



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2013 00370**

(22) Data de depozit: **16/05/2013**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/10/2017** BOPI nr. **10/2017**

(41) Data publicării cererii:
27/02/2015 BOPI nr. **2/2015**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL DE BIOLOGIE - ACADEMIA ROMÂNĂ, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 296, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU INGINERIE ELECTRICĂ ICPE - CA, SPLAIUL UNIRII NR.313, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:

• **COGