



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „CAROL DAVILA“ DIN BUCUREȘTI

FACULTATEA DE FARMACIE



Str. Traian Vuia 6, sector 2, București, tel.: 021-318 07 47/48/49, www.umfd.ro, email: decanat.farmacie@umfd.ro

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

DOMENIUL FARMACIE

FITOSINTEZA UNOR NANOPARTICULE DE ARGINT CU POTENȚIALĂ APLICARE ÎN PARODONTOPATII

REZUMAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. DINU-PÎRVU CRISTINA ELENA

Student doctorand:

LUNGU (LUPULIASA) ALINA IOANA

2024



CUPRINS

Introducere	6
I. PARTEA GENERALĂ	Error! Bookmark not defined.
1. Concepte actuale privind tratamentul parodontopatiilor	Error! Bookmark not defined.
1.1. Aspecte generale privind terapia parodontopatiilor.....	7
1.2. Antibioterapia sistemică în tratamentul standard al parodontopatiilor.....	7
1.3. Antibioterapia locală ca opțiune neinvazivă de elecție. Terapii locale adjuvante..	8
1.4. Sisteme moderne de cedare locală a substanțelor active în terapia bolii paodontale. Sisteme multiparticulate. Nanoparticule metalice.....	8
2. Abordări fitoterapice în managementul parodontopatiilor	Error! Bookmark not defined.
2.1. Importanța fitoterapiei	9
2.2. Familia Lamiaceae.....	9
2.2.1. Lamium album L.....	29
2.2.2. Marrubium vulgare L.....	Error! Bookmark not defined.
2.2.3. Hyssopus officinalis L.....	Error! Bookmark not defined.
2.2.4. Origanum vulgare L.....	38
II. CERCETĂRI PERSONALE.....	41
3. IPOTEZA DE LUCRU ȘI OBIECTIVELE GENERALE	9
3.1. Ipoteza de lucru	9
3.2. Obiectivele generale ale studiului.....	9
4. METODOLOGIA GENERALĂ A CERCETĂRII.....	10
4.1. Materiale utilizate	10
4.2. Obținerea extractelor naturale	10
4.3. Fitosinteza nanoparticulelor de argint	11
4.4. Tehnici de caracterizare.....	12
4.4.1. Determinarea conținutului total de fenoli (TPC).....	48
4.4.2. Cromatografia de lichide de înaltă precizie.....	49
4.4.3. Spectrometria UV-Vis.....	12



4.4.4.	Difracția de raze X	12
4.4.5.	Microscopia electronică de transmisie (TEM)	12
4.4.6.	Spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)	13
4.4.7.	Activitatea antioxidantă	13
4.4.8.	Evaluarea biocompatibilității nanoparticulelor de argint fitosintetizate	13
4.4.9.	Evaluarea viabilității celulare	13
4.4.10.	Determinarea producției de oxid nitric (NO) prin metoda Griess	14
4.4.11.	Evaluarea toxicității prin Testul LDH (Lactat dehidrogenaza)	14
4.5.	Analiza statistică	14
5.	CARACTERIZAREA EXTRACTELOR ȘI A NANOPARTICULELOR DE ARGINT FITOSINTETIZATE	14
5.1.	Caracterizarea extractelor naturale	58
5.2.	Caracterizarea nanoparticulelor de argint	15
6.	EVALUAREA POTENȚIALULUI BIOMEDICAL ȘI A CITOTOXICITĂȚII	78
6.1.	Evaluarea activității antioxidante a nanoparticulelor de argint	78
6.2.	Evaluarea morfologiei, biocompatibilității, viabilității și citotoxicității	17
6.2.1.	Analiza dinamicii și morfologiei fibroblastelor gingivale umane (HFIB-G) expuse la nanoparticule de argint fitosintetizate	79
6.2.2.	Analiza viabilității fibroblastelor gingivale umane (HFIB-G) după incubarea cu nanoparticule de argint fitosintetizate prin tehnica MTT.	83
6.2.3.	Evaluarea producției de oxid nitric (NO) prin metoda Griess	19
6.2.4.	Evaluarea citotoxicității prin metoda LDH	20
7.	CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE	20
	BIBLIOGRAFIE	Error! Bookmark not defined.



Listă de abrevieri

AgNP	nanoparticule de argint
ADN	acid dezoxiribonucleic
Ag+	ioni de argint
AgNO ₃	azotat de argint
CAL	<i>clinical attachment loss</i>
CaO	oxid de calciu
CHX	clorhexidină încapsulată
Cs	<i>Camellia sinensis</i>
CuO	oxid de cupru
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
Dp	dimensiunea medie a cristalelor
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
DPPH	test pentru estimarea activității antioxidante
EDX	dispersie de energie
FBS	ser fetal bovin
FDA	<i>U.S. Food and drug administration</i>
FTIR	spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier
GAE	acid galic
GTR	<i>guided tissue regeneration</i>
HFIB-G	linie celulară de fibroblaste
Hi	<i>Heterotheca imuloides</i>
HM	extracție asistată de microunde de <i>Hyssopus officinalis</i>
HPLC	chromatografia lichidă de înaltă precizie
HPLC-DAD	chromatografia lichidă de înaltă precizie echipat cu matrice de diode
HPMC	hidroxipropil metilceluloza
HR-TEM	microscopie electronică de transmisie de înaltă rezoluție
HT	extracție clasică de <i>Hyssopus officinalis</i>
ICDD	<i>The International Centre for Diffraction Data</i>
LDD	<i>local drug delivery</i>
LDH	lactat dehidrogenaza
LDL	lipoproteine cu densitate scăzută
MAE	extracție asistată cu microunde
MgO	oxid de magneziu
MM	extracție asistată de microunde de <i>Marrubium vulgare</i>
MNP	nanoparticule magnetice
MT	extracție clasică de <i>Marrubium vulgare</i> test de viabilitate cu bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-
MTT	difeniltetrazolium
NaBH ₄	borohidruură de sodiu
NAD ⁺	<i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>



ND	Nedetectat
NO	oxid nitric
NO ₂	Nitrit
NP	Nanoparticule
OFD	<i>open flap debridement</i>
OM	extracție asistată de microunde de Origanum vulgare
OMS	World Health Organization (Organizația Mondială a Sănătății)
OT	extracție clasică de Origanum vulgare
PCL	Policaprolactona
PGLA	poliglicolid-co-lactida
PHBA	ploihidroxi-butiric
PLGA	polilactodecoglicolida
PRP	<i>platelet rich plasma</i>
RB	tărâțe de orez
RG	germeni de orez
RH	coajăde orez
ROS	specii reactive de oxigen
SAED	difracția electronilor în zonă selectată
SD	deviația standard a mediei
SDD	Subantimicrobiene
SDS	dodecil sulfat de sodiu
SEM	microscopie electronică de baleiaj
SH	grupare sulf-hidril
Si	Siliciu
TBARS	substanțe reactive la acidul tiobarbituric
TEM	microscopie electronică de transmisie
TFA	acid trifluoracetic
THP-1	linie celulară de monocite
TiO ₂	dioxid de titan
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate
TPC	conținut total de compuși fenolici
UM	extracție asistată de microunde de Lamium album
UT	extracție clasică de Lamium album
UV	ultraviolet
XRD	difracție cu raze X 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-
XTT	carboxanilide
ZnO	oxid de zinc
ZnONP	nanoparticule de oxid de zinc



Introducere

Parodontopatiile reprezintă afecțiuni cronice inflamatorii asociate cu acumularea plăcii dentare (biofilmului dentar) și care conduc la distrugerea progresivă a parodontiului. Parodontopatiile apar în urma interacțiunilor dinamice complexe dintre agenți bacterieni, factori imunologici specifici și factori nocivi de mediu.

