplastic (sistemul se subțiază prin forfecare).

Un alt aspect important discutat este tixotropia, care descrie modificarea reversibilă a proprietăților gelului în funcție de timpul de forfecare și de perioadele de repaus [17].

În concluzie, gelurile cu nanoparticule de argint arată o reactivitate pseudoplastica și tixotropie, ceea ce are implicații semnificative în dezvoltarea și utilizarea lor.

Pentru a studia eventualul caracter tixotropic al sistemelor nenenewtoniene, sunt necesare alte analize, în special analize oscilatorii (Figura 8.2), caracteristice materialelor viscoelastice, cu proprietăți intermediare între lichid și solid.



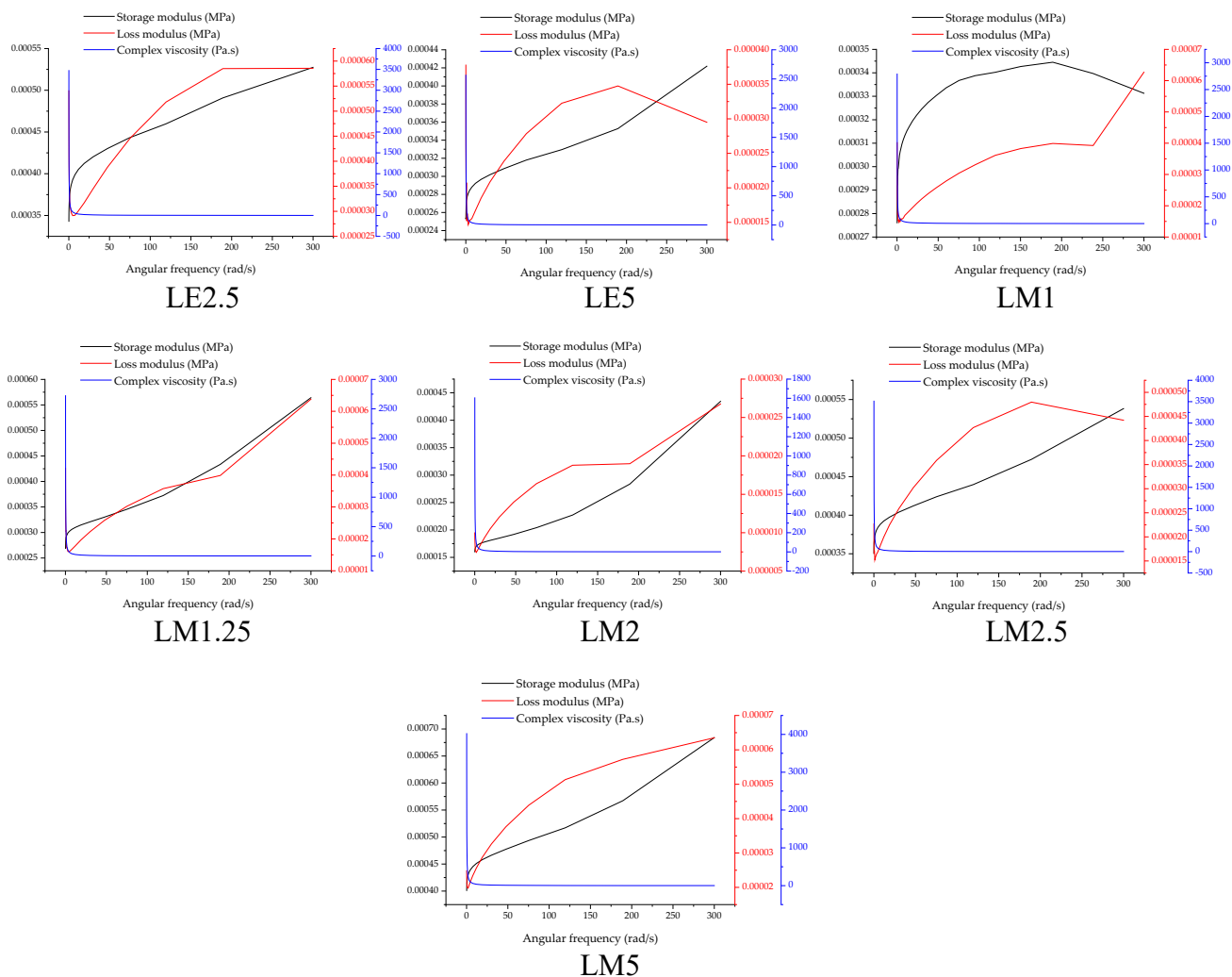


Figura 8.2 Dependența modurilor de elasticitate (Storage modulus/MPa) și vâscozitate (Loss modulus/MPa), respectiv a vâscozității complexe (Complex viscosity/Pa.s) în funcție de viteza unghiulară (Angular frequency/rad/s) pentru gelurile testate

Evoluția modului de stocare/de elasticitate (G') oferă informații despre comportamentul solid (elastic) al probei, în timp ce modulul de pierdere/de vâscozitate (G'') oferă informații despre comportamentul lichid (vâscos) [18].

Pentru probele la care modulul de stocare a fost mai mare decât modulul de pierdere este sugerată o contribuție mai mare a componentei elastice față de cea vâscoasă (evidentă la probele LE1.25; LM 2; LM2.5 și LM5).

Măsurătorile reologice indică un G' aproape independent de frecvență, în timp ce G'' a crescut ușor cu frecvența, așa cum este caracteristic pentru materialele de tip gel [19].

În ceea ce privește vâscozitatea complexă (η), aceasta este dependentă de frecvență și este determinată pentru un sistem vâscoelastic nenenewtonian prin supunerea acestuia la tensiune de forfecare oscilatorie. [20].

Constanța vâscozității complexe (Figura 8.2) sugerează interacțiuni între nanoparticulele utilizate și componenta polimerică din formulările de gel.

