

Universitatea din București

Facultatea de Biologie

Caracterizarea microbiotei periodontale
și contribuții la dezvoltarea de noi
perioceutice de origine vegetală

REZUMAT

Conducător științific:

Prof. univ. dr. Veronica Lazăr

Doctorand:

Bucur (Popa) Marcela

București

2015

CUPRINS

Introducere.....	1
Capitolul 1. Arhitectura, compoziția și implicațiile plăcii dentare în patologia cavității bucale.....	3
1.1 Microbitota cavității bucale	3
1.2 Etapele formării plăcii dentare.....	5
1.3 Implicațiile microbiotei plăcii dentare în patologia dentară.....	15
1.1.1 Cariogeneza.....	15
1.1.2 Infecțiile endodontice.....	17
1.1.3 Afecțiuni periodontale.....	17
1.3.3.1. Gingivita.....	20
1.3.3.2. Periodontita.....	20
1.4 Acțiunea antimicrobiană a extractelor vegetale și utilizarea lor în tratamentul afecțiunilor cavității bucale.....	23
Capitolul 2. Caracterizarea microbiotei periodontale și evaluarea efectului antimicrobian și imunomodulator al unor perioceutice de origine vegetală.....	32
2.1 Izolarea și identificarea tulpinilor microbiene.....	34
2.1.1 Materiale și metode	34
2.1.1.1 Examenul microscopic al frotiurilor colorate Gram.....	34
2.1.1.2 Testul catalazei.....	36
2.1.1.3 Testul oxidazei.....	36
2.1.1.4 Identificarea de certitudine a tulpinilor microbiene prin stabilirea profilului biochimic cu ajutorului testelor API (Indexul Profilului Analitic).....	36
2.1.2. Rezultate și discuții.....	39
2.2 Determinarea markerilor fenotipici și genotipici de rezistență la antibiotice ai tulpinilor bacteriene izolate din leziuni periodontale.....	46
2.2.1 Materiale și metode.....	46
2.2.1.1 Determinarea fenotipică a spectrului de sensibilitate la antibiotice al tulpinilor izolate.....	46
2.2.1.2 Determinarea genotipică a spectrului de sensibilitate la antibiotice al tulpinilor izolate.....	47
2.2.2 Rezultate și discuții.....	52
2.3 Caracterizarea la nivel fenotipic și genetic a spectrului factorilor de virulență asociați peretelui celular (aderența la substrat celular și inert) și solubili (toxine și enzime).....	63
2.3.1 Materiale și metode.....	63
2.3.1.1 Aderența la substratul inert.....	63
2.3.1.2 Aderența la substratul celular.....	64
2.3.1.3 Evidențierea prin teste biochimice a factorilor solubili de virulență și patogenitate.....	64
2.3.1.4 Evidențierea unor gene de virulență.....	67
2.3.2. Rezultate și discuții.....	70
2.4 Obținerea și caracterizarea fizico-chimică a unor uleiuri volatile de origine vegetală	82
2.4.1 Materiale și metode.....	82
2.4.1.1 Extracția prin hidrodistilare a uleiurilor volatile.....	82
2.4.1.2 Caracterizarea fizico-chimică a uleiurilor volatile	83

2.4.2. Rezultate și discuții.....	84
2.5 Obținerea, caracterizarea fizico-chimică a unor grafene funcționalizate cu argint și/sau ulei volatil de cuișoare.....	106
2.5.1. Sinteza grafenelor.....	106
2.5.2 Caracterizarea materiei prime-oxidul de grafit.....	106
2.5.3 Sinteza grafenelor funcționalizate cu argint	109
2.5.4 Determinarea distribuției granulometrice și a diametrului mediu al grafenei funcționalizate cu argint.....	110
2.5.5 Determinarea absorbanței în UV-Vis a nanoparticulelor de grafene funcționalizate cu argint	113
2.5.6 Analiza structurală prin difracție de raze X pentru grafene funcționalizate cu argint.....	117
2.5.7 Analiza termogravimetrică (TGA).....	121
2.5.8. Spectroscopie de infraroșu cu transformanță Fourier (FT-IR).....	123
2.6 Determinarea activității antimicrobiene a uleiurilor volatile și a grafenelor funcționalizate prin metode convenționale față de celulele microbiene în stare planctonică și aderată și investigarea mecanismelor moleculare de acțiune prin citometrie în flux.....	132
2.6.1 Materiale și metode.....	132
2.6.1.1 Determinarea concentrației minime inhibitorii a uleiurilor volatile/ standardelor analitice /grafenelor funcționalizate– metoda microdiluțiilor.....	132
2.6.1.2 Evaluarea sensibilității biofilmelor bacteriene la acțiunea extractelor vegetale/ standardelor analitice/grafene funcționalizate.....	133
2.6.1.3 Evaluarea influenței uleiurilor volatile și a standardelor analitice asupra permeabilității membranare și activității pompelor de eflux bacteriene	133
2.6.2. Rezultate și discuții	136
2.7. Studiul <i>in vitro</i> al biocompatibilității extractelor vegetale și a grafenelor funcționalizate cu extract de cuișoare prin determinarea activității citotoxice și a influenței asupra ciclului celular.....	237
2.7.1. Materiale și metode.....	237
2.7.1.1 Cultură de celule.....	237
2.7.2 Rezultate și discuții.....	241
2.8. Studiul efectului imunomodulator al unor extracte vegetale cu activitate antimicrobiană prin analiza profilului de expresie a genelor pentru citokine pro- și antiinflamatorii	246
2.8.1 Materiale și metode.....	246
2.8.1.1 Culturi de celule.....	246
2.8.1.2. Evaluarea profilului citokinic al celulelor THP1 în prezența uleiurilor volatile.....	246
2.8.1.3. Sinteza ADNc prin reverstranscrierea ARN total.....	248
2.8.1.4. Real-Time qRT-PCR (Real Time quantitative Reverse Transcription PCR).....	249
2.8.2 Rezultate și discuții.....	251
3. Concluzii.....	257
Lista de lucrări publicate pe parcursul elaborării tezei	262
Bibliografie.....	265

Introducere

Cavitatea bucală oferă o largă varietate de habitate, fiecare exercitând o presiune selectivă diferită, pentru o gamă foarte diversă de microorganisme (Wilson, 2008). Cariogeneza implică prezența bacteriilor Gram pozitive acidogene și acidurice (capabile să tolereze pH-ul acid), mai ales streptococii orali din grupul mutans (*Streptococcus mutans*, *Str. sobrinus*), lactobacilii și actinomicetele care metabolizează glucidele la acizi organici (în special acid lactic) care dizolvă fosfatul de calciu din compoziția smalțului dentar.

Afecțiunile periodontale sunt caracterizate de infecția și inflamația localizată în care sunt implicate în principal bacterii anaerobe Gram negative și afectează unul sau mai multe țesuturi periodontale – osul alveolar, ligamentul periodontal, cementul și țesutul gingival. Patogeneza acestei afecțiuni implică mecanisme imunologice care duc la distrugerea tisulară și pierderea osului (Nair și colab. 2014).

Tratamentul clasic al periodontitei se realizează cu agenți antimicrobieni de spectru larg (tetraciclina) sau cu o combinație de agenți, ca amoxicilina și metronidazolul. S-au utilizat de asemenea, penicilina V, ampicilina, augmentinul, eritromicina, cefalexina, dar este imposibilă găsirea unui antibiotic care să inhibe creșterea celor peste 500 de specii care cresc pe suprafața dentară (Chifiriuc și colab., 2011).

Rezistența bacteriană la antibiotice este o problemă acută a medicinei moderne, reducerea consumului inutil de antibiotice fiind o soluție aparent accesibilă, dar ridicând problematica stabilirii unui echilibru între reducerea presupusă a nivelului antibioretistenței și beneficiile evidente ale antibioterapiei. Nevoia globală pentru opțiuni alternative de prevenție și tratament pentru afecțiunile orale care să fie eficiente și economice vine din incidența ridicată a afecțiunii. Substanțele naturale izolate din plante folosite în medicina tradițională sunt considerate opțiuni promițătoare pentru viitor (Palombo, 2011).

Scopul acestui studiu a fost caracterizarea tulpinilor microbiene izolate din afecțiuni periodontale în ceea ce privește gradul de rezistență la antibioticele și substanțele antimicrobiene utilizate în mod curent în tratamentul periodontic, evidențierea potențialului lor de patogenitate și virulență și determinarea influenței unor extracte vegetale asupra acestor caracteristici în vederea utilizării lor ca alternative la substanțele anti-microbiene.

Capitolul 1. Arhitectura, compoziția și implicațiile plăcii dentare în patologia cavității bucale

1.1. Microbitota cavității bucale

Comunitatea bacteriană de la nivelul cavității orale este dominată de filumurile: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* și *Fusobacteria*. Un număr de 15 filumuri din domeniul *Bacteria* sunt listate în *Human Oral Microbiome Database* (HUMD) ca fiind regăsite în cavitatea orală, dintre care 11 sunt comensali orali: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Synergistetes*, *Tenericutes*, SR1 și TM7 (Curtis și colab, 2011); GNO2 a fost adăugat recent bazei de date (tabel nr. 1) și este necesară confirmarea prezenței și prevalenței sale în cavitatea orală, în timp ce genurile *Acidobacteria*, *Chlamydia* și *Deinococcus-Thermus* reprezintă colonizatori temporari (Wade, 2013). Componenta fungică a microbiomului oral este diversă, fiind reprezentată de peste 100 de specii diferite, genurile predominante fiind *Candida*, *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Saccharomycetales*, *Aspergillus*, *Fusarium* și *Cryptococcus* (Ghonnoum și colab. 2010).

Archaea reprezintă o componentă minoră a microbiomului oral și comunitatea archeană este limitată la un număr mic de specii/filotipuri, toate fiind metanogene. Sunt detectate și la indivizii sănătoși, însă numărul lor este mai ridicat la cei cu periodontite, iar speciile izolate sunt: *Methanobrevibacter oralis* și cele 2 filotipuri *Methanobrevibacter* denumite *Methanobrevibacterium curvum/congolus* și *Methonosarcina mazeii* (Matarazzo și colab., 2011; Nguyen-Hien și colab., 2013).

Cavitatea orală conține un spectru larg de membri aparținând familiei *Herpesviridae* în special din genul *Betapapillomavirus* și *Gammapapillomavirus* (Bottalico și colab., 2011).

Două specii de protozoare au fost regăsite în microbiota orală, *Entamoeba gingivalis* și *Trichomonas tenax*, numărul lor fiind însă mai ridicat la persoanele cu igienă precară (Ghabauchi și colab., 2010; Wade, 2013).

1.2. Etapele formării plăcii dentare

Procesul formării plăcii dentare poate fi împărțit în câteva faze:

- 1) Formarea peliculei pe suprafața dentară
- 2) Aderența/atașarea inițială a bacteriilor
- 3) Colonizarea/maturarea plăcii (Kolenbrander, 2000).

1.3. Implicațiile microbiotei plăcii dentare în patologia dentară

1.3.1. Cariogeneza

Cariile dentare reprezintă dizolvarea smalțului dintelui de către acidul produs ca rezultat al fermentării carbohidraților din dietă de către bacteriile din microbiota cavității orale. În timp ce *S. mutans* și lactobaciliile sunt deseori prezenți în leziunile cariogene, alte specii prezente sunt *Selenomonas*, *Neisseria*, o serie de specii streptococice, *Bifidobacterium* și propionibacterii, *Scardovia wiggisiae*, *Veillonella parvula*, *Streptococcus cristatus* și *Actinomyces gerensceriae*. (Scannapieco, 2013).

1.3.2. Infecțiile endodontice

Dacă leziunile determinate de cariile dentare sunt lăsate netratate, leziunea poate progresa prin dentină la pulpă, iar pulpa este infectată și moare. Microbiota asociată cu infecțiile endodontice netratate este reprezentată în primul rând de bacterii proteolitice anaerobe.

1.3.3. Afecțiuni periodontale

Afecțiunile parodontale sunt clasificate în: I) afecțiuni gingivale; II) periodontită cronică; III) periodontită agresivă; IV) periodontită ca manifestare a bolilor sistemice și V) malformații și condiții dezvoltate sau dobândite. (Newman și colab., 2012).

1.4. Acțiunea antimicrobiană a extractelor vegetale și utilizarea lor în tratamentul afecțiunilor cavității bucale

Există aproximativ 500000 de specii de plante în lume dintre, care aproximativ doar 1% au fost analizate fitochimic și care au un potențial imens de descoperire a noi compuși bioactivi (Palombo, 2011). Peste 70% dintre agenții terapeutici dezvoltați între 1981 și 2006 pentru bolile infecțioase (atât bacteriene, cât și fungice) au fost derivați din produși naturali (Newman și Cragg, 2007). Numeroase extracte vegetale deja comercializate sau studiate experimental s-au dovedit eficiente față de specii microbiene implicate în formarea plăcii dentare.

Capitolul 2. Caracterizarea microbiotei periodontale și evaluarea efectului antimicrobian și imunomodulator al unor perioceutice de origine vegetală

Periodontita este cea mai comună infecție cronică la nivelul populației adulte la nivel global. Tratamentele existente pentru prevenirea și tratamentul bolii periodontale sunt costisitoare și au eficiență selectivă și limitată în timp asupra semiologiei complexe. (Shaddox și Walker, 2010) În acest context, identificarea unor alternative de tratament/prevenție a bolii periodontale ar fi deosebit de oportune. Valențele unei astfel de abordări rezidă în creșterea susceptibilității microorganismelor la antibiotice curent utilizate în practica stomatologică și stimularea răspunsului imun benefic al gazdei. În prezenta lucrare este propusă și argumentată utilizarea unor compuși naturali cu potențial antimicrobian și imunomodulator, premise pentru dezvoltarea unor soluții terapeutice inovative pentru boala periodontală.

Scop: Caracterizarea virulenței și antibioretistenței unor tulpini microbiene izolate de la nivelul leziunilor periodontale și evaluarea efectului antimicrobian și imunomodulator al unor noi perioceutice pe bază de extracte vegetale și grafene funcționalizate.

Obiective:

- 1) Identificarea tulpinilor microbiene izolate de la nivelul leziunilor periodontale în scopul realizării unei colecții reprezentative utilizate pentru cercetările ulterioare;
- 2) Determinarea markerilor fenotipici și genotipici de rezistență la antibiotice ai tulpinilor bacteriene izolate din leziuni periodontale;
- 3) Caracterizarea la nivel fenotipic și genetic a spectrului factorilor de virulență asociați peretelui celular (aderența la substrat celular și inert) și solubili (toxine și enzime);
- 4) Obținerea și caracterizarea fizico-chimică a unor uleiuri volatile de origine vegetală
- 5) Fabricarea și caracterizarea fizico-chimică a unor grafene funcționalizate cu argint și/sau ulei volatil de cuișoare;
- 6) Determinarea activității antimicrobiene a uleiurilor volatile și a grafenelor funcționalizate prin metode convenționale față de celulele microbiene în stare planctonică și aderată și investigarea mecanismelor moleculare de acțiune prin citometrie în flux;

- 7) Studiul *in vitro* al biocompatibilității extractelor vegetale și a grafenelor funcționalizate cu extract de cuișoare prin determinarea activității citotoxice și a influenței asupra ciclului celular;
- 8) Studiul efectului imunomodulator al unor extracte vegetale cu activitate antimicrobiană prin analiza profilului de expresie a genelor pentru citokine pro- și antiinflamatorii.

2.1 Izolarea și identificarea tulpinilor microbiene

Studiul a fost realizat pe un număr de 50 probe recoltate din punga periodontală în cadrul unor cabinete stomatologice private, cu chiurete Gracey sau cu conuri de hârtie sterilizate, special pregătite pentru a fi introduse în punga parodontală. Probele au fost însămânțate pe medii îmbogățite neselective (geloză sânge) și au fost incubate timp de 24h - 7 zile la 37°C, în aerobioză și anaerobioză, pentru izolarea speciilor prezente.

Caracteristicile de cultură și morfologia celulelor au fost determinate prin analiza dimensiunilor, pigmentilor sintetizați, formei, modului de dezvoltare a coloniilor, ca și **determinarea caracterului Gram** care a permis clasificarea tulpinilor izolate în funcție de afinitatea tinctorială și tipul morfologic. În funcție de caracteristicile morfotinctoriale și de rezultatele **testelor enzimatiche rapide pentru oxidază și catalază**, au fost selectate **tipurile de galerii API** pentru identificarea de certitudine a tulpinilor respective - *API Staph*, *API 20 Strep*, *API 20 A*, *API 20E*, *API 20NE*.

2.1.2. Rezultate și discuții

Au fost izolate 160 de tulpini microbiene. Identificarea acestora a relevat o mare diversitate taxonomică, ele aparținând următoarelor genuri: *Gemella sp.*, *Actinomyces sp.*, *Propioniumbacterium sp.*, *Prevotella sp.*, *Lactococcus sp.*, *Enterococcus sp.*, *Bifidobacterium sp.*, *Streptococcus sp.*, *Pantoea ssp.*, *Aerococcus sp.*, *Eubacterium sp.*, *Veillonella sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Gardnerella sp.*, *Pasteurella sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Micrococcus sp.*, *Fusobacterium sp.*, *Chryseomonas sp.*, *Agrobacterium sp.*, *Stenotrophomonas sp.*, *Bacteroides sp.*, *Burkholderia sp.*, *Vibrio sp.*, *Aeromonas sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Propionibacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Enterobacter sp.*, *Ewingella sp.*, *Citrobacter sp.*, *Leuconostoc sp.*. Genurile predominante au fost reprezentate de *Staphylococcus*, *Streptococcus* și *Actinomyces* totalizând 45,62% dintre tulpinile identificate.

Diversitatea taxonomică extinsă și rata redusă de izolare a periodontopatogenilor “clasici” obținută în acest studiu susțin implicarea plăcii bacteriene nespecifice în etiologia leziunii periodontale.

2.2 Determinarea markerilor fenotipici și genotipici de rezistență la antibiotice ai tulpinilor bacteriene izolate din leziuni periodontale

Antibiograma a fost realizată conform specificațiilor recomandărilor standardului *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* în vigoare.

2.2.1.2 Determinarea genotipică a spectrului de sensibilitate la antibiotice al tulpinilor izolate

În urma observării fenotipurilor bacteriene obținute cu ajutorul testelor anterioare, s-a realizat verificarea existenței câtorva gene frecvent asociate cu producerea de β -lactamaze, β -lactamaze de spectru extins, gene ale casetelor SCCmec, utilizând mixul de reacție - GoTaq® Green Master Mix (Jena Bioscience, Germany): *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48}*; *bla_{CTX-M}*; *bla_{TEM}* pentru bacilii Gram negativi din familiile *Pseudomonadaceae* și *Enterobacteriaceae*, în cazul cocilor Gram pozitivi (*Staphylococcus aureus*) a fost investigată prezenta genelor caselor SCCmec; a căror prezență în genomurile bacteriene a fost evidențiată pentru aceleași specii circulante în alte regiuni ale globului. Pentru amplificarea acestor gene, au fost folosiți primeri descriși în literatură,

2.2.1 Rezultate și discuții

Antibioticele utilizate în tratamentele parodontale aparțin următoarelor clase: tetraciline, macrolide, compușin nitroimidazolici, quinolone, peniciline și cefalosporine. Tulpinile aparținând genului *Streptococcus* s-au dovedit a fi în general rezistente la acțiunea antibioticelor, peste 40% dintre tulpini fiind rezistente la tetraciclina, eritromicina, clindamicina și penicilina (Fig. 14)

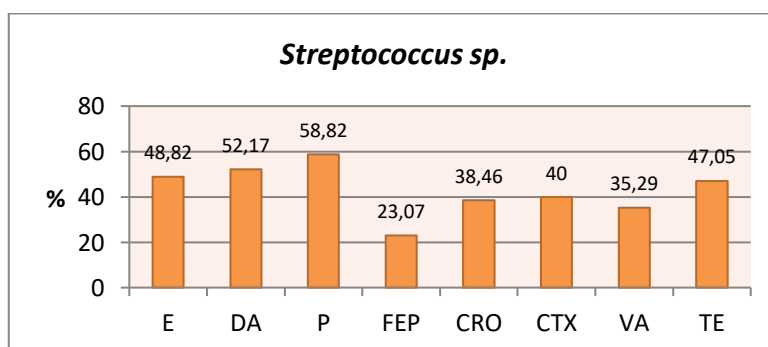


Fig. 14 Profilul de rezistență al tulpinilor din genul *Streptococcus* testate

Tulpinile de *Enterococcus* sp. sunt izolate în cazurile de eșec al tratamentului parodontitei apicale. Enterococii prezintă rezistență naturală la multe grupe de antibiotice : cefalosporine, peniciline rezistente la penicilinază, monobactami, sulfonamide, sensibilitate intermediară sau rezistență la fluoroquinolone (Chifiriuc și colab., 2011). Tulpinile testate în studiul de față au fost sensibile la acțiunea vancomicinei și a linezolidului, fiind rezistente și înalt rezistente la acțiunea eritromicinei, a ciprofloxacinelor și tetraciclinei (fig. 15).

