



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00126

(22) Data de depozit: 16/03/2022

(41) Data publicării cererii:  
29/09/2023 BOPI nr. 9/2023

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,  
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• NISTOR CRISTINA LAVINIA,  
ȘOS. ALEXANDRIA NR. 16, BL. L4, ET. 1,  
AP. 41, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;  
• CİNTEZA OTILIA-LUDMILA, STR.SIBIU  
NR.15, BL.Z8, SC.1, AP.15, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• MIHĂESCU CĂTĂLIN IONUȚ, BD.TRAIAN  
VUIA, NR.20, BL.Y19, SC.2, ET.3, AP.35,  
GALAȚI, GL, RO;

• BURLACU SABINA GEORGIANA,  
STR.RAHOVEI, NR.24-26, SC.B, E.2, AP.12,  
BRAGADIRU, IF, RO;  
• PETCU CRISTIAN, B-DUL 1 MAI NR. 15  
BL. C3, SC. 3, AP.104, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• NINCIULEANU CLAUDIA MIHAELA,  
STR.ZORILOR NR.1, BL.P3, SC.A, ET.4,  
AP.28, RÂMNICU VÂLCEA, VL, RO;  
• SCOMOROSCENCO CRISTINA,  
BD.METALURGIEI, NR.468-472, BL.C7,  
AP.28, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;  
• IANCHIȘ RALUCA, STR. COPȘA MICĂ  
NR. 24A, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;  
• GÎFU IOANA CĂTĂLINA,  
STR. TINERETULUI, NR.15, BL.26, SC.B,  
AP.38, MORENI, DB, RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI PRODUS PE BAZĂ  
DE NANOPARTICULE CU EFECT SINERGETIC ASUPRA  
STRESULUI OXIDATIV NEURONAL ȘI ASUPRA FORMĂRII  
FIBRILELOR  $\beta$ -AMILOIDICE PENTRU TRATAMENTUL  
PREVENTIV AL BOLII ALZHEIMER**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs pe bază de nanoparticule cu proprietăți de reducere a stresului oxidativ și de prevenire a formării plăcilor  $\beta$ -amiloidice extracelulare cerebrale caracteristice unor afecțiuni neurodegenerative. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de: încapsulare a ingredientului bioactiv curcumină în particule de silice mezoporoasă sintetizate *in situ* printr-un procedeu sol-gel în mediu apos, la temperatura de 40°C, în prezență de polioxietilensorbitan monooleat ca surfactant, utilizând ca sursă de silice trietoxi(fenil) silan și (3-aminopropil)triethoxisilan, adăugare de nanoparticule (NP)

de Ag în sistemul sol-gel cu absorbția acestora pe suprafața particulelor de silice încărcate cu curcumină, grefarea lanțurilor de PEG 750 la suprafața particulelor de silice și menținerea amestecului de reacție sub agitare, la 40°C, timp de 12 h, rezultând particule funcționalizate de PEG-silice încărcate cu curcumină și NP de Ag care acționează simultan ca vectori de transport pentru ingredientul activ, precum și ca inhibitori al fibrilării  $\beta$ -amiloidice.

Revendicări: 3  
Figuri: 2

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr. ....	a 2022 00126
Data depozit .....	16-03-2022

30

**Procedeu de obținere a unui produs pe bază de nanoparticule cu efect sinergetic asupra stresului oxidativ neuronal și asupra formării fibrilelor  $\beta$ -amiloidice pentru tratamentul preventiv al bolii Alzheimer**

Invenția constă într-un procedeu de obținere a unui produs eficient și inovativ cu proprietăți de inhibare a fibrilării  $\beta$ -amiloidice, fenomen caracteristic unor afecțiuni neurodegenerative, ca de exemplu boala Alzheimer. Acest nou produs include ingrediente bioactive cu efect asupra stresului oxidativ neuronal (curcumină) și fibrilării beta-amiloidice (nanoparticule de Ag cu forma triunghiulară) și un nanopurtător de substanță bioactivă (particule de silice funcționalizate cu PEG și încărcate cu curcumină) care poate acționa în același timp și ca inhibitor al fibrilării beta-amiloidice.

Boala Alzheimer este una dintre cele mai frecvente boli ale creierului asociate cu vârsta, caracterizată prin formarea de plăci de  $\beta$ -amiloid extracelulare cerebrale și de neurofibrilari intracelulare, care declanșează o afectare a disfuncției cognitive. Peptidele  $\beta$ -amiloidice ( $A\beta$ ), cum ar fi  $A\beta_{42}$  sau  $A\beta_{40}$ , provin din proteina precursor de amiloid (APP) și pot manifesta un fenomen de agregare anormală, care se consideră că joacă un rol important în procesul patologic.

