



MD 1684 Y 2023.04.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1684** (13) **Y**
(51) Int.Cl: *A61K 33/38* (2006.01)
B82B 3/00 (2006.01)
C01G 5/00 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE DE SCURTĂ DURATĂ

În termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție de scurtă durată, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului

(21) Nr. depozit: s 2022 0053
(22) Data depozit: 2022.08.12

(45) Data publicării hotărârii de
acordare a brevetului:
2023.04.30, BOPI nr. 4/2023

(71) Solicitanți: IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD; AGENȚIA NAȚIONALĂ PENTRU SĂNĂTATE PUBLICĂ AL MINISTERULUI SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA, MD

(72) Inventatori: BURDUNIUC Olga, MD; COȘERI Sergiu, RO; MAREȘ Mihai, RO; BILIUȚĂ Gabriela, RO; NASTASA Valentin, RO; BOSTĂNARU-ILIESCU Andra-Cristina, RO

(73) Titulari: IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD; AGENȚIA NAȚIONALĂ PENTRU SĂNĂTATE PUBLICĂ AL MINISTERULUI SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA, MD

(54) Procedeu de obținere a materialelor pe bază de nanoparticule de argint cu activitate antifungică

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la nanotehnologie și medicină, în special la un procedeu de obținere a materialelor pe bază de nanoparticule de argint, stabilizate cu derivați celulozici cu activitate antifungică.

Esența invenției constă în aceea că se prepară o soluție de azotat de argint cu concentrația de 0,01 M prin dizolvarea lui în apă bidistilată sau dimetilsulfoxid, de asemenea, se prepară o soluție cu concentrația

2
de 1% de un derivat celulozic în apă bidistilată sau dimetilsulfoxid, apoi în soluția cu derivatul celulozic se adaugă soluție de azotat de argint într-un raport volumic de 4:1, care se agită continuu, timp de 2 ore, la temperatura camerei. În calitate de derivat celulozic se utilizează hidroxipropilceluloză, metilceluloză, etilceluloză sau acetat de celuloză.

Revendicări: 2

Figuri: 2

MD 1684 Y 2023.04.30

(54) Process for producing materials based on silver nanoparticles with antifungal activity

(57) Abstract:

1
The invention relates to nanotechnology and medicine, in particular to a process for producing materials based on silver nanoparticles stabilized by cellulose derivatives with antifungal activity.

Summary of the invention consists in that it is prepared a silver nitrate solution with a concentration of 0.01 M by dissolving it in bidistilled water or dimethyl sulfoxide, it is also prepared a solution with a concentration

2
of 1% of a cellulose derivative in bidistilled water or dimethyl sulfoxide, then to the solution with the cellulose derivative is added silver nitrate solution in a volume ratio of 4:1, which is continuously stirred for 2 hours, at room temperature. As cellulose derivative is used hydroxypropylcellulose, methylcellulose, ethylcellulose or cellulose acetate.

Claims: 2

Fig.: 2

(54) Способ получения материалов на основе наночастиц серебра с антигрибковой активностью

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к нанотехнологии и медицине, в частности к способу получения материалов на основе наночастиц серебра, стабилизированных производными целлюлозы с антигрибковой активностью.

Сущность изобретения состоит в том, что приготавливают раствор нитрата серебра с концентрацией 0,01 М путем его растворения в бидистиллированной воде или диметилсульфоксиде, также приготавливают раствор с концентрацией 1% производного целлюлозы в

2
бидистиллированной воде или диметилсульфоксиде, затем в раствор с производным целлюлозы добавляют раствор нитрата серебра в объемном соотношении 4:1, которого непрерывно перемешивают в течение 2 часов, при комнатной температуре. В качестве производным целлюлозы используют гидроксипропилцеллюлозу, метилцеллюлозу, этилцеллюлозу или ацетат целлюлозы.

П. формулы: 2

Фиг.: 2

Descriere:

5 Invenția se referă la nanotehnologie și medicină, în special la un procedeu de obținere a materialelor pe bază de nanoparticule de argint, stabilizate cu derivați celulozici cu activitate antifungică.

Actualmente, la nivel mondial domeniul nanotehnologiei este abordat ca un subiect important pentru tehnologia secolului XXI. În ultimii ani, se atestă o tendință de dezvoltare a particulelor la scară nanometrică datorată noilor oportunități promițătoare pentru utilizarea nanomaterialelor în multe domenii ale științei și tehnologiei, inclusiv în medicină.

10 Sunt cunoscute mai multe procedee de obținere a materialelor pe bază de nanoparticule de argint (AgNP) stabilizate. În practica medicală pentru obținerea materialelor antifungice pe bază de nanoparticule de argint stabilizate se utilizează de regulă un precursor metalic, un agent de reducere și un agent de stabilizare, iar pentru generarea nanoparticulelor în soluție sunt necesare trei procese de reacție, anume reacția de reducere a ionilor metalici (a precursorului metalic), nucleația și dezvoltarea nanoparticulelor. Reacția de reducere a ionilor metalici constă în reducerea ionilor metalici la atomi liberi de metal, în prezența unui agent de reducere (Khan Z., Al-Thabaiti S.A., Obaid A.Y., Al-Youbi A.O. Preparation and characterization of Silver nanoparticles by chemical reduction method, Colloids Surf B., vol. 82, 2011, p. 51513-51517, doi: 10.1016/j.c01surfb.2010.10.008).

