

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚELE VIEȚII "REGELE MIHAI I" DIN  
TIMIȘOARA**



**FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ TIMIȘOARA**

**TOACĂ (DEGI) DIANA MARIA**

# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**COORDONATOR ȘTIINȚIFIC:  
CONF. DR. MUSELIN FLORIN**

**TIMIȘOARA**

**2024**

UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚELE VIEȚII "REGELE MIHAI I" DIN  
TIMIȘOARA



FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ TIMIȘOARA

TOACĂ (DEGI) DIANA MARIA

# TEZĂ DE DOCTORAT

EVALUAREA *IN VITRO* A EFECTULUI ANTIBACTERIAN AL  
EXTRACTULUI DE *SEMPERVIVUM TECTORUM L.*, FAȚĂ DE  
BACTERIILE PATOGENE IZOLATE DIN OTITELE EXTERNE  
DE LA CÂINE

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC  
CONF. DR. MUSELIN FLORIN

TIMIȘOARA

2024

UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES "KING MIHAI I" FROM TIMIȘOARA



FACULTY OF VETERINARY MEDICINE TIMIȘOARA

TOACĂ (DEGI) DIANA MARIA

# DOCTORAL THESIS

*IN VITRO* EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL  
EFFECT OF *SEMPERVIVUM TECTORUM L.* EXTRACT  
AGAINST  
PATHOGENIC BACTERIA ISOLATED FROM DOG OTITIS  
EXTERNA

SCIENTIFIC LEADER  
ASSOC. PROF. DR. MUSELIN FLORIN

TIMIȘOARA

2024

# REZUMAT

al tezei de doctorat intitulată:

## EVALUAREA *IN VITRO* A EFECTULUI ANTIBACTERIAN AL EXTRACTULUI DE *SEMPERVIVUM TECTORUM L.*, ÎN CAZURILE DE OTITE EXTERNE LA CÂINE

Doctorand: TOACĂ (DEGI) DIANA MARIA

Conducător științific: Conf. Dr. MUSELIN FLORIN

Cuvinte-cheie: *Sempervivum tectorum*, otită, câine, tratament, nanoparticule

### Prezenta teză conține:

Introducere

Rezumate, (rom, eng)

Abrevieri

Partea generală (25 pagini)

Partea specială (60 pagini)

Tabele: 10

Figuri full color: 24

Bibliografie: 217 titluri

Anexe

## PARTEA I. STADIUL ACTUAL AL CUNOȘTIINTELOR

**Partea I** este reprezentat de informații care reprezintă stadiul actual al cunoașterii și este structurat pe opt capitole, care cuprind:

- *Sempervivum tectorum L.*: relevanța etnobotanică;
- revizuirea datelor publicate în literatura de specialitate;
- herbalism tradițional European;
- istoricul plantei, *Sempervivum tectorum L.*;
- *Sempervivum tectorum L.*, utilizarea medicinală;
- specii hibride de *Sempervivum tectorum L.*;
- aspecte epidemiologice în otitele carnivorelor;
- activitatea antimicrobiană a nanoparticulelor metalice.

### Capitolul 1: *Sempervivum tectorum L.*: relevanța etnobotanică

Familia *Crassulaceae* este una dintre cele mai mari familii de plante cu flori și include aproximativ 1400–1700 specii din 40–55 genuri [15, 40, 45, 70, 71] distribuite aproape cosmopolit (excluzând Antarctica, Sahara Centrală și alte deșerturi de nisip) în condiții de climat semiarid. În Europa, aproximativ 400 de specii din această familie sunt cultivate atât în câmp deschis, cât și protejat [83, 93, 94].

Probabil, evoluția familiei *Crassulaceae* a urmat adaptările la viața din zona montană (unde cresc majoritatea *Crassulaceae*-lor) și, în principal, la deschiderea ecotipurilor (complex de factori ecologici specifici unei zone) de rocă și piatră. Prin urmare, sunt competitori slabi ai plantelor din flora spontană [140, 158, 159].

*Sempervivum tectorum L. 1753* (urechelnița) este o plantă erbacee, perenă, ce posedă o rozetă bazală de frunze suculente, netede pe ambele părți, cu margini ciliate. Frunzele au formă alungită sau obovată. Florile sunt actinomorfe, de culoare roz, grupate în inflorescențe cimoase, iar fructele sunt polifolicule [8, 140, 168, 183].

Speciile din familia *Crassulaceae* (familia *Stonecrop*) sunt foarte diverse, de la mici plante anuale nesemnificative până la plante perene și arbori. Multe dintre specii au flori atractive. Familia *Theentire* este formată din 35 de genuri și 23 de genuri hibride cu un total de 1410 specii și 305 de taxoni intraspecifici [71, 94].

### Capitolul 2: Revizuirea datelor publicate în literatura de specialitate

Speciile de *Crassulaceae* sunt cunoscute în toate regiunile mari ale lumii. Majoritatea plantelor din această familie se găsesc în zona pădurilor tropicale, unde *Crassulaceae* sălbatice au lipsit inițial [202, 211, 214, 216]. Distribuția largă a acestora a fost confirmată prezența plantei în mai multe erbării, provenind din diferite țări în care au fost studiate colecțiile de erbării, inclusiv din Europa și Rusia. Speciiile sălbatice de *Crassulaceae* sunt numeroase

și diverse în Africa (mai mult de 350 de specii), iar în Madagascar, Africa de Sud și de Est sunt centrele diversității taxonomice ale acestei familii. Sunt descrise numeroase specii naturalizate de *Crassulaceae* în Danemarca (*Hylotelephium spectabile* (Boreau) H. Ohba), Cehia, Ungaria, Suedia și Finlanda (*Phedimus spurious*, *Sedum hispanicum* etc.). Cazurile de naturalizare a speciilor de *Crassulaceae* sunt cunoscute și în Europa de Est.

Din punct de vedere istoric, familia *Crassulaceae* s-a dispersat mai mult sau mai puțin în afara marilor lor zone geografice abia după Marile Descoperiri Geografice (începând din secolele XV și XVI). Aceasta s-a produs activ încă din secolele XIX și XX sub influența factorilor antropici. Principalul factor limitant pentru naturalizarea lor largă în Europa de Est este absența habitatelor adecvate, în primul rând, a rocilor și a versanților pietroși.

*Sempervivum tectorum* este descris în Nomenclatorul de plante, la poziția: Sp. Plantă. 464 (1753) [23].