Bariera hematoencefalică (BBB) acționează ca o protecție pentru sistemul nervos central (SNC) împotriva posibilelor deteriorări datorate substanțelor care provin din circulația sângelui. Dar, în același timp, BBB limitează pătrunderea medicamentelor în creier și este unul dintre obstacolele clinice majore în calea tratamentului bolilor SNC. Pentru a penetra această barieră și pentru a elibera medicamente în matricea cerebrală au fost deja testate diferite sisteme de livrare bazate pe nanotehnologie. Unii dintre candidații binecunoscuți pentru livrarea țintită a medicamentelor în SNC sunt sistemele coloidale, bazate pe nanoparticule (NPs). De asemenea, circulația de lungă durată în fluxul sanguin a NPs după administrare este una dintre cele mai importante cerințe pentru sistemele de eliberare a medicamentelor, deoarece sistemul reticuloendotelial (SRE) este un agent activ în îndepărtarea acestora. Totuși, unele caracteristici ale NPs, cum ar fi dimensiunea și funcționalizarea suprafeței, le ajută să evite recunoașterea de către SRE și să reziste mai mult timp în circulația sanguină. Astfel, modificarea suprafeței NPs cu diferite molecule organice, cum ar fi polietilenglicolii (PEG) constituie o strategie promițătoare pentru creșterea timpului de înjumătățire și persistență în fluxul sanguin. Un strat extern de lanțuri PEG hidrofile în jurul suprafeței particulei camuflează particulele contra recunoașterii de către SRE și asigură un timp mai lung de rezidență în plasmă.

Curcumina este un medicament polifenolic cunoscut, care are un mare potențial ca agent terapeutic, însă prezintă dezavantajul unei biodisponibilități foarte scăzute. Până în prezent, nanoparticulele de silice încărcate cu curcumină au fost utilizate în special pe tratamentul cancerului, dar unele studii recente au arătat că acestea pot avea, de asemenea, potențial pentru tratamentul altor boli cronice și care pun viața în pericol, inclusiv Alzheimer, diabet, infecții, precum și diferite boli de rinichi, hepatice sau cardiovasculare.

Este cunoscut din brevetul **US9187397B2** faptul că curcumina prezintă activitate antiinflamatoare și este un puternic anti-oxidant și captator de radicali liberi. La șoarecii

transgenici care supraexprimă APP, curcumina a redus nivelurile de proteine oxidate și de citokină inflamatorie IL 1 (Lim et al., (2001).J Neurosci 2,8370-8377), oferind astfel o potențială terapie împotriva activării microgliale la pacienții cu boala Alzheimer.

De asemenea, este cunoscut din brevetul **CN107296802B** că au fost obținute microcapsulele de tip silice poroasă hidrofobizată, încărcate cu curcumină, cu activitate antioxidantă, care îmbunătățesc în mod eficient solubilitatea în apă și stabilitatea curcuminei.

Din brevetul **US20210322580A1** este cunoscut că nanopurtători de silice hibridizată cu nanoparticule superparamagnetice de oxid de fier (SPIONs) și încărcăți cu curcumină prin tehnica de adsorbție forțată sau la echilibru pot fi utilizați pentru livrarea simultană către o țintă, în scop de diagnostic sau terapeutic, ca de exemplu, pentru imagistica prin rezonanță magnetică sau pentru livrarea țintită a curcuminei către o celulă sau un țesut. Nanocombinația este funcționalizată cu chitosan, acid poliacrilic, acid poliglicolic sau alt agent pentru a crește biocompatibilitatea sa in vivo.

Brevetul **ES2885052T3** se referă la obținerea unei formulări de tip gel, constând dintr-un gel, o nanoformulare de curcumină solubilă în apă, o nanoformulare de extract etanolic de *Emblia Officinalis* solubilă în apă și o nanoformulare solubilă în apă a unui extract etanolic de *Camellia Sinensis*, în care gelul menționat este *Aloe vera* sau silicagel. Formularea este destinată preparării de plasturi transdermici pentru administrarea de fitofarmaceutice. Invenția cuprinde potențiale proprietăți antiinflamatorii, antioxidante, antimicrobiene, anticancer și de vindecare a rănilor. Mai mult, inventatorii consideră invenția utilă, de asemenea, pentru boala Alzheimer și pentru scleroza multiplă.

La rândul său, brevetul **WO 2014/147638** se referă la o matrice pentru îmbunătățirea vindecării rănilor compusă dintr-un țesut hidrofil acoperit cu chitosan zwitterionic cu masă moleculară mică, pe de o parte, și particule de curcumină (în care nanoparticulele de curcumină sunt produse prin ultrasonicare) și extract de tulsii, pe de altă parte.