20 Pentru a reduce pe cât posibil reactivii toxici, utilizați de regulă în sintezele chimice pentru a utiliza reactivi cât mai blânzi, lipsiți de toxicitate, s-a luat în considerare că polizaharidele pot înlocui cu succes compușii toxici, utilizați în general ca agenți de reducere și stabilizare în procesele de generare a nanoparticulelor metalice. De asemenea, de-a lungul timpului au fost dezvoltate procese blânde de obținere a nanoparticulelor de argint, care utilizează drept solvent apa, de exemplu utilizarea β -D-glucozei ca agent de reducere, iar amidonul drept agent de stabilizare a nanoparticulelor (Raveendran P., Fu J., Wallen S.L. Completely green synthesis and stabilization of metal nanoparticles. J. Am. Chem. Soc., vol. 125, 2003, p. 13940–13941).

25 Au fost realizate numeroase studii care au avut la bază polizaharide capabile să stabilizeze nanoparticulele de argint, cum ar fi celuloza, amidonul, lentinanul, curdlanul, chitosanul, heparina, agarul, xantanul, acidul hialuronic etc (Ifuku S., Tsuji M., Morimoto M., Saimoto H., Yano H. Synthesis of silver nanoparticles templated by TEMPO-mediated oxidized bacterial cellulose nanofibers, Biomacromolecules, vol. 10, 2009, p. 2714–2717; Peng H., Yang A., Xiong J. Green microwave-assisted synthesis of silver nanoparticles using bamboo hemicelluloses and glucose in an aqueous medium, Carbohydr Polym. Vol. 91, 2012, p. 348-355; Yan J.K., Cai P.F., Cao X.Q., Ma H.L., Zhang Q., Hu N.Z., Zhao Y.Z. Green synthesis of Silver nanoparticles using 4-acetamidoTEMPO-oxidized curdlan, Carbohydr. Polym., vol. 97, 2013, p. 391-397; Tran H.V., Tran L.D., Ba C.T., Vu H.D., Nguyen T.N., Pham D.G., Nguyen P.X. Synthesis, characterization, antibacterial and antiproliferative activities of monodisperse chitosan-based Silver nanoparticles, Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp., vol. 360, 2010, p. 32–40; Huang H., Yang X. Synthesis of polysaccharide-stabilized gold and silver nanoparticles: A green method. Carbohydr. Res., vol. 339, 2004, p. 2627-2631).

30 Este cunoscut un procedeu de obținere a materialelor pe bază de nanoparticule de argint cu utilizarea pululanului sau pululanului oxidat, drept materiale pentru obținerea de nanoparticule de argint. Atât pululanul, cât și pululanul oxidat s-au dovedit a fi materiale eficiente în astfel de procese, care pot înlocui cu succes compușii toxici utilizați în general în calitate de agenți de reducere și stabilizare a nanoparticulelor de argint [1].

35 Un alt aspect observat în cadrul acestui studiu a fost că nanoparticulele de argint obținute au prezentat o activitate antifungică eficientă. Astfel, evaluarea potențialului antifungic al nanoparticulelor de argint preparate a fost testat pe 100 de izolate clinice, o parte dintre acestea fiind izolate din infecții fungice invazive. Au fost incluse în acest studiu, izolate clinice din 5 genuri diferite (*Candida*, *Cryptococcus*, *Magnusiomyces*, *Saccharomyces* și *Trichosporon*). Două genuri au fost reprezentate de o singură specie fiecare - *Magnusiomyces capitatus* și *Trichosporon asahii*. Genul *Saccharomyces* a fost reprezentat de o singură specie - *Saccharomyces cerevisiae* cu 3 izolate. Cel mai numeros gen din acest studiu a fost *Candida*, cu 15 specii și 94 de izolate clinice. Cele mai multe izolate au fost reprezentate de specia *Candida glabrata* - 27, urmată de specia *Candida albicans* - 23 și *Candida parapsilosis* cu 16 izolate. *Candida krusei* a fost reprezentată de 5 izolate; *Candida guilliermondii* și *Candida tropicalis* - fiecare câte 4 izolate fiecare; *Candida lusitanae* - cu 3 izolate; *Candida famata*, *Candida kefyr*, *Candida norvegensis* și *Candida utilis* - câte 2 izolate fiecare și *Cryptococcus neoformans*, *Candida pulcherrima*, *Candida pelliculosa*, *Candida dubliniensis*,

Candida robusta – câte un izolat de fiecare. Toate tulpinile sunt caracterizate fenotipic și genotipic și incluse în Colecția Română de Culturi Tip (RTCC - Romanian Type Culture Collection).