### **Capitolul 3: Herbalism tradițional European**

Etnobotanica reprezintă, încă, o sursă fertilă de informații pentru cercetări antropolingvistice, psihologice și psiholingvistice. Fitonimia dezvăluie preocupările, reprezentările și subconștientul afectiv ale poporului. La plante, mult mai mult ca la alte categorii, denumirile au fost sugerate oamenilor de așa-zisa *signatura rerum*, de tainicele "înscrieri" prezente în morfologia, cromatica, mirosul, gustul, gingășia ori, din contră robustețea sau vulgaritatea organelor speciilor vegetale. Alte fitonime au derivat din diversele proprietăți ale plantelor, din ecologia și corologia lor, fenologia lor, din relațiile cu celelalte viețuitoare. Faptul că ele au fost consemnate în diverse scrieri este un câștig atât pentru etnobotanica românească, cât și pentru lingvistică și istorie [18, 19, 40, 96]. Timp de secole, sistemele medicale tradiționale (SMT), au fost sistemele medicale principale în țările de origine, iar acum, cu toate acestea, dominanța actuală a modelului medical științific occidental, cetățenii și medicii clinicieni încep să se bazeze și au încredere în astfel de sisteme medicale, înlocuind terapiile convenționale demonstrate științific, cu cele neconvenționale. Moștenirea cunoștințelor tradiționale despre sistemele de vindecare autohtone se bazează pe două tipuri de transmisie: tipul vertical, unde datele sunt moștenite de la părinte la copil, spre deosebire de transmisia orizontală care apare între orice indivizi din aceeași generație. Aceste tipuri de transmisie au fost documentate și în România, în regiunile Transilvaniei și Banat, unde au fost efectuate sondaje etnobotanice. Plantele medicinale, utilizate în terapia populară din Transilvania și Banat, joacă un rol important în viața de zi cu zi a locuitorilor, în special în zone îndepărtate, foarte tradiționale. Transilvania și mai ales Banatul montan, abundă de valori botanice; o serie de plante au jucat un rol important în tratarea diverselor boli cu metode tradiționale de vindecare de mult timp. În ultimul deceniu, un număr remarcabil de studii de teren au explorat etnobotanica din Balcanii de Sud-Vest (țări din peninsula Balcanică care încă nu aparțin în întregime Uniunii Europene), cu scopul de a înregistra cunoștințele populare și percepțiile plantelor sălbatice, utilizate în principal în domeniile alimentar și medicamentos [18, 101, 111, 159, 164, 176, 178].

### **Capitolul 4: Istoricul plantei, *Sempervivum tectorum* L.**

Urechelnița a fost dedicată în antichitate lui Jupiter sau Thor și a purtat și numele Ochiului lui Jupiter, Barba lui Thor, Barba lui Jupiter, Barba Jovis (în Franța, Joubarbe des toits), datorită grupările sale masive de flori, care trebuiau să semene cu barba lui Jupiter. Numele german de Donnersoart și englezul Thunderbeard au același sens, derivând de la Jupiter Thunderer [199, 200].

Era foarte apreciată și stimată în rândul Romanilor, care o creșteau în vase înaintea caselor lor.

Cuvântul "*leek*" are origine anglo-saxonă, reprezentând o plantă, astfel încât Houseleek înseamnă literalmente "Planta de casă". De asemenea, a fost numit, în secolul al XIV-lea, Ayron, Ayegreen și Sengreen, adică Evergreen (veșnic verde) [204, 205]. Numele generic *Sempervivum*, din latinescul *semper* (întotdeauna) și *vivo* (trăiesc), se referă la păstrarea vitalității sale în aproape toate condițiile, iar denumirea specifică *tectorum* este martorul locului său obișnuit de creștere - un acoperiș [198, 208, 209, 213].

### **Capitolul 5: *Sempervivum tectorum* L., utilizarea medicinală.**

În medicina tradițională se folosește în tratamentul afecțiunilor inflamatorii ale urechilor, având și acțiune antinoceptivă. Sucul proaspăt din frunzele de *S. tectorum* este utilizat în medicina tradițională, aproape exclusiv extern. Acesta este aplicat ca un bandaj pe răni, inflamații, arsuri și abcese. De asemenea se mai folosește pe zonele dureroase datorate gutei ca agent de răcire și efect astringent. Consumul de ceai preparat din frunzele de *S. tectorum* este recomandat în tratamentul ulcerului [18, 19, 101, 104, 111, 130].

Activitatea antimicrobiană este atribuită compușilor fenolici, considerându-se că fie inhibă enzimele responsabile de producerea energiei celulare, fie modifică permeabilitatea membranelor celulare.

### **Capitolul 6: Specii hibride de *Sempervivum tectorum* L.**

*S. tectorum* var. *tectorum* (Linn. *sensu stricto*). Acesta este cel mai cunoscut dintre speciile de *Sempervivum* cultivate, fiind cultivat pe scară largă în cea mai mare parte a Europei, în special pe acoperișurile caselor (inițial ca farmec împotriva fulgerului). Originea este obscură, deoarece nu este nicăieri indigenă, dar ocazional naturalizată. *Sempervivum marmoreum* Griseb. este un crassulacean descris de Grisebach în 1843 în primul volum al *Spicilegium*

*Florae Rumelicae et Bithynicae*, din Munții Athos, Grecia: „În m. Athone: în regiunea subalpina versus pinetum (subst. Marmor)” [109].

Cerințele sale de sol adaugă la aceste plante o amplitudine ecologică considerabilă, asociată cu capacitatea aparatul său vegetativ de propagare inepuizabil. *Sempervivum marmorium* Griseb. are o viață lungă, perenă, care se propagă prin stoloni ca la majoritatea celorlalte specii de *Sempervivum* [83]. Hibridarea observată printre celelalte specii de *Sempervivum s.s.* ar fi produs în acest caz niște hibrizi prezumtivi cu *S. tectorum*, printre care *S. michaelis-borsii* Domk., care este notoriu în România; însă acestea au fost contestate de către autorii de mai târziu și respinse sau sinonimitate. Are o multitudine de sinonime, dintre care următoarele au fost descrise din Carpații României fiind, de asemenea, cele mai des utilizate în lucrările floristice referitoare la regiunea de interes [147].

*Sempervivum assimile* Schott și *S. blandum* Schott au fost ambele descrise în 1853 din Carpații României „ex Siebenburgen”; *S. rubicundum* Schur. (1858) descris din Canionul Turda, în Munții Apuseni [147].

Domokos, citat de Papp [147], a descris *S. banaticum*, în regiunile din Banat, aproape de Svinița, în regiunea Danubiană inferioară, la o altitudine de 700 m, în Munții Trascău, iar în 1935 tot același autor descrie un hibrid numit *S. michaelis-borsii* Domk. din Munții Bihor.

Deși specia *S. schlehanii* Schott (1853), a fost descrisă în Alpii Dalmațieni, este adesea citată în România [9]. Alte specii descrise sunt următoarele: *Sempervivum tectorum* var. *arvernense*: răspândit în regiunea Auverne din Franța, respectiv în regiunile centrale și sudice ale Italiei [40, 130, 163]. Specii sinonime pentru această varietate sunt [203, 206, 212, 215]: *Sempervivum arvernense* Lecoq & Lamotte (1847); *Sempervivum tectorum* ssp. *arvernense* (Lecoq & Lamotte) Bellia & de Andrade (1972); *Sempervivum tectorum* var. *clusianum* Grande (s.a.); *Sempervivum montanum* Tenore (1830); *Sempervivum italicum* I. Ricci (1961) și *Sempervivum riccii* Iberite & Anzalone (2001).

#### **Capitolul 7: Aspecte epidemiologice în otitele carnivorelor**

Otita externă este definită ca o inflamație acută sau cronică a epiteliului canalului auditiv extern care poate cuprinde de asemenea și pavilionul auricular. Această condiție este caracterizată de eritem și accentuarea descuamării epiteliului cu variații treptate ale durerii și pruritului. Este o boală comună la câini și pisici iar condițiile care duc la apariția bolii rezultă din combinația modificărilor dinamice care afectează statusul anatomic, fiziologic și microbiologic al canalului auditiv extern [33, 59, 92, 99, 152]. Succesul în managementul otitelor externe depinde de înțelegerea factorilor primari, predispozanți și perpetuanți care intervin în procesul de patogeneză. Otita externă este o afecțiune complicată, dificil de diagnosticat și de tratat, datorită fiziologiei unice a canalului auditiv și a fiziopatologiei comune a otitelor externe, indiferent de cauză [92, 108, 150, 193].