9. Concluzii și contribuții personale

9.1. Concluzii

Nanotehnologia și dezvoltarea de nanomateriale reprezintă un subiect de mare actualitate, anual fiind desfășurate și publicate un număr impresionant de studii în acest domeniu. În mod particular, fitosinteza de nanomateriale este în plină evoluție în ultimii ani.

Scopul prezentei lucrări a fost de a evalua posibilitățile de fitosinteză a nanoparticulelor metalice utilizând două plante cu aplicații biomedicale dovedite (*Echinacea purpurea* L. și *Leonurus cardiaca* L.).

În ceea ce privește studiul experimental asupra fitosintezei de nanoparticule de argint utilizând extracte de Echinacea, pot fi formulate următoarele concluzii:

Rezultatele experimentale obținute evidențiază potențiala aplicare a extractelor de Echinacea în fitosinteza de nanoparticule metalice. Caracterizarea complexă a extractelor a evidențiat concentrații semnificativ mai mari de compuși fenolici totali pentru extractele obținute prin metoda clasică de extracție la temperatură, în timp ce metoda de extracție asistată cu microunde a condus la extracția unor cantități semnificativ mai mari de flavonoide.

Conform rezultatelor experimentale, a fost confirmată fitosinteza de nanoparticule cu morfologii sferice sau cvasi-sferice, cu dimensiuni sub 30 nm în general și cu tendința de a forma nanoparticule cu dimensiuni mai mici atunci când sunt folosite soluții de extract cu concentrație mai scăzută.

Proprietățile antioxidante ale extractelor ar putea fi corelate cu nivelul compușilor fenolici totali (CFT). Astfel, fiind înregistrate valori semnificativ mai mari ale CFT pentru extractul obținut prin metoda clasică la temperatură (E_e), activitatea antioxidantă

determinată prin testul DPPH a fost, de asemenea, semnificativ mai mare pentru EE5 comparativ cu EM5.