Dezavantajele procedurii cunoscute constau în aceea că pululanul este o polizaharidă destul de costisitoare și puțin studiată, în comparație cu celuloza, disponibilitatea ei fiind incomparabil redusă. De asemenea, dacă ținem cont de preocupările în creștere asupra protecției mediului înconjurător și a nevoilor de dezvoltare durabilă din ultimii ani, considerăm că utilizarea derivaților celulozici este extrem de benefică pentru astfel de aplicații. Un alt dezavantaj al acestui procedeu față de procedeul revendicat constă în faptul că pentru generarea nanoparticulelor de argint s-a utilizat o concentrație mult mai mare de argint, și anume 5 mM AgNO₃, comparativ cu procedeul revendicat, unde s-a utilizat o concentrație de 0,01 mM AgNO₃. În același timp, după evaluarea activității antifungice a nanoparticulelor încorporate în matricea pululanului, un dezavantaj observat, a constat un efect antifungic *in vitro*, care nu a fost uniform față de toate izolatele fungice testate și totodată intervalul concentrațiilor obținute este unul destul de larg. De asemenea, nanoparticulele de argint încorporate în matricea pululanului au reușit să inhibe toate izolatele la concentrații mai mari de 16 mM (concentrația de argint).

Problema pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea unui procedeu de obținere a nanoparticulelor de argint stabilizate cu derivați ai celulozei blânzi, lipsiți de toxicitate, facilitând astfel conceperea unor noi materiale cât mai prietenoase mediului înconjurător. Prin urmare, nanoparticulele de argint stabilizate cu derivați ai celulozei au fost utilizate pentru activitate antifungică *in vitro*, care a fost mult mai bună decât în cea mai apropiată soluție, atât față de speciile de *Candida albicans* cât și față de speciile de *Candida non-albicans*. În cadrul derivaților celulozici, concentrațiile minime inhibitorii în funcție de specie, au fost între 6...12 ori mai mici decât cele obținute în cazul celei mai apropiate soluții. Plecând de la aceste rezultate, următorul obiectiv urmărit a fost obținerea de nanoparticule de argint printr-o metodă uzuală, cu largă disponibilitate industrială, ieftină și eficientă, folosind drept agent de reducere și stabilizare a nanoparticulelor, derivați celulozici uzuali: hidroxipropilceluloza (HPC), metilceluloza (MC), etilceluloza (EC) acetatul de celuloză (CA). Pentru aplicații biomedicale/antifungice, celuloza este un polimer natural destul de ofertant, prezentând unele caracteristici unice precum biodegradabilitate, biocompatibilitate, lipsa toxicității și proprietăți mecanice excelente. În această ordine de idei, utilizarea derivaților celulozici reprezintă o soluție viabilă pentru dezvoltarea de noi materiale cu proprietăți antifungice. Astfel, aceste materiale/nanocompozite pot servi un suport rațional în extinderea arsenalului de remedii antifungice la concentrații minime inhibitorii cât mai joase, care să prezinte costuri reduse pentru utilizarea acestora, atât în practica medicală umană, cât și veterinară.

Esența invenției constă în aceea că se prepară o soluție de azotat de argint cu concentrația de 0,01 M prin dizolvarea lui în apă bidistilată sau dimetilsulfoxid, de asemenea, se prepară o soluție cu concentrația de 1% de un derivat celulozic în apă bidistilată sau dimetilsulfoxid, apoi în soluția cu derivatul celulozic se adaugă soluție de azotat de argint într-un raport volumic de 4:1, care se agită continuu, timp de 2 ore, la temperatura camerei. În calitate de derivat celulozic se utilizează hidroxipropilceluloză, metilceluloză, etilceluloză sau acetat de celuloză.

Rezultatul tehnic al invenției constă în faptul că procedeul de obținere a materialelor antifungice pe bază de nanoparticule de argint stabilizate cu derivați celulozici este simplu și eficient, unde se utilizează materiale ieftine și uzuale și fără utilizarea agenților toxici și factorilor fizici externi, precum temperatura, presiunea, etc. Rezultatele studiului cu nanoparticulele de argint încorporate în matricea pululanului (soluția cea mai apropiată), au arătat că toate cele patru tipuri de nanoparticule de argint au prezentat efect antifungic față de izolatele clinice testate. Printre izolatele cele mai reprezentative din acest studiu nu există o anumită valoare a concentrației minime inhibitorii (CMI) pentru AgNP-urile testate, intervalul de concentrații active a variat de la 2 la 16 mM, cu o predominanță a valorilor cuprinse între 4 și 8 mM. Astfel, compușii testați au inhibat 29% din izolate la 2 mM Ag, 76% la 4 mM Ag, 98% la 8 mM Ag și 99% la 12 mM Ag.