Canalul auditiv extern normal nu este steril, el conține un număr limitat de microorganisme care sunt într-un echilibru atât cu gazda, cât și între ele. Microflora canalului auditiv extern este constituită în primul rând din stafilococi cagulazo pozitivi, streptococi non hemolitici și levuri din genul *Malassezia*. Otita externă (OE) la câine este o boală cu etiologie multifactorială.

#### **Capitolul 8: Activitatea antimicrobiană a nanoparticulelor metalice**

Nanotehnologia este un punct fierbinte de cercetare în știința materialelor moderne. Această tehnologie este capabilă să ofere aplicații noi, care variază de la compuși inovatori de țesături, prelucrarea alimentelor și producția agricolă până la tehnici medicinale sofisticate [162]. În concluzie, este considerată nanotehnologie, procedurile privind sinteza, caracterizarea și explorarea materialelor din regiunea nanometrului (1–100 nm). Nanoparticulele metalice de argint, cupru și aliajele lor sunt cunoscute cu potențiale activități antimicrobiene, împotriva unei game largi de agenți patogeni infecțioși (bacterii, ciuperci și virusuri) și sunt promițătoare ca agenți antimicrobieni împotriva infecțiilor cu bacteria, *S. aureus* [13]. Nanotehnologia este utilizată pe scară largă în generarea de diverse produse, în domeniile biologiei și medicinei. Utilizarea nanotehnologiei în biologie a oferit multe oportunități în multe domenii, inclusiv inginerie de țesături, administrarea de medicamente, diagnostic, imagistică și lupta împotriva infecțiilor bacteriene. Având nevoie de noi agenți antimicrobieni, nanoparticulele au fost propuse pentru a trata infecțiile, deoarece folosesc mecanisme diferite pentru a ucide bacteriile decât antibioticele convenționale, cu o toxicitate relativ scăzută în celulele umane și animale. Ca urmare, nanomaterialele pot fi considerate o alternativă promițătoare la antibiotice pentru a controla infecțiile bacteriene [4, 6, 12, 13].

Compușii de argint au fost folosiți de a lungul istoriei pentru a controla proliferarea microbiană. Efectul antifungic și antibacterian al nanoparticulelor de argint, chiar și împotriva bacteriilor rezistente la antibiotice a fost demonstrat în condiții *in vitro*.

### **PARTEA A II-A. CERCETĂRI PROPRII**

**Capitolul 9. Activitatea antimicrobiană a extractului de *Sempervivum tectorum* l. față de bacteriile patogene izolate din cazurile de otita externă de la câine**

Acest studiu și-a propus să evalueze activitatea antibacteriană a extractelor de *Sempervivum tectorum L.* împotriva bacteriilor izolate din probele clinice, respectiv față de tulpini standardizate (*S. aureus* și *P. aeruginosa*) prin analiza (caracterizarea) chimică a probelor, folosind spectrofotometrie UV. Au fost studiate activitatea antibacteriană, conținutul total de compuși fenolici și concentrația de proantociani ale extractelor etanolice realizate din frunze proaspete de *Sempervivum tectorum L.*

Plantele de *Sempervivum tectorum L.* au fost colectate din flora spontană din zona Socolari (Coordonate GPS: 44°56'39,57" N, 21°43'45,00" E), aflată în regiunea montană din vestul României, în primăvara și vara anului 2019. Plantele au fost identificate conform cheii de determinare date de Flora Europaea (*Sempervivum tectorum* LINN.; Sp. Plant. 464/1753), pe baza informațiilor furnizate de Euro+Med PlantBase, în cadrul Departamentului de Biologie Vegetală și Plante Medicinale, a Facultății de Medicină Veterinară din Timișoara.

Probele reprezentate de frunze de *Sempervivum tectorum L.* uscate și măcinate fin, au fost liofilizate (Leybold Heraeus Lyovac GT2/LH Leybold, Labexchange–Die Laborgeräteborse GmbH, Burladingen, Germania) pentru a obține masa brută de extract pentru experimente ulterioare.

Extracția principiilor active s-a realizat după o metodă convențională, utilizând un solvent hidroalcoolic (apă deionizată și etanol 50:50), pe probe liofilizate. Extracția a folosit un sistem de digestie cu microunde CEM Star 2 Plus Open Vessel (CEM Corporation, Matthews, NC, SUA), timp de 5 minute la 50 W și 35°C, iar extractul a fost centrifugat la 4000 rpm timp de 10 minute și filtrat prin hârtie de filtru Whatman®, având gradientul nr. 4.

Conținutul fenolic total al extractelor de *Sempervivum tectorum L.*, a fost determinat prin spectrofotometrie UV (Varian Cary 50 UV-VIS, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SUA) folosind metoda Folin-Ciocalteu. Echivalentul acidului galic (GA) (mg GA/g materie primă) a fost utilizat pentru a exprima cantitatea totală de fenoli. Polifenolii totali au fost cuantificați folosind o lungime de undă de 241 nm și comparați cu etanolul ca martor.

Determinarea cantității de lumină absorbită de substanțele supuse analizei a fost măsurată spectrofotometric la o lungime de undă de 765 nm. Determinarea conținutului de proantocianidine în extractele de *Sempervivum tectorum L.* s-a realizat tot prin spectrofotometria UV pe baza hidrolizei acide și a formării culorii.

Activitatea antimicrobiană a extractelor de plantă au fost evaluate pe un grup de bacterii, care a inclus tulpini izolat din probe clinice, Gram-pozitive și negative, incluzând tulpini clinice de *Staphylococcus aureus* și *Pseudomonas aeruginosa*, respectiv tulpini standardizate ATCC 25923 și ATCC 27853.

Extractele au fost diluate în serie în concentrații cuprinse între 0,5 și 62 g/mL (0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0, 16,0, 32,0 și 64,0 g/mL). Martorii pozitivi au inclus enrofloxacină (ENR, 5 ug) și gentamicină (GN, 10 ug) (ambele de la Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Franța), în timp ce solventul a acționat ca și martor negativ. Rezultatele sunt prezentate ca medie ± SE. Rezultatele au fost prelucrate statistic și au fost calculate folosind software-ul GraphPad InStat 3 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, SUA).

Probele de extracte de *S. tectorum L.* liofilizate au avut cel mai mare conținut în compuși fenolici (126,17 mg GA/g material). Rezultatele noastre arată că, utilizarea metodei de extracție asistată cu microunde și a unui amestec hidroalcoolic de etanol:apă 1:1, a fost cea mai bună modalitate de a extrage eficient compușii polifenolici. Cel mai mare conținut de PAC (15,39 mg PAC/g material) a fost obținut în probele extrase de *S. tectorum L.* liofilizate, utilizând extracția asistată cu microunde și un amestec hidroalcoolic, ce conține amestec de apă și etanol 50:50.