Invenția **CN102225919B** dezvăluie un analog de curcumină și o metodă de preparare a acestuia, precum și aplicarea analogului în prepararea unui medicament rezistent la boala Alzheimer. A fost observat că analogul curcuminei are un efect evident de inhibare asupra agregării fibrilelor beta-amiloidice, are o capacitate puternică de a reduce radicalii de oxigen și, în același timp, este capabil să chelaze ionii metalici divalenți, cum ar fi ionii feroși ( $Fe^{2+}$ ) sau ionii de cupru ( $Cu^{2+}$ ).

În brevetul **ES2427216T3** este prezentată o compoziție de curcuminoid care oferă o biodisponibilitate orală îmbunătățită, cuprinzând: un curcuminoid; un antioxidant; un vehicul solubilizator în apă, acceptabil farmaceutic, care cuprinde: (a) micelle lipidice în care compoziția este furnizată sub formă de microemulsie, nanoparticule solide sau micelle lipidice; sau (b) un ulei microîncapsulat în care compoziția este furnizată ca un ulei microîncapsulat și în care compoziția este adecvată pentru administrare orală.

De asemenea, brevetul **US20180318217A1** include o compoziție pentru încărcarea eficientă a curcuminei, cuprinzând: o cantitate dintr-un complex curcuminoid: lipozom eficient pentru a încărca curcumina în lipozom, în care curcuminoizii au între 2 până la 9 procente în greutate din compoziția totală și curcuminoizii sunt naturali sau sintetici.

Cheng și colab. [C.S. Cheng, T.P. Liu, F.C. Chien, C.Y. Mou, S.W. Wu, Y.P. Chen, "Codelivery of Plasmid and Curcumin with Mesoporous Silica Nanoparticles for

**Promoting Neurite Outgrowth**”, ACS Appl. Mater. Interfaces 2019, 11(17), 15322-15331] au raportat utilizarea unor nanoparticule de silice mezoporoasă încărcate cu curcumină, pentru terapia neurodegenerativă. Această abordare a implicat co-livrarea direcționată a curcuminei pentru a preveni daunele celulare cauzate de speciile reactive de oxigen. Grupul a propus că nanoparticulele modificate cu curcumină au capacitatea de a încetini sau de a preveni tulburările neurologice precum Alzheimer, Parkinson etc. De asemenea, Li și colab. [L. Hadisoewignyo, S. B. Hartono, A. Kresnamurti, I. Soeliono, Y. Nataline, G.A. Prakoso, D.A.R. E. Aulia, “**Evaluation of anti-inflammatory activity and biocompatibility of curcumin loaded mesoporous silica nanoparticles as an oral drug delivery system**”, Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology 2018, 9(3), 035007] au sintetizat nanoparticule de silice mezoporoasă (MSN) PEG-ilate în care au încapsulat paclitaxel și curcumină. Experimentele de eliberare in vitro ale nanoparticulelor de silice modificate cu curcumină și paclitaxel au dezvăluit un efect citotoxic clar și persistent împotriva celulelor cancerului mamar canin.

Invenția noastră se referă la obținerea unui produs nanoformat original, pentru prevenirea bolii Alzheimer, cu proprietăți de reducere a stresului oxidativ și de prevenire a formării plăcilor  $\beta$ -amiloidice, bazat pe particule de silice mezoporoasă funcționalizate cu PEG<sub>750</sub> și încărcate cu nanoparticule (NPs) de Ag și cu curcumină.

**Problema tehnică pe care o rezolvă invenția** constă în realizarea unui procedeu de obținere a unui produs capabil să prevină formarea de plăci  $\beta$ -amiloidice extracelulare cerebrale prin împiedicarea agregării fibrilelor  $\beta$ -amiloidice. Noul produs își propune să prevină boala Alzheimer, folosind un nou nanosistem, bazat pe particule de PEG-silice încărcate cu Ag și curcumină, care, pe lângă rolul esențial de a preveni agregarea fibrilelor  $\beta$ -amiloidice, va avea, de asemenea, și proprietăți antioxidante și antiinflamatorii. În plus, produsul protejează moleculele de curcumină, facilitează pătrunderea lor în sistemul nervos central prin penetrarea barierii hemato-encefalice (BBB) și permite eliberarea graduală a acestora.

#### **Expunerea invenției:**

Invenția se referă la procedeul de obținere al unui produs nanoformat, cu capacitatea de a preveni apariția bolii Alzheimer, care include ingrediente bioactive cu efect asupra stresului oxidativ neuronal (curcumină) și fibrilării beta-amiloidice (nanoparticule de Ag cu formă triunghiulară) și un vector de transport al substanței bioactive (particule de silice funcționalizate cu PEG<sub>750</sub> și încărcate cu curcumină), care poate acționa în același timp și ca inhibitor al fibrilării beta-amiloidice.