Avantajele procedurii revendicate privind obținerea nanoparticulelor de argint stabilizate se atestă prin utilizarea unor derivați celulozici ieftini uzuali, iar procedeul de obținere este unul simplu și eficient. În acest procedeu nu se utilizează agenți suplimentari, toxici, pentru reducerea și stabilizarea nanoparticulelor, nu se utilizează factori fizici externi, precum temperatura, presiunea etc. Mai mult, se reduce costul procesului în sine, timpul necesar pentru obținerea nanoparticulelor de argint. Totodată, a fost demonstrat efectul citotoxic al argintului la concentrații mai mari, iar în procedeul revendicat se folosesc concentrații foarte reduse, dar cu o concentrație minimă inhibitorie diferită, în funcție de specie și este de 6...12 ori mai mică decât în cea mai apropiată soluție, ceea ce se consideră că procedeul revendicat este superior procedurii conform celei mai apropiate soluții.

Invenția se explică prin desenele din figurile 1 și 2, care reprezintă:

- fig. 1, spectrele de absorbție UV-VIS pentru nanoparticulele de argint stabilizate cu derivați celulozici;

5 - fig. 2, imaginile a)STEM și b) TEM ale nanoparticulelor de argint stabilizate cu derivați celulozici.

Metoda de obținere a nanoparticulelor de argint.

Se prepară o soluție de azotat de argint cu concentrația de 0,01 M prin dizolvarea lui în apă bidistilată sau dimetilsulfoxid, de asemenea, se prepară o soluție cu concentrația de 1% de un derivat celulozic în apă bidistilată sau dimetilsulfoxid, apoi în soluția cu derivatul celulozic se adaugă soluție de azotat de argint într-un raport volumic de 4:1, care se agită continuu, timp de 2 ore, la temperatura camerei. În calitate de derivat celulozic se utilizează hidroxipropilceluloză, metilceluloză, etilceluloză sau acetat de celuloză.

Exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1

15 Nanoparticulele de argint pe bază de metilceluloză (AgNPs-MC) au fost obținute la temperatura camerei, utilizând apă bidistilată în calitate de solvent, azotatul de argint în calitate de precursor și metilceluloza în calitate de agent de reducere a precursorului metalic și stabilizare a nanoparticulelor de argint în mediul de reacție. Astfel, pentru sinteza nanoparticulelor s-a preparat o soluție ce conține metilceluloză (MC) în apă bidistilată, în concentrație de 1%. Soluția de azotat de argint a fost preparată prin dizolvarea lui în dimetilsulfoxid (DMSO), cu obținerea unei concentrații a soluției de azotat de argint de 0,01 M. În soluția de polimer s-a adăugat 2,5 ml de soluție de AgNO₃, cu concentrația de 0,01 M, volumul final al soluției de amestec fiind de 12,5 ml. Apoi soluția a fost lăsată timp de 2 ore sub agitare continuă, la temperatura camerei, în lipsa oricărui agent suplimentar de reducere sau stabilizare. O primă indicație a formării nanoparticulelor de argint a fost modificarea culorii soluției inițiale de la incolor la maro închis.

Formarea nanoparticulelor de argint implică următoarele etape:

30 i) Etapa de reducere a precursorului (azotatul de argint) de către derivatul celulozic prin intermediul grupelor hidroxilice reducătoare, disponibile de-a lungul lanțului polizaharidic, care sunt responsabile de reducerea ionilor de argint (Ag⁺) la atomi liberi de argint (Ag⁰). ii) Etapa de nucleație a atomilor liberi. iii) Etapa de creștere a nanoparticulelor de argint stabilizate prin interacțiunea cu moleculele de derivat celulozic, care prin intermediul grupărilor hidroxilice formează un strat/înveliș protector la suprafața particulelor și le stabilizează (stabilizare sterică).

Exemplul 2

35 Nanoparticulele de argint pe bază de hidroxipropilceluloză (AgNPs-HPC) au fost obținute la temperatura camerei, utilizând apă bidistilată în calitate de solvent, azotatul de argint în calitate de precursor și hidroxipropilceluloza în calitate de agent de reducere a precursorului metalic și stabilizare a nanoparticulelor de argint în mediul de reacție. Astfel, pentru sinteza nanoparticulelor s-a preparat o soluție de hidroxipropilceluloză (HPC) în apă bidistilată, în concentrație de 1%. Soluția de azotat de argint a fost preparată prin dizolvarea lui în apă bidistilată, concentrația soluției de azotat de argint fiind de 0,01 M. În soluția de polimer s-a adăugat 2,5 ml de soluție de AgNO₃ cu concentrația de 0,01 M, volumul final al soluției de amestec fiind de 12,5 ml. Apoi soluția a fost lăsată timp de 2 ore sub agitare continuă, la temperatura camerei, în lipsa oricărui agent suplimentar de reducere sau stabilizare. O primă indicație a formării nanoparticulelor de argint a fost modificarea culorii soluției inițiale de la incolor la maro deschis.