Având în vedere prevalența crescută a acestor afecțiuni în rândul populației, precum și necesitatea protejării și restabilirii sănătății parodontale pentru bunăstarea generală, studiile tezei de doctorat s-au axat pe dezvoltarea unor sisteme terapeutice cu rol funcțional în tratarea parodontopatiilor.

Tratamentele medicamentoase actuale se bazează pe de-o parte pe utilizarea agenților antimicrobieni pentru eliminarea microorganismelor patogene, iar pe de altă parte pe utilizarea antiinflamatoarelor pentru reducerea răspunsului inflamator, respectiv o corectare complexă și completă a mediului bucal cu împiedicarea retenției plăcii bacteriene. Dar, administrarea pe termen lung a acestora induce o serie de reacții adverse și nu este recomandată. În prezent, se caută soluții alternative biocompatibile, care să conducă la efecte terapeutice satisfăcătoare, fără consecințe negative.

Pentru a asigura succesul terapiei, este esențială selectarea corectă a agenților antimicrobieni și utilizarea unei metode eficiente de administrare, respectiv a unor sisteme de eliberare corespunzătoare a substanțelor medicamentoase.

În comparație cu antibioticele tradiționale, nanoparticulele de argint au proprietăți antibacteriene fără a genera rezistență bacteriană.

Datorită toxicității reduse, capacităților fototermale, imunoterapiei, activității antiinflamatorii, calităților antibacteriene, tehnicilor simple de fabricație și costurilor ieftine, nanoparticulele metalice multifuncționale cu activități terapeutice arată promițătoare considerabile în domeniul tratamentului bolii parodontale. Pornind de la aceste caracteristici, nanoparticulele de argint au fost selectate ca sisteme terapeutice în prezentul studiu.

Nanoparticulele de argint mediate de extracte de plante oferă o metodă simplă pentru sinteza *in situ*, fiind în același timp foarte stabile, deoarece acționează atât ca agenți reducători, cât și ca agenți de stabilizare.

Produsele vegetale au fost alese pornind de la multiple date existente în literatură cu privire la acțiunea antimicrobiană, antioxidantă și antiinflamatoare a părților aeriene ale speciilor de Unguraș (*Marrubium Vulgare L.*), Isop (*Hyssopus officinalis L.*), Oregano (*Origanum vulgare L.*) și Urzică

(*Lamium album L.*).

Astfel, obiectivul principal al tezei de doctorat a fost fitosinteza AgNP-urilor cu rol antimicrobian împotriva agenților patogeni orali, constituind baza pentru dezvoltarea de produse multifuncționale care pot ajuta la prevenirea și tratamentul infecțiilor și bolilor dentare, asigurând o terapie mai puțin intruzivă.

I. PARTEA GENERALĂ

1. Concepte actuale privind tratamentul parodontopatiilor

1.1. Aspecte generale privind terapia parodontopatiilor

Parodontopatiile sunt cunoscute ca afecțiuni multifactoriale care implică atât prezența biofilmelor bacteriene, cât și un răspuns inflamator complex, incluzând producerea de citokine, eicosanoide și metaloproteinaze. Bacteriile Gram-negative existente în biofilm induc producerea unui răspuns inflamator din partea gazdei, fapt care poate produce distrugerea progresivă, uneori ireversibilă a țesuturilor moi și/sau osoase [1-3].

Terapia chirurgicală include tehnici precum: debridarea cu clapă deschisă (Open Flap Debridement - OFD); regenerarea ghidată a țesutului (Guided Tissue Regeneration -GTR; terapie folosind plasmă bogată în trombocite (Platelet-Rich Plasma PRP) [2,3].

Terapia nechirurgicală constă într-o serie de proceduri și intervenții menite să controleze infecția și să prevină progresia bolii parodontale, printre care:

1. Detartraj - poate include procedura de *scaling*, care implică îndepărtarea plăcii bacteriene și a tartrului de pe suprafața dinților și de sub linia gingivală și, respectiv procedura de *root planing*, care constă în netezirea rădăcinilor dinților pentru a elimina toxinele bacteriene și pentru a crea o suprafață curată și netedă, favorizând reatașarea gingiei sănătoase la dinte.
2. Tratament cu antibiotice și antimicrobiene – atât sistemic: administrarea orală sau injectarea de antibiotice pentru a controla infecția; cât și tratament local: aplicarea directă a antibioticelor sau agenților antimicrobieni în pungile parodontale pentru a reduce bacteriile specifice, așa cum este prezentat în continuare.
3. Îngrijirea orală personală riguroasă: periajul corect și ața dentară sunt esențiale pentru prevenirea acumulării plăcii bacteriene, alături de utilizarea unor agenți antiseptici, ca ape de gură antiseptice pentru reducere încărcării bacteriene locale.
4. Managementul factorilor de risc: renunțarea la fumat deoarece este cunoscut ca factor major de risc pentru bolile parodontale; controlul glicemiei, având în vedere faptul ca diabetul necontrolat poate agrava bolile parodontale [4].

1.2. Antibioterapie sistemică în tratamentul standard al parodontopatiilor

În tratamentul nechirurgical al parodontopatiilor cronice și prevenirea complicațiilor severe utilizează frecvent ca antibiotice standard metronidazolul fie singur, fie utilizat în asociere cu alte antibiotice cum ar fi amoxicilina, sau amoxicilina cu acidul clavulanic sau ciprofloxacina.

1.3. Antibioterapia locală ca opțiune neinvazivă de elecție. Terapii locale adjuvante.

Principala cauză a infecțiilor în parodontopatii o constituie pungile parodontale, motiv pentru care aplicarea directă a medicamentelor în aceste zone s-a dovedit mai eficientă decât tratamentele sistemice, sau complementară acestora, reducând totodată complicațiile asociate administrării orale. Pentru a asigura succesul terapiei, este esențială selectarea corectă a agenților antimicrobieni și utilizarea unei metode eficiente de administrare, a unor sisteme de eliberare corespunzătoare a substanțelor medicamentoase [2].

1.4. Sisteme moderne de cedare locală a substanțelor active în terapia bolii parodontale.

Sisteme multiparticulate. Nanoparticule metalice.

Nanoparticulele de argint sintetizate prin metode fitochimice, cunoscute sub denumirea de **nanoparticule de argint fitosintetizate (AgNPs)** reprezintă obiectul unor cercetări actuale pentru potențialele lor aplicații în diverse domenii medicale, inclusiv în medicina dentară. În cazul parodontozei, AgNPs oferă beneficii terapeutice semnificative având în vedere proprietăților lor puternic antibacteriene (dezechilibrează membranele celulare bacteriene, penetrează celulele și interferează cu funcțiile metabolice și replicarea ADN-ului bacterian). Alături de activitatea specific antibacteriană, AgNPs manifestă și proprietăți proprii antiinflamatorii, benefice în terapia parodontală [5]. Sinteza prin fitosinteză a acestor AgNPs este ecologică și sustenabilă, se realizează folosind extracte vegetale care acționează ca *agenți reducători pentru formarea nanoparticulelor* și ca *stabilizatori*, îmbunătățind biodisponibilitatea și compatibilitatea nanoparticulelor [6]. Sunt selectate îndeosebi extractele vegetale cu principii active cu activitate intrinsecă antioxidantă, dar și antiinflamatorie, antimicrobiană, antiseptică, așa cum se va prezenta în capitolul următor al părții generale-teoretice a lucrării și care au fost ideile generatoare ale studiilor care fac obiectul contribuțiilor personale ale lucrării.