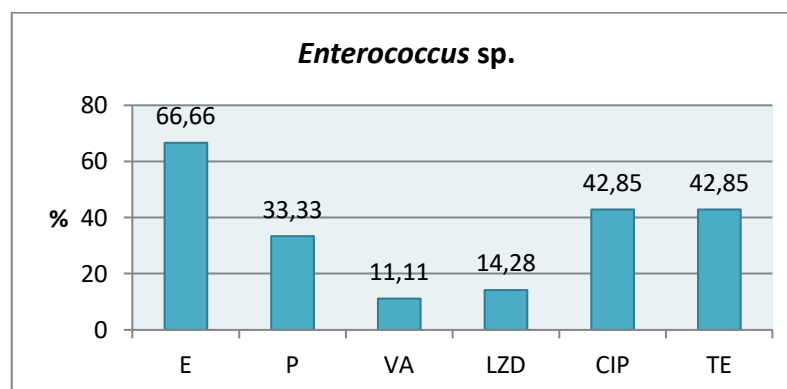


Fig. 15 Profilul de rezistență al tulpinilor din genul *Enterococcus* testate

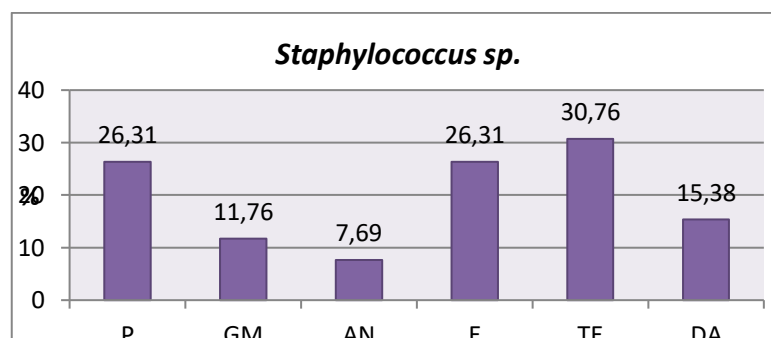


Fig. 16 Profilul de rezistență al tulpinilor din genul *Staphylococcus* testate

Tulpinile de *Staphylococcus* au fost în general sensibile la acțiunea antibioticelor (Fig. 16), toate izolatatele testate fiind sensibile la acțiunea tobramicinei.

În ceea ce privește bacteriile anaerobe, pentru interpretarea rezultatelor obținute prin metoda difuzimetrică s-au considerat sensibile tulpinile care au prezentat o zonă de inhibiție a creșterii mai mare de 10 mm (Murray și Rosenblatt, 1977). Se remarcă sensibilitatea ridicată a tulpinilor bacteriene testate la majoritatea antibioticelor testate, cu excepția ATM (11 tulpini rezistente), P, CTX, CAZ, FEP (5 tulpini rezistente), CN (4 tulpini rezistente) (Tabel nr. 12). Dintre tulpinile testate, o tulpină de *Actinomyces naeslundii* și o tulpină de *Bifidobacterium* sp. au manifestat fenotip de multirezistență la antibiotice.

Tabel nr. 12 Profilul de rezistență al tulpinilor aneroze																										
	P	PRL	M	SA	X	AM	CC	FOX	M	ME	ETP	IMP	TZP	LDO	TIM	CRD	CTX	FEP	TGC	TIC	AN	M	AT	GP	CAZ	CN
<i>Actinomyces neslundii</i>	17	19	23	17	24	25	28	37	31	43	25	29	30	13	10	S	27	20	20	R	27	24	12			
<i>Actinomyces naeslundii</i>	22	22	24	23	27	23	27	34	30	34	27	24	34	15	R	S	22	24	17	R	16	22	S			
<i>Actinomyces neslundii</i>	S	S	S	S	S	16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	25	24	S	20	16	22	S	S		
<i>Fusobacterium mortiferum</i>	20	32	42	40	38	60	36	45	40	S	35	S	44	40	34	S	30	40	25	47	43	30	38			
<i>Bacteroides urealyticus</i>	24	24	35	30	32	26	37	40	38	S	36	S	38	26	25	R	32	33	24	R	34	38	47			
<i>Bacteroides urealyticus</i>	20	24	37	34	30	14	39	38	35	S	32	S	35	42	43	R	26	34	22	R	33	35	46			
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	45	42	40	50	S	S	50	50	40	54	S	46	46	46	44	30	42	46	32	R	35	25	40			
<i>Actinomyces naeslundii</i>	36	30	31	28	26	24	25	34	26	43	35	24	37	R	R	31	26	34	30	R	22	20	30			
<i>Bacteroides sp</i>	24	24	35	30	32	26	37	40	38	S	36	S	38	26	25	R	32	33	24	R	34	38	47			
<i>Actinomyces israelii</i>	19	22	25	19	23	27	20	27	23	38	37	28	28	R	R	24	26	20	23	R	35	24	18			
<i>Bifidobacterium spp2</i>	32	34	34	30	40	32	28	38	38	S	38	S	39	16	R	34	34	35	14	R	22	32	R			
<i>Propionibacterium granulosum</i>	24	24	26	20	26	18	36	36	28	46	34	S	28	R	R	34	33	26	29	R	38	34	32			
<i>Bifidobacterium spp2</i>	29	32	28	32	30	R	R	26	21	32	33	28	28	R	R	18	25	26	18	R	25	16	R			
<i>Actinomyces naeslundii</i>	S	S	S	S	S	19	42	43	44	49	S	44	S	38	30	S	34	48	15	29	30	34	12			
<i>Actinomyces naeslundii</i>	S	S	S	S	S	21	39	41	40	30	S	30	S	30	30	S	21	41	10	24	30	30	15			
<i>Actinomyces neslundii</i>	R	26	25	17	14	R	14	31	35	29	28	R	29	29	32	24	22	28	20	33	33	27	14			
<i>Bifidobacterium spp.</i>	34	30	38	36	36	40	R	20	16	32	34	30	38	14	28	R	36	36	24	R	16	R	R			
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	45	42	40	50	S	S	50	50	40	54	S	46	46	46	44	30	42	46	32	R	35	25	40			
<i>Actinomyces israelii</i>	32	36	32	34	40	40	S	34	20	32	40	46	35	30	26	R	44	24	24	R	21	27	18			
<i>Bifidobacterium spp.</i>	32	34	30	34	20	16	S	22	12	28	42	40	35	13	17	R	43	22	19	R	27	15	R			
<i>Leuconostoc sp.</i>	R	S	S	18	S	24	S	S	S	S	S	24	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	11	S	S	16	S	19	S	S	S	S	S	25	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	R	S	S	15	S	22	S	S	S	S	S	22	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	14	S		
<i>Streptococcus mitis</i>	24	S	S	27	S	20	S	S	S	S	S	32	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	R	S	S	12	S	24	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S		
<i>Aerococcus viridans</i>	R	S	S	18	S	21	S	S	S	S	S	19	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	23	S		
<i>Leuconostoc sp.</i>	16	S	S	24	S	S	12	S	S	S	S	28	S	28	S	26	S	S	S	S	S	S	S	S		

Bacili Gram negativi glucozo-nefermentativi au prezentat rezistență ridicată la aztreonam și au fost sensibili în proporție de 100% la acțiunea următoarelor antibiotice : tazobactam, amikacin, ciprofloxacina (Fig. 17).

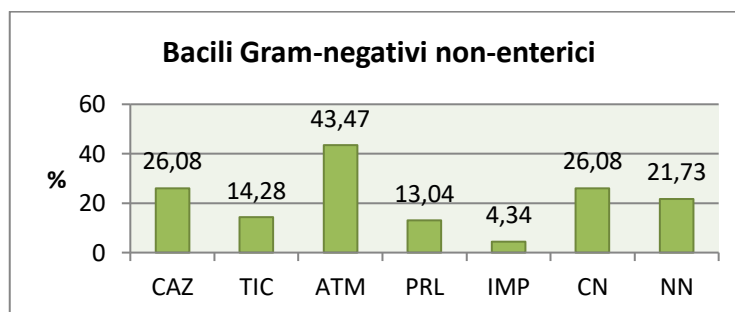


Fig. 17 Profilurile de rezistență la tulpinile de bacili Gram negativi glucozonefermentativi testate

Enterobacteriile s-au dovedit sensibile în totalitate la acțiunea piperacilinei și a tetraciclinei, dar au prezentat rezistență ridicată la cefoxitin, amoxicilină-acid clavulanic și amoxicilină (Fig. 18). Rezistența la tetraciclină pentru tulpinile testate a fost ridicată, tulpinile de *Streptococcus* sp. prezentând o rată de rezistență de 47,05%, cele de *Enterococcus* sp. de 42,85%, iar tulpinile de *Staphylococcus* sp. de 30,76% (Fig. 14, 15, 16). Dintre quinolone, ciprofloxacina este activă față de o gamă largă de bacterii Gram pozitive și Gram negative.

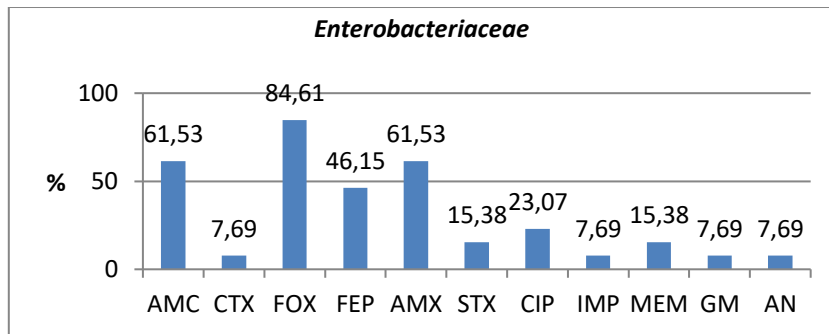


Fig. 18 Profilurile de rezistență la tulpinile de *Enterobacteriaceae* izolate

În studiul de față tulpinile de *Enterococcus* sp prezintă o rezistență ridicată 42,85% (Fig. 15), enterobacteriile sunt relativ sensibile 76,93%, în timp ce tulpinile anaerobe sunt în general sensibile. Mecanismul principal de rezistență la antibioticele β -lactamice al bacteriilor din cavitatea orală este producția de β -lactamaze. Această enzimă este frecvent detectată la nivelul situsurilor afectate de parodontoză și pare a fi corelată pozitiv cu adâncimea pungii parodontale (Walker și colab., 2004). Dintre tulpinile testate în studiul nostru, doar o tulpină de *Staphylococcus epidermidis*, a fost pozitivă pentru genele complexului SCCmec tipul I, II și IV (Fig. 19).

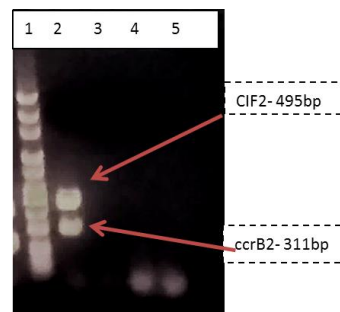


Fig. 19 Electroforeza în gel de agaroză (1%) a ampliconilor casetei SCCmec.

1- marker de greutate 1500pb, 2, 3, 4, 5 diferite tulpini de *Staphylococcus* sp.

Sinteza de β -lactamaze codificate plasmidial sau cromosomal reprezintă unul dintre fenotipurile de rezistență frecvent întâlnite la izolatele clinice de *Ps. aeruginosa*. Principalele tipuri de β -lactamaze prezente la *Ps. aeruginosa* sunt: (1) β -lactamazele codificate plasmidial (oxacilinaze [OXAs], carbenicillinaze [PSEs/CARBs], TEM-1 sau TEM-2), ce sunt responsabile de rezistența la peniciline, dar nu și la cefalosporinele și la carbapenemii antipseudomonadici; (2) β -lactamazele cu spectru extins (ESBL - *Extended-spectrum β -lactamases*): (i) ESBLs derivate din penicilinaze (de ex., TEM-4, SHV-2a, PER-1 și VEB-1);

și (ii) ESBL de tip OXA (OXA-11 și OXA-18); (3) metalo-β-lactamaze (carbapenamaze) de tipul IMP și VIM (Fig. 20).

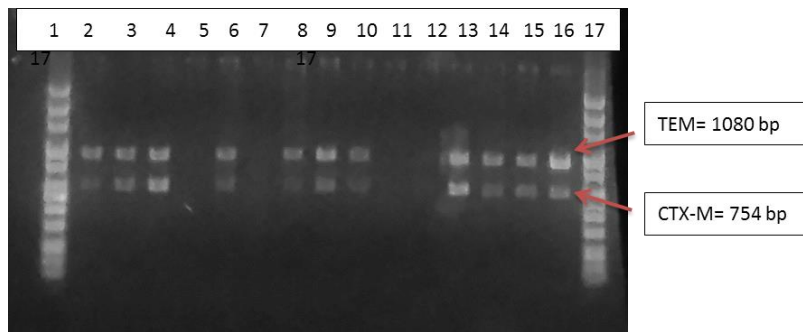


Fig. 20 Electroforeză în gel de agaroză (1%) a ampliconilor genelor pentru beta-lactamaze: 1și 17 - marker de greutate moleculară 1500pb, 2-16 diferite tulpini de Bacili Gram-negativi non-enteric

Caracterizarea la nivel fenotipic și genetic a spectrului factorilor de virulență asociați peretelui celular (aderența la substrat celular și inert) și solubili (toxine și enzime)

2.3.1 Materiale și metode

2.3.1.1 Aderența la substratul inert - testul producerii de *slime* prin metoda cantitativă.

2.3.1.2. Aderența la substratul celular - prin metoda Cravioto, adaptată, utilizând ca substrat celular linia celulară Hep-2 (*Human Epithelioma*).

2.3.1.3 Evidențierea prin teste biochimice a factorilor solubili de virulență și patogenitate

S-au efectuat teste pentru evidențierea lecitinazelor, lipazelor, proteazelor (cazeinază și gelatinază), hidrolizei esculinei, și amilazelor microbiene.

3.3.1.4 Evidențierea unor gene de virulență

Secvențele de nucleotide ale primerilor și condițiile PCR utilizate pentru amplificarea genelor ce codifică pentru diferiți factori de virulență la tulpinile de *S. aureus* și *Ps. aeruginosa* sunt prezentate în tabelul nr. 13 și 14.

Gen	Primer	Secvența de nucleotide	Program amplificare					
			Denaturare inițială	Număr cicluri	Denaturare fiecare ciclu	Atașare primeri	Extensie primeri	Extensie finală
bap	BBP-1	5'-AAGTACACTGAGTACTCAGCAAG-3'	94°C, 5 min	25	94°C, 1 min	55°C, 1 min	72°C, 1 min	72°C, 10 min
	BBP-2	5'-ATGTGCTGATAGCAACCACTACT-3'						
	EBP-1	5'-CATCCAGAACCAATCAAGAC-3'						
fliB	FNB-1	5'-CTACAGGTCATGATGATTTATCTTTG-3'	94°C, 5 min	25	94°C, 1 min	55°C, 1 min	72°C, 1 min	72°C, 10 min
	FNB-2	5'-GTAAKAGCACTAATGGTGAATGACT-3'						
	FB-2	5'-CAGGTTGATAGGAGACTATGTE-3'						
cfaA	CFB-1	5'-CTACAGGTCATGATGATTTATCTTTG-3'	94°C, 5 min	25	94°C, 1 min	55°C, 1 min	72°C, 1 min	72°C, 10 min
	CFB-2	5'-ATTTGGGCTGGCTCAGTC-3'						
	CFB-3	5'-GCTCTGTGAGCACTTTCTTCTAC-3'						
cstII	CFB-1	5'-ACATCAATTAATAGTAGGGGGCAAC-3'	94°C, 5 min	30	94°C, 1 min	50°C, 1 min	72°C, 2 min	72°C, 10 min
	CFB-2	5'-TTGCGACTGTTGTTTGTGAC-3'						
	CFB-3	5'-GAGACCGAGGAGATGAG-3'						
cna	CFB-1	5'-GAGACCGAGGAGATGAG-3'	94°C, 5 min	30	94°C, 1 min	55°C, 1 min	72°C, 2 min	72°C, 10 min
	CFB-2	5'-AGTGTGTTACTAATAGT-3'						
	CFB-3	5'-CAGATGATGATGTTTA-3'						
cnaB	C1	5'-GGAGACCAAGATTCAGAAAG-3'	94°C, 5 min	40	94°C, 30 sec	55°C, 30 sec	72°C, 1.5 min	72°C, 5 min
	C2	5'-AAAGAAACCACTCATCAGAG-3'						
	C3	5'-AAAGAAACCACTCATCAGAG-3'						
hly	hly-1	5'-ATCATGAGCAATGATCTCGAGATATCA-3'	95°C, 5 min	30	94°C, 30 sec	55°C, 2 min	72°C, 1 min	72°C, 10 min
	hly-2	5'-GCATCAAGTATGATGATGAGAAAGC-3'						
	hly-3	5'-GCCATGCTGATGAGAAAGC-3'						
hlyB	hlyB-1	5'-CCAGTGGCTGACAGAGG-3'	94°C, 5 min	35	94°C, 2 min	57°C, 2 min	72°C, 1 min	72°C, 7 min
	hlyB-2	5'-GGTATCAATGTGGGGTGG-3'						
	hlyB-3	5'-GGGACTTTTTCTCTGGG-3'						
hlyD	hlyD-1	5'-GATGAGTGGTGTGATGAGG-3'	94°C, 5 min	35	94°C, 2 min	57°C, 2 min	72°C, 1 min	72°C, 7 min
	hlyD-2	5'-AGATGAGTGGTGTGATGAGG-3'						
	hlyD-3	5'-CAGCTTTGATGATGATGAGG-3'						
hlyE	hlyE-1	5'-CAGCTTTGATGATGATGAGG-3'	94°C, 5 min	35	94°C, 2 min	57°C, 2 min	72°C, 1 min	72°C, 7 min
	hlyE-2	5'-CAGCTTTGATGATGATGAGG-3'						
	hlyE-3	5'-CAGCTTTGATGATGATGAGG-3'						
hlyF	hlyF-1	5'-AGGTTTTTCCAGAGTATCC-3'	95°C, 5 min	35	94°C, 30 sec	50°C, 30 sec	72°C, 1.5 min	72°C, 5 min
	hlyF-2	5'-CTTTTTTCTCTGGCTAATC-3'						
	hlyF-3	5'-AGGTTTTTCCAGAGTATCC-3'						
hlyG	hlyG-1	5'-AGGTTTTTCCAGAGTATCC-3'	94°C, 5 min	30	94°C, 30 sec	50°C, 30 sec	72°C, 2 min	72°C, 5 min
	hlyG-2	5'-CTTTTTTCTCTGGCTAATC-3'						
	hlyG-3	5'-AGGTTTTTCCAGAGTATCC-3'						

Tabelul nr. 14 Secvențele primerilor și condițiile de amplificare pentru evidențierea genelor ce codifică pentru proteaze, alginat, fosfolipaze, exotoxine și pioverdină la tulpinile *de Ps. aeruginosa* studiate.

Genă	Primer	Secvența de nucleotide	Program de amplificare				
			Denaturare inițială	Număr cicluri	Denaturare în fiecare ciclu	Atașare primeri	Extensie primeri
las B	forward	5'-TTCTACCCGAAGGACTGATAC-3'	94°C, 5 min	30	94°C, 1 min	52°C, 1 min	72°C, 1,5 min
	reverse	5'-AACACCCATGATCGCAAC-3'					
aprA	forward	5'-ACCCTGTCCTATTGTTCC-3'	94°C, 5 min	30	94°C, 1 min	52°C, 1 min	72°C, 1,5 min
	reverse	5'-GATTGCAGCGACAACCTGG-3'					
rhlA B	forward	5'-TCATGGAATTGTCAACAACCGC-3'	94°C, 5 min	30	94°C, 1 min	52°C, 1 min	72°C, 1,5 min
	reverse	5'-ATACGGCAAAATCATGGCAAC-3'					
proteaza IV	TCF	5'-TATTTCCGCGACTCCCTGTA-3'	94°C, 5 min	34	94°C, 30 sec	60°C, 30 sec	72°C, 2 min
	TCR	5'-GAATAGACGCCGCTGAAATC-3'					
algD	forward	5'-ATGCGAATCAGCATCTTTGGT-3'	94°C, 3 min	30	94°C, 30 sec	55°C, 1 min	72°C, 1,5 min
	reverse	5'-CTACCAGCAGATGCCCTCGGC-3'					
plcH	forward	5'-GAAGCCATGGCTACTTCAA-3'	94°C, 3 min	30	94°C, 30 sec	55°C, 1 min	72°C, 1,5 min
	reverse	5'-AGAGTGACGAGGAGCGGTAG-3'					
plcN	forward	5'-GTTATCGCAACCGCCCTAC-3'	94°C, 3 min	30	94°C, 30 sec	55°C, 1 min	72°C, 1,5 min
	reverse	5'-AGGTGCAACACCTGGAACAC-3'					
exoU	forward	5'-CCGTTGGTGGCCGTTGAAG-3'	94°C, 2 min	36	94°C, 30 sec	59°C, 30 sec	68°C, 1 min
	reverse	5'-CCAGATGTTACCGACTC G-3'					
exoT	forward	5'-AATCGCCCTCAACTGCATGCG-3'				58°C, 30 sec	
	reverse	5'-TGTTCCCGAGGTACTGCTC-3'					
exoA	Éta1B	5'-AACAGCTCAGCCACATGTC-3'	94°C, 5 min	35	94°C, 30 sec	65°C, 30 sec	72°C, 2 min
	Éta2	5'-CGCTGGCCCATTCGCTCCAGCGCT-3'					
exoS	ExoSf2	5'-ATC GCTTCAGCAGATCCGTC-3'	94°C, 5 min	35	94°C, 30 sec	65°C, 30 sec	72°C, 2 min
	ExoSr2	5'-CAGGCCAGATCAAGGCCGCGC-3'					
pvdA	pvd A-F	5'-GACTCAGGCAACTGCAAC-3'	94°C, 5 min	30	94°C, 30 sec	59°C, 30 sec	72°C, 2 min
	pvd A-R	5'-TTCAGGTGCTGGTACAGG-3'					

3.2. Rezultate și discuții

Realizarea testului producerii de *slime*, a permis clasificarea tulpinilor izolate în funcție de capacitatea de aderență la substrat inert astfel: tulpini înalt aderente (55%), cu aderență moderată (14%) și neaderente (31%). Dintre tulpinile aparținând speciilor de “colonizatori primari” testate pentru capacitatea de a adera la substratul inert se observă că majoritatea (83%) formează o peliculă aderentă la suprafața sticlei.

