

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE FARMACIE
DEPARTAMENTUL II – SPECIALIZAREA FARMACOGNOZIE**

KIS I. BRIGITTA



REZUMAT

Conducător științific
Prof. Univ. Dr. Corina Danciu

**Timișoara
2022**

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE FARMACIE
DEPARTAMENTUL II – SPECIALIZAREA FARMACOGNOZIE**

KIS I. BRIGITTA



REZUMAT

***POPULI GEMMAE: FITOCHIMIE, POTENȚIAL TERAPEUTIC
ȘI SINTEZA VERDE A NANOPARTICULELOR DE ARGINT***

Conducător științific
Prof. Univ. Dr. Corina Danciu

**T i m i ș o a r a
2022**

POPULI GEMMAE: FITOCHIMIE, POTENȚIAL TERAPEUTIC ȘI SINTEZA VERDE A NANOPARTICULELOR DE ARGINT

I. INTRODUCERE

Din trecut și până în prezent Regnul Plantae oferă numeroase specii de plante care conțin fitocompuși cu valoare terapeutică incontestabilă. Evoluția științei și a tehnologiei a dus la descoperirea potențialului terapeutic a metaboliților secundari extrași din diferite produse vegetale. Din acest motiv, interesul pentru fitochimice a crescut semnificativ în ultimii ani. Studii recente au descris că mai mult de 60% dintre medicamentele utilizate în prezent se bazează pe plante medicinale (1). Un număr mare de compuși naturali au demonstrat eficacitatea în prevenția/tratamentul diferitelor probleme legate de sănătatea umană, inclusiv a bolilor acute și/sau cronice (2, 3). De asemenea, sunt cunoscute încă din perioada antichității, calitățile fizico-chimice și efectele biologice ale metalelor prețioase și semiprețioase cum ar fi Au, Ag, Cu sau Zn. Dintre acestea argintul este cel mai recunoscut datorită calităților de agent catalizator, antimicrobian, anti-inflamator sau cicatrizant. Coroborarea științei moderne prin studiile interdisciplinare, cu domeniul nanotehnologiei contribuie la obținerea de noi compuși de tipul nanoparticulelor cu proprietăți farmacologice bogate. Aplicarea nanotehnologiei în medicină a deschis noi căi pentru a oferi opțiuni de tratament mai sigure și mai eficiente. Nanoparticulele, datorită dimensiunilor mici (între 10 și 100 nm), pot contribui la eliberarea ținută a medicamentelor în anumite zone ale corpului, astfel crescând eficacitatea acestora și reducând efectele secundare (4).

Populus nigra L. (plopul negru) este o specie a genului *Populus*, aparținând familiei *Salicaceae*. Plopul negru este un arbore a cărui înălțime poate ajunge până la 30 m, iar diametrul până la 2 m. În România crește prin pajiști umede și depresiuni, dar apare și la câmpie (5, 6). Principalul produs vegetal obținut de la plopul negru este reprezentat de muguri. Aceștia sunt mari, de 2 cm lungime și 5-8 mm grosime, conici, alungiți, vârful este ascuțit și ușor curbat, de culoare galben-brună. La suprafață prezintă un lipici vâcos cu un miros balsamic slab, dar aromat. Pe axa centrală a mugurilor sunt 4-8 bractee ovale și ascuțite, acestea fiind aderente datorită rășinilor din compoziție. Tot datorită rășinilor care acoperă mugurii, aceștia au un aspect strălucitor (7, 8).

În ceea ce privește compoziția chimică a produsului vegetal de interes (*Populi gemmae*-notat în continuare Pg), numeroase studii asupra rășinii obținute din muguri de plop, au demonstrat prezența derivaților flavonici (crizol, tectocrizol, apigenol), flavonolilor (galangin, isalpinin, quercetol, kemferol) și a altor derivați metilați corespunzători (pinocembrină, pinostrombină). De asemenea, a fost demonstrată prezența acizilor cafeic, dimetilcafeic, izoferulic, precum și a esterilor acestora. Esterii acidului izoferulic cu alcooli alifatici și aromatici sunt prezenți în număr mare și par să predomine cantitativ în extract. De asemenea, au fost identificați acizi grași și alcooli alifatici. Dintre componentele terpenice identificate cel mai important este bisabololul, alături de: γ -selinena, δ -cadinena, α -elemene și γ -cadinena (9, 10). În literatura de specialitate a fost menționată absența antocianinei, saponinelor și a chinonelor (11).

Speciile de plop reprezintă un subiect de interes în domeniul medical datorită profilului fitochimic extins, dar și datorită toxicității reduse. Diferite tipuri de extracte obținute din produsul

vegetal și-au dovedit eficacitatea pentru tratamentul unui număr crescut de afecțiuni precum bronșită, tuse, trahee, laringită, dureri în gât, ulcere, hemoroizi, fisuri anale, reumatism etc. Un număr tot mai mare de studii au descris noi aplicații farmaceutice ale diferitelor tipuri de extracte obținute de la mugurii de plop negru, printre acestea numărându-se proprietățile: antioxidante, antidiabetice, anticanceroase, hepatoprotectoare și antimicrobiene (12-19).

Obiectivele acestei teze de doctorat a fost:

- Evaluarea extractului de Pg obținut din zona de vest al României cu privire la compoziția fitochimică și capacitatea antioxidantă.
- Evaluarea potențialului terapeutic al extractului de Pg (studii *in vitro* cu privire la activitatea antimicrobiană pe tulpinile selectate (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*); evaluarea acțiunii antiproliferative, citotoxice, pro-apoptice pe liniile celulare de adenocarcinom mamar uman MCF7, respectiv adenocarcinom pulmonar A549; studii privind potențialul antiangiogenic utilizând tehnica membranei corioalantoice a embrionului de găină; studii privind activitatea imunomodulatoare a extractului de Pg.
- Evaluarea nanoparticulelor de argint obținute prin sinteza verde din extractul de muguri de *Populus nigra* L. (caracterizarea fizico-chimică, studii *in vitro* cu privire la activitatea antimicrobiană pe tulpinile selectate (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*), respectiv antiproliferativă pe liniile celulare de adenocarcinom mamar uman MCF7, și adenocarcinom pulmonar A549.