AgNPs pot fi incorporate în diverse produse dentare precum ape de gură și paste de dinți pentru a oferi tratament și prevenție țintite pentru boala parodontală. Ele sunt de asemenea utile în implanturi, acoperiri ale unor dispozitivele dentare pentru a preveni colonizarea microbială și formarea de biofilm.

2. Abordări fitoterapice în managementul parodontopatiilor

2.1. Importanța fitoterapiei

Există o serie de dovezi care atestă preocupările privind valorificarea plantelor în diferite domenii de activitate.

Datorită diversității compușilor chimici conținuți este de așteptat ca plantele medicinale să contribuie la dezvoltarea unor noi strategii terapeutice inovative, precum și a unor noi modele moleculare cu activitate antimicrobiană, antiinflamatoare și antinociceptivă locală.

Pentru tratarea parodontopatiilor ar putea fi benefică utilizarea anumitor extracte obținute din plante, care într-o formulare adecvată ar putea avea efecte terapeutice evidente. Am selectat spre analiză plante din familia Lamiaceae, recomandate de literatura de specialitate pentru acțiunile antimicrobiană, antioxidantă, antiinflamatoare și antifungică.

2.2. Familia Lamiaceae

Una dintre familiile de plante cu o varietate de aplicații biologice și medicale o reprezintă familia Lamiaceae, iar printre cele mai cunoscute plante cu utilizare diversă sunt mirodeniile precum menta, busuiocul, salvia, rozmarinul, isopul și oregano [7]. Datorită proprietăților biologice, speciile din familia Lamiaceae sunt utilizate în industria farmaceutică și în medicina tradițională, iar printre aplicațiile medicale se pot enumera stimularea circulației sângelui, aplicații diuretice, întărirea sistemului nervos central [8-10].

Datorită uleiurilor esențiale din speciile de Lamiaceae, aplicațiile biologice sunt numeroase și cuprind activități antioxidante, antiinflamatorii, analgezice, antimicrobiene, antifungice, antipuriginose, neuroprotectoare, antiseptice, antialergenice, antihepatotoxice etc. [11-14].

II. CERCETĂRI PERSONALE

3. Ipoteza de lucru și obiectivele generale

3.1. Ipoteza de lucru

Dezvoltarea nanoparticulelor metalice fitosintetizate a devenit unul dintre cele mai productive domenii de cercetare în nanotehnologie. Volumul anual de publicații pe această temă a crescut exponențial. Având mai multe avantaje în comparație cu nanoparticulele obținute pe căi clasice (inclusiv, dar fără a se limita la, proprietăți antioxidante sau antimicrobiene îmbunătățite, precum și toxicitate redusă), nanoparticulele fitosintetizate sunt acum considerate alternative viabile la nanoparticulele metalice convenționale. Extractele dintr-o gamă diversă de plante sunt folosite în sinteza verde a acestor nanoparticule, unde acționează atât ca agenți de reducere, cât și de acoperire.

3.2. Obiectivele generale ale studiului

Plecând de la aceste observații, cercetarea din prezenta teză de doctorat a avut drept *scop fitosinteza unor nanoparticule de argint utilizând diverse extracte ale unor plante autohtone*.

În ciuda gamei vaste de plante explorate pentru această aplicație, o analiză a bazelor de date științifice majore (SCOPUS, Web of Knowledge) nu a evidențiat niciun studiu privind utilizarea extractelor de *Marrubium vulgare L.* pentru fitosinteza nanoparticulelor de argint. În acest context, *noutatea* adusă de cercetările întreprinse se referă la faptul că *extractul speciei Marrubium vulgare L.*, folosit la prepararea nanoparticulelor de argint *nu a fost menționat până acum ca agent reducător utilizat în procesul de fitosinteză* al acestora. Am utilizat pentru fitosinteza nanoparticulelor de argint mai multe extracte vegetale pentru o analiză comparativă a performanțelor acestora.

Obiectivele generale urmărite în prezenta cercetare au fost:

1. *Obținerea extractelor vegetale*
2. *Fitosinteza nanoparticulelor de argint*
3. *Caracterizarea extractelor vegetale și a nanoparticulelor experimentale*
4. *Evaluarea acțiunii biologice, biocompatibilității și citotoxicității nanoparticulelor experimentale*

4. Metodologia generală a cercetării

4.1. Materiale utilizate

Materialul vegetal utilizat în acest studiu, reprezentat de părțile aeriene ale speciilor **Unguraș** (*Marrubium Vulgare L.*), **Isop** (*Hyssopus officinalis L.*), **Oregano** (*Origanum vulgare L.*) și **Urzică** (*Lamium album L.*) a fost colectat din semințe certificate și achiziționat de pe piața locală.

4.2. Obținerea extractelor naturale

Pentru obținerea extractelor naturale s-au aplicat două metode de extracție, alegerea acestora fiind justificată de capacitatea de a asigura atât extracția eficientă a principiilor active, cât și posibilitatea de a fi scalate pentru aplicații industriale, conform datelor din literatură [15].

- metoda clasică, care constă în amestecarea materialului vegetal cu solventul și menținerea acestui sistem la o anumită temperatură minim 1h.

În cazul nostru, produsul vegetal, care anterior a fost mărunțit, a fost supus extracției clasice la temperatura de 70°C, utilizând ca solvent un amestec hidroalcoolic, în raport volumetric etanol:apă = 1:1; pentru extracție a fost utilizată etuva Memmert UN 110, timpul de extracție fiind de 3 ore.

- metoda asistată de microunde pentru care materialul vegetal și solventul au fost încălzite folosind un echipament Ethos Easy Advanced Microwave Digestion System, timp de 30 de minute la o temperatură de 70°C.

Pentru ambele metode, solventul folosit a fost un amestec hidroalcoolic (etanol:apă 1:1 v/v), iar raportul dintre materialul vegetal și solvent a fost menținut la 1:10 (g/v).

După obținerea și filtrarea extractelor, acestea au fost reduse folosind un rotaevaporator Laborota 4000 Heildolph pentru îndepărtarea solventului volatil, utilizând distilarea sub vacuum. În final, după îndepărtarea a peste 90% din solvent, extractul a fost uscat prin liofilizare (utilizând un liofilizator Christ LSC Alpha 2-4-LSC) 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.

Extractele obținute, pentru prepararea nanoparticulelor de argint, au fost redizolvate în apă. Procedul de fitosinteză presupune amestecarea unor cantități egale de extract natural și soluție de azotat de argint (AgNO_3 , 10^{-3} M), obținută prin dizolvarea cantității adecvate de AgNO_3 (Chimreactiv, Romania) în apă bidistilată. Apa bidistilată utilizată pentru toate experimentele a fost obținută în laborator, utilizând un distilator GFL 2102.

Extractele utilizate au fost codificate conform Tabelului 1.

Tabel 1. Codificarea extractelor obținute, utilizând ca solvent amestecul hidroalcoolic (conform raportului prezentat mai sus), cu un raport material vegetal/solvent (g/mL) de 1/10.