Pentru realizarea acestui produs, a fost selectată o formulare hibridă, bazată pe încapsularea curcuminei în particule de silice sintetizate *in situ* printr-un procedeu sol-gel în mediu apos, la temperatura de 40°C. În cadrul acestei sinteze s-a utilizat Tween 80 (polioxietilensorbitan monooleat) ca surfactant, iar butanolul a avut rol de co-surfactant. Precursorul de silice din care s-au sintetizat particulele în care a fost încapsulată curcumina a fost trietoxi(fenil)silanul (PhTES). Alături de PhTES a mai fost adăugat în amestecul sol-gel un co-precursor de silice, (3-aminopropil)trietoxisilan (APTES), care, pe de o parte participă la reacția sol-gel împreună cu PhTES, iar pe de altă parte asigură un pH bazic în amestecul de

reacție, fără a mai fi necesară adăugarea de hidroxid de amoniu ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ). Raportul gravimetric PhTES/APTES a fost de 5/1. Particulele de silice încărcate cu curcumină au fost funcționalizate ulterior cu  $\text{PEG}_{750}$  și încărcate cu NPs de Ag cu morfologie specială (nanoparticule triunghiulare, disponibile comercial - *NanoXact Silver Nanoplates – PVP* ( $\lambda$  660 nm; diametrul 40 nm), producător *NanoComposix*). Pentru a se putea cupla covalent la suprafața particulelor de silice,  $\text{PEG}_{750}$  a fost în prealabil modificat, fiind conectat covalent, prin formarea unei punți uretanice, cu un alt co-precursor de silice, prevăzut cu funcțiuni izocianat, (3-isocyanatopropyl)triethoxysilane (NCOTEOS), la un raport molar de 1/1. Legăturile covalente uretanice s-au format între grupările hidroxil de la  $\text{PEG}_{750}$  și grupările izocianat de la NCOTEOS, rezultând un derivat silanic, notat  $\text{PEG}_{750}\text{-Si}$ . Acest nou compus a fost utilizat pentru a putea grefa, prin intermediul reacțiilor de hidroliză și condensare care au loc în timpul sintezei sol-gel, lanțurile de PEG la suprafața particulelor de silice încărcate cu curcumină. La finalul sintezei, particulele rezultate au fost spălate prin dializă.

Vectorii de transport de tip silice mezoporoasă au fost utilizați pentru a încapsula curcumina cu scopul de a-i crește solubilitatea, permeabilitatea prin membrana hematoencefalică și biodisponibilitatea prin împiedicarea rearanjării și formării de auto-ansamble moleculare.

#### **Modul de lucru**

Pentru obținerea produsului cu aplicabilitate în prevenirea bolii Alzheimer s-a procedat astfel:

**Pasul 1:** Sinteza particulelor de silice s-a realizat printr-un procedeu sol-gel în mediu apos, la temperatura de 40 °C, care permite conservarea proprietăților bioactive ale curcuminei. Încapsularea curcuminei s-a realizat *in-situ*, principiul activ fiind prezent în sistem în timpul sintezei rețelei de  $\text{SiO}_2$ . Pentru început, a fost preparată o soluție de surfactant Tween 80 în apă distilată, sub agitare magnetică, la temperatura de 40 °C. Sinteza s-a desfășurat în interiorul unui vas Erlenmeyer prevăzut cu dop, introdus într-o baie de apă, încălzită la 40°C. A fost adăugată apoi o cantitate de butanol (pentru o mai bună emulsifiere) și soluția de curcumină solubilizată în dimetil sulfoxid (DMSO). Amestecul rezultat a fost menținut sub agitare magnetică și la temperatura de 40 °C timp de ~ 2 minute.

**Pasul 2:** Peste amestecul obținut la pasul 1, a fost adăugat în picătură, cu ajutorul unei pâlnii de picurare, precursorul de silice PhTES. Amestecul format a fost lăsat sub agitare magnetică și la temperatura de 40 °C timp de 1h, pentru ca reacțiile sol-gel să înceapă și particulele de silice să înceapă să se formeze în interiorul micelilor de surfactant.

**Pasul 3:** În cadrul acestui pas a fost adăugat co-precursorul de silice APTES. La adăugarea acestuia, sub acțiunea mediului bazic, culoarea portocaliu intens a amestecului din vas a virat către roșu intens. Însă în scurt timp, intensitatea culorii a început să scadă, pe măsură ce curcumina era captată în interiorul particulelor de silice care continuau să crească. Amestecul astfel format a fost menținut sub agitare magnetică și la temperatura de 40 °C încă 1h.