Evidențierea capacității tulpinilor izolate de a adera la substratul celular a fost testată folosind linia celulară de origine epitelială HEP2. Indexul de aderență a tulpinilor a fost între 0 și 100% iar tipul de aderență observate au fost aderență difuză, localizată, agregativă, difuz-localizată.

Tulpinile bacteriene au capacitatea de a liza hematiile consecutiv lezării membranei celulare prin acțiunea **hemolizinelor** pe care le produc, Un procent de 64,7 % dintre tulpinile analizate au fost pozitive.

Lecitinazele și lipazele sunt enzime implicate în patogeneza unor tulpini bacteriene prin capacitatea lor de a induce formarea de pori la nivelul membranei celulelor eucariote și prin alterarea conținutului lipidic al acestora (Chifiriuc și colab., 2011). Tulpinile luate în studiu au fost pozitive în proporție de 22,44% pentru lecitinaze și 11,42% pentru lipaze.

Proteazele sunt enzime care hidrolizează legăturile peptidice interne dintre proteine și peptide, fiind nespecifice în general (Zarnea și Popescu, 2011). Dintre tulpinile analizate, 25,47% pozitive pentru cazeinază și 16,66% pentru gelatinază. Un procent ridicat (47,11%)

dintre tulpinile analizate au fost pozitive pentru **hidroliza esculinei**, cu producerea de esculetol, care fixează cu mare afinitate fierul acționând așadar ca pseudosiderofor, datorită prezenței grupării catecol, prezente de asemenea în structura sideroforilor de tip catecolat (Fig. 19). **DN-azele** bacteriene acționează asupra ADN bacterian determinând eliberarea de mono- sau dinucleotide (Lazăr și colab., 2004). Un procent de 21,6% dintre tulpinile testate posedă echipamentul enzimatic necesar clivării ADN bacterian. **Amilazele** sunt enzime care clivează legăturile $\alpha 1 \rightarrow 4$ glicozidice din moleculele de amidon și glicogen, furnizând astfel sursa de C necesară metabolismului bacterian și un avantaj competitiv pentru creșterea și multiplicarea celulelor producătoare. Amilazele au fost prezente la 27,9% dintre tulpinile izolate în studiul de față.

În scopul evidențierii unui panel cât mai larg de factori de virulență, pe lângă abordarea fenotipică au fost utilizate de asemenea și metode moleculare, de evidențiere a unor gene de virulență deja caracterizate ale unor specii microbiene. Tulpinile de *S. aureus* au fost negative pentru toți cei 18 factori de virulență investigați la nivel genotipic (adezine, toxine, enzime), ceea ce susține necesitatea unei abordări complementare a studiului virulenței bacteriene. În schimb tulpinile de *P. aeruginosa* au fost pozitive pentru majoritatea genelor de virulență investigate.

Proteaza IV este o serin-endoprotează de 26 kDa, secretată de majoritatea izolatelor de *Ps. aeruginosa* ce determină keratite microbiene, care în asociație cu alte proteaze joacă un rol important în patogeneza corneeană. Această genă a fost evidențiată la două dintre cele 4 tulpini de *Ps. aeruginosa* analizate (Fig.21).

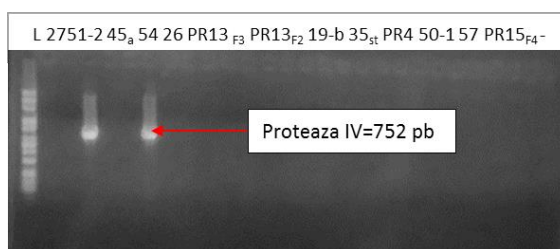


Fig. 21 PCR simplex pentru proteaza IV (752bp): ampliconi prezenți la tulpinile de *Ps. aeruginosa* 2 și 26.

Ps. aeruginosa produce trei tipuri de proteine solubile implicate în invazia tisulară: două fosfolipaze C – fosfolipaza hemolitică (*haemolytic phospholipase C* [PLC-H]) și fosfolipaza nehemolitică (*non-haemolytic phospholipase C* [PLC-N]) și ramnolipidul. Aceste enzime pot acționa sinergic pentru a degrada fosfolipidele (ex, fosfatidilcolina și sfingomielină) și contribuie la invazie prin efectele lor citotoxice asupra neutrofilelor, limfocitelor și a altor

celule eucariote. Aceste gene au fost evidențiate la două dintre cele 4 tulpini de *Ps. aeruginosa* analizate, aceleași care au fost pozitive și pentru proteaza IV (Fig. 21). Toxinele ExoT și ExoS sunt enzime ADP-ribozilante, fiind proteine bifuncționale.

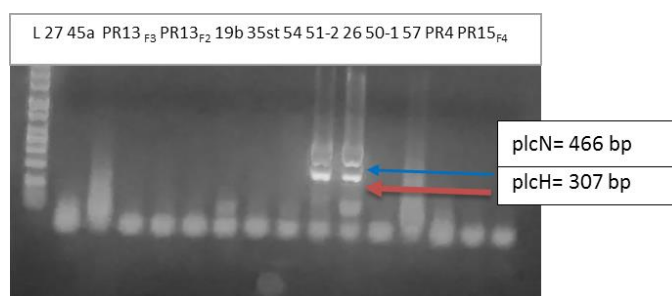


Fig. 21 Multiplex PCR pentru genele fosfolipazelor plcH+plcN: ampliconi prezenți pentru tulpinile de *Ps. aeruginosa* 2 și 26.

Ps. aeruginosa inhibă repararea epitelului lezat într-o manieră dependentă de ExoT. Aceste gene au fost evidențiate la cele două tulpini de *Ps. aeruginosa* pozitive și pentru genele pentru proteaze și fosfolipaze (Fig.22).

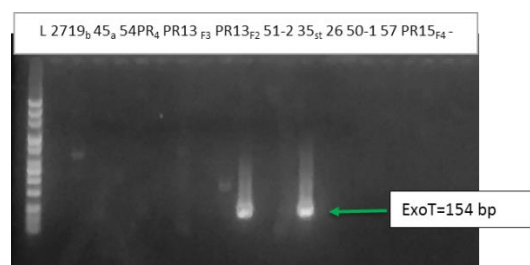


Fig. 22 Multiplex PCR pentru genele exotoxinelor ExoU (134 bp) și ExoT (152 bp): ampliconi prezenți exclusiv pentru ExoT la tulpinile de *Ps. aeruginosa* 2 și 26.

2.3. Obținerea și caracterizarea fizico-chimică a unor uleiuri volatile de origine vegetală

Plantele selecționate pentru extracția uleiurilor volatile aparțin la mai multe categorii: plante medicinale (*Salvia officinalis*), plante aromatice (*Eugenia caryophyllata*, *Satureja hortensis*, *Lavandula angustifolia*, *Anethum graveolens*, *Carum carvi*), citrice (*Citrus lemon*, *Citrus sinensis*) și conifere (*Picea* spp.). Acestea sunt cunoscute ca fiind producătoare de uleiuri volatile. Apartenența la taxoni supraspecifici, organele selectate pentru extracție și numărul de extracții sunt prezentate în tabelul nr. 15.

Tabel nr. 15 Materialul vegetal utilizat pentru extracții

Nr. crt.	Planta	Familia	Organul/tesutul producător de UV	Nr. extracții
1	<i>Salvia officinalis</i> (salvie)	Lamiaceae	părți aeriene	4
2	<i>Satureja hortensis</i> (cimbru de grădină)	Lamiaceae	părți aeriene	3
3	<i>Lavandula angustifolia</i> (lavandă)	Lamiaceae	părți aeriene	3
4	<i>Anethum graveolens</i> (mărar)	Apiaceae	frunze	2
5	<i>Carum carvi</i> (chimen)	Apiaceae	fructe	2
6	<i>Eugenia caryophyllata</i> (cuișoare)	Myrtaceae	muguri	2
7	<i>Citrus lemon</i> (lămâi)	Rutaceae	epicarpul fructelor	2
8	<i>Citrus sinensis</i> (portocal)	Rutaceae	epicarpul fructelor	2
9	<i>Picea</i> spp. (conifere)	Pinaceae	muguri	3

2.4.1.2 Caracterizarea fizico-chimică a uleiurilor volatile

Probele de ulei volatil extrase au fost diluate pentru analiza GC-MS în hexan (5 μ L/ mL) și au fost analizate prin cromatografie de gaze cuplată cu spectrometrie de masă, cu ajutorul analizorului 7890A-5975C Agilent Series System (fig. 24).

2.4.2 Rezultate și discuții

Analiza GC-MS a uleiului volatil din salvie a condus la identificarea a 18 componente, dintre care principalele sunt α -thujona și camforul, cu procente comparabile (25,778% și respectiv 26,316%). Componentele identificate prin analiză GC-MS din uleiul volatil extras din frunze de *S. hortensis* au fost carvacrol (54,069%), γ -terpinen (26,749%) și p-cimen (7,996). Carvacrolul și timolul, componente majoritare, monoterpene izomere cu structură fenolică, sunt prezente în uleiul volatil din frunze de cimbru alături de alte monoterpene (cis-terpineol, terpinen-4-ol, acetat de bornil), acesta având o compoziție echilibrată terpenoide : terpen, 54,66%:43,07%. Au fost identificate 39 de componente, dintre care 16,298 % sunt compuși hidrocarbonați, iar restul terpenoide diverse. Componentele majoritare al uleiului volatil din lavandă sunt linaloolul 28,675 % și linalil acetatul 13,264 %.

Toate componentele *A. graveolens* conțin uleiuri volatile, iar compoziția acestora este diferită în funcție de organul vegetativ/de reproducere din care se realizează extracția. Uleiul volatil extras din fructe de *C. carvi* a fost intens studiat datorită proprietăților aromatice.

Uleiul volatil din muguri uscați de *E. caryophyllata* are multiple valențe terapeutice menționate în literatura de specialitate și valorificate în medicina alternativă, dar și în cea alopatică. Extractele din *Picea* spp. au fost identificate 30 de componente, dintre care 38,013 % sunt hidrocarburi monoterpene; componentele majoritare sunt reprezentate de d-limonen 31,094 % și γ -terpineol 20,738 %.

S-au realizat două experimente, unul pentru determinări cantitative ale componentelor eugenol, eucaliptol, limonen și β -pinen din uleiuri volatile extrase din *E. caryophyllata*, *S. officinalis*, intervalul curbelor de calibrare fiind stabilit experimental (tabelul nr.25), prin compararea % de arie relativă ale probelor injectate pentru analiză calitativă.. Cel de-al doilea experiment a fost realizat pentru dozarea a 15 componente, iar intervalul curbelor de calibrare s-a stabilit experimental pornind de la concentrații recomandate în Farmacopeea Europeană (Ed. a-VIII-a).

2.3 Obținerea, caracterizarea fizico-chimică a unor grafene funcționalizate cu argint și/sau ulei volatil de cuișoare

2.5.1. Sinteza grafenelor

Sinteza grafenelor a fost efectuată *in situ* prin metoda hidrotermală și a constat în reducerea concomitentă a oxidului de grafenă și a sărurilor de argint, respectiv azotatul de argint în cazul nostru. Solventul folosit a fost dimetil formamida (DMF), solvent aprotic, polar cu caracter hidrofilic, temperatură ridicată de fierbere, rată mică de evaporare, facilitează reacțiile chimice cu mecanism polar de tip SN₂ (substituții nucleofile de tip 2) și care are formula (CH₃)₂NC(O)H, C₃H₇NO densitate de 0,95g/cm³ la 20⁰C, punctul de fierbere 152, vâscozitate 0.92 mPa la 20⁰C, masa moleculară 73.10 g·mol⁻¹.

2.5.2. Caracterizarea materiei prime-oxidul de grafit

Materia primă de la care s-a pornit a fost oxidul de grafit sintetizat prin metoda Hammer și apoi exfoliat în vederea obținerii oxidului de grafenă. Spectrul de absorbție în domeniul UV-Vis a oxidului de grafenă și a grafenelor funcționalizate cu argint aflate în suspensie a fost determinat prin metoda spectrofotometriei de absorbție a luminii, folosind spectrofotometrul UV-Vis-NIR tip V-570 (Able&Jasco, Japonia).

Spectroscopiile Raman au fost efectuate pe un spectrometru micro Ramana Horiba (Jobin Yvon) utilizând oculare cu mărimi de 50x, și laser-e cu lungime de undă de 514,5nm și 647,5 nm. Spectrele Raman al GO, înregistrate la lungimea de excitare de 514 nm. Spectrul Raman al GO prezintă în domeniul spectral 1000 - 1800 cm⁻¹, două benzi etichetate ca benzi D și G având maximele la cca. 1352 și 1601 cm⁻¹. Banda D este atribuită modului respirator al inelelor de carbon hexagonale și intensitatea acestei benzi a fost interpretat ca rezultând din prezența defectelor în grafenă. Banda G este atribuită modului fononic E_{2g} la centrul zonei Brillouin. În regiunea spectrală 2500-3500 cm⁻¹ sunt observate două linii Raman cu maximele la cca. 2706 și 2938 cm⁻¹ care sunt atribuite ordinului doi al benzii D și o combinație a modurilor fononice activate de defecte etichetata D+D'.

Conform spectrului Raman se observă o mare dezordine în structura oxidului de grafenă datorată proceselor oxidative suferite în timpul sintezei, intensitatea benzii D (determinate de dezordine-defecte și grupări funcționale) este mai mare decât intensitatea benzii G (determinate de ordinea în plan a legaturilor C-C aromatice). Se observă pic-uri slabe ca intensitate în zona 2700cm⁻¹ –banda 2D respective 2900 cm⁻¹D+D' determinate de o structurare spațială a materialului carbonic. Structura fiind amorfă dar cu ordine pe distanțe (Fig 43).

2.5.3. Sinteza grafenelor funcționalizate cu argint

Sinteza grafenelor funcționalizate a fost efectuată *in situ* prin metoda hidrotermală și a constat în reducerea concomitentă a oxidului de grafenă și a sărurilor de argint, respectiv azotatul de argint în cazul nostru. Au fost sintetizate 4 modele experimentale de soluții de grafene funcționalizate cu argint (Tabel nr 27)

Tabel nr. 27 Concentrația (raport masic) și componenții sintezei grafenelor funcționalizate cu nanoparticule de argint.

Notăție	Raport masic	Concentrație PVP
LGF1	GO/Ag/ad=1/1/m _{aditiv1}	c1-1mg/ml
LGF2	GO/Ag=1/1/ m _{aditiv2}	c1-1mg/ml
LGF3	G/Ag/ ad=1/1/ m _{aditiv2}	c2-280 μg/ml
LG4	GO/Ag=1/1/ m _{aditiv2}	c2-280 μg/ml

Sinteza grafenelor funcționalizate prin metoda hidrotermală a dus la obținerea a 4 loturi de grafene funcționalizate cu raport masic 1/1= grafena funcționalizată/Ag⁰, cu două concentrații diferite de aditiv (m1 și m2) și două concentrații de grafenă funcționalizată în volumul final (1mg/ml și 280mg/ml) (fig. 44).

2.5.4 Determinarea distribuției granulometrice și a diametrului mediu al grafenei funcționalizate cu argint

Distribuția granulometrică și diametrul mediu al nanoparticulelor de grafene funcționalizate cu argint s-a determinat cu un aparat tip 90 PLUS (Brookhaven, SUA), dotat cu software BIC Particle Sizing prin metoda DLS (Dynamic Light Scattering sau împrăștierea dinamică a luminii). Diametrul mediu al nanoparticulelor de grafene funcționalizate cu argint, precum și distribuția mărimii nanoparticulelor obținute prin DLS au fost exprimate ca o distribuție după număr, folosind în analiza cumulativă un model de calcul de tip distribuție de mărime multimodală (Multimodal Size Distribution - MSD) (Koppel, 1972).

În cadrul unei analize DLS, pentru fiecare probă s-au efectuat câte 7 determinări, cu durata de un minut/măsurătoare, fiind prezentate media acestor măsurători (Fig. 45, 46).

Tabel nr 28 Rezultate DLS pentru soluții de grafene funcționalizate cu argint

Proba	Diametru mediu hidrodinamic, D _H , [nm]	Indice de polidispersie, IP	D _{MSD} -[nm] (intensitate)	Nr. de populații	Diametru mediu [nm],(G(d)=100 %, Predominant)
LGF 1	79.1±1.3	0.264±0.012	285.8	3	81.8
LGF 2	59.2±3.9	0.396±0.030	106.5	3	59.8
LGF 3	47.3±2.7	0.296±0.013	56.4	2	67.1
LGF 4	22.3±1.9	0.142±0.044	43.4	2	16.3

În urma măsurării diametrului hidrodinamic, respectiv al diametrului efectiv se constată

ca (tabel nr. 28):

- Dublarea cantității de aditiv de dispersie duce la scăderea la jumătate a diametrului hidrodinamic respectiv a diametrului efectiv (LGF1 și LGF2) și ambele modele experimentale prezintă 3 populații.
- Pentru aceeași concentrație (LGF3 și LGF4) dar cu modificarea tipului de material carbonic utilizat (G respectiv GO) are loc o inversare a intensității populațiilor, respectiv pentru LGF3 predomină populația cu diametre mari în timp ce pentru LGF4 predomină populația cu diametre mici, efectul surfactant este mai mare în ultimul caz.
- Pentru concentrații diferite, concentrațiile mici ($280\mu\text{g/ml}$) duc la obținerea celor mai mici particule (56.4-43.4 nm).

2.5.6. Determinarea absorbției în UV-Vis a nanoparticulelor de grafene funcționalizate cu argint

Absorbția în UV-Vis a nanoparticulelor de de grafene funcționalizate cu argint aflate în suspensie a fost determinată prin metoda spectrofotometriei de absorbție a luminii, folosind spectrofotometrul UV-Vis-NIR tip V-570 (Able&Jasco, Japonia) cu software Spectra Manager (Georgakilas și colab., 2012). Din spectrele experimentale UV-VIS a lotului 2- grafene funcționalizate cu argint se constată ca:

- Toate spectrele experimentale de absorbție UV-VIS prezintă pic-uri asimetrice (maxime de absorbție) caracteristice grafenelor în jurul valorii aproximative de 270 nm și pic-uri specifice nanoparticulelor de de argint (Ag^0).
- Probele LGF2 și LGF3 prezintă o deplasare a maximului de absorbție spre lungimi de undă mai mici (*Blue Shift* denumit și efect bathochromic) în timp ce proba LGF4 prezintă o deplasare a maximului de absorbție spre lungimi de undă mai mari (*Red shift-hypsochromic efect*);
- Pentru proba LGF 4 se constată o agregare a particulelor carbonice (RGO-grafenelor reduse) în soluție.

2.5.7. Analiza structurală prin difracție de raze X pentru grafene funcționalizate cu argint

Identificarea calitativă s-a efectuat utilizând baza de date ICDD PDF2 Release 2012, spectrelor experimentale asociindu-se următoarea fișă teoretică cu nr. 03-065-2871 (tabel nr.30).

Tabel nr.30 Parametrii caracteristici ai fișei teoretice

			Parametrii celulei elementare, $a=b=c, \alpha=\beta=90^\circ$
Formula	Sistem de cristalizare	Grup spatial	a (Å)
Ag	cubic	Fm-3m(225)	4.08610

Din spectrele experimentale XRD a Lotului 2- Grafene functionalizate cu argint se constată că

- Spectrele experimentale XRD prezintă pic-uri caracteristici Ag, identificate după fișa cu numărul fișa 03-065-2871 pentru Ag policristalin;
- Parametrii celulei elementare sunt apropiați de cei ai grafitului policristalin din fișa: 03-065-2871 pentru Ag.
- Alura spectrelor XRD este specifică nanoparticulelor (intensitatea pic-urilor scade cu creșterea unghiului Bragg);
- Lotul 2 probele LGF 2 și LGF 3 particulele de argint prezintă dimensiunea medie de cristalit aproximativ egală în jurul valorii de 35 nm în timp ce pentru LGF1 și LGF4 sunt diferite, respective 39.90 nm și 10.51 nm.