Metoda microdiluției în bulion, a fost utilizată pentru a evalua concentrația minimă inhibitorie și concentrația minimă bactericidă a extractelor de *S. tectorum L.* utilizate în diferite concentrații. Efectele inhibitoare ale extractului de *S. tectorum L.* au devenit observabile la o concentrație de 1,47 μg/mL împotriva tulpinilor de *S. aureus* ATCC 25923 și respectiv de 1,75 μg/mL împotriva tulpinilor de *P. aeruginosa* ATCC 27853. Activitatea antibacteriană a fost determinată conform raportului CMB/CMI. Extractele pe bază de etanol ale frunzelor de *S. tectorum L.* au fost bacteriostatice împotriva tulpinilor clinice izolate de *S. aureus*, cu valori medii ale CMI de 23,25 μg/mL și respectiv ale CMB de 37,23 μg/mL și au fost bactericide împotriva tulpinii standard de *S. aureus* ATCC 25923, cu valori medii ale CMI de 20,33 μg/mL și respectiv a CMB de 37,29 μg/mL. Valorile medii ale CMI și CMB ale tulpinilor clinice și standard de *P. aeruginosa* au fost de 24,234 și 20,53 μg/mL, respectiv, 37,30 și 37,02 μg/mL. Cu o valoare a CMB de 15,75 μg/mL, a extractul de *S. tectorum L.* am demonstrat activitate bactericidă potențială împotriva bacteriilor patogene testate (*S. aureus* și *P. aeruginosa*). Datele rezultate în urma determinărilor efectuate, reprezintă abaterea standard a mediei a trei replici (SD, standard deviation). Diferențele valorilor medii au fost considerate semnificative la  $p < 0,05$ .

#### **Capitolul 10. Analiza comparativă a compoziției compușilor fenolici bioactivi din trei varietăți de *Sempervivum*: *S. tectorum L.* și *S. H. Celon***

Compușii fenolici bioactivi sunt antioxidanți puternici din compoziția plantelor medicinale, în plantele de cultură medicinale și industriale utilizate în mod tradițional și au atras un interes sporit în ultimii ani pentru aplicarea și rolul lor în medicina naturistă, pentru rolul lor antibacterian.

În acest studiu, ținta calitativă a fost legată de posibilele aplicații viitoare ale extractelor de *Sempervivum tectorum* L., a trei varietăți de plante, cultivate în condiții diferite și anume: condiții naturale (flora spontană), plante din flora spontană aclimatizate în zone de câmpie și respectiv plante cultivate cu scop ornamental în condiții controlate (în sere și care sunt hibrizi ai *Sempervivum tectorum* L.) în medicina veterinară, respectiv pentru îmbunătățirea metodologiei de extracție, a costurilor privind prepararea extractelor, precum și pentru îmbunătățirea cunoștințelor existente cu privire la conținutul de compuși fenolici din plantele luate în studiu.

Frunzele varietăților de *Sempervivum* testate, au fost colectate înainte de uscare și apoi împărțite în 3 părți egale pentru a determina conținutul de substanță uscată. Frunzele au fost ulterior congelate în azot lichid pentru a preveni volatilizarea compușilor fenolici iar ulterior au fost liofilizate (Flexy-Dry MP, FTS Systems, SUA), până când masa a fost constantă. Conținutul de substanță uscată din fiecare probă a fost determinat gravimetric.

Fiecare probă liofilizată (5 g) a fost plasată într-un balon cu fund rotund, urmată de adaosul unei cantități de 50 mL de solvent (soluție hidroalcoolică, compusă din etanol și apă deionizată, 50:50 v:v). EAM a fost efectuat timp de 5 minute la 50 W și 35°C, utilizând un sistem de digestie cu microunde CEM Star 2 Plus Open Vessel (CEM Corporation, Matthews, NC, SUA), iar extractul a fost centrifugat la 4000 rpm timp de 10 minute și filtrat prin hârtie de filtru Whatman®, având gradientul nr. 4 (încă două măsuri de solvent au fost folosite pentru a extrage reziduuul de presă, astfel volumul total de solvent utilizat, a fost 150 mL). Cuantificarea spectrometrică a polifenolilor și proantocianidinelor a fost efectuată în conformitate cu directiva Farmacopeei Europene.

Conținutul fenolic total (CFT) al extractelor de *Sempervivum tectorum* L., a fost determinat prin spectrofotometrie UV (Varian Cary 50 UV-VIS, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SUA) folosind metoda Folin-Ciocalteu (FC). Echivalentul acidului galic (EAG) (mg AG/g materie primă) a fost utilizat pentru a exprima CFT. Polifenolii totali au fost cuantificați folosind o lungime de undă de 241 nm și comparați cu etanolul ca martor.

În studiile noastre, utilizând extracte hidroalcoolice din frunze *Sempervivum tectorum* L. s-a demonstrat că cel mai mare conținut total de compuși fenolici, se găsește în plantele provenite din flora spontană.

Cel mai mare conținut de fenolici a fost găsit în extractele liofilizate de *Sempervivum tectorum* L. provenită din flora spontană, crescută în condiții naturale (109,695 mg/g). Totuși, cantități semnificative de polifenoli (98,856 mg/g) au fost de asemenea conținute în plantele de *Sempervivum tectorum* L. aclimatizate în condițiile de sol și de mediu din vestul României.

Determinări paralele privind cuantificarea compușilor fenolici au fost efectuate și din seva proaspătă, extrasă din frunzele plantelor supuse studiului. În acest caz cantitățile decelate de substanțe fenolice au fost semnificativ reduse, și au fost încadrate în intervalul 2,393 și 4,601 mg/g.

Rezultatele obținute în cazul extractelor liofilizate și respectiv din frunze proaspete de *Sempervivum tectorum* L., au fost comparate cu un alt produs des utilizat în alimentație omului și nu numai. Este vorba de semințele de struguri albi, proveniți din industria de prelucrare în vederea extragerii uleiului.

Rezultatele arată că cel mai mare conținut de PAC a fost obținut în probele *S. tectorum* liofilizat provenite din mediul natural (până la 14,983 mg EC/g extract) folosind extracția asistată de microunde și amestecul de etanol:apă deionizată, în proporție de 50:50.

### **Capitolul 11. Biosinteza nanoparticulelor de argint utilizând extractul de *Sempervivum tectorum* și efectul antibacterian împotriva tulpinilor de *Staphylococcus pseudintermedius* izolate din cazurile de otită externă la câine**

Nanoparticulele sunt utilizate în scopuri medicinale, iar nanoparticulele metalice, sunt considerate cele mai promițătoare deoarece prezintă proprietăți antibacteriene remarcabile datorită raportului lor mare privind suprafața și volumul, ceea ce este de interes pentru cercetători din cauza creșterii alarmante a rezistenței tulpinilor bacteriene față de antibiotice, și dezvoltării tulpinilor cu rezistență multiplă la substanțele antimicrobiene și apariția super bacteriilor. Argintul este un agent antimicrobian bine cunoscut împotriva a peste 650 de microorganisme din clase diferite, cum ar fi bacterii Gram-negative și Gram-pozitive, fungi sau viruși [74, 181].

Frunzele proaspete și sănătoase de *Sempervivum tectorum* L. au fost colectate din regiunea muntelui Socolari din vestul României în perioada iunie-iulie 2022 și selectate pentru a fi utilizate pentru biosinteza nanoparticulelor de argint. Plantele au fost identificate conform cheii de determinare date de Flora Europaea (*Sempervivum tectorum* LINN.; Sp. Plant. 464/1753), pe baza informațiilor furnizate de platforma Euro+Med PlantBase [182].