Nr. crt.	Plantă	Metodă de extracție și codificare			
		Extracție clasică	HT	Extracție asistată de microunde	HM
1	Isop (<i>Hyssopus officinalis</i> L.)	Extracție clasică	HT	Extracție asistată de microunde	HM
2	Oregano (<i>Origanum vulgare</i> L.)	Extracție clasică	OT	Extracție asistată de microunde	OM
3	Urzică (<i>Lamium album</i> L.)	Extracție clasică	UT	Extracție asistată de microunde	UM
4	Unguraș (<i>Marrubium vulgare</i> L.)	Extracție clasică	MT	Extracție asistată de microunde	MM

4.3. Fitosinteza nanoparticulelor de argint

Pentru procesul de fitosinteză, s-au amestecat volume egale de extract preparat și soluție de azotat de argint (25 mL din fiecare). Acest amestec a fost lăsat să reacționeze timp de 24 de ore în condiții ambientale, pH-ul final al amestecului fiind situat în jurul valorii 7 și determinat utilizând un pH-metru Lab 870 (Analytic Laboratory). Reducerea ionilor Ag^+ la nanoparticule de argint (AgNP) a fost realizată prin adăugarea extractelor brute la soluția de azotat de argint proaspăt preparată.

4.4. Tehnici de caracterizare

4.4.1. Determinarea conținutului total de fenoli (TPC)

Reactivul Folin-Ciocalteu și soluția de carbonat de sodiu au fost obținute de la Merck KGaA, Darmstadt, Germania. Acești reactivi au fost utilizați fără purificare suplimentară. Densitatea optică a fost măsurată la 765 nm folosind un spectrofotometru UV-Vis Rigol Ultra 3660 de la Rigol Technologies, Beijing, China. Rezultatele au fost comparate cu o curbă standard preparată cu soluții de acid galic, iar valorile finale au fost exprimate ca miligrame de echivalenți de acid galic (GAE) per gram de substanță uscată [16].

4.4.2. Cromatografia de lichide de înaltă precizie

Cuantificarea polifenolilor și a altor compuși din extracte a fost efectuată folosind un sistem HPLC L-3000 de la Rigol Technologies Inc., Beijing, China. Acest sistem a fost echipat cu un detector cu matrice de diode (HPLC-DAD) și o coloană Kinetex EVO C18 (150 × 4,6 mm, dimensiunea particulei de 5 μm). Faza mobilă a constat dintr-un sistem cu doi solvenți, solventul A fiind 0,1% acid trifluoracetic (TFA) în apă și solventul B fiind 0,1% TFA în acetonitril. Eluarea a fost efectuată în modul gradient, cu următorul gradient: 2-100% solvent B la 30°C timp de 60 de minute, la un debit de eluare de 1 mL/min. Analiza a fost efectuată la cinci lungimi de undă diferite (255, 280, 325 și 355 nm).

4.4.3. Spectrometria UV-Vis

Pentru aceste determinări, a fost folosit un spectrofotometru Rigol Ultra 3660 de la Rigol Technologies Inc., Beijing, China. Acest echipament are o rezoluție optică de 0,5 nm și utilizează cuve de cuarț cu o lungime de cale de 1 cm. Analiza a fost efectuată în intervalul de lungimi de undă de 370-600 nm, conform recomandărilor din literatura de specialitate [17-19].

4.4.4. Difracția de raze X

Analizele de difracție de raze X au fost efectuate folosind un difractometru Rigaku SmartLab de 9 kW de la Rigaku Corp., Tokyo, Japonia. Instrumentul a fost operat la 45 kV și 200 mA, cu radiație CuK α ($\lambda = 1,54059 \text{ \AA}$). A fost folosit modul de scanare $2\theta/\theta$, acoperind intervalul unghiular de la 7 la 90° (2θ).

4.4.5. Microscopia electronică de transmisie (TEM)

Analiza prin microscopie electronică cu transmisie (TEM) a fost efectuată utilizând un microscop electronic cu transmisie corectat de imagine Titan Themis 200 de la FEI, Hillsboro, OR, SUA. Microscopul a fost echipat cu o sursă de electroni cu pistol cu emisie de câmp de înaltă luminozitate (X-FEG) și un detector Super-X pentru spectroscopie cu dispersie de energie (EDX).

Heterostructurile au fost examinate la 200 kV prin TEM de înaltă rezoluție (HR-TEM), cuplat cu difracția electronilor în zonaselectată (SAED) pentru identificarea structurală.

4.4.6. Spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)

Măsurătorile FTIR au fost efectuate folosind un instrument JASCO FT-IR 6300 de la Jasco Int. Co. Ltd., Tokyo, Japonia. Instrumentul a fost echipat cu un accesoriu Specac ATR Golden Gate de la Specac Ltd., Orpington, Marea Britanie, cu obiectiv KRS5. Măsurătorile au fost efectuate în intervalul de la 400 la 4000 cm^{-1} cu 32 de acumulări la o rezoluție de 4 cm^{-1} .

4.4.7. Activitatea antioxidantă

Activitatea antioxidantă a extractelor și nanoparticulelor de argint a fost determinată folosind testul DPPH (Sigma Aldrich, Burlington, MA, SUA).

4.4.8. Evaluarea biocompatibilității nanoparticulelor de argint fitosintetizate

Fibroblastele gingivale umane (linia celulară HFIB-G, nr. cat.: 1210412, Provitro, Berlin, Germania) au fost cultivate în mediu complet Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplimentat cu 10% ser fetal bovin (FBS) și 1% penicilină/streptomycină/amfotericină. Celulele au fost menținute într-o atmosferă umidificată cu 5% CO_2 în aer, la 37°C. Celulele (10^4 celule/godeu) au fost însămânțate în plăci cu 96 de godeuri și lăsate să adere peste noapte. Apoi, fibroblastele au fost expuse la HT-AgNP, HM-AgNP, MT-AgNP, MM-AgNP, UT-AgNP, UM-AgNP, OT-AgNP sau OM-AgNP pentru următoarele 24, respectiv 48 de ore la 37°C cu 5% CO_2 . Probele au fost diluate anterior în mediu complet Eagle modificat de Dulbecco, iar concentrațiile obținute ale NP-urilor fitosintetizate au fost de 0,1% (echivalent cu o concentrație de aproximativ 0,54 $\mu\text{g Ag/mL}$), 2,5% (echivalent cu o concentrație de 13,5 $\mu\text{g Ag/mL}$) și 5% (echivalent cu o concentrație de aproximativ 27 $\mu\text{g Ag/mL}$). Volumul final a fost de 300 μL pentru fiecare godeu. Probele de control au fost reprezentate de celule neexpuse la NP-urile fitosintetizate. La sfârșitul fiecărui timp de incubare, celulele au fost examinate utilizând un microscop inversat Optika IM-3.

4.4.9. Evaluarea viabilității celulare

Viabilitatea celulelor fibroblastice umane a fost determinată folosind testul cu bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT, Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR, SUA), care se bazează pe reducerea compusului tetrazoliu MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromură) de culoare galbenă, la cristale de formazan violet, de către enzimele (succinat dehidrogenaze mitocondriale – NAD(P)H dependente) celulelor active metabolic. (Hansen; Nielsen; Berg, 1989). Mediul de creștere a fost îndepărtat după 24 și respectiv 48 de ore de incubare și apoi, s-au adăugat 100 μL de DMEM cu 10 μL de MTT în fiecare godeu timp de 4 ore la 37°C. După incubare s-au folosit 100 μL /godeu de soluție SDS-HCl (10%) pentru a dizolva cristalele de

formazan violet, iar după alte 4 ore, absorbanta a fost măsurată la 570 nm cititorul de microplăci multimod FLUOstar® Omega de la BMG LABTECH (Ortenberg, Germania).

4.4.10. Determinarea producției de oxid nitric (NO) prin metoda Griess

Nivelurile de NO acumulate în mediul de cultură celulară au fost măsurate după 24 și respectiv 48 de ore de incubare folosind kit-ul de testare a oxidului nitric (NO, Thermo Fisher Scientific, Viena, Austria) pe baza de reactiv Griess (diclorhidrat de naftil etilendiamină 0,1% și sulfanilamidă 1% în 5% H₃PO₄). A fost măsurată absorbanta la 540 nm folosind cititorul de microplăci multi-mod FLUOstar® Omega BMG LABTECH (Ortenberg, Germania), iar rezultatele au fost comparate cu controlul.