**Pasul 4:** Peste particulele de silice încărcate cu curcumină a fost adăugată apoi o dispersie de NPs de Ag (concentrația de Ag în dispersie a fost de 29.6 mg/Kg; nanoparticule triunghiulare, disponibile comercial - *NanoXact Silver Nanoplates – PVP* ( $\lambda$  660 nm; diametrul 40 nm), producător *NanoComposix*). A fost continuată agitarea magnetică și amestecul a fost menținut

în continuare la 40 °C pentru încă 30 de minute. În prezența acestei dispersii de NPs de Ag, aspectul probelor s-a modificat de la crem-gălbui la verzui. Cu ajutorul analizei TEM a putut fi pus în evidență sistemul de NPs de silice încărcate cu curcumină (neacoperite cu PEG), pe suprafața cărora s-au atașat NPs plate de Ag de formă triunghiulară.

**Pasul 5:** În vederea grefării de lanțuri de PEG pe suprafața particulelor de silice încărcate cu curcumină și cu NPs de Ag a fost adăugat apoi peste amestecul de reacție un derivat de silice, notat de noi PEG<sub>750</sub> – Si și preparat în aceeași zi prin reacționarea poli(etilenglicol metil eter) cu masa moleculară MW 750 (PEG<sub>750</sub>) cu (3-isocianatopropil) triethoxisilan (NCOTEOS), la un raport molar de 1/1, în prezență de catalizator 1,4-diazabicyclo 2.2.2 octan (DABCO), la ~70 °C, timp de 3h. După adăugarea tuturor reactanților, proba a fost menținută timp de 12 de ore sub agitare magnetică, la temperatura de 40°C.

**Pasul 6:** În cele din urmă, particulele de silice rezultate au fost spălate prin dializare timp de 3 zile.

**Aparatura:** Pentru omogenizarea probelor s-a folosit un agitator mecanic STIRRER DLS (VELP Scientifica). Baia de apă a fost încălzită la 40 °C pe o plită AREX 6 Heating Magnetic Stirrer (VELP Scientifica), prevăzută cu un termoregulator VTF Digital Thermoregulator (VELP Scientifica). Dispersia rezultată după sinteză a fost dializată cu ajutorul unei membrane de dializă Spectra/Por 1 Dialysis Membrane Standard RC Tubing- MWCO: 6-8 kD, cu următoarele caracteristici: lățime membrană plată: 40 mm; diametru: 25,5 mm; volum/lungime: 5,1 mL/cm.

#### **Metode analitice de caracterizare a materiilor prime, intermediare și finite**

Pentru a studia structura, dimensiunea și aspectele morfologice ale nanopurtătorilor de curcumină de tip silice mesoporoasă, au fost efectuate următoarele analize: spectrometrie în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR), spectrometrie cu raze X cu dispersie energetică (Energy-Dispersive X-ray analysis – EDX), analiză dimensională prin împrăștierea dinamică a luminii (Dynamic Light Scattering - DLS), potențial zeta (Laser Doppler Velocimetry – LDV) și analiză morfologică prin microscopie electronică cu transmisie (TEM).

Înainte de a efectua **măsurători ale dimensiunii particulelor** (diametrele medii hidrodinamice) și ale potențialului zeta, probele au fost diluate după cum urmează: 0,4 ml de probă au fost introduse într-un balon cotat de 25 ml, care a fost completat până la semn cu apă distilată. Probele diluate au fost omogenizate prin ultrasonicare timp de 2 minute la 40°C, folosind o baie cu ultrasunete Bandelin Sonorex Digitec. Măsurătorile au fost efectuate folosind un instrument Zetasizer Nano ZS 3600 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, U.K.). Rezultatele au fost exprimate ca o medie a 6 măsurători succesive. **Spectrele FTIR** au fost realizate cu ajutorul unui echipament Tensor 37 Bruker (Bruker Instrument, Woodstock, NY, USA), în modul transmitanță, pe pastile de bromură de potasiu. Parametrii de analiză sunt: 40 scanări cu o rezoluție de 4 cm<sup>-1</sup> în domeniul lungimii de undă 4000-600 cm<sup>-1</sup>. Pentru analiza FT-IR, probele au fost preparate astfel: câte 3 picături din fiecare dispersie dializată au fost adăugate peste câte 1g de bromură de potasiu. Eșantioanele de bromură impregnate cu diferite probe au fost uscate într-o etuvă de vid RAYPA model EV-50, cu capacitatea de 50 litri (Vacuum Drying Oven RAYPA EV-50, RAYPA, Barcelona, Spain), timp de 24 h la