II. CONTRIBUȚIA PERSONALĂ. OBIECTIVE. MATERIALE ȘI METODE. REZULTATE.

STUDIUL 1: Evaluarea profilului fitochimic a extractului de Pg.

În ultimii ani, studiile experimentale au demonstrat că plantele medicinale prezintă o sursă bogată de fitocompuși cu o varietate mare de efecte terapeutice (20, 21). Contribuția personală a acestui studiu constă în obținerea extractului de Pg colectat din partea de vest a României, analiza profilului fizico-chimic și screening-ul pentru potențialul antioxidant.

1.1. Extracția și caracterizarea fizico-chimică a extractului de Pg.

Mugurii de plop negru au fost recoltați din Timișoara iar extracția s-a efectuat în cadrul departamentului de Farmacognozie (Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babeș”). Pentru a obține extractul, s-au amestecat 10 g produs vegetal uscat și 10 mL de etanol 70%, apoi s-a acoperit cu parafilm și s-a lăsat la temperatura camerei. Extractul a fost pus apoi pe baie cu ultrasunete timp de 10 minute iar ulterior solventul a fost eliminat cu ajutorul unui rotavapor. Cu

ajutorul tehnicilor LC-MS, FT-IR s-a obținut o imagine clară a principalilor compuși conținuți în extractul uscat de Pg (22).

În ceea ce privește rezultatele obținute s-a dovedit că extractul de Pg conține un număr semnificativ de compuși din clasele fenolilor respectiv glicozidelor fenolice. Au fost identificați următorii compuși: acid dihidroxibenzoic, acid protocatecuic, acid 3-cafeoilchinic, acid 5-cafeoilchinic, acid cafeic și cicoric, apigenin-glucuronidă, crisoeriol-glucuronidă, tremuloidină, salicină, pinostrobină și tremulacină.

1.2. Evaluarea activității antioxidante a extractului de Pg.

În ultimii ani s-a pus un accent important pe plantele medicinale cu potențial antioxidant care pot avea numeroase beneficii pentru sănătate. Scopul acestui studiu a fost acela de a evalua activitatea antioxidantă a extractului de Pg cu ajutorul unei metode frecvent utilizate, DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Principalul avantaj al metodei DPPH este faptul că este rapidă și ușor de realizat. Acest test implică reacția de oxido-reducere dintre radicalul DPPH și antioxidanții naturali conținuți în extractul de Pg. Procentul de antioxidant obținut pentru extractele Pg a fost comparat cu cel obținut pentru vitamina C (referință). Valorile IC₅₀ alături de IC₁₀, IC₂₀, IC₈₀ și IC₉₀ au fost determinate folosind software-ul OriginPro 2020 (23).

Rezultatele obținute în ceea ce privește activitatea antioxidantă a extractului de Pg variaza de la 95% la 97,3%, în timp ce în cazul referinței acestea au fost între 97,5% la 98,9% (vitamina C). Reacția cinetică a fost examinată timp de 1200 de secunde pentru fiecare concentrație de extract Pg (50, 100, 250, 500, 1000 μg/mL). Rezultatele obținute în acest studiu au dovedit că extractul de Pg a prezentat o activitate antioxidantă semnificativă, comparabilă cu cea obținută pentru soluția etanolică de Vitamina C.

1.3. Determinarea elementelor anorganice ale extractului de Pg prin GF-AAS.

Pentru stabilirea elementelor anorganice ale extractului de Pg s-a folosit metoda GF-AAS. Concentrațiile de metal au fost stabilite cu ajutorul unui spectrofotometru novA 400G și pentru fiecare element, s-a înregistrat anterior o curbă de calibrare cu soluții standard Merck (24).

În ceea ce privește determinarea elementelor anorganice din probele de Pg, au fost detectate următoarele elemente: cadmiu 0,019 μg/g, crom 0,79 μg/g, mangan 0,59 μg/g, nichel 3,28 μg/g, cupru 6,66 μg/g, zinc 6,66 μg/g, fier 39 μg/g, aluminiu 2109,87 μg/g. Au fost doar 3 elemente (plumb, cobalt, arsen) sub limita de detectare. Prin urmare, extractul de Pg nu prezintă toxicitate.

STUDIUL 2: Evaluarea potențialului terapeutic al extractului de Pg.

Contribuția personală a acestui studiu constă în evaluarea extractului de Pg privind activitatea antimicrobiană împotriva microorganismelor selectate, activitatea antiproliferativă, citotoxică, pro-apoptotică, antimigratorie asupra liniilor celulare MCF7 (adenocarcinoma mamar), respectiv A549 (adenocarcinom pulmonar), activitatea antiangiogenică *in ovo* pe membrana corioalantoică și activitatea imunomodulatoare a extractului de Pg incluzând studii de viabilitate celulară și evaluarea expresiei citokinelor selectate.

2.1. Evaluarea activității antibacteriene și antifungice a extractului de Pg.

Pentru evaluarea antimicrobiană a extractului de Pg s-a folosit metoda disc-difuzimetrică și metoda diluției. Extractul de Pg a fost evaluat împotriva a opt microorganisme selectate: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida albicans* (25).

Pe baza rezultatelor obținute, s-a demonstrat faptul că extractul de Pg poate acționa ca agent bactericid împotriva *Staphylococcus aureus*, și ca agent bacteriostatic împotriva *Streptococcus pyogenes* și *Streptococcus mutans*, de asemenea ca agent fungicid împotriva tuturor tulpinilor de *Candida* testate. Valorile CMI (concentrația minimă inhibitoare) au fost cele mai crescute pentru *Staphylococcus aureus* (0,625 mg/mL) și *Enterococcus faecalis* (2,5 mg/mL). Au fost înregistrate valori mai scăzute pentru *Streptococcus pyogenes* și *Streptococcus mutans* (0,312 mg/mL pentru ambele).

2.2. Teste de evaluare *in vitro*: screening-ul potențialului antiproliferativ/citotoxic/pro-apoptotic al extractului de Pg pe două linii de celule canceroase (liniile celulare MCF7 și A549).