Ca remarcă generală, proprietățile antimicrobiene ale nanoparticulelor fitosintetizate (prezentate ca zona de inhibare, în mm) au pornit de la valori ridicate, corespunzătoare celei mai mari concentrații de extract și au scăzut încet, atingând un platou (EM2,5 și EE2 pentru *Candida albicans* ATCC 64548, respectiv EM1.25 și EE1.25 pentru *Escherichia coli* ATCC 8738), după care s-a observat o creștere bruscă, asociată creșterii influenței dimensiunii particulelor asupra efectului antimicrobian.

Prin compararea rezultatelor analizelor fitochimice cu datele de literatură, au fost obținute valori mai scăzute ale compușilor fenolici totali.

Comparând cele două metode de extracție se poate observa că extracția clasică la temperatură duce la un conținut mai mare de compuși fenolici totali, comparativ cu extracția cu microunde, iar în ceea ce privește conținutul total de flavonoide, diferențele nu sunt semnificative statistic.

Determinările HPLC au relevat prezența unor acizi fenolici (acid clorogenic, acid cafeic și acid cumaric), la valori similare datelor de literatură. A fost identificată, de asemenea, prezența unor antocianidine și flavonoide (rutin, hiperozidă, catechină, naringin și naringenin), unele dintre acestea nemaifiind prezentate anterior în studiile de literatură.

Rezultatele determinărilor analitice au demonstrat fitosinteza nanoparticulelor de argint folosind extracte de *Leonurus cardiaca* L., cele mai mici dimensiuni ale nanoparticulelor fiind obținute cu ajutorul extractului obținut prin metoda asistată de microunde la o concentrație de 1 mg/mL.

Nanoparticulele de argint fitosintetizate au demonstrat un potențial antioxidant superior semnificativ statistic (conform testului DPPH) comparativ cu extractele utilizate pentru sinteză; toate variantele experimentale testate au demonstrat proprietăți antimicrobiene semnificative (atât împotriva liniilor Gram-negative, cât și a celor Gram-pozitive, demonstrate prin studiul efectelor asupra *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli*).

Având în vedere rezultatele obținute, nanoparticulele fitosintetizate utilizând extracte de *L. cardiaca* au fost selectate pentru obținerea unor formulări semisolide de tip hidrogel pentru aplicații topice (caracterizate din punct de vedere reologic).

9.2. Contribuții personale

Lucrarea de față are un nivel de originalitate ridicat, contribuțiile personale la dezvoltarea cunoașterii în domeniu putând fi sumarizate astfel:

- Sinteza originală de nanoparticule de argint cu extracte de *L. cardiaca*.
- Dezvoltarea unei metodologii inovatoare pentru fitosinteza de nanoparticule de argint cu extracte de *E. purpurea*.
- Realizarea unui studiu analitic complex, care a inclus caracterizarea atât a extractelor, cât și a nanoparticulelor obținute.
- Evaluarea potențialului antioxidant și a proprietăților antimicrobiene ale nanoparticulelor, cu implicații în domeniul biomedicinii.
- Investigarea influenței metodei de extracție și a concentrației de extract asupra morfologiei și proprietăților nanoparticulelor.

Aceste contribuții au fost recunoscute prin publicarea rezultatelor în reviste științifice de prestigiu (Q1 și Q2), într-un capitol de carte la nivel internațional și prin participarea la conferințe științifice internaționale.