În concluzie, parametrii cristalograficii ai celulei elementare sunt asemănători cu cei ai argintului policristalin din fișa utilizată (PDF 03-065-2871), în timp ce dimensiunea medie de cristalit calculată conform formulei 3.2.1 este variabilă, descrescătoare în funcție de cei doi parametri variați.

2.5.8. Analiza termogravimetrică (TGA)

S-a utilizat analizorul termic simultan TG-DSC de tip STA 449 F3 Jupiter, NETZSCH, Germania, în mediu protectiv de argon, vit. $10^\circ\text{C}/\text{min}$ și 600°C . Analizorul termic simultan TG-DSC de tip STA 449 F3 Jupiter, NETZSCH, Germania, permite determinarea variațiilor de masă și a modificărilor termice pentru diferite tipuri de materiale, inclusiv materiale neomogene.

2.5.9. Spectroscopie de infraroșu cu transformanță Fourier (FT-IR)

Spectrele FTIR au fost înregistrate folosind un spectrometru Jasco IR-4200 prin tehnica ATR (*attenuated total reflectance*) prin cuplarea spectrometrului cu modulul ATR JASCO PRO 470-H. Spectrele FTIR au fost prelucrate cu aplicația Spectra Analysis pentru determinarea absorbției la diferite frecvențe.

În fig. 55 se observă că pe folia de GO care se întinde peste grila de carbon cu găuri sunt dispersate particulele de Ag. Particulele de dimensiuni mari, de sute de nm, nici nu mai sunt transparente fascicolului de electroni (contrast negru). În figura 55 (c) este redată diagrama

de difracție de electroni corespunzătoare unei zone din figura 55 (b) care să conțină particule mai mici și transparente fascicolului de electroni (contrast gri). Pe lângă spoturile de difracție intense, care provin de la folia de GO, indexate cu 4 indici, conform unei structuri hexagonale, apar spoturi de difracție mai puțin intense, care se așază pe cercuri de difracție indicate cu săgeți albe și care se indexează, cu trei indici, cu structură cub cu fețe centrate a Ag. Indicii hkl sau hkl pentru structurile hexagonale sau cubice, respectiv, indică planele cristaline din structurile respective care difractă. În concluzie, în proba LGF2, avem particule de Ag de diferite mărimi așezate pe folia de GO (Fig. 55 și Fig. 56).

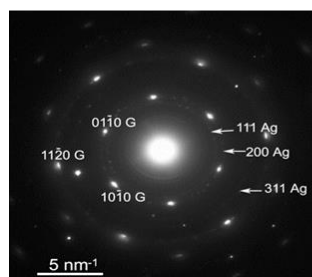
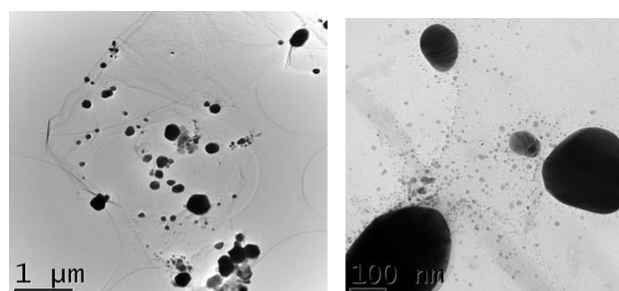
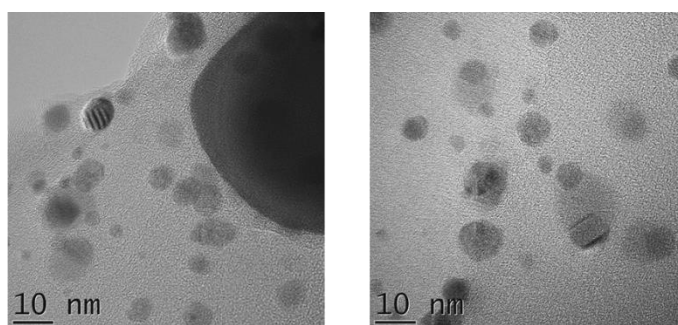


Fig. 55 Imagini TEM la diferite mărimi și difracție de electroni pentru proba LGF2. a) folia de GO suprapusă pe grila de carbon; b) particulele de Ag dispersate doar pe folia de GO; c) diagrama de difracție de electroni (cu săgeți și ordine de mărime sunt indexate maximele de mărime pentru particulele de Ag).



a) b)
Fig. 56 a și b imagini HRTEM pentru proba LGF2
13 (a) se remarcă marginea foliei de grafenă peste gaura din grila de carbon (colțul din stânga sus al figurii). Se remarcă că folia de oxid de grafit este cvasi-amorfa. Particulele mici de Ag cu dimensiuni între 2 și 10 nm au tendința de a se aranja în jurul celor mari. Aceasta este vizibil și în figura 12 (b).

Analiza microscopică a probei LGF1 relevă faptul că distribuția dimensională a particulelor distribuite pe folia de GO este mai largă, de la câțiva nm până la câțiva micrometri.

La fel ca și pentru proba LGF2, pe imaginea corespunzătoare diagramei de difracție s-au indicat cu săgeți albe și s-au indexat maximele (cercurile) de difracție corespunzătoare

particulelor de Ag. Remarcabil este faptul că în această diagramă de difracție, spre deosebire de proba LGF2, spoturile de difracție corespunzătoare Go sunt foarte slabe și difuze, de aceea nu au mai fost notate pe figură. Prezența unor spoturi de difracție difuze în GO din proba LFG1 ar însemna o mai slabă cristalinitate a acestuia față de GO din proba LGF2. În schimb, în comparație cu fig. 55 un alt aspect structural observat în proba LGF1 este apariția multor spoturi de difracție suplimentare (unele dintre ele notate cu roșu în diagrama de difracție din fig. 57 c). Aceste spoturi de difracție suplimentare, care nu aparțin GO sau Ag ar putea proveni de la un oxid de Ag. Prezența lor arată în proba LGF1 avem un amestec de particule de Ag și particule de Ag oxidat.

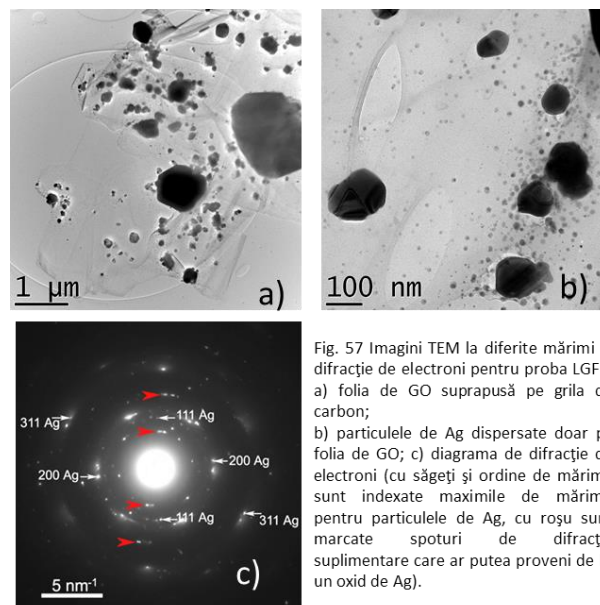


Fig. 57 Imagini TEM la diferite mărimi și difracție de electroni pentru proba LGF1. a) folia de GO suprapusă pe grila de carbon; b) particulele de Ag dispersate doar pe folia de GO; c) diagrama de difracție de electroni (cu săgeți și ordine de mărime sunt indexate maximile de mărime pentru particulele de Ag, cu roșu sunt marcate spoturi de difracție suplimentare care ar putea proveni de la un oxid de Ag).

Aspectul morfologic al probei LGF1 (Fig. 58) arată că în cazul acestei probe, pe lângă particulele foarte mici, de dimensiuni <10 nm, unele particule mai mari de Ag/oxid de Ag sunt înglobate într-un alt material, care este amorf și care ar putea fi stabilizatorul PVP.

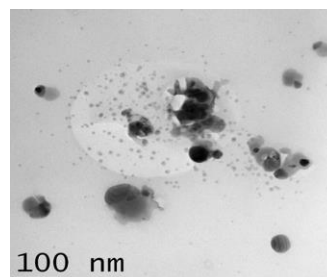


Fig. 58 Imagine TEM pe proba LGF1 Pe lângă particulele foarte mici, de dimensiuni <10 nm, unele particule mai mari de Ag/oxid de Ag sunt înglobate într-un alt material, care este amorf și care ar putea fi stabilizatorul PVP.

În înalta rezoluție, proba LGF1 arată ca în figura 59, destul de asemănător cu proba LGF2.

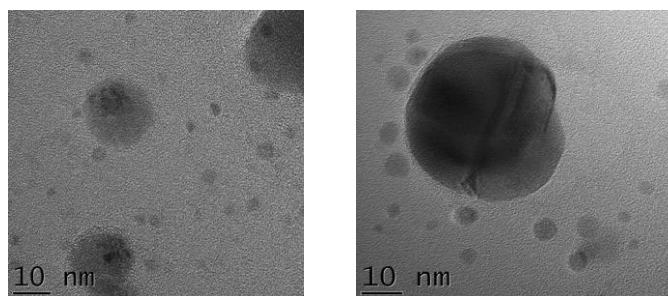


Figura 59. Imagini HRTEM pe proba LGF1

Studiul prezent arată că analizele Raman efectuate la lungimea de excitare 514 nm au condus la următoarele concluzii:

i) dispersarea fulgilor de grafit în DMF conduce la obținerea unor structuri cu cateva straturi de grafenă care sunt evidențiate în spectrele Raman ale probelor etichetate LEX1 și LEX2 printr-o schimbare a valorii raportului între intensitățile relative ale benzilor G și D de la 2.39 (LEX 1) la 1.57 (LEX2),

ii) interacția chimică a GO cu particule de Ag stabilizate cu cantități din ce în ce mai mari de PVP, LGF1 și LGF2, conduce la o funcționalizare a GO cu PVP. Acest proces de funcționalizare este evidențiat prin deplasarea benzii G către energii mici de la 1601 cm^{-1} (GO) la 1598 cm^{-1} (LGF1) și 1584 cm^{-1} (LGF2) variație acompaniată de modificarea poziției benzii D.

Studiile de microscopie electronică prin transmisie de înaltă rezoluție au arătat că exfolierea în DMF la diverse concentrații a fost mai eficientă la proba LEX1 față de proba LEX2, conducând în proba LEX1 la obținerea unor grafene cu puține straturi mai extinse (ca suprafață) și cu mai puține defecte (muchii) față de proba LEX2.

Analizele morfologice și structurale în probele funcționalizate LGF1 și LGF2 au arătat ca în proba LGF1 s-au obținut particule de Ag și oxid de Ag depuse pe GO, în timp ce în proba LGF2 particulele sunt numai de Ag. În ambele cazuri, distribuția dimensională a particulelor este foarte largă.

În concluzie cel mai stabil termic este LGF2, toate prezintă trei pierderi de masă determinate de descompuneri (eliminarea apei de constituție sau legată fizic-umiditatea higroscopică, și două pierderi de masă –descompuneri termice prima datorată grafenelor funcționale și a doua aditivului).

Soluția optimă pentru grafenele funcționalizate la concentrații de 1mg/ml – este LGF2 (DH= 59.2 ± 3.9 are valoarea cea mai mică, respectiv a= 35 nm are valoarea cea mai mică), iar la concentrații de 280 mg/ml, soluția optimă este LGF3 (DH= 22.3 ± 1.9 are valoarea cea mai

mică, respectiv $a=10.51$ nm are valoarea cea mai mică).

2.4 Determinarea activității antimicrobiene a uleiurilor volatile și a grafenelor funcționalizate prin metode convenționale față de celulele microbiene în stare planctonică și aderată și investigarea mecanismelor moleculare de acțiune prin citometrie în flux

2.4.1 Materiale și metode

2.6.1.1 Determinarea concentrației minime inhibitorii a uleiurilor volatile/ standardelor analitice /grafenelor funcționalizate– metoda microdiluțiilor

Analiza cantitativă s-a realizat prin metoda microdiluțiilor seriale în mediu lichid (bulion Mueller-Hinton), în plăci cu 96 de godeuri (Lazăr și colab., 2005). Uleiurile volatile și standardele analitice s-au diluat serial zecimal, volumul final al mediului de cultură inoculat fiind de 200 μ l (tabelele 33, 34). Pentru solubilizarea componentelor testate s-a utilizat dimetilsulfoxid (DMSO), în proporție de 1:1 (V/V). S-au utilizat control negativ – mediu de cultură și diluții blanc pentru variantele analitice, control pozitiv – martor de creștere bacteriană. CMI s-a stabilit macroscopic, ca fiind ultima concentrație la care nu s-a observat apariția creșterii microbiene, respectiv apariția turbidității mediului și prin citire spectrofotometrică a absorbanței la 620nm pentru determinarea densității optice a culturilor bacteriene.

2.6.1.2.Evaluarea sensibilității biofilmelor bacteriene la acțiunea extractelor vegetale/ standardelor analitice/grafene funcționalizate

Pentru a evalua acțiunea extractelor vegetale și a standardelor analitice asupra biofilmului bacterian s-a folosit protocolul prezentat de Oliveira modificat (Oliveira și colab., 2012). 150 μ l bulion BHI au fost repartizați în plăci cu 96 godeuri cu fund plat. Godeurile au fost inoculate cu 50 μ l suspensie bacteriană cu densitatea de 1.5×10^8 UFC/ ml, ajustată cu un standard McFarland 0.5. Incubarea s-a realizat la 37°C pentru 48 ore, pentru a permite formarea biofilmului. Mediul de cultură a fost îndepărtat. Godeurile au fost spălate de 3 ori cu soluție salină pentru a se îndepărta celulele rămase neaderate. În fiecare godeu s-a adăugat 200 μ l soluție ulei volatil/ standard analitic și s-a menținut placa la temperatura camerei 20 min după care godeurile au fost spălate de trei ori cu soluție salină pentru a se îndepărta urmele de extract/standard. Mediul de cultură corespunzător a fost adăugat (200 μ l) în fiecare godeu iar microplăcile au fost incubate 24h la 37°C. Absorbanta a fost citită la 620nm după perioada de incubare pentru a se determina eficiența compusului testat. S-au utilizat martor negativ, mediu

de cultură și martor pozitiv, celule netratate. Testul relevă creșterea bacteriană după cea de-a doua perioadă de incubare, ceea ce reprezintă indicativul celulelor viabile în biofilm.

2.6.1.3. Evaluarea influenței uleiurilor volatile și a standardelor analitice asupra permeabilității membranare și activității pompelor de eflux bacteriene

Evaluarea influenței uleiurilor volatile, a standardelor analitice și a grafenelor funcționalizate asupra activității pompelor de eflux bacteriene s-a realizat prin tehnica citometriei în flux: determinarea viabilității celulare prin marcarea cu iodură de propidiu și evaluarea activității pompelor de eflux bacteriene prin marcarea cu bromură de etidiu.

Achiziția de date s-a realizat cu citometrul FACS Calibur care prezintă un laser cu argon de 488nm și filtru de 670 nm pentru probele marcate cu PI și 585±42 nm pentru probele marcate cu EB. Măsurătorile au fost realizate în scala *forward scatter* (FSC) vs. *side scatter* (SSC). S-au realizat porți pentru a exclude particulele nefluorescente obținute în urma achiziționării a 10000 evenimente. Pentru analiza statistică a fost utilizat *software*-ul de analiză al citometrului BD CellQuest Pro v.4.0.2.

2.6.2. Rezultate și discuții

Nevoia globală pentru opțiuni alternative de prevenție și tratament pentru afecțiunile orale care să fie eficiente și economice are ca premisă incidența ridicată a acestora. În ciuda câtorva agenți disponibili comercial, aceste substanțe pot altera echilibrul microbiotei orale și au efecte secundare diverse, locale sau sistemice (ex. stări de vomă, diaree și colorarea smalțului dentar).

Prođușii naturali derivați din plantele medicinale s-au dovedit a fi o sursă abundentă de compuși farmacologic activi, dintre care mulți au stat la baza dezvoltării unor derivate, substanțe de sinteză sau semisinteză, pentru industria farmaceutică. Uleiurile volatile, produse ale metabolismului secundar vegetal sunt resurse valoroase pentru studiile de farmacognozie și dezvoltarea unor noi alternative terapeutice anti-infecțioase. Numeroase studii din literatură, dar și brevete se bazează pe utilizarea uleiurilor volatile pentru formulări diverse cu activitate antimicrobiană/ anti-patogenică. Numeroase familii de plante sunt cunoscute ca fiind producătoare de uleiuri volatile: *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Cupressaceae*, *Hypericaceae*, *Lamiaceae*, *Liliaceae*, *Myrtaceae*, *Pinaceae*, *Piperaceae*, *Rosaceae*, *Rutaceae*, *Fabaceae*, *Santalaceae*, *Zingiberaceae*, *Zygophyllaceae*. Acestea sunt utilizate ca baze de selecție pentru alternative ale antibioticelor/ biocidelor curent utilizate în practica medicală. Carson și Hammer, 2011, menționează potențialul antimicrobian al tuturor uleiurilor volatile, la concentrații care nu depășesc 5% (V/V) (Carson și Hammer, 2011).

Selecția s-a bazat în studiul de față pe randamentul de extracție și pe diversitatea compozițională a uleiurilor volatile. Din punct de vedere calitativ, compoziția uleiurilor volatile testate a fost: majoritar terpenică (uleiurile din frunze de mărar și epicarpul fructelor de lămâi și portocal), echilibrată terpene : terpenoide (uleiul din muguri de conifere și din cimbru – *herba*), majoritar terpenoidică (uleiul din salvie, lavandă – *herba*, cuișoare și chimen – fructe uscate) (Hayashi și colab., 2014).

În extractele studiate terpenoidele identificate aparțin la diverse clase de substanțe. În uleiul din salvie s-au identificat tuionă și camfor, cetone monoterpene, în raport procentual comparabil (aprox. 25% din totalul componentelor identificate, dintre care terpenoidele au reprezentat peste 80%); în uleiul din cuișoare eugenol, fenilpropanoid reprezentând peste 85% din totalul componentelor identificate; în uleiul din lavandă s-au identificat linalool și linalil acetat (alcool monoterpenc, respectiv ester monoterpenc) în raport de 2:1 și reprezentând peste 40% din totalul componentelor identificate; în uleiul de cimbru carvacrol, alcool monoterpenc reprezentând peste 50% din totalul componentelor identificate; în uleiul de chimen se remarcă prezența carvonei, cetonă monoterpencă reprezentând aprox. 80% din totalul componentelor identificate; în uleiul din muguri de conifere s-a identificat terpineol, în proporție de aproximativ 20% din totalul componentelor identificate.

În cele ce urmează va fi prezentată activitatea antimicrobiană a uleiurilor volatile testate și a standardelor analitice eugenol, eucaliptol și β -pinen. Rezultatele sunt exprimate ca valori CMI (mg/ml) stabilite după citirea spectrofotometrică a densității optice a culturilor bacteriene pentru întregul interval de concentrații testate pentru fiecare variantă analizată. De asemenea, s-a realizat o centralizare a valorilor CMI per tulpină bacteriană și ulei volatil, pentru evidențierea eficacității fiecărui extract.

Rezultatele vor fi prezentate ierarhizând uleiurile volatile/ standardele analitice potrivit efectului lor antimicrobian. Criteriul de clasificare s-a elaborat utilizând datele prezentate de Carson și Hammer. S-au stabilit intervale de concentrație pentru variantele analitice: <1%, 1.5-2.5%, ~5% și >5% (V/V). Astfel, uleiurile volatile cu activitate antibacteriană la concentrații >5% au fost considerate ca având efect minim (*C. carvi*, *Picea* spp., *A. graveolens*, *C. sinensis*), iar cele cu activitate antimicrobiană la concentrații <1% au fost considerate ca având efect maxim (*E. caryophyllata*, *S. hortensis*) (fig. 62).

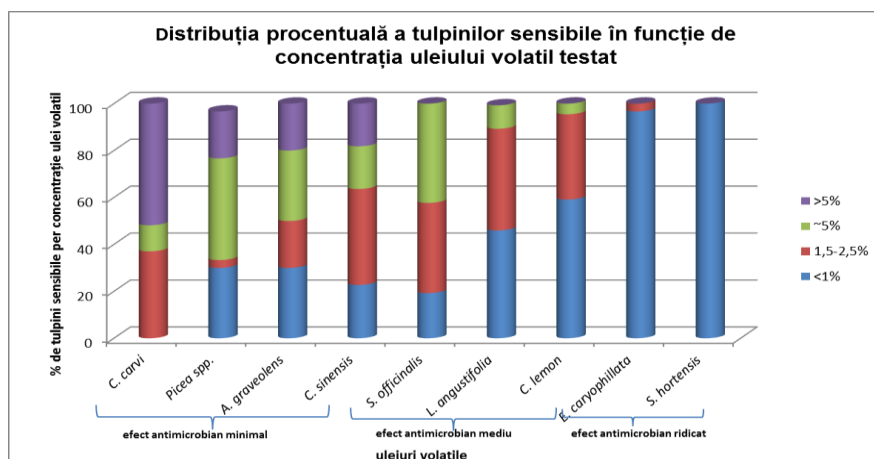


Fig. 62 Distribuția procentuală a tulpinilor sensibile în funcție de concentrația uleiului volatil testat și clasificarea uleiurilor volatile în funcție de dinamica efectului antimicrobian

Literatura de specialitate menționează sporadic, în articole tip *review*, activitatea antimicrobiană a uleiului volatil din fructe de *C. carvi* asupra tulpinilor microbiene implicate în etiologia bolii periodontale (Cowan și colab., 2009). *C. carvi* utilizat în studiul de față are o activitate antibacteriană minimală comparativ cu celelalte variante analitice, cu până la 50% dintre tulpinile testate susceptibile la concentrații >5% (V/V).