2.2.1. Caracterizarea proprietăților antiproliferative ale extractului de Pg folosind testul MTT.

Contribuția personală constă în evaluarea potențialului antiproliferativ al extractului de Pg pe liniile celulare de adenocarcinom mamar MCF7 și de adenocarcinom pulmonar A549 utilizând metoda MTT. Această metodă este utilizată pentru determinarea viabilității celulare și constă în reducerea sării de tetrazolium de culoare galbenă (bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu) la cristale de formazan de culoare violetă (23).

Rezultatele obținute în urma studiului au arătat că extractul Pg este selectiv pe liniile celulare selectate, valorile IC₅₀ fiind 72,49 μg/mL pe linia celulară MCF7 și 66,26 μg/mL pe linia celulară A549 (după 72 de ore de stimulare cu extract).

2.2.2. Caracterizarea distribuției celulelor în fazele ciclului celular după incubare cu extract de Pg.

Caracterizarea distribuției celulelor MCF7 și A549 în fazele ciclului celular după incubare cu extractul de Pg (10, 25, 50, 75, 100, 150 μg/mL) a fost realizată prin citometrie în flux (23).

S-au obținut rezultate similare atât în cazul celulelor A549 cât și în cazul celulelor MCF7. Extractul de Pg oprește celulele în faza G₀/G₁, cu toate acestea, procentul de celule în această fază este relativ mic, astfel principalul mecanism antiproliferativ al extractului de Pg nu se manifestă pe fazele ciclului celular.

2.2.3. Evaluarea efectului antimigrator al extractului de Pg folosind metoda Scratch.

Efectul antimigrator asupra celulelor canceroase MCF7 și A549 după incubarea cu extractul de Pg (10, 25, 50, 75, 100, 150 μg/mL) a fost evaluat prin metoda Scratch. Această

metodă se bazează pe capacitatea de a inhiba migrarea celulară, metastaza, creșterea și dezvoltarea celulelor canceroase (26).

Rezultatele înregistrate demonstrează că extractul de Pg a scăzut migrarea celulelor și a produs modificări în morfologia celulelor canceroase. Extractul de Pg a provocat o scădere dependentă de doză a ratei de închidere “Scratch”, care a fost de 1,4% (concentrația de 100 $\mu\text{g/mL}$ extract de Pg) și de 1,3% (concentrația de 150 $\mu\text{g/mL}$ de extract de Pg) în cazul liniei de celule canceroase MCF7. O concluzie similară a fost obținută pentru linia celulară A549, extractul de Pg a scăzut rata de închidere “Scratch” într-o manieră dependentă de doză, cea mai mare rată de închidere a fost de 14,1% (100 $\mu\text{g/mL}$ Pg) și 12,5% (150 $\mu\text{g/mL}$ Pg).

2.2.4. Determinarea potențialului citotoxic al extractului de Pg folosind testul lactat dehidrogenază (LDH).

Potențialul citotoxic al extractului de Pg (10, 25, 50, 75, 100 și 150 $\mu\text{g/mL}$) s-a evaluat prin intermediul testului LDH. Principiul acestui test se bazează pe eliberarea enzimei LDH în mediu; aceasta printr-o reacție enzimatică produce formazan. Cantitatea de formazan obținută este direct proporțională cu LDH, un indicator al efectului citotoxic (23, 25).

Rezultatele au arătat că extractul de Pg a avut un efect citotoxic asupra ambelor linii de celule canceroase. Un efect citotoxic semnificativ a fost observat după 72 de ore de stimulare cu concentrațiile: 25 $\mu\text{g/mL}$ ($13,5 \pm 0,7\%$), 50 $\mu\text{g/mL}$ ($18,2 \pm 0,9\%$), 75 $\mu\text{g/mL}$ ($22,9 \pm 1,1\%$) și 100 $\mu\text{g/mL}$ ($29,9 \pm 1,4\%$) în cazul celulelor MCF7. Pe de altă parte, efectul citotoxic a fost atins la 25 $\mu\text{g/mL}$ ($11,3 \pm 0,9\%$), 50 $\mu\text{g/mL}$ ($13,1 \pm 1\%$), 75 $\mu\text{g/mL}$ ($18 \pm 1,4\%$), dar și 100 $\mu\text{g/mL}$ ($21,7 \pm 1,6\%$) în cazul liniei celulare A549. Rata de citotoxicitate la doza de 150 $\mu\text{g/mL}$ a fost de $37 \pm 4,1\%$ față de control ($5 \pm 1,1\%$) în cazul celulelor MCF7 și $7,8 \pm 1,3\%$ față de control ($2,9 \pm 0,8\%$) în cazul celulelor A549. Prin urmare, s-au obținut rezultate citotoxice ușor superioare pentru linia celulară MCF7 în comparație cu linia celulară A549.

2.2.5. Detectarea potențialului pro-apoptotic al extractului de Pg prin colorare cu 4,6-diamidino-2-fenilindol (metoda DAPI).

Evaluarea potențialului pro-apoptotic al extractului de Pg (10, 25, 50, 75, 100 și 150 $\mu\text{g/mL}$) pe liniile de celule canceroase selectate (MCF7 și A549) a fost analizat prin metoda colorimetrică DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) (23, 25).

În urma testului DAPI, rezultatele obținute au indicat că dozele mari de extract de Pg au condus la semne de apoptoză pentru celulele testate care se traduc prin modificarea morfologiei celulelor canceroase. De asemenea, o creștere semnificativă a condensării cromatinei și semne de “blebbing” a membranei nucleare au fost observate.

2.2.6. Caracterizarea potențialului pro-apoptotic al extractului de Pg (precoce/tardiv) și a gradului de necroză prin tehnica Annexin V-PI.

Pentru a evalua procesul de apoptoză, tehnica Annexin V-PI a fost efectuată utilizând citometria în flux cu fluorescență. În urma incubării cu extractul de Pg (10, 25, 50, 75, 100, 150

μg/mL), liniile celulare MCF7 și A549 au fost evaluate cu privire la apoptoza precoce/tardivă, celule viabile și necrotice (23, 25).