45 Formarea nanoparticulelor de argint implică următoarele etape:

50 i) Etapa de reducere a precursorului (azotatul de argint) de către derivatul celulozic prin intermediul grupelor hidroxilice reducătoare, disponibile de-a lungul lanțului polizaharidic, care sunt responsabile de reducerea ionilor de argint (Ag⁺) la atomi liberi de argint (Ag⁰). ii) Etapa de nucleație a atomilor liberi. iii) Etapa de creștere a nanoparticulelor de argint stabilizate prin interacțiunea cu moleculele de derivat celulozic, care prin intermediul grupărilor hidroxilice formează un strat/înveliș protector la suprafața particulelor și le stabilizează (stabilizare sterică).

Exemplul 3

55 Nanoparticulele de argint pe bază de etilceluloză (AgNPs-EC) au fost obținute la temperatura camerei, utilizând dimetilsulfoxidul (DMSO) în calitate de solvent, azotatul de argint în calitate de precursor și etilceluloza în calitate de agent de reducere a precursorului metalic și stabilizare a nanoparticulelor de argint în mediul de reacție. Astfel, pentru sinteza nanoparticulelor s-a preparat o soluție de etilceluloză (EC) în dimetilsulfoxid, în concentrație de 1%. Soluția de azotat de argint a fost preparată prin dizolvarea lui în dimetilsulfoxid, concentrația soluției de azotat de argint fiind de 0,01 M. În soluția de polimer s-a adăugat 2,5 ml de soluție de AgNO₃ în concentrație de 0,01 M, volumul

final al soluției de amestec fiind de 12,5 ml. Apoi soluția a fost lăsată timp de 2 ore sub agitare continuă, la temperatura camerei, în lipsa oricărui agent suplimentar de reducere sau stabilizare. O primă indicație a formării nanoparticulelor de argint a fost modificarea culorii soluției inițiale de la incolor la galben pai.

5 Formarea nanoparticulelor de argint implică următoarele etape:

i) Etapa de reducere a precursorului (azotatul de argint) de către derivatul celulozic prin intermediul grupelor hidroxilice reducătoare, disponibile de-a lungul lanțului polizaharidic, care sunt responsabile de reducerea ionilor de argint (Ag^+) la atomi liberi de argint (Ag^0). ii) Etapa de nucleație a atomilor liberi. iii) Etapa de creștere a nanoparticulelor de argint stabilizate prin interacțiunea cu moleculele de derivat celulozic, care prin intermediul grupărilor hidroxilice formează un strat/înveliș protector la suprafața particulelor și le stabilizează (stabilizare sterică).

Exemplul 4

15 Nanoparticulele de argint pe bază de acetat de celuloză (AgNPs-CA) au fost obținute la temperatura camerei, utilizând dimetilsulfoxidul (DMSO) în calitate de solvent, azotatul de argint în calitate de precursor și acetatul de celuloză în calitate de agent de reducere a precursorului metalic și stabilizare a nanoparticulelor de argint în mediul de reacție. Astfel, pentru sinteza nanoparticulelor s-a preparat o soluție de acetat de celuloză (CA) în dimetilsulfoxid, în concentrație de 1%. Soluția de azotat de argint a fost preparată prin dizolvarea lui în dimetilsulfoxid, concentrația soluției de azotat de argint fiind de 0,01 M. În soluția de polimer s-a adăugat 2,5 ml de soluție de AgNO_3 în concentrație de 0,01 M, volumul final al soluției de amestec fiind de 12,5 ml. Apoi soluția a fost lăsată timp de 2 ore sub agitare continuă, la temperatura camerei, în lipsa oricărui agent suplimentar de reducere sau stabilizare. O primă indicație a formării nanoparticulelor de argint a fost modificarea culorii soluției inițiale de la incolor la galben deschis.

Formarea nanoparticulelor de argint implică următoarele etape:

25 i) Etapa de reducere a precursorului (azotatul de argint) de către derivatul celulozic prin intermediul grupelor hidroxilice reducătoare, disponibile de-a lungul lanțului polizaharidic, care sunt responsabile de reducerea ionilor de argint (Ag^+) la atomi liberi de argint (Ag^0). ii) Etapa de nucleație a atomilor liberi. iii) Etapa de creștere a nanoparticulelor de argint stabilizate prin interacțiunea cu moleculele de derivat celulozic, care prin intermediul grupărilor hidroxilice formează un strat/înveliș protector la suprafața particulelor și le stabilizează (stabilizare sterică).

Caracterizarea nanoparticulelor de argint prin spectroscopia de absorbție UV- VIS.

35 Caracterizarea nanoparticulelor de argint s-a efectuat prin utilizarea spectroscopiei în domeniul ultraviolet și vizibil (UV-VIS), care a permis confirmarea inițială a nanoparticulelor de argint sintetizate, folosind spectrofotometrul UV-vizibil JascoV-550, la lungimea de undă de 200...600 nm.