Pentru a sintetiza NPAg, a fost preparată o soluție de azotat de argint de 1 mM (0,179 g AgNO<sub>3</sub> amestecat bine cu 100 g de apă deionizată) și păstrată într-o sticlă de chihlimbar. Într-un balon conic, au fost adăugate 50 mL de AgNO<sub>3</sub> de 1 mM și 5 mL de extract de frunze de *Sempervivum tectorum*, cu adăugare treptată și amestecare constantă. Ulterior, această soluție a fost supusă unui tratament termic prin incubare la 60°C timp de 15 minute în condiții de întuneric pentru a preveni reacțiile fotochimice, într-un agitator orbital și a asigura sinteza nanoparticulelor de argint. Culoarea galben deschis a extractului de frunze s-a schimbat în maro închis, indicând faptul că nanoparticulele de argint s-au format.



Soluția de NPAG biosintetizată, a fost centrifugată (Eppendorf 5423, Darmstadt, Germania) la 1000 rpm timp de 10 minute. Supernatantul a fost eliminat, iar precipitatul a fost colectat într-un tub separat, spălat și dizolvat în apă deionizată, urmat de o altă centrifugare la 1000 rpm timp de 10 minute. Procesul a fost repetat de cinci ori, iar materialul sedimentat rezidual (masă brută) a fost liofilizat (Leybold Heraeus Lyovac GT2, Labexchange–Die Laborgeräteborse GmbH, Burladingen, Germania) și apoi utilizat pentru caracterizarea fizică. Cu ajutorul unui spectrofotometru UV-Vis a fost analizată soluția de NPAG biosintetizate (Varian Cary 50 UV-Vis, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SUA) în intervalul spectral 300-600 nm. Analiza prin difracție cu raze X (DRX) a fost realizată pentru a evalua morfologia NPAG biosintetizate folosind sistemul JDX-3532 (Jeol, Tokyo, Japonia).

Dimensiunea domeniului cristalitului a fost determinată prin luarea în considerare a lățimii vârfurilor XRD și aplicarea formulei Scherrer,  $D = K\lambda/\beta\cos\theta$ . Morfologia și distribuția nanoparticulelor de argint biosintetizate au fost observate folosind un TEM de scanare (JSM 5910, Jeol, Tokyo, Japonia).

Efectul antimicrobian ale nanoparticulelor de argint biosintetizate au fost testate prin metoda difuzimetrică Kirby-Bauer. Tulpinile bacteriene de *S. pseudintermedius*, utilizate în studiul nostru, sunt izolate clinice, care fac parte din colecția Laboratorului de Bacteriologie al Facultății de Medicină Veterinară, Departamentul de Boli Infecțioase și Medicină Preventivă, Universitatea de Științele Vieții Regele Mihai I, Timișoara și tulpina, respectiv tulpina de referință, *S. pseudintermedius* ATCC 49051<sup>TM</sup>. Soluția de nanoparticule de argint biosintetizate au fost repartizate în plăci pentru microtitrare cu 96 de godeuri, utilizând concentrații diferite ale soluției, astfel 25, 50, 75 și 100 μg/mL. În cadrul testului a fost utilizat un disc alb steril pentru testul de susceptibilitate antimicrobiană (CT0998B - Blank Discs, Oxoid, Hants, UK). Discurile au fost încărcate cu 10 μL de soluții cu concentrații diferite conținând NPAG biosintetizate. Discurile au fost apoi plasate pe placa de agar Columbia și incubate la 37°C, în condiții de aerobioză, timp de 24 de ore.

Controlul pozitiv pentru a evalua activitatea antimicrobiană, a inclus un antibiotic sintetic din clasa floroquinolonelor, norfloxacină iar interpretările rezultatelor au fost în conformitate cu recomandările Institutului de Standarde de Laborator Clinic (CLSI) [55], în timp ce apa deionizată a acționat ca și control negativ. Testul pentru CMI a fost efectuat utilizând o placă de microtitrare cu 96 de godeuri, după metoda standard reprezentată de microdiluția în bulion. În schimb, testul CMB a fost efectuat pe plăci cu agar Muller Hinton (MHA, MLT-D, Arad, România). Densitatea finală a inoculului bacterian a fost de  $5 \times 10^5$  UFC/mL.

Culoarea variată a extractului diluat, de la galben deschis la maro închis (apreciată vizual), indică faptul că, formarea NPAG a fost obținută datorită reducerii ionilor de argint metalic. Vârfurile de absorbție apar între 474 și 487 nm, și există o deplasare a acestor vârfuri către creșterea lungimii de undă în funcție de creșterea dimensiunii particulelor asociată cu o schimbare.

# SUMMARY

of the doctoral thesis entitled:

## ***IN VITRO* EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL EFFECT OF *SEMPERVIVUM TECTORUM L.* EXTRACT IN CASES OF OTITIS EXTERNA IN DOGS**

**PhD student: TOACĂ (DEGI) DIANA MARIA**

**PhD supervisor: Assoc. Prof. Dr. MUSELIN FLORIN**

**Keywords:** *Sempervivum tectorum*, otitis, dog, treatment, nanoparticles

### **Contents:**

Introduction

Summaries (Ro, Eng)

Abbreviations

Theoretical context/Literature review (25 pages)

Research plan (60 pages)

Tables: 10

Full-color figures: 24

References: 217 titles

Annexes

### **PART I. CURRENT STATE OF KNOWLEDGE (THEORETICAL CONTEXT/LITERATURE REVIEW)**

Part I outlines the current state of knowledge and is organized into eight chapters, which include:

- *Sempervivum tectorum L.*: ethnobotanical relevance;
- Review of data published in specialized literature.
- Traditional European herbalism.
- Use throughout the history of *Sempervivum tectorum L.*
- *Sempervivum tectorum L.*, medicinal use;
- *Sempervivum* species, associated with *Sempervivum tectorum L.*
- Epidemiological aspects of otitis in canines.
- Antimicrobial activity of metal nanoparticles.

#### **Chapter 1: *Sempervivum tectorum L.*: ethnobotanical relevance**

The *Crassulaceae* family is one of the most prominent families of flowering plants. It includes about 1400–1700 species in 40–55 genera [15, 40, 45, 70, 71], with a quasi-cosmopolitan distribution (excluding Antarctica, Central Sahara, and other sandy deserts) in semi-arid climate conditions. In Europe, about 400 species of this family are cultivated in open and protected fields [83, 93, 94].

The evolution of the *Crassulaceae* family likely corresponds to adaptations for survival in mountainous regions, where the majority of these species are found. This evolution is primarily attributed to the development of ecotypes suited to rocky and stony habitats, characterized by unique ecological factors specific to these locations. Consequently, *Crassulaceae* are generally considered poor competitors among the spontaneous flora [140, 158, 159].

*Sempervivum tectorum L.* 1753 (eardrop) is a herbaceous, perennial plant with a basal rosette of succulent leaves, smooth on both sides, with ciliated margins. The leaves have an elongated or obovate shape. The flowers are actinomorphic, pink in color, and grouped in cymose inflorescences, and the fruits are poly follicular [8, 140, 168, 183].

*Crassulaceae* (Stonecrop family) species are diverse, from small, insignificant annuals to perennials and trees. Many of the species have attractive flowers. The family comprises 35 and 23 hybrid genera, with 1410 species and 305 intraspecific taxa [71, 94].