S-a demonstrat că extractul de Pg induce un fenomen modest de apoptoză. Linia celulară MCF7 a fost mai sensibilă decât linia celulară A549. În ceea ce privește linia celulară MCF7, rezultate statistic semnificative în cazul celulelor apoptotice tardive au fost observate începând de la concentrația de 50 μg/mL de extract de Pg (procentul a fost de $0,44\% \pm 0,32$ față de control care a fost de $0,04\% \pm 0,03$) și au crescut treptat de la 75 μg/mL ($0,27\% \pm 0,25$), 100 μg/mL ($1,74\% \pm 0,25$) și respectiv 150 μg/mL ($3,11\% \pm 3,08$). Valorile de celule apoptotice precoce au fost următoarele: $2,63\% \pm 3,72$ (10 μg/mL Pg), $3,73\% \pm 4,49$ (25 μg/mL Pg), $8,85\% \pm 9,55$ (50 μg/mL Pg), $113,33\% \pm 11,12$ (75 μg/mL Pg), $28,83\% \pm 4,68$ (100 μg/mL Pg) și $45,53\% \pm 6,50$ (150 μg/mL Pg). Semnele de necroză au fost înregistrate pornind de la dozele cele mai mici: $6,64\% \pm 1,09$ (10 μg/mL), $9,53\% \pm 2,11$ (25 μg/mL), $9,98\% \pm 4,30$ (50 μg/mL), $14,97\% (\pm 75,14\%)$ μg/mL), $9,90\% \pm 3,14$ (100 μg/mL) și $5,01\% \pm 4,07$ (150 μg/mL).

În ceea ce privește linia celulară A549, extractul de Pg a prezentat un fenomen slab de apoptoză. Procentul de celule apoptotice precoce a crescut de la $1,34\% \pm 0,33$ (control) până la $1,70\% \pm 0,47$ (10 μg/mL Pg), $1,27\% \pm 0,12$ (25 μg/mL Pg), $1,34\% \pm 0,3$ μg (50 μg/mL Pg), mL Pg), $1,97\% \pm 0,77$ (75 μg/mL Pg), $1,47\% \pm 0,42$ (100 μg/mL Pg), $2,68\% \pm 0,62$ (150 μg/mL Pg). Legat de apoptoza tardivă, s-a conturat o ușoară creștere a celulelor, de la $1,43\% \pm 0,14$ (control) la $5,15\% \pm 1,02$ (150 μg/mL Pg), însă restul concentrațiilor testate nu au produs o creștere remarcabilă. Procentul de celule necrotice a crescut de la $0,12\% \pm 0,12$ (control) până la $0,60\% \pm 0,11$ (50 μg/mL Pg) și $0,62\% \pm 0,02$ (75 μg/mL Pg). Pe de altă parte, procentul de celule A549 viabile au scăzut de la $97,12\% \pm 0,04$ (control) la $92,01\% \pm 0,02$ (150 μg/mL).

2.2.7. Evaluarea profilului antiangiogenic al extractului de Pg folosind tehnica membranei corioalantoice normale (CAM).

Angiogeneza este considerată un factor important în progresia cancerului; în plus, este responsabilă pentru procesul de invazie celulară și metastază. Scopul acestui studiu a fost de a evalua *in ovo* efectul antiangiogenic al extractului de Pg pe membrana corioalantoică. Această metodă necesită utilizarea ouălor de găină fertilizate (*Gallus gallus domesticus*). S-a urmărit efectul asupra CAM a 150 μg/mL extract Pg în dezvoltarea normală, controlul fiind reprezentat de 0,1% DMSO. Evaluarea stereomicroscopică a fost efectuată zilnic, iar fotografiile capturate au fost prelucrate în continuare cu software-ul Zeiss ZEN (27).

Extractul de Pg a fost foarte bine tolerat pe membrana corioalantoică, nu au fost observate semne de toxicitate la nivelul plexului vascular. În urma incubării timp de 24 de ore cu extractul de Pg, s-a observat un grad scăzut de interconexiune capilară în interiorul inelului de plastic (unde a fost aplicat extractul). Un număr scăzut de vase nou formate a fost detectate în interiorul inelului. Cu toate acestea, părțile netratate (în afara inelului) au prezentat un grad mai mare de dezvoltare a vascularizației. S-a observat că utilizarea a 150 μg/mL de extract Pg pe CAM este bine tolerată. În concluzie, extractul de Pg a prezentat un potențial antiangiogenic pe membrana corioalantoică.

2.2.8. Efectele imunomodulatoare ale extractului de Pg. Evaluarea viabilității celulelor dendritice și expresiei citokinelor IL-10 și IL-23.

2.2.8.1. Evaluarea viabilității celulelor dendritice.

Scopul acestui studiu a fost evaluarea potențialului imunomodulator al extractului de Pg pe celule mononucleare din sângele periferic (PBMC) diferențiate în celule dendritice (CD). Determinarea viabilității celulelor a fost efectuată prin metoda colorimetrică FACS cu DAPI (24 de ore de stimulare), în timp ce evaluarea activității apoptotice s-a efectuat prin testul Annexin V-7AAD. DMSO a fost utilizat ca și control, în prezența sau absența unei stimulări inflamatorii cu LPS. Rezultatele obținute au fost examinate și interpretate folosind software-ul Flow Jo 7.6.5 (23).

Rezultatele preliminare obținute au indicat faptul că concentrațiile mai mari de extract de Pg ar putea afecta răspunsul imun, prin urmare, au fost incluse și concentrații mai mici de Pg (1-10 $\mu\text{g/mL}$). Metoda colorimetrică DAPI a arătat că nu au existat efecte citotoxice ale extractului de Pg (la concentrațiile scăzute și moderate) asupra CD naive și inflamatorii. Doar la concentrațiile de 75 și 100 $\mu\text{g/mL}$ de extract de Pg s-au identificat fenomene de toxicitate celulară (dar nu ating diferențe semnificative statistice). De asemenea, s-a demonstrat că celulele tratate cu cele mai scăzute concentrații de extract Pg (1-10 $\mu\text{g/mL}$) nu au intrat pe calea apoptotică. Concentrațiile mari de extract de Pg au dus la unele modificări în morfologia celulară. Prin urmare, utilizarea concentrațiilor scăzute de extract de Pg este substanțial mai bună, evitând apariția fenomenelor de apoptoză.