40 O caracteristică esențială a nanoparticulelor de argint, este modul în care electronii liberi din banda de conducție ai argintului interacționează cu lumina, fenomen cunoscut sub denumirea de rezonanță plasmonică de suprafață (SPR), care determină apariția unei benzi de absorbție în spectrul UV-VIS. În general, nanoparticulele de argint absorb lumina în regiunea vizibilă a spectrului electromagnetic la lungimi de undă cuprinse între 380 și 450 nm, prezentând culori distincte în funcție de dimensiune, formă și mediul lor. În figura 1 sunt prezentate spectrele de absorbție UV-VIS pentru nanoparticulele de argint stabilizate cu derivați celulozici, fiecare prezentând valori SPR caracteristice în funcție de derivatul celulozic utilizat: nanoparticule de argint stabilizate cu acetatul de celuloză (AgNPs-CA - 411 nm), nanoparticule de argint stabilizate cu etilceluloză (AgNPs-EC - 382 nm), nanoparticule de argint stabilizate cu metilceluloză (AgNPs-MC - 389 nm), nanoparticule de argint stabilizate cu hidroxipropilceluloză (AgNPsHPC - 393 nm), indicând obținerea cu succes a nanoparticulelor de argint.

50 Totodată, a fost utilizată microscopia electronică de transmisie cu scanare (STEM) în scopul studierii morfologiei, suprafeței dimensiunilor nanoparticulelor de argint sintetizate, utilizând microscopul electronic de transmisie cu scanare Supra Zeiss cu rezoluție de 1 nm, la 30 kV cu detector Oxford EDS de 20 mm. Astfel, 10 μl de probă a fost aplicată pe suport și uscată în condiții atmosferice înainte de analiză. A fost realizată microscopia electronică de transmisie (TEM): imaginile TEM au fost efectuate cu microscopul electronic Hitachi High-Tech HT7700 (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japonia), folosind câte 1 μl de soluție de AgNPs plasată direct pe o rețea de cupru acoperită cu carbon și lăsată să se usuce înainte de analiza TEM în condiții atmosferice.

Determinarea dimensiunii nanoparticulelor a fost efectuată utilizând programul Image J.

55 Din imaginile STEM și TEM se observă că dimensiunea nanoparticulelor de argint depinde în mare măsură de tipul de derivat celulozic folosit în reacția de reducere a precursorului (AgNO_3). Astfel, în cazul utilizării acetatului de celuloză în calitate de stabilizator se obțin nanoparticule de

argint cu dimensiunile cele mai mici (16...19 nm), în timp ce nanoparticulele stabilizate de etilceluloză formează agregate mai mari (80...100 nm). De asemenea, din toate imaginile se poate observa că forma nanoparticulelor este sferică (figura 2a, 2b - imagini a) STEM b) TEM ale nanoparticulelor de argint stabilizate cu derivați celulozici).

5 Potențialul zeta (ζ) și dimensiunea medie a particulelor au fost măsurate cu ajutorul aparatului Zeta Sizer model Nano ZS (Malvern Instruments, UK), dotat cu un laser He-Ne și utilizând metoda împrăștierei luminii în regim dinamic (DLS). Tehnica DLS s-a aplicat ca principiu de măsurare a dimensiunii particulei, difracția luminii laser (633 nm) și electroforeza laser cu efect Doppler pentru determinarea potențialului zeta.

10 Diametrul mediu al AgNPs determinat prin TEM a fost comparat cu diametrul determinat prin difuzia dinamică a luminii (DLS). Indicele de polidispersitate (IP) determinat prin corelarea datelor DLS prezintă valori rezonabile, variind de la 0,263 în cazul probei AgNPs-CA (nanoparticule de argint stabilizate cu acetat de celuloză), la 0,485 pentru proba AgNPs-EC (nanoparticule de argint stabilizate cu etilceluloză) indică o polidispersitate dimensională relativ îngustă. Diametrul mediu
15 obținut în urma analizelor DLS variază în funcție de tipul de derivat celulozic folosit, de la 119,7 nm pentru AgNPs-HPC (nanoparticule de argint stabilizate cu hidroxipropilceluloză) la 491 nm pentru AgNPs-EC (nanoparticule de argint stabilizate cu etilceluloză). Rezultatele obținute pentru diametrul mediu prin analiza TEM diferă vizibil de cele obținute prin analiza DLS. Diferențele dintre valorile
20 obținute prin cele două metode sunt datorate în special proceselor implicate în obținerea probelor, tehnica TEM utilizând probe în stare uscată pentru a determina dimensiunea particulelor, în timp ce metoda DLS implică măsurători ale dimensiunilor particulelor în stare hidratată a probelor. În aceste condiții considerăm că dimensiunea obținută prin analiza TEM este dimensiunea reală a
25 nanoparticulelor, în timp ce diametrul măsurat prin metoda DLS este un diametru hidrodinamic, care pare să fie supraestimat, datorită interacțiunilor puternice dintre solvent și constituenții nanoparticulelor. De asemenea, analizând valorile potențialului zeta (tabelul I) obținute pentru particulele de argint, se observă că toate probele prezintă valori negative ale potențialului zeta, cea mai bună stabilitate a nanoparticulelor fiind în cazul probei AgNPs-CA (nanoparticule de argint stabilizate cu acetat de celuloză) (-24,5 mV), cea mai mică în cazul nanoparticulelor de argint stabilizate cu metilceluloză AgNPs-MC (-1,93 mV).