temperatura de 40°C. După uscare, bromura impregantă cu probă a fost transformată în pastilă transparentă prin presare într-o matriță Specac cu diametrul de 13 mm și cu capacitatea maximă de încărcare de 10 tone, (Specac, Orpington, Marea Britanie), cu ajutorul unei prese hidraulice manuale pentru FT-IR Specac (Specac, Orpington, Marea Britanie), cu capacitatea maximă de încărcare de 15 tone. Imaginile **TEM** au fost înregistrate cu un microscop electronic cu transmisie, model Tecnai G<sup>2</sup> F20 TWIN Cryo-TEM (FEI Company, USA), la o tensiune de accelerare de 200 kV, iar parametrii de lucru utilizați au fost următorii: 10 μL din suspensia inițială au fost depuși și uscați pe grile de carbon cu 200 de ochiuri (formvar grids) de la Ted Pella Inc. (USA). Spectrele EDX au fost obținute folosind un detector X-MaxN 80T (Oxford Instruments, Marea Britanie).

Procedeul prin care se asigură obținerea produsului produs nanoformat original, cu proprietăți de reducere a stresului oxidativ și de prevenire a formării plăcilor β-amiloidice, bazat pe particule funcționalizate de PEG - silice, încărcate cu NPs de Ag și cu curcumină., constă în următoarele *etape experimentale*:

- 1. Emulsionarea curcuminei solubilizate în DMSO** – Etapa constă în traparea eficientă a curcuminei solubilizate în DMSO în micellele formate de surfactant (Tween 80) și de co-surfactant (butanol).
- 2. Începutul formării in situ a particulelor de silice capabile să trapeze curcumina** – Etapa constă în autoasamblarea moleculelor de precursor de silice (PhTES) în jurul micellelor de surfactant care conțin curcumina și în începutul formării rețelei hibride de silice în urma reacțiilor sol-gel.
- 3. Formarea particulelor de silice încărcate cu curcumină** – În această etapă s-a avut în vedere formarea vectorilor de silice mezoporoasă care conțin curcumina în urma reacțiilor sol-gel desfășurate în mediu apos la pH bazic (pH ~8-9), care au loc între precursorul PhTES și co-precursorul de silice APTES.
- 4. Adsorbția nanoparticulelor de Ag la suprafața nanoparticulelor de silice încărcate cu curcumină** – În urma adăugării dispersiei de NPs de Ag cu formă triunghiulară, acestea s-au adsorbit complet pe suprafața particulelor de silice.
- 5. Grefarea lanțurilor de PEG la suprafața particulelor de silice încărcate cu curcumină și cu NPs de Ag** – Derivatul de silice PEG<sub>750</sub> –Si proapăt preparat a fost adăugat în sistemul sol-gel, facilitând cuplarea covalentă a lanțurilor de PEG<sub>750</sub> prevăzute cu grupări trietoxi-silan la rețeaua de silice din care este constituită matricea în care a fost încapsulată curcumina.
- 6. Spălarea particulelor de silice prin dializare** – Vectorii de transport rezultați, de tip silice, au fost purificați prin dializare în scopul îndepărtării surfactanților.

*Avantajele* utilizării metodei conform invenției constau în:

- Dezvoltarea unui nou nanotransportor (vector de transport) capabil să penetreze bariera hematoencefalică și care facilitează livrarea medicamentelor;
- Dezvoltarea unui nou tip de nanoformulare pentru medicamente precum curcumina;
- Produsul obținut prezintă bune proprietăți antiinflamatoare, cu efecte secundare foarte scăzute.

- Metoda de preparare este simplă și convenabilă, cu surse de materie primă ușor accesibile și cost redus, iar biodisponibilitatea curcuminei este îmbunătățită.

În continuare este prezentat un exemplu de realizare a invenției, cu referire la schema 1 și la figura 1, ce reprezintă:

- figura 1 - modul de obținere a particulelor de silice încărcate cu curcumină și cu nanoparticule de Ag și funcționalizate la suprafață cu PEG<sub>750</sub>.

- figura 2 – imaginile TEM ale particulelor de silice încărcate cu curcumină și cu nanoparticule de Ag