2.2.8.2. Evaluarea expresiei citokinelor IL-10 și IL-23.

Scopul acestui studiu a fost evaluarea potențialului imunomodulator al extractului de Pg asupra CD, prin analiza activității asupra citokinelor selectate, utilizând metoda ELISA. În acest experiment, au fost selectate două interleukine semnificative, și anume IL-10 și IL-23 (23).

Rezultatele privind expresia și eliberarea citokinelor au indicat faptul că concentrațiile scăzute de extract de Pg au condus la o creștere a secreției de IL-10 și IL-23 pe CD inflamatorii. Concentrațiile mai mari de Pg (începând de la 75 și 100 $\mu\text{g/mL}$) au scăzut producția de citokine de CD inflamatorii. De altfel, citokina antiinflamatoare IL-10 a prezentat rezultate semnificativ mai crescute decât citokina inflamatorie IL-23. Prin urmare, extractul de Pg poate inhiba răspunsurile proinflamatorii ale celulelor imune.

STUDIUL 3: Sinteza verde a nanoparticulelor de argint (AgNP).

Contribuția personală a acestui studiu constă în obținerea nanoparticulelor de argint folosind extractul de Pg, evaluarea efectului antimicrobian pe tulpinile selectate (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* și *Candida parapsilosis*) folosind metoda disc-difuzimetrică și metoda diluției, evaluarea potențialului antiproliferativ pe liniile celulare canceroase MCF7 și A549 cu ajutorul metodei MTT.

3.1. Sinteza verde a AgNP din extractul de Pg.

Scopul acestui studiu a fost utilizarea unei metode ecologice, tip „verde” pentru sintetiza nanoparticulelor de argint folosind extractul de Pg. Aceasta metodă a fost dezvoltată pentru a obține nanoparticule folosind extractul etanolic de Pg (Pg-AgNPs). Examinarea fizico-chimică a AgNP-urilor obținute a fost efectuată utilizând următoarele tehnici: analiza TG-DSC, FT-IR și investigațiile cu microscopie electronică (TEM și SEM-EDX). Aceste metode evidențiază stabilitatea, grupurile funcționale aflate la suprafața nanoparticulelor, de asemenea, dimensiunea și forma Pg-AgNP-urilor proaspăt sintetizate (28).

Din cauza temperaturilor diferite în timpul procesului de sinteză și din cauza diferitelor concentrații ale soluției apoase de AgNO₃, s-au obținut două tipuri diferite de Pg-AgNP (Pg-AgNPs_S1 la 25 °C și 1M iar Pg-AgNPs_S2 la 60 °C și 5M). Pg-AgNPs_S1 au prezentat o formă sferică sau cvasi-sferică, iar Pg-AgNPs_S2 au prezentat o formă neregulată (cu variații tip: romboedrice, triunghiulară și sferică). Analizele fizico-chimice au demonstrat faptul că Pg-AgNP-urile obținute sunt stabile, iar dimensiunea lor este mică, un aspect relevant pentru aplicațiile biomedicale. De asemenea, s-a demonstrat că forma și dimensiunea nanoparticulelor pot fi influențate prin controlul concentrației de sare metalică și a temperaturii de reacție.

3.2. Activitatea antimicrobiană a Pg-AgNP-urilor folosind metoda disc-difuzimetrică și metoda diluției

Activitatea antimicrobiană *in vitro* a Pg-AgNP-urilor (Pg-AgNP_S1 și Pg-AgNP_S2) a fost evaluată prin metoda disc-difuzimetrică și prin metoda diluției. Tulpinile selectate au fost: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* și *Candida parapsilosis* (29, 30).

Pg-AgNPs_S1, care au o formă sferică sau cvasi-sferică și o dimensiune între 3 și 60 nm, au prezentat o activitate slabă asupra *Pseudomonas aeruginosa* și *Escherichia coli* (Gram-negative), dar au prezentat rezultate semnificative asupra *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* (Gram pozitiv) și asupra speciilor de *Candida*. În mod similar, Pg-AgNPs_S2 care au o formă și o dimensiune neregulată între 5 și 150 nm, au prezentat o activitate slabă asupra speciilor *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* (Gram-negative) și asupra speciilor de *Candida* (*Candida albicans* și *Candida parapsilosis*). Pg-AgNPs_S2 au prezentat o activitate semnificativă asupra *Streptococcus pyogenes* și *Staphylococcus aureus* (Gram-pozitiv). Ambele Pg-AgNP-uri au prezentat activitate antimicrobiană semnificativă asupra bacteriilor Gram-pozitive. Comparând activitatea antimicrobiană a celor două nanoparticule (Pg-AgNPs-S1 și Pg-AgNPs-S2), se poate constata că diferența de activitate se poate datora formelor și dimensiunilor variate ale nanoparticulelor.

3.3. Activitatea antiproliferativă a Pg-AgNP-urilor folosind metoda MTT.

Scopul studiului a fost de a evalua activitatea antiproliferativă a Pg-AgNPs_S1 și Pg-AgNPs_S2 asupra liniilor celulare MCF7 (adenocarcinoma mamar) și A549 (adenocarcinom pulmonar), utilizând metoda MTT. A fost urmat același protocol ca și în studiul anterior menționat

mai sus. Concentrații diferite de Pg-AgNPs (10, 25, 50, 75, 100 și 150 $\mu\text{g/mL}$) au fost testate pe liniile de celule canceroase selectate, cu timpii de incubare de 24 și 72 de ore (31).

S-a demonstrat că Pg-AgNPs-urile au prezentat un potențial antiproliferativ în cazul ambelor linii de celule canceroase studiate (MCF7 și A549), însă dintre cele două nanoparticule testate Pg-AgNPs_S2 a prezentat o activitate superioară asupra liniei celulare MCF7 (comparând cu linia celulară A549). În cazul Pg-AgNPs_S1, s-a observat o scădere dependentă de doză a viabilității celulare pentru ambele linii celulare, în mod special în cazul liniei A549.

Activitatea antiproliferativă a nanoparticulelor de plop testate s-au manifestat într-o manieră dependentă de doză și timp, cu toate acestea, Pg-AgNPs_S2 au demonstrat un potențial antiproliferativ mult mai puternic pe ambele linii celulare canceroase studiate.