30

Diametrul mediului determinat prin TEM DLC, indicele de polidispersitate și valoarea potențialului zeta pentru nanoparticulele de argint stabilizate cu derivați celulozici

Tabelul 1

Tipul nanoparticulelor de argint (AgNPs)	Diametrul mediu determinat prin TEM (nm)	Diametrul mediu determinat prin DLC (d.nm)	Indice de polidispersitate (IP)	ζ potențial (mV)
Nanoparticule de argint stabilizate cu acetat de celuloză (AgNPs-CA)	16-19 nm	432	0,263	-24,5
Nanoparticule de argint stabilizate cu etilceluloză (AgNPs-EC)	80-100 nm	491	0,485	-8,24
Nanoparticule de argint stabilizate cu metilceluloză (AgNPs-MC)	19-90 nm	348	0,302	-1,93
Nanoparticule de argint stabilizate cu hidroxipropilceluloză (AgNPs-HPC)	25-99 nm	119,7	0,269	-7,12

35 Valorile CMI nanoparticulelor de argint stabilizate cu derivați ai celulozei, atât față de speciile de *Candida albicans*, cât și față de speciile de *Candida non-albicans* au fost evaluate utilizând tehnica microdiluiției după standardul EUCAST E.Def. 7.32, modificată. Testările au fost efectuate în

mediu lichid Mueller Hinton dublu concentrat, suplimentat cu glucoză de 2% și s-a utilizat un inocul de 10^5 UFC/godeu. S-au realizat diluții în serie pentru toți cei patru derivați de celuloză cu AgNO_3 (hidroxipropilceluloză, metilceluloză, etilceluloză, acetatul de celuloză), variind de la 2 la 0,0312 mM. S-a folosit controlul de creștere al levurilor și controlul sterilității pentru a asigura fiabilitatea testărilor. Incubarea a fost efectuată la temperatura de 37°C , timp 72 de ore. CMI a fost considerată cea mai scăzută concentrație minimă inhibitoare, fără creștere vizuală a levurilor testate. Concentrația minimă fungicidă (CMF) a fost evaluată prin inocularea a 10 μl din godeurile care nu au prezentat creștere pe plăcile cu Sabouraud Dextrose Agar (SDA), urmat de incubare la temperatura de 37°C , timp de 72 de ore. Valoarea CMF a fost considerată cea mai scăzută concentrație, care nu a prezentat creștere sau cu mai puțin de trei colonii, în cazul subculturilor. Valorile CMI și CMF obținute pentru derivații de celuloză cu AgNO_3 față de speciile din cadrul genului *Candida* sunt prezentate în tabelul 2.

Activitatea antifungică (CMI; CMF; mM) a nanoparticulelor de argint stabilizate cu derivați ai celulozei

Tabelul 2

Tulpini	AgNPs MC		AgNPs HPC		AgNPs - CA		AgNPs - EC	
	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
<i>C. albicans</i>	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
<i>C. glabrata</i>	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
<i>C. dubliniensis</i>	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
<i>C. parapsilosis</i>	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
<i>C. tropicalis</i>	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
<i>C. guilliermondii</i>	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
<i>C. norvegensis</i>	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
<i>C. krusei</i>	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625
<i>C. robusta</i>	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625
<i>C. neoformans</i>	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625
<i>C. kefyr</i>	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625
<i>C. lusitaniae</i>	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625
<i>C. pelliculosa</i>	0,0625	0,125	0,0625	0,0625	0,0625	0,125	0,0625	0,125

CMI = concentrația minimă inhibitoare; CMF = concentrația minimă fungicidă

Toți derivații de celuloză au prezentat un potențial antifungic ridicat, comparativ cu nanoparticulele de argint încorporate în matricea pululanului, cu valori ale CMI cuprinse între 0,0625...0,125 mM (concentrația de argint). Legat de activitatea antifungică a principalilor derivați de celuloză cu AgNO_3 , aceștia au acționat similar față de speciile *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. norvegensis* cu o valoare a CMI de 0,125 mM; în timp ce față de *C. krusei*, *C. robusta*, *C. kefyr*, *C. neoformans*, *C. lusitaniae* și *C. pelliculosa* au prezentat un grad mai mare de inhibare a creșterii levurice cu o valoare a CMI de 0,0626 mM.

Comparativ cu cea mai apropiată soluție, pe baza valorilor CMF, toți derivații de celuloză au prezentat o activitate "cidă" uniformă și cu o singură valoare a CMI față de toate speciile levurice luate în studiu.