Uleiul volatil din *C. sinensis* conține majoritar limonen (~95% din totalul componentelor identificate), iar activitatea sa antimicrobiană asupra tulpinilor testate poate fi considerată minimă, distribuția procentuală a tulpinilor susceptibile relevând efectul minim asupra a 18,18% dintre tulpini și 18,18% tulpini susceptibile la concentrații de ~5% V/V.

Activitatea antimicrobiană a uleiurilor volatile din *Picea* spp a fost minimă, 20% dintre tulpinile izolate de periodontopatogeni fiind sensibile la concentrații ale uleiului volatil de peste 5% V/V. Activitatea antimicrobină modestă a acestui extract ar putea fi corelată cu compoziția echilibrată terpenoide: terpenoide, între care componentele majoritare sunt reprezentate procentual ~38, respectiv 20%, iar restul componentelor, numeroase (30 de compuși identificați), având pondere mică, dar putând iniția relații de antagonism între componente.

Extractul din *Citrus lemon* (lămâi) are o activitate inhibitorie medie cu valori CMI de 5,25-21 mg/ml. Liu și colab, raportează însă o pentru *Streptococcus mutans* o inhibiție a dezvoltării la o concentrație de 4,5mg/ml de ulei de lămâi (Liu și colab., 2013).

Extractul obținut din lavandă (*Lavandula angustifolia* L.) prezintă o activitate inhibitorie medie, valorile CMI fiind încadrate în intervalul 1,38 – 22,12 mg/ml, însă pentru 43% dintre tulpini concentrația optimă este de 22,12 mg/ml.

Uleiul volatil din *S. officinalis herba*, a prezentat o activitate antimicrobiană medie, cu valori CMI în proporție egală distribuite la valorile 22,95, respectiv 45,9 mg/ml.

În studiul de față, toate tulpinile testate au manifestat susceptibilitate la uleiul volatil din salvie, la concentrații sub 5% V/V. Componentele majoritare ale acestuia, recunoscute ca substanțe cu activitate antimicrobiană sunt tuiona și camforul, monoterpene (cetone monoterpene), distribuite în procente comparabile în amestec (~25%). Uleiul volatil din salvie a fost majoritar constituit din terpenoide (>80% din totalul compușilor identificați).

Uleiul volatil obținut din muguri de *Eugenia caryophyllata* prezintă o foarte bună activitate antimicrobiană, valorile CMI obținute încadrându-se în intervalul 0,1-6,59 mg/ml, excepție făcând o singură tulpină de *Pasteurella haemolytica* a cărei creștere a fost inhibată la o concentrație de 13,18 mg/ml.

Conform datelor din literatură extractul din *Eugenia caryophyllata* inhibă dezvoltarea patogenilor orali (*Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*) la concentrații de 0,25-0,5 mg/ml (Bersan și colab., 2014).

Extractele etanolice și metanolice de cuișoare testate pe *Streptococcus mutans* și *Streptococcus salivarius* au fost active la o concentrație de 12,5 și 1,5mg/ml pentru prima tulpină și 25 și 6,25 mg/ml pentru a doua (Mirpour și colab. 2015). Componentul majoritar al uleiului volatil din cuișoare este eugenolul, fenilpropanoid cu activitate antimicrobiană cunoscută, curent utilizat în practica stomatologică.

Cea mai bună activitate antimicrobiană a fost manifestată de uleiul volatil din *Satureja hortensis herba*. În ceea ce privește tulpinile de *Streptococcus sp.* activitatea inhibitorie a extractului a fost observată la o valoare între 0,17 și 2,72 mg/ml. Sharifi-Rad și colab. în studiul realizat pe extract din părți aerine de *Satureja intermedia* C.A. raportează pentru tulpinile de *Streptococcus mutans* o valoare a CMI între 4,2 și 5,1 mg/ml, iar pentru *Streptococcus salivarius* CMI a fost între 11,4 și 12,5 mg/ml. (Sharifi-Rad și colab., 2015). Zomorodian și colab., raportează pentru tulpinile de *Streptococcus mutans*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. sobrinus* testate activități inhibitorii ale uleiurilor volatile extrase din speciile *Satureja khuzestanica* și *Satureja bachtiarica* la valori între 0,062 și 0,25 respectiv 0,125 și 0,5 μl/ml (Zomorodian și colab., 2015).

Componentele majoritare în uleiul volatil din *S. hortensis* au fost carvacrolul și γ -terpinen, distribuția terpenoide fiind echilibrată în acest amestec. Carvacrolul este menționat în literatură ca substanță cu activitate antimicrobiană demonstrată (Carson și Hammer, 2011). Comparând activitatea antimicrobiană a uleiului din cimbru cu aceea a celui

din muguri de conifere, ambele amestecuri cu compoziție terpenică : terpenoide comparabilă, se poate propune ipoteza unui sinergism de acțiune, sau efect aditiv al componentelor carvacrol și γ -terpinen.

Studiul activității compușilor naturali, amestecuri complexe, asupra unor tulpini izolate de periodontopatogeni s-a completat în prezenta lucrare cu determinarea activității antimicrobiene a unor componente izolate, standarde analitice: eugenol, fenilpropanoid, eucaliptol, alcool monoterpenic, β -pinen, hidrocarbură monoterpenică. Terpenoidele eugenol și eucaliptol au manifestat activitate antimicrobiană la concentrații sub 0,5% V/V, în timp ce β -pinenul a avut activitate antimicrobiană la concentrații sub 1% V/V (20% dintre tulpini cu valori CMI de 10,9mg/ml) .

Influența extractelor vegetale asupra expresiei fenotipice a factorilor de virulență solubili

Influența extractelor vegetale asupra expresiei fenotipice a factorilor de virulență solubili a fost testată pe un număr de 28 de tulpini folosind 9 extracte (chimen, salvie chiparos, lavandă, β pinen, mărar, cuișoare, cimbru, eugenol). Analiza datelor a arătat că în general virulența tulpinilor nu este afectată de prezența uleiurilor, totuși s-a observat pentru unele tulpini o diminuare a expresiei enzimelor implicate în formarea de pori membranari (producerea de lecitinaze) și a unor enzime implicate în hidrolizarea proteinelor la peptide și aminoacizi (cazeinaza).

Influența extractelor vegetale asupra hidrofobității

Streptococcus mutans aderă la suprafața dentară prin interacții hidrofobe. Agenții terapeutici care pot reduce formarea legăturii hidrofobe pot reduce riscul de carii și implicit pe cel de alte afecțiuni dentare (Nostro și colab. 2004). Determinarea indicelui de hidrofobitate a fost realizat după un contact al tulpinilor microbiene de 24 ore cu concentrații subinhibitorii din diferite extracte vegetale. Tulpinile testate au prezentat grade diferite de hidrofobitate, caracter influențat de tulpinul de bacterie și de extractul vegetal și concentrația utilizată. β -pinenul a fost compusul cu cea mai mare activitate (Fig. 83), însă nu se remarcă o modificare semnificativă a hidrofobității în cazul nici unui dintre uleiurile volatile sau standarde. Rezultatele au arătat o posibilă explicație pentru reducerea hidrofobității ar putea fi legarea componentelor active din extractele vegetale la proteinele de la nivelul suprafeței celulare (Hasan și colab., 2012).

Influența extractelor vegetale asupra producerii de acid

Unele specii bacteriene rezidente la nivelul cavității orale sunt acidogene și acidurice, mai ales speciile de *Streptococcus sp.* care sunt implicate în procesul cariogenic. În general, dezvoltarea bacteriilor în prezența extractului vegetal nu a determinat modificarea semnificativă a valorii pH, totuși dintre extractele vegetale testate, cel de cuișoare este cel mai eficient în baleiajul mediului de la acid la mai puțin acid (Table 35).

Tabel nr 35 Valorile pH ale mediului de cultură pentru tulpinile microbiene dezvoltate în prezența unor concentrații sunbinhibitorii de extracte vegetale și standarde analitice.

Tulpina	marior	chimen	salvie	chibritos	lavandă	ibinon	marar	cuișoare	eugenol
60.1	8,254	5,966		5,438	5,248	6,72	6,104		
42	5,885	5,122	5,996	5,692			7,045		
38.2	8,073	6,237		5,248	5,363	5,528	6,366	5,803	
60.3	8,039	6,55	5,856		7,1	6,73	6,69	7,204	
61.2	8,289	5,659	5,467	5,748	5,632	6,812	7,072		5,397
71	8,199	6,492		5,769	5,35	6,509	6,66		
26.3	7,355		7,115			6,37		7,249	7,173
41.5	5,819		7,203			4,933		4,996	5,204
39.1	4,94		4,777		4,963			5,015	4,995
39.2	5,706		5,037			5,076		7,224	7,209
26.4	6,795		4,67		4,784	5,194		5,073	7,216
41.2	7,168			5,53	5,777	7,229	6,265	7,022	5,33
66	4,983			4,971	5,063			7,229	4,952
119	4,96				4,975	5,011		4,972	4,985
41.1	4,031				4,99	4,948		7,061	5,1
42.1	7,269				7,177	7,01			6,897
50	5,25				4,995	5,155		5,003	7,239
48	5,178					5,045		5,084	5,074
65	4,91				5,031	5,026	4,976	6,514	7,184
51	5,026				5,055	4,995		5,011	4,996
114	5,031				4,992	4,975	5,002	4,998	7,24
110	8,314				4,888	4,941		4,828	4,757
47	6,001					4,885	5		4,997
35.4	6,795					5,155		7,19	
67	5,061					4,991		7,21	7,235
20.1	6,419					5,027		4,969	4,998
44	8,16					5,577			
123	6,307					5,105		7,191	4,799

Activitatea antimicrobiană a grafenelor funcționalizate cu Ag și/sau extract de cuișoare

În cadrul acestui studiu s-a urmărit capacitatea grafenelor de a fi utilizate ca sisteme de transport și eliberare pentru uleiul de cuișoare. Grafenele funcționalizate cu extract de cuișoare testate în prezentul studiu au prezentat o activitate antimicrobiană limitată (Fig. 84, Fig. 85, Fig. 86, Fig. 87), cea mai buna activitate inhibitorie fiind manifestată față de unele tulpini Gram pozitive (T 38.2 *Streptococcus salivarius sp. salivarius*, T 119 *Staphylococcus xylosus*, T 61.2 *Gemella morbillorum*, T 44 *Streptococcus acidominimas*, T 110 *Actinomyces naeslundii*) însă rezultatele nu se pot generaliza pentru o anumită specie microbiană, deoarece acțiunea antimicrobiană s-a dovedit specifică de tulpină. Comparând grafena de tip 3 (pe bază de grafit, de dimensiuni mai mici) cu primele două se poate observa acțiunea inhibitorie mai accentuată a acesteia față de primele două tipuri de grafenă (cea pe bază de oxid de grafit și de grafit, dar de dimensiuni mai mari). Valorile CMI se încadrează în intervalul 1055-32,96μg/ml, excepție făcând tulpina T 71 *Fusobacterium mortiferum* a cărei dezvoltare este inhibată de o concentrație de 16.48 μg/ml.

Grafenele obținute din oxid de grafit (GO) funcționalizate cu Ag și/sau extract de cuișoare au fost testate pentru a determina activitatea antimicrobiană pe care o exercită față de tulpinile bacteriene izolate din parodontoză. Astfel s-a determinat valoarea CMI pentru

grafenele obținute din GO funcționalizate cu Ag și s-a observat că în general au o activitate inhibitorie ridicată. Tulpinile testate au fost sensibile la acțiunea grafenei testate cu excepția T 119 *Actinomyces naeslundii* care a manifestat rezistență, dar acest fenomen nu este generalizat pentru toate tulpinile de *Actinomyces sp.* testate deoarece T 110 *Actinomyces naeslundii* și T 41.2 *Actinomyces naeslundii* au fost sensibile la concentrații inhibitorii foarte mici de 0,035 respectiv 0,017 mg/ml. Concentrațiile active obținute s-au încadrat în intervalul 0,004 -0,07 mg/ml. Analizând valorile obținute se poate afirma că acțiunea inhibitorie este tulpină specific și nu specie specifică. DMF 2 – grafena obținută din grafit și funcționalizată cu Ag are în general o activitate inhibitorie bună cu valori CMI cuprinse în intervalul 0.035-0.004 mg/ml (Fig. 94, Fig 95). Comparativ cu DMF 1 – grafena obținută din oxid de grafit se observă că are o mai slabă activitate inhibitorie a DMF2.

DMF 3 – grafena obținută din oxid de grafit, funcționalizată cu Ag prezintă o foarte bună activitate inhibitorie asupra culturii bacteriene în stare planctonică, valorile CMI fiind de 0,017 și 0,002 mg/ml. Analizând rezultatele obținute cu valorile de la DMF 1 se observă că deși material primă este aceeași – oxidul de grafit – grafenele DMF 3 sunt mai active, particulele de grafenă fiind mai mici în cazul grafenei DMF 3 comparativ cu DMF 1, ceea ce permite o mai bună interatiune cu particulele de Ag. Pentru a determina dacă activitatea inhibitorie a grafenei funcționalizate se datorează acțiunii combinate dintre grafenă și Ag și nu doar Ag a fost testată separat concentrația de Ag-PVP utilizată pentru funcționalizarea grafenelor și s-a constatat că valorile CMI sunt foarte mici, cuprinse între 0,28 și 0,035 mg/ml, excepție făcând tulpina T41.5 la care valoarea CMI este de 0.017mg/ml. (Fig. 98, 99) Analizând toate valorile CMI obținute pentru setul de grafene funcționalizate cu Ag se observă că valorile obținute pentru DMF 4 sunt mai mici decât pentru celelalte probe de grafene. După ce s-a evidențiat activitatea inhibitorie a grafenelor funcționalizate cu Ag s-a investigat dacă aceleași grafene funcționalizate cu Ag devin mai active în urma combinării cu extract de cuișoare.

Analizele prezentate în capitolele anterioare au arătat că uleiul esențial obținut din *Syzygium aromaticum* (cuișoare) prezintă o foarte bună activitate antimicrobiană, valorile CMI obținute încadrându-se în intervalul 0,1-6,59 mg/ml, excepție făcând o singură tulpină de *Pasteurella haemolytica* care a fost inhibată la CMI de 13,18 mg/ml. Astfel pentru grafenele funcționalizate cu Ag și extract de cuișoare s-a determinat valorile CMI pe același set de tulpini microbiene ca și în cazul grafenelor funcționalizate doar cu Ag.

DMF 1 funcționalizat cu Ag și extract de cuișoare prezintă activitate inhibitorie la o concentrație de 0,035 – 0,002 mg/ml, excepție făcând tulpina T 123 *Streptococcus*

acidominimas care a fost inhibată de o concentrație mai mare de substanță activă, de 0.07mg/ml. Comparativ cu grafenele funcționalizate cu Ag, cele tratate și cu ulei sunt active la concentrații mai mici. Aceeași direcție (creșterea eficienței extractului cu scăderea concentrației minime inhibitorii de substanță activă) se observă și în cazul combinației DMF 2 cu Ag și **extract**, valoarea CMI fiind cuprinsă între 0,017 și 0,002 mg/ml, comparativ cu 0.035-0.004 mg/ml concentrație activă pentru DMF2 cu Ag. În cazul combinației DMF 3 Ag și extract vegetal cu excepția a două tulpini (T 123 *Streptococcus acidominimas* și T60.3 *Pantoea sp.*), pentru care valoarea CMI este de 0,008 respectiv 0,004 mg/ml, restul tulpinilor sunt inhibate de o concentrație de 0,002 mg/ml. Și în cazul DMF 4 Ag și extract se observă o potențare a acțiunii inhibitorii, concentrația activă încadrându-se între 0,07 și 0,008 mg/ml.

În concluzi grafenele pe bază de grafit și oxid de grafit pot fi utilizate pentru obținerea unor materiale compozite, prin funcționalizare cu Ag și/sau uleiuri vegetale, utilizate în tratamentul și profilaxia afecțiunilor periodontale, datorită activității antimicrobiene exercitate la concentrații foarte mici de substanță activă, față de colonizatorii primari ai plăcii dentare.

Evaluarea influenței uleiurilor volatile și a standardelor analitice asupra activității pompelor de eflux bacteriene

Marcarea alternativă a probelor (tulpini microbiene crescute în prezența combinațiilor testate la concentrație subinhibitorie) cu cei doi fluorocromi, a permis aprecierea mecanismului prin care substanța acționează asupra tulpinilor microbiene, respectiv permeabilizarea învelișurilor celulare, sau inhibarea activității pompelor de eflux microbiene. Acest ultim mecanism este de un deosebit interes, deoarece poate facilita recuperarea sensibilității la antibiotice a tulpinilor microbiene care au prezentat fenotipuri de rezistență prin ținerea activității pompelor de eflux cu ajutorul unui inhibitor. În mod ideal inhibitorul potențează activitatea unui antibiotic față microorganisme multirezistente prin pompe de eflux și prin urmare reduce concentrația minimă inhibitorie a antibioticului testat (Apama și colab., 2014).

Pentru **tulpina T 35.4 *Streptococcus intermedius*** analiza prin citometrie în flux a relevat **prezența concomitentă a mecanismelor de acțiune** investigate la toate variantele analitice studiate, cu excepția eucaliptolului. Standardul eucaliptol acționează printr-un mecanism diferit de permeabilizarea sau inhibarea pompelor de eflux, valorile obținute pentru mediana fluorescenței fiind similare cu cele obținute pentru martorii netratați.

Analiza în citometrie în flux pentru **tulpina T 38.2 *Streptococcus salivarius sp. salivarius*** a relevat faptul că atât **uleiurile vegetale testate cât și standardele analitice** acționează **la nivelul pompelor de eflux**. Spre deosebire de tulpinile anterioare **T 35.4**

Streptococcus intermedius și T 38.2 *Streptococcus salivarius sp. salivarius* la care extractele de *Eugenia caryophyllata* și *Citrus lemon* au acționat la nivelul membranei prin permeabilizarea învelișurilor celulare (PIC) respectiv la nivelul pompelor de eflux, la T 44 *Streptococcus acidominimas* aceste extracte acționează diferit, ceea ce conduce la concluzia că în cadrul aceleiași specii efectul inhibitor al uleiurilor esențiale este dependent de tulpină. Restul extractelor testate au avut efect asupra pompelor de eflux. În cazul tulpinii T 47 *Streptococcus mitis* uleiurile vegetale și standardele analitice testate acționează atât la nivelul pompelor de eflux cât și la nivelul permeabilizării învelișului celular. Pentru tulpina T 48 *Streptococcus acidominimas* activitatea antimicrobiană se manifestă prin acțiunea la nivelul pompelor de eflux.

Tulpina T 123 *Streptococcus acidominimas* este influențată de extractele testate la nivelul activității pompelor de eflux, la nivelul învelișului celular dar și prin alte mecanisme care nu au fost investigate. Comparativ cu tulpinile T44 și T48 de *Streptococcus acidominimas* se observă că uleiurile și standardele analitice testate nu au mecanisme de acțiune identice la toate cele trei tulpini ale aceleiași specii, demonstrând din nou faptul că efectul antimicrobian exercitat este tulpină specific.

Analiza prin citometrie în flux a acțiunii grafenelor funcționalizate cu Ag și/sau extract vegetal de cuișoare DMF1 [(grafenă din oxid de grafit funcționalizată cu Ag), DMF2 (grafenă din grafit funcționalizată cu Ag), DMF3 ((grafenă din grafit funcționalizată cu Ag de dimensiuni mai mici), DMF4 (nanoparticule de Ag acoperite cu PVP- polivinilpirolidonă), DMF1 + EV (extract cuișoare), gr 1, gr 2, gr 3, gr 4 (grafene din oxid de grafit sau grafit nefuncționalizate cu Ag cu EV)] a relevat pentru tulpina T 35.4 *Streptococcus intermedius* o acțiune concomitentă, atât la nivelul pompelor de eflux (inhibare), cât și la nivelul învelișurilor celulare (permeabilizare). Se remarcă efectul predominant de permeabilizare a învelișurilor celulare produs de grafenele nefuncționalizate cu Ag, dar funcționalizate cu ulei de cuișoare

Atât grafenele funcționalizate cu Ag, dar mai ales cele funcționalizate cu uleiuri vegetale exercită un puternic efect de inhibare a pompelor de eflux. Acțiunea cea mai intensă, atât în ceea ce privește permeabilizarea, cât și inhibarea pompelor de eflux a fost observată pentru grafena din grafit funcționalizată cu ulei de cuișoare și pentru nanoparticulele din Ag acoperite cu PVP și funcționalizate cu ulei de cuișoare. Acțiunea concomitentă asupra unor ținte diferite ale celulelor microbiene scurtcircuitează mecanismele de selecție a tulpinilor rezistente, ceea ce reprezintă un avantaj pentru conceperea unor strategii durabile și eficiente de tratament antimicrobian.