III. CONCLUZII

Având în vedere rezultatele obținute în urma studiilor din cadrul acestei teze de doctorat, se pot concluziona următoarele:

1. Analiza LC-MS a demonstrat că extractul obținut din mugurii de plop colectat din vestul României este bogat în compuși care aparțin în principal clasei fenolilor respectiv glicozidelor fenolice (acid dihidroxibenzoic, acid protocatecuic, acid 3-cafeoilchinic, acid 5-cafeoilchinic, acid cafeic și cioric, apigenin-glucuronidă, crisoeriol-glucuronidă, tremuloidină, salicină, pinostrobină și tremulacină).
2. Extractul etanolic de Pg este un inhibitor competitiv al Vitaminei C: consumă tot DPPH-ul în primele 20 de secunde. Concentrațiile selectate de extract de Pg (50, 100, 250, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$) au avut o activitate antioxidantă puternică. Procentul de inhibiție a extractului de Pg a variat între 95%-97,3% în comparație cu Vitamina C care a fost între 97,5%-98,9%.
3. În ceea ce privește profilul de siguranță al extractului de Pg, se poate concluziona că extractul a prezentat unele dintre oligoelementele esențiale (precum Fe, Cu, Zn, Mn). Elementele cu potențial toxic au fost sub limita de detecție (cum ar fi As, Cd, Co, Pb). În consecință, extractul de Pg nu conține elemente toxice, fiind sigur pentru administrare în doza corectă.
4. Extractul de Pg a prezentat o activitate antimicrobiană semnificativă împotriva microorganismelor selectate (*Streptococcus pyogenes*- MIC= 0,312 mg/mL, *Streptococcus mutans*- MIC= 0,312 mg/mL, *Staphylococcus aureus*- MIC= 0,312 mg/mL și specii de Candida, cum ar fi *Candida parapsilosis*- MIC= 1,25 mg/mL, *Candida albicans*- MIC= 1,25 mg/mL).
5. În ceea ce privește activitatea antiproliferativă, s-a demonstrat că extractul de Pg posedă activitate semnificativă pe ambele linii de celule canceroase (linia celulară de adenocarcinom mamar uman MCF7, precum și pe linia celulară de carcinom pulmonar uman A549) într-o manieră dependentă de doză și timp. În condițiile experimentale din cadrul acestui studiu, valorile IC_{50} înregistrate au fost 72,49 $\mu\text{g/mL}$ (linia celulară MCF7) și 66,26 $\mu\text{g/mL}$ (linia celulară A549).

6. Extractul de Pg a oprit proliferarea liniilor de celule canceroase selectate (MCF7 și A549) în faza G0/G1, dar procentul acestora a fost relativ scăzut, astfel se poate concluziona că mecanismul antiproliferativ al extractului de Pg nu este legat de fazele ciclului celular.
7. Efectul anti-migrator al extractului de Pg asupra liniilor de celule canceroase MCF7 și A549 a fost înregistrat la concentrații de 50 $\mu\text{g/mL}$, 75 $\mu\text{g/mL}$ și 100 $\mu\text{g/mL}$ extract Pg.
8. În ceea ce privește activitatea citotoxică a extractului de Pg pe liniile celulare testate, s-a demonstrat că după 72 de ore de stimulare a fost observat un efect citotoxic semnificativ la 75 $\mu\text{g/mL}$ ($22,9 \pm 1,1\%$) și 100 $\mu\text{g/mL}$ ($29,9 \pm 1,4\%$) în cazul celulelor MCF7, respectiv la 75 $\mu\text{g/mL}$ ($18 \pm 1,4\%$) și 100 $\mu\text{g/mL}$ ($21,7 \pm 1,6\%$) în cazul liniei celulare A549. Cea mai mare rată de citotoxicitate a fost de $37\% \pm 4,1\%$ față de control ($5 \pm 1,1\%$) în cazul celulelor MCF7, dar în general, concluzia este că activitatea citotoxică este relativ slabă.
9. Prin testul DAPI, s-a demonstrat faptul că condensarea cromatinei a fost crescută într-o manieră dependentă de doză. După incubarea cu doze mari de extract de Pg (100 și 150 $\mu\text{g/mL}$) s-au observat semne de apoptoză pentru celulele canceroase testate. Fragmentarea ADN-ului nu a fost detectată în cazul celulelor MCF7 și nici în cazul celulelor A549.
10. În urma efectuării analizei Annexin-PI se poate concluziona faptul că extractul de Pg induce un fenomen modest de apoptoză. Linia celulară MCF7 a fost mai sensibilă decât linia celulară A549.
11. Legat de profilul antiangiogenic al extractului de Pg se poate concluziona faptul că extractul aplicat la nivelul membrane corioalantoice a dus la un grad scăzut de interconexiune capilară fiind detectat doar un număr mic de vase nou formate. Extractul de Pg (150 $\mu\text{g/mL}$) a fost bine tolerat și nu a prezentat semne de toxicitate.
12. Activitatea celulelor imune a fost sensibilă la concentrațiile scăzute de extract de Pg (1-10 $\mu\text{g/mL}$), astfel, nu au existat efecte citotoxice ale extractului asupra CD naive și inflamatorii. Doar concentrațiile mari de extract de Pg (75 și 100 $\mu\text{g/mL}$) au indus toxicitate celulară, însă nu au fost atinse diferențe statistic semnificative. De asemenea, aceste concentrații mari de Pg au dus la unele modificări în morfologia celulară.
13. În ceea ce privește activitatea imunomodulatoare, s-a demonstrat că cea mai mică concentrație de extract de Pg (10 $\mu\text{g/mL}$) a reglat IL-12 și IL-23 subunitățile p19, p35.
14. S-au obținut două AgNP-uri diferite folosind un extract etanolic de Pg. Evaluând proprietățile fizico-chimice, s-a demonstrat că ambele Pg-AgNP-uri au fost stabile, iar dimensiunile particulelor au variat între 3 și 150 nm. Pg-AgNPs_S1 au avut o formă sferică sau cvasi-sferică, iar Pg-AgNPs_S2 au avut o formă neregulată. Acest studiu a demonstrat că Pg-AgNP-urile obținute pot fi potrivite pentru aplicații biomedicale ulterioare.
15. Atât Pg-AgNPs_S1 cât și Pg-AgNPs_S2 au prezentat activitate antimicrobiană semnificativă. Pg-AgNPs_S2 au prezentat o activitate semnificativă împotriva bacteriilor Gram-pozitive (*Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*) și asupra speciilor de *Candida* (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis*), dar o activitate mai slabă asupra bacteriilor Gram-negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*). Pg-AgNPs_S1 au prezentat o activitate mai slabă în general, dar un efect notabil asupra bacteriilor Gram-