Procedeu propus include o direcție nouă în domeniul nanotehnologiei și medicinei, anume utilizarea nanoparticulelor de argint obținute prin acest procedeu manifestă un efect antifungic ridicat față de toate speciile levurice luate în studiu, cu valori ale CMI mult mai mici și mai uniforme comparativ cu soluția cea mai apropiată.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Burduniuc O., Bostanaru A.C., Mares M., Biliuta G., Coseri S. Synthesis, Characterization, and Antifungal Activity of Silver Nanoparticles Embedded in Pullulan Matrices. *Materials* (Basel). 2021 Nov 20, vol. 14(22), p. 7041 doi: 10.3390/ma14227041. PMID: 34832441; PMCID: PMC8622049

(57) Revendicări:

1. Procedeu de obținere a materialelor pe bază de nanoparticule de argint cu activitate antifungică, care constă în aceea că se prepară o soluție de azotat de argint cu concentrația de 0,01 M prin dizolvarea lui în apă bidistilată sau dimetilsulfoxid, de asemenea, se prepară o soluție cu concentrația de 1% de un derivat celulozic în apă bidistilată sau dimetilsulfoxid, apoi în soluția cu derivatul celulozic se adaugă soluție de azotat de argint într-un raport volumic de 4:1, care se agită continuu, timp de 2 ore, la temperatura camerei.

2. Procedeu, conform revendicării 1, în calitate de derivat celulozic se utilizează hidroxipropilceluloză, metilceluloză, etilceluloză sau acetat de celuloză.

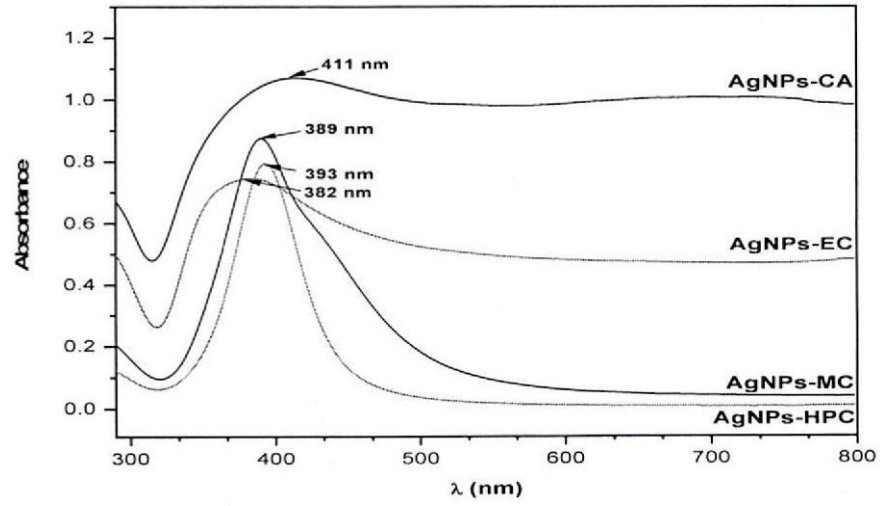


Fig. 1

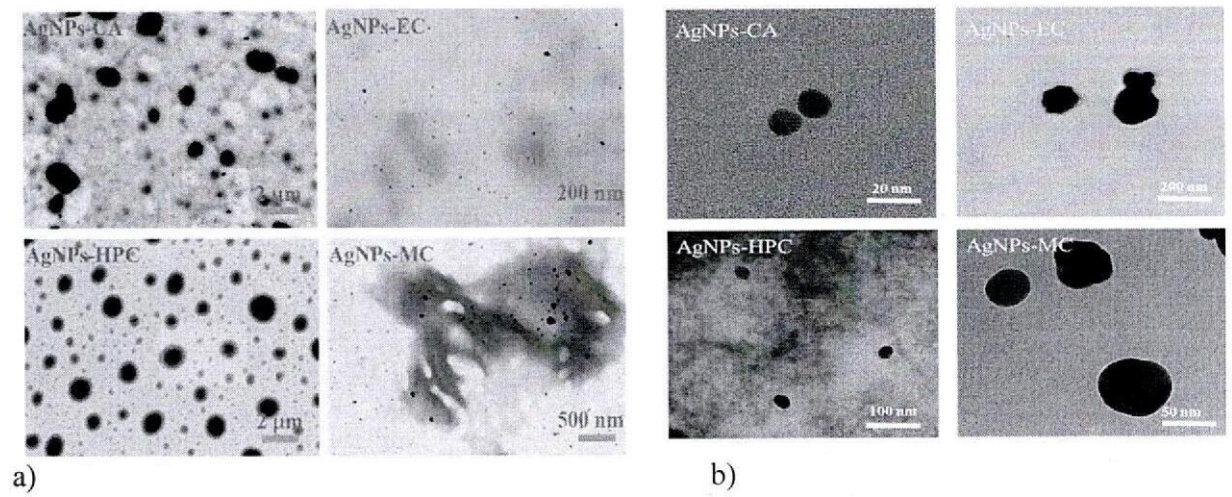


Fig. 2