Afectiunile dentare precum caria dentară și parodontoza sunt direct legate de capacitatea bacteriilor de a forma biofilme (Rosan și colab. 2000), sub forma plăcii supragingivale și subgingivale (Konidi și colab., 2015). Compușii derivați din plante și uleiurile esențiale pot influența formarea biofilmului prin inhibarea sintezei peptidoglicanilor (Gao și colab., 2003), lezarea structurii membranare bacteriene (Cox și colab., 2000), și modularea procesului de *quorum-sensing* (Gao și colab., 2003).

Analizând datele obținute în urma experimentelor destinate observării capacității extractelor vegetale și a standardelor analitice de a inhiba formarea biofilmului bacterian se constată că extractul de cuișoare, lavandă și eugenolul – standard analitic au manifestat cel mai bun efect anti-biofilm. Celulele bacteriene incorporate în biofilm sunt mai rezistente la acțiunea antibioticelor convenționale comparativ cu cele aflate în stare planctonică (Gilbert și colab., 1997). Pentru a explica rezistența biofilmelor la substanțele antimicrobiene au fost propuse o serie de mecanisme: 1) penetrarea restricționată a agenților antimicrobieni, 2) inducerea răspunsului general de stress, 3) rate de creștere și metabolism scăzute, 4) expresia mărită a pompelor de multirezistență la bacterii, 5) activarea mecanismului de *quorum sensing and response*, 6) modificarea profilurilor proteinelor membranare externe (Konidhi și colab., 2015). La fel ca în cazul uleiurilor volatile, și în cazul grafenelor se constată că este nevoie de o concentrație mai mare de substanță activă pentru inhibarea biofilmelor comparative cu celulele planctonice.

2.7. Studiul *in vitro* al biocompatibilității extractelor vegetale și a grafenelor funcționalizate cu extract de cuișoare prin determinarea activității citotoxice și a influenței asupra ciclului celular

Analiza ciclului celular prin citometrie în flux a celulelor HT29 menținute pentru 24h în prezența uleiurilor volatile (1μl ulei/ml mediu) a demonstrat că toate aceste uleiuri influențează progresia ciclului celular. De asemenea, apariția unui peak în stânga G0/G1, sub-G0, a fost asociat morții celulare. Uleiul volatile de mărar induce o activare celulară prin creșterea fazei S și un slab efect apoptotic. În schimb, lavanda și chiparosul, induc o scădere marcantă a celulelor aflate în faza G0/G1 cu creșterea exacerbată a sub-G0 (celule moarte). Contactul celulelor HT29 cu uleiul volatil de chimen a dus o scădere procentului de celule aflate în faza G0/G1 și apariția sub-G0, confirmând astfel rezultatele obținute la evaluarea citotoxicității celulare.

Analiza efectului citotoxic al sistemelor de transport și eliberare propuse, bazate pe grafene funcționalizate cu Ag și încărcate cu ulei esențial de cuișoare a arătat că acestea prezintă

biocompatibilitate ridicată și nu sunt citotoxice, mai ales la concentrația de 1 μl/ml, la care nu se observa modificări ale ciclului celular pentru niciuna din cele 3 grafene testate .

Studiul efectului imunomodulator al unor extracte vegetale cu activitate antimicrobiană prin analiza profilului citokinic al celulelor THP-1 prin tehnica realtimePCR

Pentru experimentele de imunomodulare s-a utilizat linia monocitară THP-1. În scopul evaluării profilului citokinic celulele THP1 (500.000 de celule) au fost tratate timp de 1 h cu ulei volatil (1:5000). După 1 h s-a adăugat LPS (1 μg/ml) și s-a continuat incubarea la 37°C timp de 3,5 ore. Celulele au fost recoltate, centrifugate la 1300 rpm, 5 min. Din sedimentul celular a fost extras ARN utilizând TRIZOL.

În vederea reverstranscrierii s-a utilizat ARN total cu kitul High-Capacity cDNA *Reverse Transcription Kits Reactions*, de la Applied Biosystems, utilizând MultiScribe™ Reverse Transcriptase. Amestecurile de reacție au fost lucrate în triplicat, analizând nivelurile de expresie ale ARNm prin real time PCR realizat cu ABI 7300 Real Time PCR System utilizând TaqMan® Universal PCR Master Mix (furnizat la o concentrație de 2X, PN 4304437), care conține toți reactivii necesari pentru procesul de PCR, cu excepția probei ADN, a primerilor, sondei TaqMan® și kit-ul pre-validat Taqman Gene Expression Assays (Applied Biosystems) conform TaqMan® Gene Expression Master Mix Protocol (PN 4371135) pentru IL-1beta (Assay ID: Hs00174097_m1); IL-2, IL-6, IL-10 (Assay ID: Hs00174131_m1); TNF-α (Assay ID: Hs00174128_m1); iar ca gene țintă, iar GAPDH TaqMan® Ribosomal RNA Control Reagents (p/n4308313), de la Applied Biosystems.

Aparatul utilizat pentru reacția de qRT-PCR a fost 7300 Real-Time PCR System, de la Applied Biosystems. Rezultatele obținute au fost interpretate cu programul: 7300 System SDS Software.

Rezultate și discuții

În cadrul acestui studiu, am urmărit modificarea expresiei genelor pentru citokine pro- (IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-alfa) și anti-inflamatorii (IL-10) în celulele THP-1 tratate cu uleiuri esențiale și apoi stimulate cu LPS.

Uleiului de chimen și de cimbru au avut un puternic efect stimulator asupra expresiei IL-10, și inhibitor al celorlalte extracte testate, efectul inhibitor fiind mai intens în cazul extractelor de cuișoare (*clove*), eucalipt și chiparos

Extractele testate au avut efecte variabile asupra producției de interleukina-1β. S-a remarcat efectul puternic stimulator (pro-inflamator) al uleiului esențial extras din cimbru și al standardului analitic beta-pinen și cel puternic inhibitor (anti-inflamator) al standardelor de

eugenol și al uleiului de eucalipt și cuișoare. THP1 nu a exprimat IL-2, iar expresia IL-2 nu a fost modificată nici de către LPS nici sub acțiunea extractelor respective.

Toate extractele au stimulat într-o măsură variabilă producerea de IL-6, cu excepția uleiului de cuișoare, cel mai puternic efect stimulator fiind exercitat de uleiul de cimbru și de standardul analitic beta-pinen. În studiul de față s-a remarcat efectul puternic stimulator al uleiului de cimbru și al standardului analitic beta-pinen, și puternic inhibitor al eugenolului, uleiului de cuișoare și de eucalipt. Celelalte produse testate au stimulat ușor producerea de TNF. Dintre uleiurile testate, uleiul de cimbru a prezentat un efect imunomodulator manifestat prin stimularea expresiei genelor, atât pentru citokinele pro-inflamatorii (IL-1, IL-6, TNF, cât și anti-inflamatorii (IL-10), probabil asociat citotoxicității crescute. Uleiul de cuișoare și de eucalipt, precum și standardul analitic eugenol au manifestat un efect anti-inflamator, prin inhibarea expresiei genelor pentru IL-1 și TNF, în timp ce standardul analitic beta-pinen a manifestat un efect pro-inflamator prin stimularea expresiei genelor pentru IL-1, IL-6 și TNF.

Astfel, se poate concluziona că amestecurile fitochimice obținute din diferite specii de plante pot fi utilizate în tratamentul unor condiții patologice, pentru diminuarea sau stimularea apariției unui răspuns pro-inflamator, însă alegerea lor trebuie să fie precedată de evaluarea corectă a statusului inflamator al țesutului respectiv.

Concluzii

Caracterizarea microbiologică a celor 160 de tulpini microbiene izolate de la pacienți cu afecțiuni periodontale, mai precis din probe de placa bacteriană subgingivală a condus la următoare concluzii:

1. Identificarea tulpinilor izolate a relevat o mare diversitate taxonomică, genurile predominante fiind reprezentate de *Staphylococcus*, *Streptococcus* și *Actinomyces* (45,62%), precum și prezența unor asociații bacteriene descrise în boala periodontală la adulți, incluzând tulpini de *Bacteroides* sp., *Fusobacterium* sp., *Streptococcus* sp. și *Actinomyces* sp.

2. Diversitatea taxonomică extinsă și rata redusă de izolare a periodontopatogenilor clasici obținută în acest studiu ar putea fi considerate argumente în favoarea ipotezei implicării plăcii bacteriene nespecifice în etiologia leziunii periodontale. Înțelegerea modificărilor la nivelul microbiotei orale care predispon la apariția primelor stadii ale bolii periodontale, ar putea constitui un potențial bioindicator pentru diagnosticarea precoce a bolii periodontale și pentru un tratament adecvat, înainte de apariția manifestărilor clinice ale acestor boli.

Dintre tulpinile Gram-pozitive izolate, cele aparținând speciilor genului *Streptococcus* s-au dovedit a fi în general rezistente la acțiunea antibioticelor, peste 40% dintre tulpini fiind rezistente la tetraciclină, eritromicină, clindamicină și penicilină, cele de enterococi au fost sensibile la acțiunea vancomicinei și a linezolidului, dar rezistente la eritromicină, ciprofloxacina și tetraciclină, iar cele de *Staphylococcus sp.* au fost în general sensibile la setul specific de antibiotice.

Bacili Gram negativi glucozo-nefermentativi au prezentat rezistență ridicată la aztreonam, tulpinile de enterobacterii s-au dovedit sensibile în totalitate la acțiunea piperacilinei și a tetraciclinei, dar au prezentat rezistență ridicată la cefoxitin, amoxicilină-acid clavulanic și amoxicilină.

Dintre tulpinile de bacterii anaerobe testate, o tulpina de *Actinomyces naeslundii* și una de *Bifidobacterium sp.* au manifestat fenotip de multirezistență la antibiotice.

Analiza determinismului genetic al rezistenței a relevat prezența genelor complexului SCCmec tipul I, II și IV la tulpini ale genului *Staphylococcus* și a genelor CTX-M și TEM codificatoare pentru beta-lactamaze de spectru larg la tulpini aparținând genului *Pseudomonas*.

Evaluarea capacității de aderență a tulpinilor bacteriene izolate din placa subgingivală de la pacienți cu leziuni periodontale a relevat potențialul crescut al speciilor de “colonizatori primari” ai plăcii dentare de a coloniza substratul inert, un indice de aderență la celulele HEp-2 variabil (0-100%) și *pattern*-uri de aderență difuză, localizată, agregativă, difuz-localizată.

Tulpinile bacteriene izolate din leziuni periodontale au prezentat un spectru larg de factori de virulență solubili care favorizează supraviețuirea, creșterea și multiplicarea microorganismelor, degradează țesuturile gazdei și protejează bacteriile de acțiunea efectorilor imunitari ai gazdei (hemolizine - 64,7 %, hidroliza esculinei - 47,11%, amilaza - 27,9%, cazeinază - 25,47%, lecitinaze -22,44%, DN-aze - 21,6%, gelatinază - 16,66%, lipaze - 11,42%).

Tulpinile de *S. aureus* au fost negative pentru toți cei 18 factori de virulență investigați la nivel genotipic (adezine, toxine, enzime) ceea ce sugerează capacitatea lor redusă de adaptare la acest habitat și caracterul lor tranzitoriu la acest nivel.

În schimb, tulpinile de *P. aeruginosa* au fost pozitive pentru majoritatea genelor de virulență investigate (proteaza IV, fosfolipaza hemolitică C și fosfolipaza nehemolitică C, exotoxina T), rezultate ce susțin necesitatea unei abordări complementare, prin metode fenotipice și genetice, a studiului virulenței bacteriene.

Din punct de vedere calitativ, compoziția uleiurilor volatile testate a fost: majoritar terpenică (uleiurile din frunze de mărar și epicarpul fructelor de lămâi și portocal), echilibrată

terpene : terpenoide (uleiul din muguri de conifere și din cimbru – *herba*), majoritar terpenoidică (uleiul din salvie, lavandă – *herba*, cuișoare și chimen – fructe uscate).

Testarea activității unor uleiuri volatile/ standarde analitice asupra creșterii unor tulpini izolate din leziuni periodontale a relevat că uleiurile esențiale volatile obținute din *Syzygium aromaticum* și *Saturenja hortensis* au prezentat o foarte bună activitate antimicrobiană, cu valori CMI cuprinse între 0,1-6,59 mg/ml și respectiv 10,91 - 0.08mg/ml; extractele din *Citrus lemon* și *Lavandula officinalis L.* au prezentat o activitate inhibitorie moderată, iar uleiurile volatile din *C. sinensis*, *C. carvi*, *Picea spp* au avut o activitate antibacteriană redusă.

Extractul de cuișoare, lavandă și eugenolul au prezentat cea mai mare capacitate de a inhiba formarea biofilmului bacterian de către tulpini izolate din leziuni parodontale, concentrațiile de eradicare a biofilmului preformat fiind superioare celor necesare inhibării inițierii biofilmului.

În cadrul acestui studiu au fost obținute și caracterizate fizico-chimic ca potențiale substanțe antimicrobiene și/sau ca sisteme de transport și eliberare controlată a uleiurilor esențiale patru tipuri de grafene pe bază de grafit sau oxid de grafit, de diferite dimensiuni la scară nanometrică, funcționalizate cu Ag și acoperite cu polimerul polivinilpirolidonă, pentru a preveni agregarea, a crește biocompatibilitatea și a facilita funcționalizarea ulterioară a acestora.

Grafenele funcționalizate cu extract de cuișoare testate în prezentul studiu au prezentat o activitate antimicrobiană limitată, cea mai buna activitate inhibitorie fiind manifestată față de unele tulpini Gram pozitive de către grafena pe bază de grafit, de dimensiuni mai mici, comparativ cu cele pe bază de oxid de grafit și de dimensiuni mai mari.

Grafenele obținute din oxid de grafit funcționalizate cu Ag au manifestat o activitate antimicrobiană mai ridicată, valorile CMI încadrându-se în intervalul 0,004 -0,07 mg/ml.

Grafenele pe bază de grafit, funcționalizate cu Ag și extract de cuișoare au prezentat o activitate antimicrobiană îmbunătățită, demonstrată de cele mai mici valori CMI cuprinse între 0,017 și 0,002 mg/ml, ceea ce sugerează potențialul grafenelor de a fi utilizate pentru obținerea unor materiale compozite, prin funcționalizare cu Ag și/sau uleiuri vegetale, pentru aplicații în tratamentul și profilaxia afecțiunilor periodontale, datorită activității antimicrobiene exercitate la concentrații foarte mici de substanță activă, față de colonizatorii primari ai plăcii dentare.

Evaluarea influenței uleiurilor volatile, a standardelor analitice și a grafenelor asupra permeabilității membranare și activității pompelor de eflux bacteriene a relevat faptul că atât extractele, cât și grafenele funcționalizate cu Ag, dar mai ales cele funcționalizate cu uleiuri vegetale exercită un puternic efect de inhibare a pompelor de eflux. Acțiunea concomitentă

asupra unor ținte diferite ale celulelor microbiene reduc probabilitatea apariției fenomenului de rezistență, ceea ce reprezintă un avantaj pentru conceperea unor strategii durabile și eficiente de tratament antimicrobian.

Testele de citotoxicitate au dovedit că extractul de mărar are cea mai mică toxicitate față de linia celulară de origine epitelială HT29, în timp ce extractul de cimbru a fost cel mai toxic. Analiza ciclului celular prin citometrie în flux a demonstrat că uleiul volatil de mărar induce o activare celulară prin creșterea fazei S și un slab efect apoptotic, uleiul de lavandă și chiparos induce o scădere marcată a celulelor aflate în faza G0/G1 cu creșterea exacerbată a sub-G0 (efect pro-apoptotic), iar uleiul volatil de chimen a indus o scădere a procentului de celule aflate în faza G0/G1 și apariția sub-G0, confirmând astfel rezultatele obținute la evaluarea citotoxicității celulare.

Analiza efectului citotoxic al sistemelor de transport și eliberare propuse, bazate pe grafene funcționalizate cu Ag a arătat că acestea prezintă biocompatibilitate ridicată și nu sunt citotoxice, mai ales la concentrația de 1 μl/ml, la care nu se observă modificări ale ciclului celular pentru niciuna din cele 3 grafene testate.

Studiul efectului imunomodulator al unor extracte vegetale cu activitate antimicrobiană prin analiza profilului citokinic al celulelor THP-1 prin tehnica *Real-Time PCR* a arătat că uleiurile esențiale testate și componentele lor majoritare au influențat diferit profilul citokinic al celulelor THP-1, astfel:

- uleiul de cimbru a stimulat expresia pentru citokinele pro-inflamatorii (IL-1, IL-6, TNF), cât și anti-inflamatorii (IL-10), probabil asociat citotoxicității crescute.

- uleiul de cuișoare și de eucalipt, precum și standardul analitic eugenol au manifestat un efect anti-inflamator, prin inhibarea expresiei genelor pentru IL-1 și TNF, în timp ce standardul analitic beta-pinen a manifestat un efect pro-inflamator, prin stimularea expresiei genelor pentru IL-1, IL-6 și TNF;

Aceste rezultate conduc la concluzia că amestecurile fitochimice ar putea fi utilizate în tratamentul complex al unor condiții patologice, vizând pentru diminuarea sau stimularea apariției unui răspuns pro-inflamator, însă alegerea lor trebuie să fie corelată cu determinarea statusului imun local și general al gazdei.

Rezultatele obținute referitoare la potențialul antimicrobian și imunomodulator al acestor extracte recomandă continuarea cercetărilor în vederea obținerii unor strategii adjuvante sau alternative pentru managementul terapeutic și profilactic al afecțiunilor periodontale, precum și continuarea studiilor în direcția identificării mecanismelor intime de

acțiune a acestora asupra diferitelor căi de semnalizare implicate în activarea diferitelor tipuri celulare implicate în geneza și evoluția leziunilor din boala periodontală.

Lista de lucrări publicate pe parcursul elaborării tezei

În perioada realizării acestei teze de doctorat, au fost publicate un număr de 8 articole ISI (dintre care **1 articol ISI ca prim autor**), 5 articole BDI și au fost comunicate un număr de **5 lucrări** (la manifestări științifice internaționale (3) și naționale (2)).

- **Articole ISI**

Autor principal/corespondent

1. **Popa M**, Hussien MD, Cirstea A, Grigore R, Lazar V, Bezirtzoglou E, Chifiriuc MC, Sakizlian M, Stavropoulou E, Bertesteanu S. Insights on Metal Based Dental Implants and their Interaction with the Surrounding Tissues. Curr Top Med Chem. 2015;15(16):1614-21 (**FI =3,4**).
2. Antipa C., **Popa M.**, Măruțescu L., Bleotu C., Lazăr V., Berteșteanu S., Grigore R., Bezirtzoglou E., Ruta S.M., Virulence Profiles of Bacterial Strains Isolated From Periodontal Lesions. Romanian Biotechnological Letters, Vol 20, no 4, 2015

Coautor

1. Mihai MM, Holban AM, Giurcaneanu C, Popa LG, Oanea RM, Lazar V, Chifiriuc MC, **Popa M**, Popa MI. Microbial biofilms: impact on the pathogenesis of periodontitis, cystic fibrosis, chronic wounds and medical device-related infections. Curr Top Med Chem. 2015;15(16):1552-76 (**FI =3,4**).
2. Pop CS, Hussien MD, Popa M, Mares A, Grumezescu AM, Grigore R, Lazar V, Chifiriuc MC, Sakizlian M, Bezirtzoglou E, Bertesteanu S. Metallic-based micro and nanostructures with antimicrobial activity. Curr Top Med Chem. 2015;15(16):1577-82 (**FI =3,4**).
3. Nemțanu M, Minea R, Mazilu E, Setnic S, Mitru E, Balotescu MC, **Bucur M**, Oproiu C, Mihăescu G, Dițu LM Effects of Ionizing Radiation on the Antioxidant and Antimicrobial Activities of Sea Buckthorn Oil. I. International Medicinal and Aromatic Plants Conference on Culinary Herb published in Acta Horticulturae 2009, 58: 128–135

Articole BDI

Coautor

1. Saviuc C, Grumezescu AM, Oprea E, Radulescu V, Dascalu L, Chifiriuc MC, **Bucur M**, Banu O, Lazar V. Antifungal activity of some vegetal extracts on *Candida* biofilms developed on inert substratum. *Biointerface Res ApplChem* 2011, 1 (1): 15-23
2. Stanciu AM, Gaspar A, Moldovan L, Saviuc C, **Popa M**, Măruțescu L., In vitro antimicrobial activity of Romanian medicinal plants hydroalcoholic extracts on planktonic and adhered cells, *Roum Arch Microbiol Immunol.*, 70(1):11-4, (2011).
3. Chifiriuc MC, Dițu LM, Oprea E, Lițescu S, **Bucur M**, Măruțescu L, Enache G, Saviuc C, Burlibașa M, Trăistaru T, Tănăse G, Lazăr V. *In vitro* study of the inhibitory activity of usnic acid on dental plaque biofilm. *Roum Arch Microbiol Immunol.* 2009, 68(4):215-22.
4. Balotescu MC, Dițu LM, Banu O, Bleotu C, Drăcea O, **Bucur M**, Larion C, Israil AM, Lazăr V. Subinhibitory concentrations of phenyl lactic acid interfere with the expression of virulence factors in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Roum. Arch. Microbiol. Immunol.* 2009, 68 (1): 28-34
5. Lazar V, Chifiriuc C, **Bucur M**, Burlibasa M, Sfeatcu R, Stanciu G, Savu B, Traistaru T, Cernat R, Suciu I, Suciu, N. Investigation of dental- plaque formers biofilms by optic and confocal laser scanning microscopy and microbiological tools. *Rev Med Chir.* 2008, 112 (3): 812-820

Rezumate în volume ale manifestărilor științifice:

- *În țară*

1. Lazăr V., Dițu L.M., **Bucur M.**, Măruțescu M., Iordache C., Delcaru C., Chifiriuc M.C., Burlibașa M., Tănase G., Trăistaru T., 2009, Studiul in vitro al influenței acidului usnic asupra mecanismelor de *quorum sensing and response* implicate în inițierea și dezvoltarea plăcii dentare. Vol. de rezumate al celui de Al XIII-lea Congres National UNAS (Uniunea Nationala a Stomatologilor din Romania. Bucuresti, 8-11 Oct., 2009.
2. **Popa M.**, Chifiriuc C., Burlibasa M., Muntianu L., Tanase G., Lazar V. Profilul fenotipic al markerilor de virulenta la tulpinil aerobe si anaerobe izolate din placadentara, poster 33, Abstract publicat in *Bact. Virusol. Parasitol. Epidemiol.*, 2011, Suppl. 56: p.78

- ***În străinătate***

1. Saviuc C., Grumezescu A., Chifiriuc M.C., Dascalu L., **Popa M.**, Cotar A., Holban A., Bleotu C., Oprea E., Mihaiescu D., Lazar V.. P1044 *In vitro* assessment of the core/shell/extra-shell nanosystem influence on the antibiofilm effect of usnic acid. 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Milan, CMI, vol. 17, S4: p. 163
2. Ion I., Lungu M., Patroi D., Marinescu V., Tsakiris V., Bratulescu A., Lungulescu M., Chifiriuc C M, **Popa M.**, Nistor LC., Epurescu G. Synthesis and characterization of silver nanoparticles fictionalized graphene oxide for using in polymer composites, Conference: 12th International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies (NN15) 7-10 July 2015, Thessaloniki, Greece, At Thessaloniki, Greece

Abnet C.C., Qiao Y.L., Mark S.D., Dong Z.W., Taylor P.R., Dawsey S.M., 2001. Prospective study of tooth loss and incident esophageal and gastric cancers in China. *Cancer Causes Control*, 12(Pt 9), 847–54.