pozitive (*Streptococcus pyogenes* și *Staphylococcus aureus*), și activitate antibacteriană mult mai slabă asupra bacteriilor Gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa* și *Escherichia coli*). Diferența dintre cele două Pg-AgNP testate se poate datora proprietăților fizico-chimice variate, cum ar fi forma sau dimensiunea lor. Pg-AgNPs-S1 au avut o dimensiune mică a particulelor, iar Pg-AgNPs-S2 au avut o dimensiune mai mare a particulelor, astfel încât suprafața de contact a fost mărită.

16. În urma evaluării activității antiproliferative *in vitro* a fost demonstrat faptul că Pg-AgNPs_S2 au prezentat un potențial antiproliferativ mai puternic pe liniile de celule canceroase umane MCF7 și A549 decât Pg-AgNPs_S1. Această activitate s-a manifestat într-o manieră dependentă de timp și doză.

Gradul de originalitate a tezei de doctorat constă în:

- Investigarea pentru prima dată a profilului fitochimic al extractului de muguri de *Populus nigra* L., recoltat din zona de vest a României (Timișoara).
- Evidențierea elementelor anorganice prezente în extractul de Pg.
- Realizarea unui studiu privind activitatea antioxidantă a extractului de Pg.
- Testarea activității antimicrobiene a extractului de Pg pe diferite tulpini bacteriene și fungice.
- Evaluarea *in vitro* a activității antiproliferative/pro-apoptotice/citotoxice a extractului de Pg pe liniile celulare MCF7 (adenocarcinoma mamar uman) respectiv A549 (adenocarcinoma pulmonar uman).
- Evidențierea potențialului antiangiogenic al extractului de Pg folosind tehnica membranei corioalantoice CAM.
- Investigarea activității imunomodulatoare a extractului de Pg *in vitro* la nivelul celulelor dendritice umane.
- Sinteza verde și caracterizarea nanoparticulelor de argint pornind de la extractul Pg.
- Evaluarea activității antimicrobiene a nanoparticulelor de argint sintetizate din extractul de Pg.
- Analiza efectului antiproliferativ pentru nanoparticulelor de argint sintetizate din extractul de Pg.

Rezultatele cercetărilor întreprinse în cadrul acestei teze de doctorat justifică continuarea studiilor în următoarele direcții:

- Evaluarea suplimentară a extractului de Pg, precum și a nanoparticulelor de argint sintetizate din muguri de plop negru pe alte linii celulare canceroase și tulpini microbiene.
- Evaluarea suplimentară *in vivo* a extractului de Pg, precum și a nanoparticulelor de argint sintetizate din muguri de plop negru pe modele animale experimentale.
- În cazul unor rezultate pozitive pot fi deschise noi linii de cercetare care implică de asemenea studiile clinice.

BIBLIOGRAFIE

1. Anand U, Jacobo-Herrera N, Altemimi A, Lakhssassi N. A Comprehensive Review on Medicinal Plants as Antimicrobial Therapeutics: Potential Avenues of Biocompatible Drug Discovery. *Metabolites*. 2019; 9, 258. doi: 10.3390/metabo9110258.
2. Jantan I, Bukhari SNA, Seyed Mohamed MA, Wai LK, Mesaik MA. The Evolving Role of Natural Products from the Tropical Rainforests as a Replenishable Source of New Drug Leads. Drug Discovery and Development- From Molecules to Medicine. London: *IntechOpen*. 2015. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/47844> doi: 10.5772/59603.
3. Mintah SO, Asafo-Agyei T, Archer M, Junior PA, Boamah D, Kumadoh D, Appiah A, Ocloo A, Boakye YD, Agyare C. Medicinal Plants for Treatment of Prevalent Diseases. *Pharmacognosy - Medicinal Plants*. London: IntechOpen; 2019. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/64420> doi: 10.5772/intechopen.82049
4. Khan I, Saeed K, Khan I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 2017. doi:10.1016/j.arabjc.2017.05.011
5. de Souza Silva JE, Santos Souza CA, da Silva TB, Gomes IA, Brito Gde C, de Souza Araújo AA, de Lyra-Júnior DP, da Silva WB, da Silva FA. Use of herbal medicines by elderly patients: A systematic review. *Arch Gerontol Geriatr*. 2014; 59, p. 227-33. doi: 10.1016/j.archger.2014.06.002.
6. Rédei K, Keserű Z, Szulcsán G. Early Evaluation of Promising White Poplar (*Populus alba* L.) Clones in Hungary. *Acta Silvatica et Lignaria Hungarica*. 2010; 6.
7. Tiziana D, Michele I, Elena C, Simona P, Antonietta F, Severina P. White poplar (*Populus alba* L.) leaf waste recovery and intercropping outcome on its polyphenols. *Industrial Crops and Products*. 2021; 171, p. 113866. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113866>.
8. Cottrell, Joan. Conservation of black poplar (*Populus nigra* L.). Forestry Commission Information Note, 2004.
9. Vanden BA, Cox K, Van Braeckel A, Neyrinck S, De Regge N, Van Looy K. Reintroduced Native *Populus nigra* in Restored Floodplain Reduces Spread of Exotic Poplar Species. *Frontiers in Plant Science*, 2021; 11. Doi:10.3389/fpls.2020.580653
10. Stanciauskaite M, Marksa M, Liaudanskas M, Ivanauskas L, Ivaskiene M, Ramanauskiene K. Extracts of Poplar Buds (*Populus balsamifera* L., *Populus nigra* L.) and Lithuanian Propolis: Comparison of Their Composition and Biological Activities. *Plants* (Basel). 2021; 10, p. 828. doi: 10.3390/plants10050828.
11. **Kis B**, Avram S, Pavel IZ, Lombrea A, Buda V, Dehelean CA, et al. Recent Advances Regarding the Phytochemical and Therapeutic Uses of *Populus nigra* L. Buds. *Plants*, 2020; 9, 1464. doi:10.3390/plants9111464
12. Jerkovic I, Mastelić I. Volatile compounds from leaf-buds of *Populus nigra* L. (Salicaceae). *Phytochemistry*. 2003; 63, p. 109-13. 10.1016/S0031-9422(02)00706-9.
13. Wang K, Zhang J, Ping S, Ma Q, Chen X, Xuan H, Shi J, Zhang C, Hu F. Anti-inflammatory effects of ethanol extracts of Chinese propolis and buds from poplar (*Populus×canadensis*). *J. Ethnopharmacol*. 2014; 155, p. 300–311.
14. Stanciu G, Chirila E, Dobrinas S, Negreanu-Pirjol T. Studies Regarding the Determination of Antioxidant Properties of New Plant Extracts for Cosmetic Purposes. *Rev. Chim*. 2010; 61, p. 45.