#### **Chapter 2: Review of data published in the specialized literature**

*Crassulaceae* species are known in all major regions of the world. Most of the plants in this family are found in the rainforest zone, where wild *Crassulaceae* were initially absent [202, 211, 214, 216]. Their wide distribution has

been confirmed by several samples from herbaria originating from various countries where herbaria have been studied, including Europe and Russia. Wild species of *Crassulaceae* are numerous and diverse in Africa (more than 350 species), and in Madagascar, South and East Africa are the centers of taxonomic diversity of this family. Numerous naturalized species of *Crassulaceae* are described in Denmark (*Hylotelephium spectabile* (Boreau) H. Ohba), the Czech Republic, Hungary, Sweden, and Finland (*Phedimus spurious*, *Sedum hispanicum*, etc.). Cases of naturalization of *Crassulaceae* species are also known in Eastern Europe.

Historically, the *Crassulaceae* dispersed outside their large geographic areas only after the Great Geographical Discoveries (starting in the 15th and 16th centuries). This has been actively occurring since the 19th and 20th centuries under the influence of anthropogenic factors. The main limiting factor for their wide naturalization in Eastern Europe is the absence of suitable habitats, primarily rocks and stony slopes.

*Sempervivum tectorum* is described in the Plant Nomenclature under the position Sp. The plant. 464 (1753) [23].

### **Chapter 3: Traditional European Herbalism**

Ethnobotany is still a fertile source of information for anthropological, psychological, and psycholinguistic research. Phytonyms reveal people's concerns, representations, and affective subconscious. In plants, much more than in other categories, the names were suggested to people by the so-called signature rerum, by the mysterious "inscriptions" present in the morphology, chromaticity, smell, taste, tenderness or, against the robustness or vulgarity of the organs of plant species. Other phytonyms are derived from plants' various properties, ecology and chorology, phenology, and relationships with other living things. The fact that they were recorded in multiple writings is a gain for Romanian ethnobotany linguistics and history [18, 19, 40, 96]. For centuries, traditional medical systems (TMS) were the central medical systems in the countries of origin, and now, however, with the current dominance of the Western scientific medical model, citizens and clinicians are beginning to rely on and trust such medical systems, replacing scientifically proven conventional therapies with unconventional ones. The inheritance of traditional knowledge of indigenous healing systems is based on two types of transmission: the vertical type, where the data is inherited from parent to child, as opposed to the horizontal transmission between individuals of the same generation. These types of transmission were also documented in Romania, in the regions of Transylvania and Banat, where ethnobotanical surveys were carried out. Medicinal plants, used in folk therapy in Transylvania and Banat, play an essential role in the inhabitants' daily lives, especially in remote, very traditional areas. Transylvania, and especially the mountainous region of Banat, abounds in botanical values. Several plants have been essential in treating various diseases with traditional healing methods for a long time. Over the past decade, a remarkable number of field studies have explored the ethnobotany of the South-Western Balkans (countries of the Balkan peninsula that do not yet fully belong to the European Union) to record widespread knowledge and perceptions of wild plants, mainly used in the food and medicinal fields [18, 101, 111, 159, 164, 176, 178].

### **Chapter 4: Use throughout the history of *Sempervivum tectorum* L.**

The houseleek was anciently dedicated to Jupiter or Thor and used to be called by the names of Jupiter's Eye, Thor's Beard, Jupiter's Beard, and Jovis Beard (in France, Joubarbe des toits), because of its massive clusters of flowers, which were supposed to resemble Jupiter's beard. The German name- Donnersoart- and the English – Thunderbeard- have the same meaning, deriving from Jupiter, the God of Thunder [199, 200].

It was highly appreciated and esteemed among the Romanians, who grew it in pots before their houses.

The word "leek" is of Anglo-Saxon origin, representing a plant, so Houseleek means "House Plant". In the 14th century, it was also called Ayron, Ayegreen, and Sen green, meaning Evergreen (evergreen) [204, 205]. The generic name *Sempervivum*, from the Latin *semper* (always) and *vivo* (to live), refers to its preservation of vitality under almost all conditions, and the specific name *tectorum* is a testament to its usual place of growth - a roof [198, 208, 209, 213].

### **Chapter 5: *Sempervivum tectorum* L., medicinal use**

In traditional medicine, it is used in treating inflammatory diseases of the ears and has antinociceptive action. Fresh juice from the leaves of *S. tectorum* is used in conventional medicine, almost exclusively externally. It is applied as a bandage on wounds, inflammatory lesions, burns, and abscesses. It is also used in painful areas for gout as a cooling agent and astringent effect. The consumption of tea prepared from the leaves of *S. tectorum* is recommended in the treatment of stomach ulcers [18, 19, 101, 104, 111, 130].

Phenolic compounds are attributed to antimicrobial activity. They are considered inhibitors of enzymes responsible for producing cellular energy or altering cell membrane permeability.

### **Chapter 6: Hybrid *Sempervivum tectorum* L. species**

*S. tectorum* var. *tectorum* (Linn. *sensu stricto*). This is the best-known cultivated *Sempervivum* species, widely grown throughout most of Europe, especially on house roofs (originally as a charm against lightning). The origin is obscure, as it is nowhere indigenous but occasionally naturalized. *Sempervivum marmoreum* Griseb. is a crassulacean

described by Grisebach in 1843 in the first volume of *Spicilegium Florae Rumelicae et Bithynicae*, from Mount Athos, Greece: "In m. Athone: in the subalpine region versus pinetum (subst. Marmor)" [109].

Its soil requirements add considerable ecological breadth to these plants, matched only by its inexhaustible vegetative propagation apparatus. *Sempervivum marmoreum* Griseb. It is long-lived, perennial, and propagated by stolons like most other *Sempervivum* species [83]. Hybridization observed among the different species of *Sempervivum* s.s. would have produced, in this case, some presumptive hybrids with *S. tectorum*, including *S. Michaelis-Boris* Domk., which is notorious in Romania, but these were contested by later authors and rejected or synonymous. It has a multitude of synonyms, of which the Romanian Carpathians described the following, also being the most frequently used in floristic works related to the region of interest [147]:

*Sempervivum assimile* Schott and *S. blandum* Schott were both described in 1853 from the Romanian Carpathians "ex Siebenburgen"; *S. rubicundum* Schur (1858) described from the Turda Canyon, in the Apuseni Mountains [147].

Domokos, cited by Papp [147], described *S. banaticum* in the regions of Banat, near Sviña, in the lower Danube region, at an altitude of 700 m, in the Trascău Mountains, and in 1935, the same author described a hybrid called *S. michaelis-borsii* Domk. from the Bihor Mountains.

Although the *S. schlehanii* Schott (1853) species was described in the Dalmatian Alps, it is often cited in Romania [147]. Other described species are the following: *Sempervivum tectorum* var. *overdense*: widespread in the Auvergne region of France, respectively, in the central and southern regions of Italy [40, 130, 163]. Synonymous species for this variety are [203, 206, 212, 215]: *Sempervivum arvernense* Lecoq & Lamotte (1847); *Sempervivum tectorum* ssp. *arvernense* (Lecoq & Lamotte) Bellia & de Andrade (1972); *Sempervivum tectorum* var. *clusianum* Grande (s.a.); *Sempervivum montanum* Tenore (1830); *Sempervivum italicum* I. Ricci (1961) and *Sempervivum riccii* Iberite & Anzalone (2001).