4.4.11. Evaluarea toxicității prin Testul LDH (Lactat dehidrogenaza)

Acest test a fost folosit pentru a măsura lactat dehidrogenaza eliberată de celulele HFIB-G, după 24 și respectiv 48 de ore în prezența NP-urilor fitosintetizate. Astfel, 50 μL din mediu de cultura din fiecare godeu testat au fost amestecați cu 50 μL de amestec de reacție (substrat și cofactor) și incubăți la temperatura camerei timp de 30 de minute, în întuneric. A fost măsurată absorbanta la 490 nm (specific pentru produsul de reacție) și la 680 nm (pentru corecția fondului) folosind cititorul de microplăci multimod FLUOstar® Omega de la BMG LABTECH (Ortenberg, Germania). Pentru a calcula procentul de citotoxicitate, absorbanta de 680 nm a fost scăzută din absorbanta de 490 nm, iar rezultatele au fost comparate cu martorul.

4.5. Analiza statistică

Rezultatele experimentale obținute pe baza determinărilor multiple paralele (așa cum s-a menționat pentru fiecare metodă), precum și datele primare obținute au fost analizate pentru a stabili semnificația statistică folosind analiza varianței (ANOVA unidirecțională) și testul Tukey pentru a determina diferențele semnificative între medii. Diferențele semnificative au fost stabilite la $p \leq 0,05$. Rezultatele prezentate sunt media \pm eroarea standard a mediei (SE) determinărilor independente. Rezultatele testelor MTT, NO și LDH au fost exprimate ca medii cu abateri standard. Variabilele cantitative independente au fost testate între grupuri folosind Testul *t* Student. Valorile $p < 0,05$ au fost considerate semnificative statistic. Reprezentările grafice au fost construite folosind software-ul de analiză și grafică a datelor OriginPro 2018 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, SUA).

5. Caracterizarea extractelor și a nanoparticulelor de argint fitosintetizate

5.1. Caracterizarea extractelor naturale

Rezultatele analizelor fitochimice și ale analizei HPLC relevă influența metodei de extracție asupra compoziției extractului. Astfel, compușii fenolici totali (exprimați ca mg GAE/g greutate

uscată) sunt semnificativ mai mari pentru extracția asistată cu microunde; extractele de oregano au valori TPC constant mai mari, în comparație cu extractele de isop, ungueraș și urzică. Datele din literatură prezintă unele rezultate comparabile. De exemplu, macerarea la temperatura camerei într-un amestec hidroalcoolic a condus la un TPC de cca. 2,45 mg GAE/g, în timp ce diferite metode de extracție aplicate pe materialul vegetal de oregano au condus la TPC sub 20 mg GAE/g [20].

Dintre componentele identificate prin HPLC, pentru grupa de acizi fenolici (acizi galic, rosmarinic și protocatecuic), proba HT prezintă concentrații semnificativ mai mari, comparativ cu celelalte extracte. De asemenea, acidul rosmarinic a fost identificat într-un conținut mai mare decât alte studii prezentate anterior [21]. Grupul de flavanoli se găsește în mod constant într-o concentrație mai mare în extractele de microunde, precum și în extractele de oregano, aceeași tendință fiind înregistrată și pentru standardele de flavonoide (cu excepția notabilă a naringeninei), identificate în cantități mai mari în extractele de isop, deși, încă o dată, extracția asistată cu microunde a dus la un randament superior. Au fost înregistrate excepții semnificative pentru izoquercitrină (nedetectată în proba OT) și rutin (nedetectat în proba OM). Un caz interesant este reprezentat de resveratrol. Identificată în cantități mai mari în extractele de isop, prezintă randamente mai mari pentru extracția clasică temperatură; acest lucru ar putea fi explicat prin labilitatea sa termică, care poate fi accentuată în tehnicile asistate cu microunde [22].

O observație specială cu privire la rezultatele HPLC este că singurii doi compuși care se găsesc în cantități mai mari în proba MT (comparativ cu MM), sunt catechina flavan-3-ol și, într-o măsură mai mică, acidul hidroxicinamic o- acidul cumaric (de remarcat, ceilalți izomeri cuantificați, epicatechina și acidul p-cumaric, se găsesc în cantități mai mari în MM). Aceste observații ar sugera o anumită selectivitate a metodelor de extracție care ar putea influența formarea nanoparticulelor și aplicațiile biomedicale.

5.2. Caracterizarea nanoparticulelor de argint

Spectrele de absorbție UV-Vis au fost aplicate pentru a monitoriza fitosinteza nanoparticulelor de argint, evidențiind vârfuri caracteristice ale AgNP la aproximativ 423 nm pentru proba MT-AgNP și la 430 nm pentru proba MM-AgNP. În spectrele UV-Vis înregistrate pentru probele MT-AgNP și MM-AgNP, apariția unor maxime de absorbție în regiunea de 400-500 nm sugerează fitosinteza nanoparticulelor. Deși spectrele de absorbție UV-Vis sunt obținute la concentrații scăzute (folosind probe diluate), acestea nu numai că confirmă procesul de fitosinteză, dar indică și dimensiuni puțin mai mari ale nanoparticulelor în cazul probei MM-AgNP. Comparând spectrele de absorbție ale extractelor diluate și ale soluției stoc de azotat de argint, nici extractele și nici azotatul de argint nu prezintă maxime de absorbție în regiunea de interes.

Procesul de fitosinteză a fost confirmat prin analiza difracției cu raze X. Identificarea fazei Ag₀ a fost realizată prin compararea cu cardul ICDD PDF nr. 01-077-6577. Deși prezența altor vârfuri XRD este ușor vizibilă datorită contribuției haloului amorf la aspectul general al difractogramelor, o analiză detaliată folosind software-ul PDXL a confirmat prezența acestora.

Evaluarea probelor utilizând tehnici de analiză TEM, HR-TEM, SAED și distribuția dimensiunii particulelor a arătat că nanoparticulele sunt în general sferice, cu diametre medii de 14,4 nm pentru proba MT-AgNP și 18,8 nm pentru proba MM-AgNP. Utilizarea extractului MM a condus nu numai la formarea de nanoparticule cu dimensiuni mai mari, ci și la o diversitate morfologică extinsă. În timp ce nanoparticulele cvasi-sferice au fost preponderente, s-au identificat și alte morfologii distincte, inclusiv forme triunghiulare, hexagonale și elipsoidale în eșantionul MM-AgNP. Aceste rezultate subliniază avantajul utilizării extractului MT pentru sinteza nanoparticulelor de dimensiuni mai mici și cu morfologie mai uniformă, aspecte critice pentru aplicațiile biomedicale [23].

Imaginile TEM au relevat o morfologie cvasi-sferică pentru toate probele analizate, iar distribuția diametrului a fost în concordanță cu determinările XRD: HT-aproximativ 18,5 nm, HM-10,5 nm, OT-16,5 nm și OM- 10 nm.