Aguiar G.P., Carvalho C.E., Dias H.J., Reis E.B., Martins, M.H., Wakabayashi K.A., Groppo, M., Martins C.H., Cunha W.R., Crotti A.E., 2013. Antimicrobial activity of selected essential oils against cariogenic bacteria. *Nat. Prod. Res.*, 27, 1668–1672.

Ali J., Pramod K., Tahir M.A., Ansari S.H., 2011. Autoimmune responses in periodontal diseases. *Autoimmun Rev.*, 10(Pt 7), 426-31.

Aparna V., Dineshkumar K., Mohanalakshmi N., Velmurugan D., Hopper W., 2014. Identification of Natural Compound Inhibitors for Multidrug Efflux Pumps of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* Using In Silico High-Throughput Virtual Screening and In Vitro Validation. *Plos One*, 9, art.7, 1-13.

Apolônio A.C., Carvalho M.A., Bemquerer M.P., Santoro M.M., Pinto S.Q., Oliveira J.S., et al., 2008. Purification and partial characterization of a bacteriocin produced by *Eikenella corrodens*. *J. Appl. Microbiol.*, 194, 508–514.

Avila M., Ojcius D. M., Yilmaz Ö., 2009. The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA Cell Biol.*, 28 405–411.

Baalousha M., Stolpe B., Lead J.R., 2011. Flow field-flow fractionation for the analysis and characterization of natural colloids and manufactured nanoparticles in environmental systems: A critical review. *J. Chromatogr. A.*, 1218 (27), 4078-4103.

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M., 2008. Biological effects of essential oils—A review. *Food Chem. Toxicol.*, 46, 446–475.

Baricevic D. și Bartol T., 2000. The biological/pharmacological activity of the *Salvia* genus. In: SAGE - The Genus *Salvia*. Edited by S.E. Kintzios, pp. 143-184. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.

Bascones-Martinez A., Matesanz-Perez P., Escribano-Bermejo M., și colab., 2011. Periodontal disease and diabetes-Review of the Literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 16(Pt 6), e722-9.

Bassolé I.H., Juliani H.R., 2012. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17, 3989–4006.

Bătăiosu M., 2011. Teza de doctorat : Cercetări clinico-biologice și imunohistochimice asupra eficienței terapiei cu antibiotice în parodontitele marginale cornice. Conducător științific: Prof.Univ.Dr. Florica Popescu, Universitatea de Medicină și Farmacie Craiova, 358p.

Bernardes W.A., Lucarini R., Tozatti M.G., Flauzino L.G., Souza M.G., Turatti, I.C., Andrade e Silva M.L., Martins C.H., da Silva Filho A.A., Cunha W.R., 2010. Antibacterial activity of the essential oil from *Rosmarinus officinalis* and its major components against oral pathogens. *Z. Naturforschung C*, 65, 588–593.

Bersan S.M.F., Galvão L.C.C., Goes V.F.F., Sartoratto A., Figueira G.M., Rehder V. L.G., Alencar S.M., Duarte R.M.T., Rosalen P.L., Duarte M.C.T., 2014. Action of essential oils from Brazilian native and exotic medicinal species on oral biofilms. *BMC Complement Altern Med.* 14: 451 doi: 10.1186/1472-6882-14-451

Bhuiyan N.I., Begum J., Nandi N.C., Akter F., 2010. Constituents of the essential oil from leaves and buds of clove (*Syzigium caryophyllatum* (L.)), *African Journal of Plant Science*, 4(11), 451-454.

Bonnet R., 2004. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.*, 48(1),1-14.

Bottalico D., Chen Z., Dunne A., Ostolozza J., McKinney S., Sun C., Schlecht N. F, Fatahzadeh M., Herrero R., Schiffman M., Burk R.D., 2011. The Oral Cavity Contains Abundant Known and Novel Human Papillomaviruses From the Betapapillomavirus and Gammapapillomavirus Genera. *The Journal of Infectious Diseases*, 204,787–92.

Buiuc D., Neagu M., 2008. *Tratat de microbiologie clinică*, Ediția a IIa, Editura Medicală, București,.

Cha J.D., Jeong M.R., Jeong S.I., Moon S.E., Kil B.S., Yun S.I., Lee K.Y., Song Y.H., 2007. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cryptomeria japonica*. *Phytother. Res.* 21, 295–299.

Chan E. C. S., McLaughlin R., 2000. Taxonomy and virulence of oral spirochetes. *Oral Microbiol Immunol*, 15, 1–9.

Chanput W., Mesb J.J., Wichers H.J., 2014. THP-1 cell line: An *in vitro* cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology* , 23, 38-40.

Chan Y. și Chan C.H., 2003. Antibiotic resistance of pathogenic bacteria from odontogenic infections in Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 36(2),105-10.

Chen H., Gao D., Wang B., și colab., 2014. Graphene oxide as an anaerobic membrane scaffold and antagonistic effects against pathogenic *E. coli* and *S. aureus*. *Nanotechnology*. 25(16), 165101.

Chifiriuc M.C., Larion C., Iordache C., Lixandru C M, Dracea O., Bleotu,C., Bucur M., Israil A.M., 2008. Influence of soluble mediators upon the expression of different physiological and virulence hallmarks of bacteria. *Romanian Biotechnological Letters* .13 (2), 3631.

Chifiriuc M.C., Mihaescu G., Lazar V., 2011. *Microbiologie și virologie medicală*. Editura Universității din Bucuresti. 745p. ISBN 978-973-737-98 5-6579.61.

Chifiriuc M.C., Mihăescu G., Lazăr V., 2011. *Microbiologie și virologie medicală*. Editura Universității din București, 388-393.

Costache M., Georgescu S.E., 2009. Tehnica Real-Time PCR. In: *Lucrari practice de*

Biochimia acizilor nucleici și biologie moleculară, Ed. Universității din București, 124-125

Cotar A-I., Chifiriuc M-C., Dinu S., Bucur M., Iordache C., Banu O., Dracea O., Larion C., Lazăr V., 2010. Screening of Molecular Virulence Markers in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Clinical Infections. *Int J Mol Sci.*, 11(12) 5273–5291.

Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E. Warmington J.R. și colab., 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.*, 88, 170-175.

Darveau R.P., Tanner A., Page R.C., 1997. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontology 2000*, 14, 12-32.

Davey H.M., Kell D.B., 1996. Flow Cytometry and Cell Sorting of Heterogeneous Microbial Populations: the Importance of Single-Cell Analyses. *Microbiological Reviews*, 60(4), 641-696.

Dewhirst F.E., Chen T., Izard J., Paster B.J., Tanner A.C., Yu W.H., Lakshmanan A., Wade W.G., 2010. The human oral microbiome. *J Bacteriol.*, 192(19), 5002-17.

Dhiman A., Nanda A., Ahmad S., Narasimhan B., 2012. In vitro antimicrobial status of methanolic extract of *Citrus sinensis* Linn. fruit peel. *Chron Young Sci.*, 3, 204-8.

Diaz P.I., Chalmers N.I., Rickard A.H., Kong C., Milburn C.L., Palmer R.J., Kolenbrander P.E., 2006. Molecular characterization of subject specific microflora during initial colonization of enamel. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2837-2848.

Dreyer D.R., Park S., Bielawski C.W., Ruoff R., 2010. The chemistry of graphene oxide. *Chem Soc Rev.*, 39(1), 228–240.

Dubois V., Arpin C., Noury P., Quentin C., 2002a. Clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* carrying a blaTEM-21 gene located on a chromosomal interrupted TnA type transposon. *Antimicrob Agents Chemother.* 46, 3624-3626.

Dubois V., Poirel L., Marie C., Arpin C., Nordmann P., Quetin C., 2002b. Molecular characterization of a novel class 1 integron containing bla_{GES-1} and a fused product of aac3Ib/aac6'-Ib' genes cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 46, 638-645.

Ducă M., Lozan A., Port A., Glijin A., Lupascu V., 2008. Metode PCR de cuantificare a PMG. În: Aspecte metodologice în testarea plantelor modificate genetic. Ed. Universitatea de Stat din Moldova, 129-130.

Duckworth R.M. (ed.), 2006. Monographs in Oral Science. The Teeth and Their Environment Physical, Chemical and Biochemical Influences. vol. 9, 154p. ISBN: 978-3-8055-7968-1; e-ISBN: 978-3-318-01247-7

Eldh M., Lötvall J., Malmhäll C., Ekström K., 2012. Importance of RNA isolation methods for analysis of exosomal RNA: Evaluation of different methods. *Molecular Immunology*, 50, 281-284

Estévez M., et al., 2007. Sage and rosemary essential oils versus BHT for the inhibition of lipid oxidative reactions in liver pâté. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 40, 58-65.

European Pharmacopoeia, 2010. 7th edn. Volume 1. Council of Europe, Strasbourg.

Fan H., Wang J., Wu H., și colab., 2010. Fabrication, mechanical properties, and biocompatibility of graphene-reinforced chitosan composites. *Biomacromolecules.*, 11(9), 2345–2351.

Farmacopeea Română a X-a ediție, 1993. Editura Medicala București. p.660. ISBN 973-39-0226-3.

Feres M., Haffajee A.D., Allard K., Som S., Goodson J.M., Socransky S.S., 2002.

Francis G.W., Bui Y.T.H., 2015. Changes in the Composition of Aromatherapeutic *Citrus* Oils during Evaporation. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*. 2015;2015:421695. doi:10.1155/2015/421695.

Galvão L.C., Furletti V.F., Bersan S.M., da Cunha M.G., Ruiz A.L., de Carvalho J.E., Sartoratto A., Rehder V.L., Figueira G.M., Teixeira Duarte M.C., Ikegaki M., de Alencar S.M., Rosalen P.L., 2012. Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Streptococcus* mutans and their Antiproliferative Effects. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 12, 751435.

Gao M., Teplitski M., Robin J.B., Bauer W.D., 2003. Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing. *Mol.Plant Microbe Interact.*, 16, 827-834.

Genco R.J., 1992. Host responses in periodontal diseases: Current concepts. *J Periodontol.* 63, 338–55.

Georgakilas V., Otyepka M., Bourlinos A.B., Chandra V., Kim N.K., Kemp C., Hobza P., Zboril R., Kim K. S., 2012. Functionalization of Graphene: Covalent and Non-Covalent Approaches, Derivatives and Applications. *Chem. Rev.*, 112(11), 6156–6214.

Ghannoum M.A., Jurevic R.J., Mukherjee P.K., Cui F., Sikaroodi M., Naqvi A., Gillevet P.M., 2010. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog* 6: e10000713.

Gilbert P., Das J., Foley I., 1997. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv. Dent. Res.* 11, 160-167.

Giray S.E., Kırıcı S., Kaya D.A., Türk M., Sönmez O., Inan M., 2008. Comparing the effect of sub-critical water extraction with conventional extraction methods on the chemical composition of *Lavandula stoechas*. *Talanta*, 74, 930–935.

Goodson J.M. 1994. Antimicrobial strategies for treatment of periodontal diseases. *Periodontol* 2000, 5, 142–168.

Guo L., He X., Shi W., 2014. Intercellular communications in multispecies oral microbial communities. *Front Microbiol.*, 5, 328.

Gurunathan S., Han J.W., Dayem A.A, și colab., 2013. Antibacterial activity of dithiothreitol reduced graphene oxide. *J. Ind. Eng. Chem.*, 19(4), 1280–1288.

Gurunathan S., Han J.W., Dayem A.A., Eppakayla V., Kim J.H., 2012. Oxidative stress-mediated antibacterial activity of graphene oxide and reduced graphene oxide in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Nanomedicine*, 7, 5901–5914.

Gurunathan S., Han J.W., Eppakayla V., Kim J.H., 2013. Green synthesis of graphene and its cytotoxic effects in human breast cancer cells. *Int. J. Nanomedicine*, 8, 1015–1027

Hajhashemi V., Ghannadi A., Sharif B., 2003. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 67–7.

Hajishengallis G., și Lamont R.J., 2014. Breaking bad: Manipulation of the host response by *Porphyromonas gingivalis*. *Eur. J. Immunol.*, 44: 328–338.

Hammer K.A., Dry L., Johnson M., Michalak E.M., Carson C.F., Riley T.V., 2003. Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in vitro. *Oral Microbiol. Immunol.* 18, 389–392.

Hammer, K.A., Carson, C.F., 2011, cap. Antibacterial and Antifungal Activities of Essential Oils, 256-293, în Thormar H., 2010, Lipids and essential oils as antimicrobial agents, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, U.K.

Handal T., Olsen I., Walker C.B., Caugant D.A., 2004. Beta-lactamase production and antimicrobial susceptibility of subgingival bacteria from refractory periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.*, 19(5), 303-8.

Hassiotis C.N., Lazari D.M., Vlachonasios K.E., 2010. The effects of habitat type and diurnal harvest on essential oil yield and composition of *Lavandula angustifolia* Mill. *Fresenius Environmental Bulletin*, 19 (8), 1491-1498.

Hayashi M.A.F., Bizerra F.C., Da Silva P.I. Jr., 2014. Antimicrobial compounds from natural sources. Editura Frontiers in Microbiology.

Hojo K., Nagaoka S., Ohshima T., Maeda N., 2009. Bacterial interactions in dental biofilm development. *J. Dent. Res.*, 88, 982-990.

Honibald E.N., Mathew S., Padmanaban J., Sundaram E., Ramamoorthy R.D., 2012. Periosteal: Matrix metalloproteinase inhibitors as an adjunctive therapy for inflammatory periodontal disease. *J Pharm Bioallied Sci.*, 4(Suppl 2), S417–S421.

Hu W., Peng C., Luo W., și colab., 2010. Graphene-based antibacterial paper. *A.C.S. Nano.* 4(7), 4317–4323.

- Hujoel P.P., Drangsholt M., Spiekerman C., Weiss N.S., 2003. An exploration of the periodontitis–cancer association. *Ann Epidemiol.*, 13(Pt 5), 312–6.
- Hüsniü can Başer K., Buchbauer G., 2010. Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications, *CRC Press Taylor & Francis Group*.
- Ibrahim N.A., El-Sakhawy F.S., Mohammed M.M.D., Farid M.A., Abdel-Wahed A.A.M., Deabes D.A.H., 2015. Chemical composition, antimicrobial and antifungal activities of essential oils of the leaves of *Aegle marmelos* (L.) Correa growing in Egypt. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5 (2), 1-5. DOI: 10.7324/JAPS.2015.50201
- Istudor V., 2001. Farmacognozie, Fitochimie, Fitoterapie, vol II, Editura medicală, București.
- Iyer SS., Cheng G., 2012. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. *Critical reviews in immunology*, 32(1), 23-63.
- Jana S., Shekhawat G.S., 2010. *Anethum graveolens*: An Indian traditional medicinal herb and spice. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8),179-184. doi:10.4103/0973-7847.70915.
- Jenkinson H.F., Lamont R.J., 2005. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol.*, 13, 589-595.
- Kakran N.G.S.M., Bao H., Pan Y., Li L., 2011. Functionalized graphene oxide as nanocarrier for loading and delivery of ellagic acid. *Curr Med Chem.*, 18(19), 4503–4512.
- Kazemi M. și Abdossi V., 2015. Chemical composition of the essential oils of *Gnethum graveolens* L. *Bangladesh J. Bot.*, 44(1), 159-161.
- Keshavarz A., Minaiyan M., Ghannadi A., Mahzouni P., 2013. Effects of *Carum carvi* L. (Caraway) extract and essential oil on TNBS-induced colitis in rats. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 8(1),1-8.
- Kim H.-S., 2005. Do not put too much value on conventional medicines. *Journal of Ethnopharmacology*, 100 (1-2) 37–39.
- Kim T.K., Shah S., Yang L., 2015. Controlling differentiation of adipose-derived stem cells using combinatorial graphene hybrid-pattern arrays. *ACS Nano.*, 9(4), 3780–3790.
- Kolenbrander P.E., 2000. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol.*, 54, 413-37.
- Kolenbrander P.E. și London J., 1993. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J. Bacteriol.*, 175(11), 3247-52.
- Koppel D.E., 1972. Analysis of macromolecular polydispersity in intensity correlation spectroscopy: the method of cumulants. *J. Chem. Phys.*, 57, 4814-4820.
- Kornman K., Roy S., Page C., Tonetti M., 1997. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontology* 2000, 14, 33-53.

Kornman K.S., Karl E.H., 1982. The effect of long-term low-dose tetracycline therapy on the subgingival microflora in refractory adult periodontitis. *J Periodontol.*, 53(10), 604-10.

Kouidhi B., Al Qurashi Y.M., Chaieb K., 2015. Drug resistance of bacterial dental biofilm and the potential use of natural compounds as alternative for prevention and treatment. *Microbial Pathogenesis*, 80 , 39-49.

Kulkarni C. și Kinane D.F., 2014. Host response in aggressive Periodontitis. *Periodontology 2000*, 65, 79–91.

Kupcinskiene E., Stikliene A., Judzentiene A., 2008. The essential oil qualitative and quantitative composition in the needles of *Pinus sylvestris* L. growing along industrial transects, *Environ. Pollut.*, 155(3), 481-491.

Kurantowicz N., Sawosz E., Jaworsk S., și colab. 2015. Interaction of graphene family materials with *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *Nanoscale Res. Lett.* 10(23). doi:10.1186/s11671-015-0749-y.

La W.G., Jin M., Park S., Yoon H.H., Jeong G.J., și colab., 2014. Delivery of bone morphogenetic protein-2 and substance P using graphene oxide for bone regeneration. *Int. J. Nanomedicine*. 9(1), 107–116.

Lazăr V., 2003. Aderența microbiană. *București, Edit. Acad. Rom.*, 88-146.

Lazăr V., Herlea V., Cernat R., Balotescu C., Bulai D., Morariu A., 2004. Microbiologie generală :Manual de lucrări practice, Editura Universității din București.

Lee K.G., Shibamoto T., 2001. Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds (*Syzygium aromaticum* (L) Merr.Et.Perry). *Food Chemistry*, 74, 443-448.

Lee W.C., Lim C.H.Y.X., Shi H., și colab., 2011. Origin of enhanced stem cell growth and differentiation on graphene and graphene oxide. *A.C.S. Nano*. 5(9), 7334–7341.

Legault J., Lalancette K.G., Dufour D., Pichette A., 2013. Antioxidant Potential of Bark Extracts from Boreal Forest Conifers. *Antioxidants*, 2, 77-89. doi:10.3390/antiox2030077.

Li J., Helmerhorst E.J., Leone C.W., Troxler R.F., Yaskell T., Haffajee A.D., Socransky S.S., Oppenheim F.G., 2004. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol.*, 97(6), 1311-8.

Lim D.K., Barhoumi A., Wylie R.G., și colab., 2013. Enhanced photothermal effect of plasmonic nanoparticles coated with reduced graphene oxide. *Nano Lett.*, 13(9), 4075–4079.