#### **Chapter 7: Epidemiological aspects of otitis in canines**

Otitis externa is an acute or chronic inflammation of the epithelium of the external auditory canal that may also include the pinna. This condition is characterized by erythema and increased desquamation of the epithelium with gradual variations in pain and itching. It is a common disease in dogs and cats, and the conditions that lead to the appearance of the disease result from the combination of dynamic changes that affect the anatomical, physiological, and microbiological status of the external auditory canal [33, 59, 92, 99, 152]. Success in managing otitis externa depends on understanding the primary, predisposing, and perpetuating factors that intervene in the pathogenesis process. Otitis externa is a complicated condition that is difficult to diagnose and treat due to the unique physiology of the auditory canal and the typical pathophysiology of otitis externa, regardless of the cause [92, 108, 150, 193].

The standard external auditory canal is not sterile; it contains a limited number of microorganisms in balance with the host and each other. The microflora of the external auditory canal consists primarily of coagulase-positive staphylococci, non-hemolytic streptococci, and *Malassezia* yeasts. Otitis externa (OE) in dogs is a disease with a multifactorial etiology.

#### **Chapter 8: Antimicrobial activity of metal nanoparticles**

Nanotechnology is a research hotspot in modern materials science. This technology can provide new applications ranging from innovative fabric compounds, food processing, and agricultural production to sophisticated medicinal techniques [162]. In conclusion, the synthesis, characterization, and exploration of materials in the nanometer region (1–100 nm) are considered. Metallic nanoparticles of silver, copper and their alloys are known to have potential antimicrobial activities against a wide range of infectious pathogens (bacteria, fungi, and viruses) and show promise as antimicrobial agents against infections with the bacterium *S. aureus* [13]. Nanotechnology is widely used to generate various products in biology and medicine. Nanotechnology in biology has provided many opportunities, including tissue engineering, drug delivery, diagnostics, imaging, and fighting bacterial infections. In need of new antimicrobial agents, nanoparticles have been proposed to treat diseases because they use different mechanisms to kill bacteria than conventional antibiotics with relatively low toxicity in human and animal cells. As a result, nanomaterials can be considered a promising alternative to antibiotics to control bacterial infections [4, 6, 12, 13].

Silver compounds have historically been used to control microbial proliferation. Silver nanoparticles' antifungal and antibacterial effect, even against antibiotic-resistant bacteria, has been demonstrated *in vitro*.

## **PART II. RESEARCH PLAN**

### **Chapter 9. Antimicrobial activity of *Sempervivum tectorum* L. extract on pathogenic bacteria isolated from otitis externa in dogs**

This study aimed to evaluate the antibacterial activity of *Sempervivum tectorum L.* extracts against bacteria isolated from clinical samples, respectively against standardized strains (*S. aureus* and *P. aeruginosa*) by chemical analysis (characterization) of the samples, using UV spectrophotometry. The antibacterial activity, the total content of phenolic compounds, and the concentration of proanthocyanins of the ethanolic extracts made from fresh leaves of *Sempervivum tectorum L.* were studied.

*Sempervivum tectorum L.* plants were collected from the spontaneous flora of the Socolari area (GPS coordinates: 44°56'39.57" N, 21°43'45.00" E), located in the mountainous region of western Romania, in the spring and summer of 2019. The plants were identified according to the determination key given by *Flora Europaea* (*Sempervivum tectorum* LINN.; Sp. Plant. 464/1753), based on the information provided by Euro+Med PlantBase within the Department of Plant and Plant Biology Medicine of the Faculty of Veterinary Medicine from Timișoara.

Samples represented by dried and finely ground *Sempervivum tectorum L.* leaves were lyophilized (Leybold Heraeus Lyovac GT2/LH Leybold, Labexchange–Die Laborgerätebörse GmbH, Burladingen, Germany) to obtain the crude extract mass for further experiments.

The active principles were extracted using a conventional method, using a hydroalcoholic solvent (deionized water and ethanol 50:50) on lyophilized samples. The extraction used a CEM Star 2 Plus Open Vessel Microwave Digestion System (CEM Corporation, Matthews, NC, USA) for 5 min at 50 W and 35°C. The extract was centrifuged at 4000 rpm for 10 min and filtered through Whatman® filter paper, having gradient no. 4.

The total phenolic content of *Sempervivum tectorum L.* extracts was determined by UV spectrophotometry (Varian Cary 50 UV-VIS, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using the Folin-Ciocalteu method. Gallic acid (GA) equivalent (mg GA/g raw material) was used to express the total amount of phenols. Total polyphenols were quantified using a wavelength of 241 nm and compared with ethanol as a control.

The amount of light absorbed by the substances under analysis was measured spectrophotometrically at 765 nm. The proanthocyanin content in *Sempervivum tectorum L.* extracts was also determined by UV spectrophotometry based on acid hydrolysis and color formation.

The antimicrobial activity of plant extracts was evaluated on a group of bacteria, including Gram-positive and Gram-negative strains isolated from clinical samples, including clinical strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, respectively standardized strains ATCC 25923 and ATCC 27853.

Extracts were serially diluted to concentrations ranging from 0.5 to 62 g/mL (0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32.0, and 64.0 g/mL). Positive controls included enrofloxacin (ENR, 5 µg) and gentamicin (GN, 10 µg) (both from Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), while the solvent acted as a negative control. Results are presented as mean ± SE. Results were statistically processed and calculated using GraphPad InStat 3 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Freeze-dried *S. tectorum L.* extract samples had the highest content of phenolic compounds (126.17 mg GA/g material). Our results show that using the microwave-assisted extraction method and a 1:1 hydroalcoholic mixture of ethanol and water efficiently extracted polyphenolic compounds. The highest PAC content (15.39 mg PAC/g material) was obtained in samples extracted from lyophilized *S. tectorum L.* using microwave-assisted extraction and a hydroalcoholic mixture containing a 50:50 mixture of water and ethanol.

The broth microdilution method was used to evaluate the minimum inhibitory concentration and the minimum bactericidal concentration of *S. tectorum L.* extracts used in different concentrations. The inhibitory effects of *S. tectorum L.* extract became observable at a concentration of 1.47 µg/mL against *S. aureus* ATCC 25923 strains and 1.75 µg/mL against *P. aeruginosa* ATCC 27853 strains, respectively. Activity antibacterial activity was determined according to the CMB/MIC ratio.

Ethanol-based extracts of *S. tectorum L.* leaves were bacteriostatic against clinical isolates of *S. aureus*, with mean MIC values of 23.25 µg/mL and CMB values of 37.23 µg/mL, respectively, and were bactericidal against the standard strain of *S. aureus* ATCC 25923, with mean values of MIC of 20.33 µg/mL and CMB of 37.29 µg/mL, respectively. The mean MIC and CMB values of clinical and standard strains of *P. aeruginosa* were 24.234 and 20.53 µg/mL, 37.30 and 37.02 µg/mL, respectively. With a CMB value of 15.75 µg/mL, the *S. tectorum L.* extract demonstrated potential bactericidal activity against the tested pathogenic bacteria (*S. aureus* and *P. aeruginosa*). The data from the determinations represent the standard deviation of the average of three replicates (SD, standard deviation). Differences in mean values were considered significant at  $p < 0.05$ .

#### **Chapter 10. Comparative analysis of the composition of bioactive phenolic compounds from three varieties of *Sempervivum*: *S. tectorum L.* and *S. celon***

Bioactive phenolic compounds are potent antioxidants in the composition of traditionally used medicinal and industrial plants. In recent years, they have attracted increased interest in their application and role in natural medicine and their antibacterial role.