Analiza FTIR a fost efectuată atât pe nanoparticule, cât și pe extractele părinte pentru a evalua fitoconstituenții implicați în proces. Atât extractele, cât și nanoparticulele au relevat prezența grupărilor funcționale corespunzătoare alcoolilor și fenolilor (O–H), acizilor carboxilici (întinderea C–O), grupărilor metil și aldehide (întinderea legăturilor C–H), alchenelor (întinderea C=C), și aromatice (întindere C–C). Picurile FTIR observate în ambele extracte pot fi atribuite după cum urmează: 3383/65 cm⁻¹ pentru grupările hidroxil libere, 2979 și 2902/3 cm⁻¹ pentru vibrațiile de întindere C-H și 1652 cm⁻¹ pentru vibrațiile grupării carbonil. În plus, benzile de la 880 și 1453 cm⁻¹ (prezente doar în MM) ar putea fi atribuite vibrațiilor de întindere ale CO₃²⁻. Vârfurile de la 1382/4 până la 1044/5 cm⁻¹ reprezintă vibrații de întindere asimetrice și simetrice ale PO-2 și fosfolipide, în timp ce vârful de la 1404 cm⁻¹ corespunde întinderii C-O-C a acizilor nucleici și fosfolipidelor. În plus, vârful de la 632 cm⁻¹ indică îndoirea în afara planului vibrațiilor CH, iar benzile din regiunea 700-900 cm⁻¹ corespund vibrațiilor de îndoire în afara planului, în timp ce cele din regiunea de 500-600 cm⁻¹ sunt atribuite vibrațiilor de întindere a inelului, puternic amestecate cu îndoirea în plan a vibrațiilor CH.

La compararea rezultatelor obținute pentru nanoparticule (NP) cu extracte, se observă o creștere a vârfurilor corespunzătoare compușilor organici (1400–1650 cm⁻¹). Mai exact, trei vârfuri apar în spectrele FTIR ale NPs sau experimentează o creștere semnificativă a intensității: 1639/1651 cm⁻¹,

1608 cm^{-1} (mai vizibile în MM-AgNP) și 1516/5 și 1450/3, 1272/ 48, respectiv 1172/3. Datele din literatură atribuie aspectul vârfurilor FTIR la 1172/3 și 1272/48 cm^{-1} prezenței AgNP-urilor. Creșterea observată pentru vârful la 3363/31 cm^{-1} se datorează cel mai probabil prezenței nanoparticulelor de argint. Modificările semnificative rămase în spectrele FTIR ar putea fi atribuite după cum urmează: 1639/1651 cm^{-1} (întinderea C-N și C-C indicând prezența proteinelor), 1608 cm^{-1} (mai vizibile în MM-AgNP, corespunzătoare banda amidă I a proteinei), 1516/5 (vibrație de îndoire CH în plan din inelele fenil) și 1450/3 (vibrație de întindere N–H prezentă în legăturile amidice ale proteinelor). Aceste rezultate sugerează o acțiune sinergică a mai multor clase de fitoconstituenți în procesul de fitosinteză, inclusiv compuși fenolici și proteine [24].

6. Evaluarea potențialului biomedical și a citotoxicității

6.1. Evaluarea activității antioxidante a nanoparticulelor de argint

În Fig. 1 sunt redată rezultatele testului de evaluarea a potențialului antioxidant pentru extractele și dispersiile conținând nanoparticule metalice.

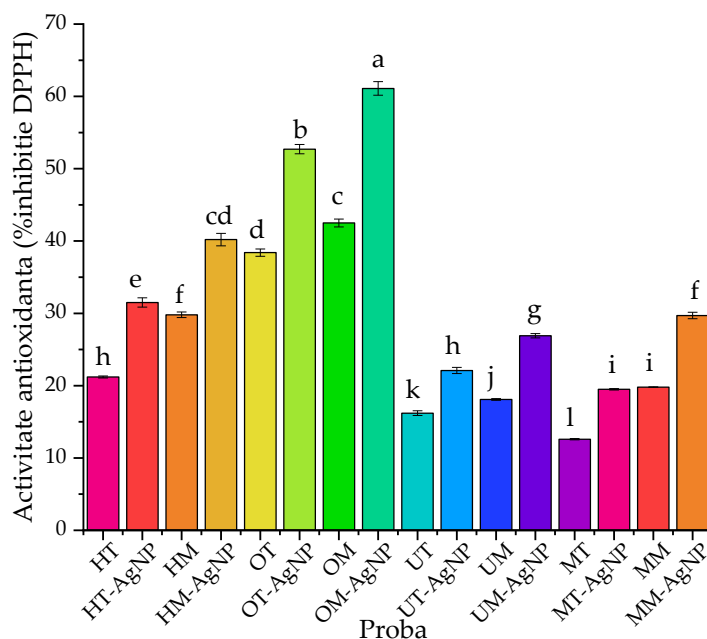


Fig. 1. Rezultatele testului de evaluarea a potențialului antioxidant (inhibare DPPH). Valorile sunt medii \pm SEM, $n = 5$ per grup de tratament. Mediile care nu prezintă o literă superscript comună diferă ($p < 0,05$), conform analizei prin ANOVA unidirecțională și testul TUKEY.

6.2. Evaluarea morfologiei, biocompatibilității, viabilității și citotoxicității

6.2.1. Analiza dinamicii și morfologiei fibroblastelor gingivale umane (HFIB-G) expuse la nanoparticule de argint fitosintetizate

Fibroblastele gingivale incubate cu nanoparticule de argint fitosintetizate în concentrații scăzute de 0.1% și timp de expunere redus (24 ore) prezintă mici modificări morfologice. Celulele păstrează în general forma alungită, dar se observă o ușoară reducere a extinderilor citoplasmice. Nucleul rămâne intact, iar citoplasma nu arată semne evidente de contracție. Fibroblastele încă aderă bine la substrat, însă pot fi observate mici vacuole citoplasmice sau începuturi de agregare a nanoparticulelor în jurul celulei.

La concentrații mari de 5% și timp de expunere prelungit cu nanoparticule de argint fitosintetizate, fibroblastele suferă schimbări morfologice dramatice. Celulele sunt complet rotunjite, mai ales pentru unguș, semn al pierderii aderenței, iar citoplasma este redusă semnificativ. Nucleii par fragmentați sau chiar absenți în unele celule, indicând moarte celulară.

Depozitele de nanoparticule de argint sunt vizibile atât în interiorul, cât și în exteriorul celulelor, sugerând internalizarea nanoparticulelor și afectarea severă a structurii celulare.

6.2.2. Analiza viabilității fibroblastelor gingivale umane (HFIB-G) după incubarea cu nanoparticulele de argint fitosintetizate prin tehnica MTT

Rezultatele obținute în urma efectuării testului MTT indică faptul că nu există modificări semnificative ale viabilității celulelor HFIB-G expuse la concentrații scăzute de 0,1% HM-AgNP și HT-AgNP, în comparație cu grupul martor. În contrast, incubarea fibroblastelor gingivale umane timp de 48 de ore cu concentrații mai mari de HM-AgNP și HT-AgNP a determinat o reducere semnificativă a viabilității celulare, cu o valoare $p < 0,001$ pentru 2.5% HM-AgNP și HT-AgNP, $p < 0,01$ pentru 5% HM-AgNP și $p < 0,05$ pentru 5% HT-AgNP.

Concentrațiile de 2.5% și 5% OM-AgNP și OT-AgNP au determinat o scădere progresivă, a viabilității celulelor HFIB-G testate, atât după incubarea la 24 de ore ($p < 0,05$ pentru 2.5% OM-AgNP și OT-AgNP; $p < 0,01$ pentru 5% OM-AgNP; , $p < 0,001$ pentru OT-AgNP), cât și după incubarea la 48 de ore ($p < 0,001$ pentru 2.5% OM-AgNP; $p < 0,01$ pentru 2.5% OT-AgNP; $p < 0,001$ pentru 5% OM-AgNP și OT-AgNP).