Bibliografie selectivă

1. Singh A. K., Yadav T.P., Pandey B., Gupta Vi, Singh S. P., Chapter 15 - *Engineering Nanomaterials for Smart Drug Release: Recent Advances and Challenges, Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems*, in *Nanoscience and Nanotechnology in Drug Delivery Micro and Nano Technologies*, 2019; 411-449
2. Taniguchi N., On the Basic Concept of "Nano-Technology", Proc. Intl. Conf. Prod. Eng. Tokyo, Part II, Japan Society of Precision Engineering, 1974
3. Svobodova B., Barrosa L., Calhelha R.C., Heleno S., Alves M.J., Walcott S., Bittova M., Kuban V., Ferreira I.C.F.R., *Bioactive properties and phenolic profile of Momordica charantia L. medicinal plant growing wild in Trinidad and Tobago*, Ind Crop Prod 2017, 95:365-373.
4. Butler M.S., *The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery*, J. Nat. Prod., 67 (12), 2141-2153, 2004
5. Sahoo P.K., Kalyan Kamal S.S., Jagadeesh Kumar T, Sreedhar B., Singh A.K., Srivastava S.K., *Synthesis of Silver Nanoparticles using Facile Wet Chemical Route*, Defence Science Journal, 59, 4, 447-455, 2009.
6. Manayi, Azadeh et al., *Echinacea purpurea: Pharmacology, phytochemistry and analysis methods*, Pharmacognosy reviews vol. 9,17 (2015): 63-72.
7. *Assessment report on Leonurus cardiaca L., herba*, European Medicines Agency, 2010.
8. Rusch C., Hennig L., Rauwald H., *7-Chloro-6-desoxy-harpagide, a major iridoid glucoside from Leonurus cardiaca L. (Ph. Eur.)*, Planta Medica, vol. 76, no. 12, Article ID P235, 2010.
9. Kuchta K., Volk R. B., Rauwald H. W., *Stachydrine in Leonurus cardiaca, Leonurus japonicus, Leonotis leonurus: detection and quantification by instrumental HPTLC and 1H-qNMR analyses*, Die Pharmazie, vol. 68, no. 7, pp. 534–540, 2013.
10. Kuchta K., Ortwein J., Hennig L., Rauwald H. W., *H-qNMR for direct quantification of stachydrine in Leonurus japonicus and L. cardiaca*, Fitoterapia, vol. 96, pp. 8–17, 2014.
11. Silva G. A., *Introduction to nanotechnology and Its application to medicine*, Surg Neuro, 61 (2004) 216.

12. www.nano.cancer.gov
13. Huang X.H., Jain P.K., El-Sayed I.H., El-Sayed M.A., *Gold nanoparticles: Interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostic and therapy*, Nanomed. Lond. 2007.
14. Yildiz E., Karabulut D., Yesil-Celiktas O., *A bioactivity based comparison of Echinacea purpurea extracts obtained by various processes*, The Journal of Supercritical Fluids, Volume 89, 2014, Pages 8-15, ISSN 0896-8446.
15. Fierascu I.C., Fierascu I., Fierascu R.C., Velescu B.Ş., Dinu-Parvu C.E., *Phytosynthesis of Silver Nanoparticles using Leonurus Cardiaca L. extracts*, Materials, 2023, 16(9), 3472; <https://doi.org/10.3390/ma16093472>
16. Fierascu I.C., Fierascu I., Baroi A.M., Ungureanu C., Ortan A., Avramescu S.M., Somoghi R., Fierascu R.C., Dinu-Parvu C.E., *Phytosynthesis of biological active nanoparticles using Echinacea purpurea L. extracts*, Materials, 2022, 15(20), 7327; <https://doi.org/10.3390/ma15207327>
17. Ghica M.V., Hîrjău M., Lupuleasa D., Dinu-Pîrvu C.E., *Flow and thixotropic parameters for rheological characterization of hydrogels*, Molecules, 2016, 21(6), E 786, <https://doi.org/10.3390/molecules21060786>.
18. Fierăscu R.C., Orţan A., Fierăscu I.C., Fierăscu I., *In vitro and in vivo evaluation of antioxidant properties of wild-growing plants. A short review*, Current Opinion in Food Science, Volume 24, 2018, Pages 1-8, ISSN 2214-7993.
19. Clark A.H., Richardson R.K., Ross-Murphy S.B., Stubbs J.M., *Structural and Mechanical Properties of Agar/Gelatine Co-Gels. Small-Deformation Studies*, Macromolecules, 16, 1367-1374 (1983).
20. Aho J., Boetker J.P., Baldursdottir S., Rantanen J., *Rheology as a tool for evaluation of mel processability of innovative dosage forms*, International Journal of Pharmaceutics, Volume 494, Issue 2, 2015.