Liu J.Q., Cui L., Dusan L., 2013. Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications. *Acta Biomater.*, 9(12), 9243–9257.

Liu Q., Wei L., Wang J., și colab., 2012. Cell imaging by graphene oxide based on surface enhanced Raman scattering. *Nanoscale*, 4(22), 7084–7089.

Liu S., Zeng T.H., Hofmann M., și colab., 2011. Antibacterial activity of graphite, graphite oxide, graphene oxide, and reduced graphene oxide: membrane and oxidative stress. *A.C.S. Nano.* 5(9), 6971–6980.

Liu Z., Robinson J.T., Sun X., Dai H., 2008. PEGylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs. *J Am Chem Soc.*, 130(33), 10876–10877.

Liu Z., Robinson J.T., Tabakman S.M., Yang K., Dai H., 2011. Carbon materials for drug delivery and cancer therapy. *Mater Today.*, 14(7–8), 316–323.

Liu Z.M., Guo Z.Y., Zhong H.Q., Qin X.C., Wan M.M., Yang B.W., 2013. Graphene oxide based surface-enhanced Raman scattering probes for cancer cell imaging. *Phys Chem Chem Phys.*, 15(8), 2961–2966.

Ly M., Abeles S.R., Boehm T.K., Robles-Sikisaka R., Naidu M., Santiago-Rodriguez T., Pride D.T., 2014. Altered oral viral ecology in association with periodontal disease, *mBio* 5(3):e01133-14. doi:10.1128/mBio.01133-14.

Ma J., Liu C., Li R., Wang J., 2012. Properties and structural characterization of oxide starch/chitosan/graphene oxide biodegradable nano-composites. *J. Appl. Polym. Sci.*, 123(5), 2933–2944.

Maestre J.R., Bascones A., Sánchez P., Matesanz P., Aguilar L., Giménez M.J., și colab., 2007. Odontogenic bacteria in periodontal disease and resistance patterns to common antibiotics used as treatment and prophylaxis in odontology in Spain. *Rev. Esp. Quimioter.*, 20, 61–67

Maggi F., Bramucci M., Cecchini C., Coman M.M., Cresci A., Cristalli G., 2009. Composition and biological activity of essential oil of *Achillea ligustica* All. (Asteraceae) naturalized in central Italy: Ideal candidate for anti-cariogenic formulations. *Fitoterapia*, 80, 313–319.

Mahboubi M. și Kazempour N., 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja hortensis* and *Trachyspermum copticum* essential oil. *Iranian Journal of Microbiology*, 3(4), 194-200.

Mangadlao J.D., Santos C.M., Felipe M.J.L., Leon A.C.C., Rodrigues D.F., Advincula R.C., 2015. On the antibacterial mechanism of graphene oxide (GO) Langmuir–Blodgett films. *Chem Commun.*, 51(14), 2886–2889.

Marsh P.D., 2005. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol.*, 32 (Suppl 6), 7-15.

Matarazzo F., Robeiro C.A., Feres M., Faveri M., Mayer M.P.A., 2011. Diversity and quantitative analysis of Archaea in aggressive periodontitis and periodontally healthy subjects. *Clinical Periodontology*, 38(7), 621-627.

Mciver K.S., Heath A.S., Scott J.R., 1995, Regulation of virulence by environmental signals in group A streptococci: influence of osmolarity, temperature, gas exchange, and iron limitation on emm transcription. *Infect Immun.*, 63(11), 4540–4542.

- Mihăescu G., Chifiriuc M.C., 2007. Antibiotice și substanțe chimioterapeutice antimicrobiene. Editura Academiei Române. 358 p. ISBN: 9789732715734.
- Mihailescu G., Chifiriuc C., Ditu L.M., 2009. Imunobiologie, Ed. Univ. din București, 572 p., ISBN 978-973-737-734-0.
- Mocellin S., Panelli M.C., Wang E., Nagorsen D., Marincola F.M., 2003. The dual role of IL-10. *Trends in Immunology*, 24(1), 36-43
- Monsefi M., Ghasemi A., Alaei S., Aliabadi E., 2014. Effects of *Anethum graveolens* L. (dill) on Oocyte and Fertility of Adult Female Rats. *Journal of Reproduction & Infertility*, 16(1), 10-17.
- Moon S.E., Kim H.Y., Cha J.D., 2011. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. *Arch. Oral Biol.*, 56, 907–916.
- Mudavath S.L., Talat M., Rai M., Srivastava O.N., Sundar S., 2014. Characterisation and evaluation of amine modified graphene amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis: in vivo and in vitro studies. *Drug Des. Devel. Ther.*, 8, 1235–1247.
- Murray P.R. și Rosenblatt J.E., 1977. Penicillin resistance and penicillinase production in clinical isolates of *Bacteroides melaninogenicus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 11, 605-608.
- Nair S., Faizuddin M. și Dharmapalan J., 2014. Role of Autoimmune Responses in Periodontal Disease. *Autoimmune Diseases*, Article ID 596824, 7p. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/596824>.
- Nanda S.S., An S.S.A., Yi, 2015. Oxidative stress and antibacterial properties of a graphene oxide-cystamine nanohybrid. *Int .J. Nanomedicine*, 10, 549–556.
- Narayanan N. și Thangavelu L., 2015. *Salvia officinalis* in dentistry. *Dental hypotheses*, 6(1), 27-30. <http://www.dentalthypotheses.com>.
- National Pharmacopoeia Committee, 2000. China Pharmacopoeia (I). Beijing: Chemical Industry Press.
- Nes I.F., Diep D.B., Holo H., 2007. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Bacteriology*, 189, 1189-1198.
- Newman D.J. și Cragg G.M., 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.*, 70(3), 461-77.
- Newman M.G., Takei H., Klokkevold P.R., Carranza F.A., 2012. Carranza's Clinical Periodontology Expert Consult: Text with Continually Updated Online Reference. 11Ed., Editura Elsevier-Health Sciences Division. ISBN:9781437704167.
- Nguyen-Hieu T., Khrlaifia S., Abondharam G., Drancourt M., 2012. Methanogenic archaea in subgingival sites: a review. *Acta pathologica microbiologica et immunologica scandinavica*, 121(6), 467-477.

Nobbs A.H., Jenkinson H.F., Jakubovics N.S., 2011. Stick to your gums: mechanisms of oral microbial adherence. *J Dent Res.*, 90(11), 1271-8.

Nobbs A.H., Lamont R.J., Jenkinson H.F., 2009. *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 73, 407–450.

Ohmen J.D., Hanifin J.M., Nickoloff B.J., Rea T.H., Wyzykowski R., Kim J., Jullien D., McHugh T., Nassif A.S., Chan S.C., 1995. Overexpression of IL-10 in atopic dermatitis. Contrasting cytokine patterns with delayed-type hypersensitivity reactions. *The Journal of Immunology*, 154(4), 1956-1963.

Olsen I., Tribble G.D., Fiehn N-E., Wang B-Y., 2013. Bacterial sex in dental plaque. *Journal of Oral Microbiology*, 5:20736.<http://dx.doi.org/10.3402/jom.v5i0.20736>

Page R.C., 1991. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res.*, 26,230–42.

Page R.C., 1992. Host response tests for diagnosing periodontal diseases. *J Periodontol.*, 63, 356–66.

Palombo E.A., 2011. Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 680354, 15 p. <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nep067>.

Pan Y., Sahoo N.G., Li L., 2012. The application of graphene oxide in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.*, 12(9),1365–1376.

Partridge S.R. 2011. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.*, 35, 820-855.

Paster B.J., Olsen I., Aas J.A., Dewhirst F.E., 2006. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000*, 42(1), 80-7.

Patil V., Mali R., Mali A., 2013. Systemic anti-microbial agents used in periodontal therapy. *J Indian Soc Periodontol.*, 17(2), 162–168.

Porte A., Godoy R.L.O., MAIA-PORTE L.H., 2013. Chemical composition of sage (*Salvia officinalis* L.) essential oil from the Rio de Janeiro State (Brazil). *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, 15 (3), 438-441.

Prajapati V.K., Awasthi K., Yadav T.P., Rai M., Srivastava O.N., Sundar S., 2012. An oral formulation of amphotericin B attached to functionalized carbon nanotube is an effective treatment for experimental visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.*, 205(2), 333–336.

Projan S.J. și Youngman P.J., 2002. Antimicrobials: new solutions badly needed, *Curr. Opin. Microbiol.* 5 (5), 463-465.

Raal A., Arak E., și Orav A., 2012. The content and composition of the essential oil Found in *Carum carvi L.* commercial fruits obtained from different countries. *Journal of Essential Oil Research*, 24 (1), 53-59. DOI: 10.1080/10412905.2012.646016.

Rădulescu V., Popescu M.L., Ilieș D.C., 2010. Chemical composition of the volatile oil from different plant parts of *Anethum graveolens L. (Umbelliferae)* cultivated in Romania. *Farmacia*, 58 (5), 594-600.

Rădulescu V., Saviuc C., Chifiriuc C., Oprea E., Ilieș D.C., Măruțescu L., Lazăr V., 2011. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil from Shoots Spruce (*Piceaabies L.*). *Revista de Chimie*, 62(1), 69-74.

Ram S.V., Rahman L.U., Chanotiya C.S., Verma R.K., Chauhan A., Yadav A., Singh A., Yadav A., 2010. Essential oil composition of *Lavandula angustifolia* Mill. cultivated in the mid hills of Uttarakhand, India. *J. Serb. Chem. Soc.*, 75 (3), 343–348.

Rana V.K., Choi M.C., Kong J.Y., și colab., 2011. Synthesis and drug-delivery behavior of chitosan functionalized graphene oxide hybrid nanosheets. *Macromol Mater Eng.*, 296(2):131–140.

Rao C.N.R., Sood A.K., Subrahmanyam K.S., Govindaraj A., 2009. Graphene the new two dimensional nanomaterial. *Angew Chem Int Ed Engl.*, 48(42), 7752–7777.

Rasooli I., Shayegh S., Taghizadeh M., Astaneh S.D.A., 2008. *Rosemarinus officinalis* and *Thymus eriocalyx* essential oils combat in vitro and in vivo dental biofilm formation. *Pharmacogn. Mag.*, 14, 65–74.

Rautio M., Sipponen A., Peltola R., Lohi J., Jokinen J.J., Papp A, Carlson P., Sipponen P. 2007. Antibacterial effects of home-made resin salve from Norway spruce (*Picea abies*). *APMIS*. 115(4), 335-40.

Razavi A., Gmür R., Imfeld T., Zehnder M., 2005. Recovery of *Enterococcus faecalis* from cheese in the oral cavity of health subjects. *Oral Microbiol Immunol.* 22(4), 248-51.

Redfield R.J., 2001. Do bacteria have sex? *Perspectives*, 2, 624-9.

Ribeiro-Ribas R.N., de Carvalho M.A., Vieira C.A., Apolônio A.C., Magalhães P.P., Mendes E.N., Oliveira J.S., Santoro M.M., Farias L. de M. 2009. Purification and partial characterization of a bacteriocin produced by an oral *Fusobacterium nucleatum* isolate. *J. Appl. Microbiol.*, 107(2), 699-705.

Robin F., Delmas J., Brebion A., Dubois D., Constantin J.M., Bonnet R., 2007. TEM-158 (CMT-9), a new member of the CMT-type extended-spectrum β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51, 4181-4183.

Rodrigues R.M., Gonçalves C., Souto R., Feres-Filho E.J., Uzeda M., Colombo A.P., 2004. Antibiotic resistance profile of the subgingival microbiota following systemic or local tetracycline therapy. *J. Clin. Periodontol.*, 31(6), 420-7.

Rosan B. și Lamont R.J., 2000. Dental plaque formation. *Microbes Infect.* 2, 1599-1607.

- Rossolini G.M., D'Andrea M.M., Mugnaioli C., 2008. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol. Infect.*, 14 Suppl (1), 33-41.
- Safieh-Garabedian B., Poole S., Allchorne A., Winter J., Woolf C.J., 1995. Contribution of interleukin-1 to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. *British Journal of Pharmacology*, 115, 1265-1275
- Salem F.M.A., Ibrahim H.M., 2010. Dry fermented buffalo sausage with sage oil extract: Safety and quality. *Grasas y aceites*, 61(1), 76-85.
- Scannapieco F.A., 2013. The Oral Microbiome: Its Role in Health and in Oral and Systemic Infections. *Clinical Microbiology Newsletter*, 35(20) 163-169.
- Sedláková J., Kocourková B., Lojtková L., Kubáň V., 2003. The essential oil content in caraway species (*Carum carvi* L.). *Hort. Sci. (Prague)*, 30, (2), 73–79;
- Sefidkon F., Abbasi K., Khaniki G.B., 2006. Influence of drying and extraction methods on yield and chemical composition of the essential oil of *Satureja hortensis*. *Food Chemistry*, 99 (1), 19–23.
- Sezik E., Ustun O., Demirci B., Husnu can Başer K., 2010. Composition of the essential oils of *Pinus nigra* Arnold from Turkey, *Turk J Chem.*, 34, 313 – 325.
- Shaddox L.M. și Walker C.B., 2010. Treating chronic periodontitis: current status, challenges, and future directions. *Clin Cosmet Investig Dent.*, 2, 79-91.
- Shapiro S., Meier A., Guggenheim B., 1994. The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. *Oral Microbiol. Immunol.*, 9, 202–208.
- Sharifi-Rad J., Sharifi-Rad M., Hoseini-Alfatemi SM., Iriti M., Sharifi-Rad M., Sharifi-Rad M., 2015. Composition, Cytotoxic and Antimicrobial Activities of *Satureja intermedia* C.A.Mey Essential Oil. *Int J Mol Sci.*, 6(8), 17812-25.
- Shayegh S., Rasooli I., Taghizadeh M., Astaneh S.D., 2008. Phytotherapeutic inhibition of supragingival dental plaque. *Nat. Prod. Res.*, 22, 428–439.
- Shen H., Zhang L., Liu M., Zhang Z., 2012. Biomedical applications of graphene. *Theranostics.*, 2(3), 283–294.
- Shi X., Gong H., Li Y., Wang C., Cheng L., Liu Z., 2013. Graphene-based magnetic plasmonic nanocomposite for dual bioimaging and photothermal therapy. *Biomaterials*, 34(20), 4786–4793.
- Silvestri J.D.F., Paroul N., Czyewski E., Lerin L., Rotava I., Cansian R.L., Mossi A., Toniazzo G., Oliveira D., Treichel H., 2010. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). *Rev. Ceres*, 57, 589–594.
- Siponnen A și Laitinen K., 2011. Antimicrobial properties of natural coniferous rosin in the European Pharmacopoeia challenge test. *APMIS*, 119, 720–724.

Sisea C.R. și Pamfile D., 2009. Testarea OMG cantitativa bazata pe tehnica Real-Time PCR. In : Testarea OMG, Ioan Valentin Petrescu-Mag, Ed. Bioflux, 106-132.

Smillie C.S., Smith M.B., Friedman J., Cordero O.X., David L.A., Alm E.J., 2011. Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome. *Nature*, 480, 241-4.

Stolzenberg-Solomon R.Z., Dodd K.W., Blaser M.J., Virtamo J., Taylor P.R., Albanes D., 2003. Tooth loss, pancreatic cancer, and *Helicobacter pylori*. *Am J Clin Nutr.*, 78(Pt 1), 176-81.

Sultan Giray S.E., Kırıcı S., Kaya D.A., Türk M., Sönmez O., Inan M., 2008. Comparing the effect of sub-critical water extraction with conventional extraction methods on the chemical composition of *Lavandula stoechas*. *Talanta*, 74, 930-935.

Taarit M.B., Msaada K., Hosni K., Hammami M., Kchouk M.F., Marzouk B., 2009. Plant growth, essential oil yield and composition of sage (*Salvia officinalis* L.) fruits cultivated under salt stress conditions. *Industrial Crops and Products*, 30, 333-337.

Takarada K., Kimizuka R., Takahashi N., Honma K., Okuda K., Kato T., 2004. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol. Immunol.*, 19, 61-64.

Teles R. și Wang C.Y., 2011. Mechanisms involved in the association between periodontal diseases and cardiovascular disease. *Oral dis.*, 17(Pt 5), 450-61.

Thaweboon S. și Thaweboon B., 2009. In vitro antimicrobial activity of *Ocimum americanum* L. essential oil against oral microorganisms. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 40, 1025-1233.

Thuy D., Devine D., Marsh P.D., 2013. Oral biofilms: molecular analysis, challenges, and future prospects in dental diagnostics. *Clin Cosmet Investig Dent.*, 5, 11-19.

Vagionas K., Graikou K., Ngassapa O., Runyoro D., Chinou I., 2007. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of three *Satureja* species growing in Tanzania. *Food Chem.*, 103, 319-324.

Vassu T., Stoica I., Csutak O., Mușat F., 2001, Genetica microorganismelor și Inginerie genetică microbială. Note de Curs și Tehnici de Laborator, Ed. Petron, București, 256 p., ISBN 973-9470-24-6.

Verma R.S., Rahman L.U., Chanotiya C.S., Verma R.K., Chauhan A., Yadav A., Singh A., Yadav A., 2010. Essential oil composition of *Lavandula angustifolia* Mill. cultivated in the mid hills of Uttarakhand, India. *J. Serb. Chem. Soc.*, 75 (3), 343-348.

Wade W.G., 2013. Characterisation of the human microbiome. *Journal of Oral Bioscience*, 55, 143-148.

Wade W.G., 2013. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacological Research*, 69, 137-143.

Walker C.B., 1996. Selected antimicrobial agents: mechanisms of action, side effects and drug interactions. *Periodontol 2000*, 10, 12–28.

Walker C.B., Karpinia K., Baehni P., 2004. Chemotherapeutics: antibiotics and other antimicrobials. *Periodontol 2000*, 36,146–165.

Wang H, Gu W, Xiao N, Ye L, Xu Q. Chlorotoxin-conjugated graphene oxide for targeted delivery of an anticancer drug. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:1433–1442.

Wang H., Qiu Z., 2011. Crystallization behaviors of biodegradable poly (l-lactic acid)/graphene oxide nano-composites from the amorphous states. *Thermochim Acta.*, 526(1–2), 229–236.

Wang Y., Li Z., Wang J., Li J., Lin Y., 2011. Graphene and graphene oxide bio-functionlization and applications in biotechnology. *Trends Biotechnol.*, 29(5), 205–212.

Wenqiang G., Shufen L., Ruixiang Y., Shaokun T., Can Q., 2007. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food Chemistry*, 101, 1558–1564.

Wilson M., 2008, *Bacteriology of Humans an Ecological Perspective*. Blackwell Publishing, UK

Wojtoniszak M., Chen X., Kalenczuk R.J., Wajda A., 2012. Synthesis, dispersion, and cytocompatibility of graphene oxide and reduced graphene oxide. *Colloids Surf B Biointerfaces.*, 89(1), 79–85.

Wright C.J., Burns L.H., Jack A.A., Back C.R., Dutton L.C., Nobbs A.H., Lamont R.J., Jenkinson H.F., 2013. Microbial interactions in building of communities. *Mol. Oral. Microbiol.*, 28(2), 83-101.

Wu S.-Y. și An S.S.A., Hulme J., 2015. Current applications of graphene oxide in nanomedicine. *International Journal of Nanomedicine*, 10 (Special Issue on diverse applications in Nano-Theranostics) 9–24.

Yang K., Wan J., Zhang S., Zhang Y., Lee S-T., Liu Z., 2010. In vivo pharmacokinetics, long-term biodistribution, and toxicology of PEGylated graphene in mice. *ACS Nano.*, 5(1), 516–522.

Yazdanpanah L. și Mohamadi N., 2014. Antifungal activity of *Satureja hortensis* L. essential oil against *Alternaria citri*. *European Journal of Experimental Biology*, 4(1):399-403.

Yazdanparast R. și Bahramikia S., 2008. Evaluation of the effect of *Anethum graveolens* L. crude extracts on serum lipids and lipoproteins profiles in hypercholesterolaemic rats. *Daru*, 16(2), 88-94.

Zarnea G. și Popescu O.V., 2011. *Dicționar de microbiologie generală și biologie moleculară*. Editura Academiei Române, București, ISBN 978-973-27-2135-3.

Zeidán-Chuliá F., Keskin M., Könönen E., Uitto V.J., Söderling E., Moreira J.C., Gürsoy U.K., 2015. Antibacterial and antigelatinolytic effects of *Satureja hortensis* L. essential oil on epithelial cells exposed to *Fusobacterium nucleatum*. *Journal of Medicinal Food*. 18(4), 503-506. doi:10.1089/jmf.2013.0052.

Zhang L., Xia J., Zhao Q., Liu L., Zhang Z., 2010. Functional graphene oxide as a nanocarrier for controlled loading and targeted delivery of mixed anticancer drugs. *Small*, 6(4), 537–544.

Zheng G.Q., Kenny P.M., Lam K.T., 1992. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. *Journal of Natural Products*, 55, 999-1003.

<http://dentalplaque.wikispaces.com>

<http://www.lahey.org./studies>

<http://www.lifetechnologies.com>

http://www.sccmec.org/Pages/SCC_TypesEN.html; IWG- SCC, 2009.