Rezultatele obținute în urma expunerii timp de 48 de ore la 2.5% și 5% MM-AgNP, respectiv MT-AgNP sunt în concordanță cu cele obținute pentru OM-AgNP și OT-AgNP. De asemenea UM-AgNP și UT-AgNP în concentrații ridicate (2,5% și 5%) determină o scădere semnificativă a viabilității celulelor fibroblastice umane într-o manieră dependentă de doză și de timpul de expunere.

Rezultatul testului MTT a arătat că atât extractele brute, cât și nanoparticulele lor corespunzătoare demonstrează o scădere dependentă de concentrație a viabilității celulare, extractele asistate de microunde (MM) și nanoparticulele sintetizate cu microunde (MM-AgNP) prezentând efecte mai pronunțate decât nanoparticulele obținute prin extracția clasică. Mai exact, tratamentul cu MM-

AgNP-urile au redus viabilitatea celulelor HFIB-G cu 37,72% după 24 de ore și cu 56,85% după 48 de ore la o concentrație de 5%, în timp ce pentru MT-AgNPs reducerea a fost de 18,08% după 24 de ore și 38,86 % după 48 de ore.

Analiza comparativă a efectelor citotoxice dintre extractele brute și nanoparticulele lor respective a relevat un model consistent în care extractele brute prezintă o potență mai mare. În special, extractul MM a dus la o reducere substanțială de 69% a viabilității celulare după 48 de ore, depășind reducerea observată pentru omologul său nanoparticule (56,86%). Această tendință subliniază capacitățile citotoxice îmbunătățite ale extractelor brute în comparație cu formulările lor de nanoparticule, sugerând o potențială concentrație de compuși bioactivi în extracte care pot fi moderate atunci când sunt procesate în nanoparticule.

În urma testului MTT a probelor de isop și oregano, s-a observat că nanoparticulele fitosintetizate testate nu au afectat nivelul de viabilitate celulară la cea mai mică concentrație după 24 și 48 de ore de incubație. Cu toate acestea, la concentrații mai mari, în special după 48 de ore de incubare, s-a observat o scădere a viabilității celulare în comparație cu martor (celule fără expunere la nanoparticulele fitosintetizate).

În cazul extractelor de urzică moartă, rezultatele testului MTT relevă faptul că viabilitatea celulară scade în manieră dependentă de doză în cazul incubării cu ambele tipuri de soluții de nanoparticule, atât după 24- cât și 48 de ore, în comparație cu controlul. Se observă o viabilitate mai scăzută în cazul probelor obținute prin metoda de extracție la temperatură în comparație cu metoda de extracție asistată de microunde.

6.2.3. Evaluarea producției de oxid nitric (NO) prin metoda Griess

Pentru testele efectuate asupra soluțiilor de nanoparticule fitosintetizate utilizând extracte de *Marrubium vulgare L* s-a observat că, spre deosebire de extractele brute, nivelurile de NO au crescut pentru ambele metode de extracție și au rămas crescute după 24 și 48 de ore la cea mai mare concentrație (5% din extractul inițial), indicând un răspuns inflamator susținut în comparație cu controlul. În mod remarcabil, cea mai semnificativă creștere a NO, cu 27%, a fost observată după 48 de ore de incubare cu extractul MM, în concordanță cu constatările de citotoxicitate raportate în rezultatele testului MTT.

Nivelul oxidului nitric în testele efectuate utilizând soluții de nanoparticule fitosintetizate prin intermediul extractelor de urzică moartă a crescut în același timp cu mărirea dozei de nanoparticule fitosintetizate, după o incubare a celulelor timp de 24h. În schimb, nivelul oxidului nitric a scăzut în

comparație cu nivelul NO din control după 48h, sugerând un efect antiinflamator asupra fibroblastelor gingivale umane ale probelor testate.

Cea mai mare capacitate antiinflamatoare a fost observată în cazul concentrațiilor mai mici de HT-AgNP după 48 de ore de incubare, unde nivelul de oxid de nitric a scăzut cu aproximativ 12% față de martor. În schimb, în cazul AgNP-urilor obținute folosind extracte de oregano, s-a observat o ușoară scădere a nivelului de NO după 48 de ore de expunere, în special la concentrația de 0,1%, comparativ cu controlul. În plus, se observă că cel mai scăzut nivel de nitriți a fost înregistrat în cazul probelor obținute prin metoda extracției la temperatură.

6.2.4. Evaluarea citotoxicității prin metoda LDH

După expunerea la HT-AgNP, integritatea membranei nu a fost afectată semnificativ. Cu toate acestea, incubarea cu HM-AgNP a afectat în mod semnificativ integritatea membranei, în special după 48 de ore, arătând o creștere de aproximativ 15% a nivelului de LDH în comparație cu controlul. Cea mai mare creștere a fost observată după 48 de ore de incubare cu OM-AgNP (creștere de 45,97% față de martor), în timp ce cel mai mare nivel măsurat după incubarea cu OT-AgNP a fost de 30,1% în comparație cu controlul după 24 de ore.

În cazul nivelului LDH eliberat în mediu pentru soluțiile de nanoparticule fitosintetizate cu extracte de unguș, nu sunt modificări semnificative comparativ cu controlul. La concentrații mai mari (2,5%, 5%), se remarcă o scădere a nivelului LDH comparativ cu controlul pentru ambele probe, sugerând un efect protector al probelor testate asupra integrității membranare a liniei celulare HFIB-G.

Pentru probele de nanoparticule fitosintetizate cu extracte de urzică moartă, în ceea ce privește nivelul LDH eliberat în mediu după pierderea integrității membranare se observă o cantitate de LDH mai mică față de control la concentrațiile mai mari ale probelor testate, mai ales după o incubare timp de 24h, sugerând o capacitate protectoare a probelor testate asupra membranei fibroblastelor gingivale umane testate. Cel mai scăzut nivel de LDH a fost măsurat după o incubare a fibroblastelor timp de 24h la concentrația de 5% UM -AgNP și UT-AgNP, cu 21,47% respectiv 23,47% față de control. Nu sunt diferențe semnificative ale nivelului de LDH în cazul incubării celulelor timp de 48h.

7. Concluzii și contribuții personale

În prezenta teza de doctorat am urmărit realizarea și caracterizarea fizico-chimică și biologică a unor nanoparticule de argint obținute prin fitosinteză, în scopul dezvoltării unor sisteme antimicrobiene moderne cu potențială eficacitate în prevenirea și tratarea locală a parodontopatiilor.



Rezultatele studiului evidențiază viabilitatea utilizării extractelor naturale în fitosinteza nanoparticulelor de argint. Aplicarea a două metode distincte de extracție, anume extracția clasică la temperatură și extracția asistată de microunde, a condus la obținerea unor extracte naturale cu diferențe notabile în compoziție. Aceste variații compoziționale, laolaltă cu diferențele compoziționale între diferite plante au avut un impact semnificativ asupra morfologiei și dimensiunii nanoparticulelor sintetizate.

Gradul de noutate al tezei este adus în principal de fitosinteza nanoparticulelor de argint folosind extracte de *Marrubium vulgare L* (unguraș). obținute prin două metode de extracție diferite: extracția clasică la temperatură-MT și extracția asistată cu microunde-MM. Utilizarea extractelor naturale pentru dezvoltarea nanoparticulelor metalice reprezintă un domeniu în continuă dezvoltare. Abordarea prezentată în această teză de doctorat se aliniază cu principiul „chimiei verzi”.