In this study, the qualitative target was related to the possible future applications of the extracts of *Sempervivum tectorum* L. of three plant varieties grown under different conditions, namely: natural conditions (spontaneous flora), plants from the spontaneous flora acclimatized in lowland areas and respectively plants cultivated for ornamental purposes under controlled conditions (in greenhouses and which are hybrids of *Sempervivum tectorum* L.) in veterinary medicine, respectively for the improvement of the extraction methodology, the costs regarding the preparation of the extracts, as well as for the improvement of the existing knowledge regarding the content of phenolic compounds from the studied plants.

The leaves of the tested *Sempervivum* varieties were collected before drying and then divided into 3 equal parts to determine the dry matter content. Subsequently, the leaves were frozen in liquid nitrogen to prevent the volatilization of phenolic compounds and lyophilized (Flexy-Dry MP, FTS Systems, USA) until the mass was constant. The dry matter content of each sample was determined gravimetrically.

Each lyophilized sample (5 g) was placed in a round bottom flask and a 50 mL amount of solvent (hydroalcoholic solution composed of ethanol and deionized water, 50:50 v:v). EAM was performed for 5 min at 50 W and 35°C using a CEM Star 2 Plus Open Vessel Microwave Digestion System (CEM Corporation, Matthews, NC, USA), and the extract was centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes and filtered through Whatman® filter paper, having gradient no. 4 (two more measures of solvent were used to extract the press residue, so the total volume of solvent used was 150 mL). The spectrometric quantification of polyphenols and proanthocyanidins was performed according to the European Pharmacopoeia directive.

The total phenolic content (TFC) of *Sempervivum tectorum* L. extracts was determined by UV spectrophotometry (Varian Cary 50 UV-VIS, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using the Folin-Ciocalteu (FC) method. Gallic acid equivalent (EAG) (mg AG/g raw material) was used to express CFT. Total polyphenols were quantified using a wavelength of 241 nm and compared with ethanol as a control.

In our studies, we used hydroalcoholic extracts from *Sempervivum tectorum* L. leaves to demonstrate that plants originating from the spontaneous flora have the highest total content of phenolic compounds.

The highest phenolic content was found in the freeze-dried extracts of *Sempervivum tectorum* L. from the spontaneous flora grown under natural conditions (109.695 mg/g). However, significant amounts of polyphenols (98.856 mg/g) were also contained in *Sempervivum tectorum* L. plants acclimatized to western Romania's soil and environmental conditions.

Parallel determinations regarding the quantification of phenolic compounds were also carried out from fresh sap extracted from the leaves of the studied plants. In this case, the detected amounts of phenolic substances were significantly reduced and ranged between 2.393 and 4.601 mg/g.

The results obtained in the case of lyophilized extracts and fresh leaves of *Sempervivum tectorum* L. were compared with those of another product often used in human nutrition, namely white grape seeds, which originate from the oil extraction industry.

The results show that the highest PAC content was obtained in the lyophilized *S. tectorum* samples from the natural environment (up to 14.983 mg EC/g extract) using the microwave-assisted extraction and the ethanol:deionized water mixture, in a ratio of 50: 50.

#### **Chapter 11. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Sempervivum tectorum* extract and antibacterial effect against *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from cases of canine otitis externa**

Nanoparticles are used for medicinal purposes, and metal nanoparticles are considered the most promising because they exhibit outstanding antibacterial properties due to their high surface area to volume ratio, which is of interest to researchers due to the alarming increase in resistance of bacterial strains to antibiotics, and the development of strains with multiple resistance to antimicrobial substances as well as the emergence of super bacteria. Silver is a well-known antimicrobial agent, acting against more than 650 microorganisms from different classes, such as Gram-negative and Gram-positive bacteria, fungi, or viruses [74, 181].

In June 2022, the fresh and healthy leaves of *Sempervivum tectorum* L. were collected from the Socolari mountain region of western Romania and selected for the biosynthesis of silver nanoparticles. The plants were identified according to the determination key given by Flora Europaea (*Sempervivum tectorum* LINN.; Sp. Plant. 464/1753), based on the information provided by the Euro+Med PlantBase platform [182].

To synthesize NP<sub>Ag</sub>, a 1 mM silver nitrate solution (0.179 g AgNO<sub>3</sub> mixed well with 100 g deionized water) was prepared and kept in an amber bottle. In a conical flask, 50 mL of 1 mM AgNO<sub>3</sub> and 5 mL of *Sempervivum tectorum* leaf extract were added gradually and constantly mixed. Subsequently, this solution was subjected to heat treatment by incubation at 60°C for 15 minutes in the dark to prevent photochemical reactions in an orbital shaker and ensure the synthesis of silver nanoparticles. The light-yellow color of the leaf extract changed to dark brown, indicating that silver nanoparticles were formed.

The biosynthesized NPAg solution was centrifuged (Eppendorf 5423, Darmstadt, Germany) at 1000 rpm for 10 minutes. The supernatant was removed, and the precipitate was collected in a separate tube, washed, and dissolved in deionized water, followed by another centrifugation at 1000 rpm for 10 min. The process was repeated five times, and the residual sedimented material (crude mass) was lyophilized (Leybold Heraeus Lyovac GT2, Labexchange–Die Laborgerätebörse GmbH, Burladingen, Germany) and then used for physical characterization. The solution of biosynthesized NPAg was analyzed using a UV-Vis spectrophotometer (Varian Cary 50 UV-Vis, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) in the spectral range 300-600 nm. X-ray diffraction (XRD) analysis was performed to evaluate the morphology of biosynthesized NPAg using the JDX-3532 system (Jeol, Tokyo, Japan).

The crystallite domain size was determined by considering the width of the XRD peaks and applying the Scherrer formula,  $D = K\lambda/\beta\cos\theta$ . The morphology and distribution of the biosynthesized silver nanoparticles were observed using a scanning TEM (JSM 5910, Jeol, Tokyo, Japan).

The antimicrobial effect of biosynthesized silver nanoparticles was tested using the Kirby-Bauer diffusimetric method. The bacterial strains of *S. pseudintermedius* used in our study were clinical isolates, part of the collection of the Bacteriology Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine, Department of Infectious Diseases and Preventive Medicine, King Mihai I University of Life Sciences, Timisoara. The reference strain was *S. pseudintermedius* ATCC 49051<sup>TM</sup>. The solution of biosynthesized silver nanoparticles was distributed in 96-well microtiter plates using different concentrations of the solution, namely 25, 50, 75, and 100 µg/mL. A sterile blank disc for the antimicrobial susceptibility test (CT0998B - Blank Discs, Oxoid, Hants, UK) was used in the test. The discs were loaded with 10 µl of solutions of different concentrations containing biosynthesized NPAg. The discs were then placed on the Columbia agar plate and incubated at 37°C under aerobic conditions for 24 hours.

The positive control to evaluate the antimicrobial activity included a synthetic antibiotic from the fluoroquinolone class, norfloxacin, and the result interpretations were done according to the recommendations of the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) [55]. At the same time, deionized water acted as a negative control. The MIC assay was performed using a 96-well microtiter plate following the standard broth microdilution method. Instead, the CMB assay was performed on Muller Hinton agar plates (MHA, MLT-D, Arad, Romania). The final density of the bacterial inoculum was  $5 \times 10^5$  CFU/mL.

The varied color of the diluted extract, from light yellow to dark brown (judged visually), indicates that the formation of NPAg was achieved due to the reduction of metallic silver ions. Absorption peaks occur between 474 and 487 nm, and these peaks shift to increasing wavelength as a function of the increase in particle size associated with a shift.