15. Benedec D, Oniga I, Muresan B, Mot AC, Damian G, Nistor A, Silaghi-Dumitrescu R, Hanganu D, Duma M, Vlase L. Contrast between Water- and Ethanol-Based Antioxidant Assays: Aspen (*Populus tremula*) and Black Poplar (*Populus nigra*) Extracts as a Case Study. *J. Food Qual.* 2014; 37, p. 259–267.
16. Vardar-Ünlü G, Sibel S, Unlu M. Composition and in vitro antimicrobial activity of Populus buds and poplar-type propolis. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2007; 24, p. 1011–1017.
17. De Marco S, Piccioni M, Pagiotti R, Pietrella D. Antibiofilm and Antioxidant Activity of Propolis and Bud Poplar Resins versus *Pseudomonas aeruginosa*. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2017; 2017, p. 1–11.
18. Sofowora A, Ogunbodede E, Onayade A. The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines*, 2013; 10, p. 210–229. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v10i5.2>.
19. Boumghar N, Behidj N, Ksouri R. Antimicrobial and antibiofilm activities of phenolic compounds extracted from *Populus nigra* and *Populus alba* buds (Algeria). *Braz. J. Pharm. Sci.* 2019; 55, p. e18114.
20. Salmerón-Manzano E, Garrido-Cardenas JA, Manzano-Agugliaro F. Worldwide Research Trends on Medicinal Plants. *International journal of environmental research and public health*, 2020; 17, 3376. <https://doi.org/10.3390/ijerph17103376>
21. Atanasov AG, Zotchev SB, Dirsch VM. et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2021; 20, p. 200–216. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>
22. Venugopal K, Ahmad H, Manikandan E, Thanigai AK, Kavitha K, Moodley MK, Bhaskar M. The impact of anticancer activity upon Beta vulgaris extract mediated biosynthesized silver nanoparticles (ag-NPs) against human breast (MCF-7), lung (A549) and pharynx (Hep-2) cancer cell lines. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2017, 173, p. 99–107.
23. **Kis B**, Pavel I, Avram S, Tăculescu EA, Herrero M, Schwiebs A, Radeke H, Muntean D, Diaconeasa Z, Minda D, Oprean C, Bojin F, Dehelean, C, Soica C, Danciu C. Antimicrobial activity, in vitro anticancer effect (MCF-7 breast cancer cell line), antiangiogenic and immunomodulatory potentials of *Populus nigra* L. buds extract. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2022; 22. Doi: 10.1186/s12906-022-03526-z.
24. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1985; 181, p. 119901299.
25. **Kis B**, Pavel I, Haidu D, Stefanut M, Diaconeasa Z, Tăculescu EA, Dehelean C, Șipos S, Ivan A, Danciu C. Inorganic Element Determination of Romanian *Populus nigra* L. Buds Extract and In Vitro Antiproliferative and Pro-Apoptotic Evaluation on A549 Human Lung Cancer Cell Line. *Pharmaceutics*. 2021; 13. Doi: 986. 10.3390/pharmaceutics13070986.
26. Buda V, Brezoiu AM, Berger D, Pavel IZ, Muntean D, Minda D, et al. Biological evaluation of black chokeberry extract free and embedded in two Mesoporous silica-type matrices. *Pharmaceutics*. 2020; 12, p. 838. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090838>
27. Moacă EA, Farcaș C, Ghiță A, Coricovac D, Popovici R, Cărăba-Meiță NL, Ardelean F, Antal DS, Dehelean C, Avram Ș. A Comparative Study of Melissa officinalis Leaves and Stems Ethanolic Extracts in terms of Antioxidant, Cytotoxic, and Antiproliferative Potential. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2018; 2018, p. 7860456. doi: 10.1155/2018/7860456.

28. Avram S, Ghiulai R, Pavel IZ, Mioc M, Babuta R, Voicu M, Coricovac D, Danciu C, Dehelean C, Soica C. Phytocompounds Targeting Cancer Angiogenesis Using the Chorioallantoic Membrane Assay. *IntechOpen*. 2017. doi: 10.5772/intechopen.68506
29. Ruíz-Baltazar AJ, Reyes-López SY, Larrañaga D, Estévez M, Pérez R. Green synthesis of silver nanoparticles using a *Melissa officinalis* leaf extract with antibacterial properties. *Results Phys*. 2017; 7, p. 2639–2643.
30. Kakakhel MA, Sajjad W, Wu F, Bibi N, Shah K, Yali Z, Wang W. Green synthesis of silver nanoparticles and their shortcomings, animal blood a potential source for silver nanoparticles: A review. *J. Hazardous Materials Advances*. 2021; 1, p. 100005. doi:10.1016/j.hazadv.2021.100005.
31. Wahab S, Khan T, Adil M, Khan A. Mechanistic aspects of plant-based silver nanoparticles against multi-drug resistant bacteria. *Heliyon*, 2021; 7, p. e07448. doi:10.1016/j.heliyon.2021.e07448.