Studiul actual reprezintă o confirmare a potențialului extractelor de *Marrubium vulgare L* în domeniul nanotehnologiei. Pe de altă parte, având în vedere potențialul biomedical binecunoscut al acestei plante, nanomaterialele dezvoltate ar putea avea aplicații în mai multe domenii biomedicale, dar sunt necesare studii suplimentare.

Cercetările întreprinse în prezenta teză de doctorat constituie o validare a potențialului aplicativ al extractelor vegetale, îndeosebi a celor de *Marrubium vulgare L* în contextul nanotehnologiei, evidențiind o aliniere cu principiul fundamental al "chimiei verzi". Această abordare urmărește reducerea substanțelor periculoase reziduale și limitarea utilizării reactivilor cu impact negativ asupra mediului și sănătății umane. Cu toate acestea, este imperativă derularea de investigații suplimentare pentru a evalua exhaustiv toxicitatea nanoparticulelor produse prin procesele de fitosinteză.

Cercetările personale au furnizat o serie de dovezi privind interacțiunile complexe dintre nanomateriale și sistemele biologice, evidențiind necesitatea continuării cu evaluări cuprinzătoare ale biocompatibilității și potențialului terapeutic al acestora.

BIBLIOGRAFIE

1. Agarwal E, Pradeep AR, Bajaj P, Naik SB. Efficacy of local drug delivery of 0.5% clarithromycin gel as an adjunct to non-surgical periodontal therapy in the treatment of current smokers with chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *Journal of Periodontology*, 83,1155 – 1163, 2012.
<https://doi.org/10.1902/jop.2012.110600>.

2. Arunachalam R, Rajeev V, Vedam V, Ganapathy S, Dhanavel J. Periostealitis in the management of Periodontal Disease. *Journal of Young Pharmacists*, 9 (1), 8 – 13, 2017. <https://doi.org/10.5530/jyp.2017.9.3>.
3. Sholapurkar A, Sharma D, Glass B, Miller C, Nimmo A, Jennings E. Professionally Delivered Local Antimicrobials in the Treatment of Patients with Periodontitis—A Narrative Review. *Dentistry Journal*, 9(1), 2, 2021. <https://doi.org/10.3390/dj9010002>.
4. https://www.ada.org/-/media/project/ada-organization/ada/ada-org/files/resources/research/ada_chairside_guide_periodontitis.pdf?rev=f31910007dc948f58b5f739282baa3e2&hash=81CB46DD0E0DEC987844AF73D1FAADF4
5. Constantin, M.; Lupei, M.; Bucatariu, S.-M.; Pelin, I.M.; Doroftei, F.; Ichim, D.L.; Daraba, O.M.; Fundueanu, G. PVA/Chitosan Thin Films Containing Silver Nanoparticles and Ibuprofen for the Treatment of Periodontal Disease. *Polymers*, 15, 4, 2023. <https://doi.org/10.3390/polym15010004>
6. Baroi, AM; Fierascu, I; Ghizdareanu, AI; Trica, B; Fistos, T; Matei, RI; Fierascu, RC; Firinca, C; Sardaescu, ID; Avramescu, SM. Green Approach for Synthesis of Silver Nanoparticles with Antimicrobial and Antioxidant Properties from Grapevine Waste Extracts. *International Journal of Molecular Sciences*, 25, 4212, 2024. <https://doi.org/10.3390/ijms25084212>
7. Bekut M, Brkić S, Kladar N, Dragović G, Gavarić N, Božin B. Potential of selected Lamiaceae plants in anti(retro)viral therapy. *Pharmacol Res*, 133:301-314, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.12.016>.
8. Nieto G. Biological activities of three essential oils of the lamiaceae family. *Medicines*, 4(3):p. 63, 2017. <https://doi.org/10.3390/medicines4030063>.
9. Popović-Djordjević J., Cengiz M., Ozer M. S., Sarikurkcu C. Calamintha incana: essential oil composition and biological activity. *Industrial Crops and Products*, 128(2018):162–166, 2019.
10. Çelik G., Kılıç G., Kanbolat Ş. Biological activity, and volatile and phenolic compounds from five Lamiaceae species. *Flavour and Fragrance Journal*, 36(2):223–232, 2021.
11. Dhayalan M, Anitha Jegadeeshwari L, Nagendra Gandhi N. Biological activity sources from traditionally used tribe and herbal plants material. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 8(6):11–23, 2015.
12. Uritu CM, Mihai CT, Stanciu GD. Medicinal plants of the family Lamiaceae in pain therapy: A review. *Pain Research and Management*, 2018:44, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7801543>

13. Cocan I, Alexa E, Danciu C. Phytochemical screening and biological activity of lamiaceae family plant extracts. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(2):1863–1870, 2018. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5640>.
14. dos Santos KP, Sedano-Partida MD, Sala-Carvalho WR. Biological activity of Hyptis Jacq. (Lamiaceae) is determined by the environment. *Indian Crops Production*, 112:705–715, 2018.
15. Huang X, Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. *Nanomedicine (Lond)*, 2(5):681–693, 2007. <https://doi.org/10.2217/17435889.2.5.681>.
16. Leung AB, Suh KI, Ansari RR. Particle-size and velocity measurements in flowing conditions using dynamic light scattering. *Applied Optics*, 45(10):2186–2190, 2006. <https://doi.org/10.1364/ao.45.002186>.
17. Noginov MA, Zhu G, Bahoura M, Adegoke J, Small C, Ritzo BA, Draciiiev VP, Siialaev VM. The effect of gain and absorption on surface plasmons in metal nanoparticles. *Applied Physics B*, 86:455–460, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00340-006-2401-0>
18. Taleb A, Petit C, Pileni MP. Optical properties of self-assembled 2D and 3D superlattices of silver nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B*, 102:2214–2220, 1998
19. He R, Qian XF, Yin J, Zhu ZK. Preparation of polychrome silver nanoparticles in different solvents. *Journal of Materials Chemistry*, 12:3783–3786, 2002
20. Teixeira B, Marques A, Ramos C, Serrano C, Matos O, Neng NR, Nogueira JMF, Saraiva JA, Nunes ML. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 2707–2714, 2013
21. Sik B, Kapcsándi V, Székelyhidi R, Hanczné EL, Ajtony Z. Recent Advances in the Analysis of Rosmarinic Acid From Herbs in the Lamiaceae Family. *Natural Product Communications*, 14, 2019. <https://doi.org/10.1177/1934578X198642>
22. Yuan JF, Wang TT, Wang DH, Zhou GH, Zou GX, Wang Y, Gong MG, Zhang B. Effect of Microwave on Changes of Gallic Acid and Resveratrolina Model Extraction Solution. *Food and Bioprocess Technology*, 13, 1246–1254, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02452-7>
23. Lupuliasa AI, Prisada RM, Matei (Brazdis) RI, Avramescu SM, Vasile BS, Fierascu RC, Fierascu I, Voicu-Bălas B, Meleşcanu Imre M, Pițuru SM, Anuța V, Dinu-Pîrvu CE. Development of biologically active phytosynthesized silver nanoparticles using *Marrubium vulgare* L. extracts: applications and cytotoxicity studies. *Nanomaterials*, 14(10), 895, 2024. <https://doi.org/10.3390/nano14100895>.



24. Lupuliasa AI, Baroi AM, Avramescu SM, Vasile BS, Prisada RM, Fierascu RC, Fierascu I, Sărdărescu (Toma) DI, Ripszky Totan A, Voicu-Bălășea B, Pițuru SM, Popa L, Ghica MV, Dinu-Pîrvu CE. Application of common culinary herbs for the development of bioactive materials. *Plants*, 13(7), 997, 2024, <https://doi.org/10.3390/plants13070997>