**Exemplu:** În vederea preparării produsului, un amestec format din 1.1 g de Tween 80 dispersate în 50 mL de apă distilată, 3 mL de butanol și 250 μL de soluție de curcumină în DMSO cu concentrația de 50 mg/mL, a fost supus agitării magnetice la temperatura de 40°C timp de ~5 minute. Apoi, au fost adăugați 250 μL precursor de silice PhTES, iar amestecul rezultat a fost agitat încă o oră. După aceea, au fost adăugați 50 μL de APTES. A fost continuată încă 1h agitarea magnetică, cu menținerea temperaturii amestecului la 40 °C. Apoi a fost adăugat 1 mL din dispersia de nanoparticule de Ag ( $c_{Ag} = 29.6 \text{ mg/Kg}$ ) și s-a continuat agitarea la temperatura de 40°C timp de 30 de minute. La final, în vederea funcționalizării cu PEG<sub>750</sub> a suprafeței particulelor de silice încărcate cu curcumină, au fost adugați 1.2 mL de derivat silianic PEG<sub>750</sub> – Si, proaspăt sintetizat. După adăugarea tuturor reactanților, proba a fost menținută timp de 12 de ore sub agitare magnetică, la temperatura de 40°C. Pentru dializarea nanoformulării finale, în membrana tubulară de dializă au fost introduși 12 mL de probă sub formă de dispersie apoasă (așa cum a rezultat din sinteză), peste care au fost adăugați aproximativ 12 mL de apă distilată. Tubul încărcat și sigilat a fost introdus într-un vas Berzelius care conținea 2L de apă distilată. Proba a fost lăsată la dializat sub o ușoară agitare magnetică timp de 3 zile, apa schimbându-se la fiecare 24 de ore.

Analizele DLS au arătat că dimensiunile particulelor de silice încărcate cu curcumină au dimensiunile cuprinse în intervalul 350-520 nm. Imaginile TEM, măsurătorile valorilor potențialului zeta și analizele spectrometrice FT-IR au confirmat realizarea cu succes a unui nanosistem destinat prevenirii fibrilării beta-amiloidice, bazat pe particule de silice încărcate cu curcumină și cu nanoparticule de Ag.

*Această lucrare a fost realizată cu sprijinul Ministerul Cercetării, Inovării și Digitalizării din România, CNCS/CCCDI – UEFISCDI, în cadrul programului PNCDI III, prin proiectul cu nr. PN-III-P2-2.1-PED-2019-4657, contract nr. 318 PED/2020 (Material avansat pe bază de nanoparticule cu efect sinergetic asupra stresului oxidativ neuronal și asupra formării fibrilelor beta-amiloidice pentru tratamentul preventiv al bolii Alzheimer «NANONERVES»).*



**Procedeu de obținere a unui produs pe bază de nanoparticule cu efect sinergetic asupra stresului oxidativ neuronal și asupra formării fibrilelor  $\beta$ -amiloidice pentru tratamentul preventiv al bolii Alzheimer**

**Revendicări**

1. Procedeu de obținere al unui produs nanoformat cu capacitatea de a preveni apariția bolii Alzheimer, care include ingrediente bioactive cu efect asupra stresului oxidativ neuronal (curcumină) și fibrilării beta-amiloidice (nanoparticule de Ag cu forma triunghiulară) și un vector de transport al substanței bioactive (particule de silice funcționalizate cu PEG<sub>750</sub> și încărcate cu curcumină) care poate acționa în același timp și ca inhibitor al fibrilării beta-amiloidice, **caracterizat prin aceea că** implică următoarele etape:

- (1) Emulsionarea curcuminei solubilizate în DMSO și agitare amestecului de reacție la temperatura de 40 °C, timp de ~ 2 minute;

- (2) Adăugarea PhTES, începutul formării *in situ* a particulelor de silice capabile să trapeze curcumina și menținerea amestecului de reacție sub agitare, la temperatura de 40 °C, timp de 1h;

- (3) Adăugarea APTES, formarea particulelor de silice încărcate cu curcumină și menținerea amestecului de reacție sub agitare, la temperatura de 40 °C, timp de 1h;

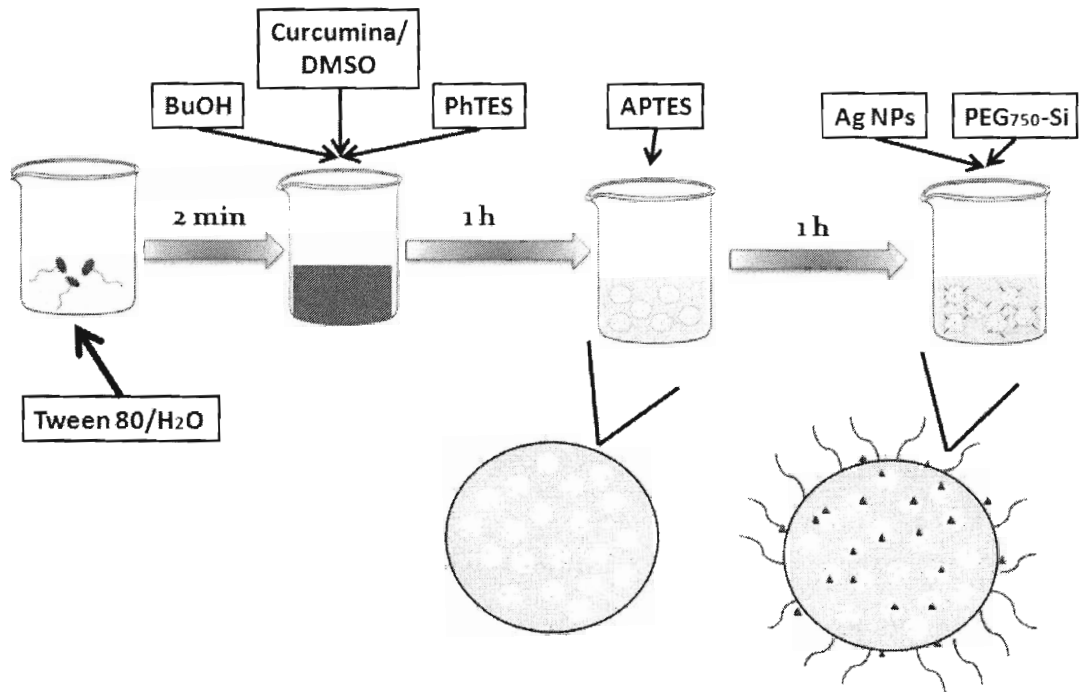
- (4) Adsorbția nanoparticulelor de Ag la suprafața nanoparticulelor de silice încărcate cu curcumină și menținerea amestecului de reacție sub agitare, la temperatura de 40 °C, timp de 30 de minute;

- (5) Grefarea lanțurilor de PEG<sub>750</sub> la suprafața particulelor de silice încărcate cu curcumină și cu NPs de Ag, prin intermediul unui derivat silanic (NCOTEOS) funcționalizat cu PEG<sub>750</sub> și menținerea amestecului de reacție sub agitare, la temperatura de 40 °C, timp de 12h;

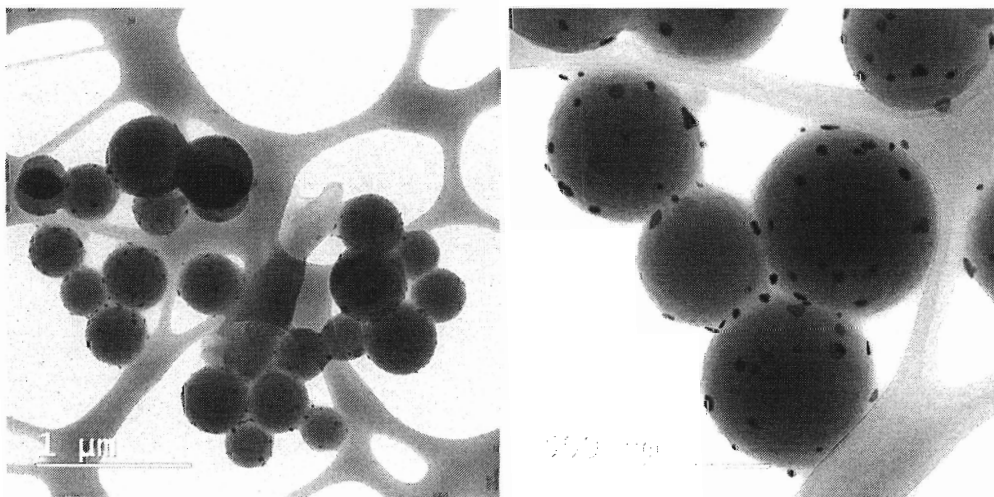
- (6) Purificarea prin dializare a vectorilor de transport obținuți.

2. Procedeu de obținere al unui produs nanoformat cu capacitatea de a preveni apariția bolii Alzheimer conform **revendicării 1, caracterizat prin aceea că** formularea este bazată pe încapsularea curcuminei în particule de silice mezoporoasă sintetizate *in situ* printr-un procedeu sol-gel în mediu apos, în prezența surfactantului Tween 80, și utilizând ca sursă de silice PhTES și APTES.

3. Procedeu de obținere al unui produs nanoformat cu capacitatea de a preveni apariția bolii Alzheimer conform **revendicării 1, caracterizat prin aceea că** particulele obținute, utilizate ca vectori de transport, au diametrele hidrodinamice medii cuprinse în intervalul 350-530 nm, nanoparticulele de Ag adăugate în sistemul sol-gel au fost complet adsorbite pe suprafața particulelor de silice încărcate cu curcumină, iar lanțurile de PEG<sub>750</sub> au fost cuplate covalent la suprafața particulelor de silice.



**Figura 1.** Modul de obținere a particulelor de silice încărcate cu curcumină și cu nanoparticule de Ag și funcționale la suprafață cu PEG<sub>750</sub>



**Figura 2.** Imaginile TEM ale particulelor de silice încărcate cu curcumină și cu nanoparticule de Ag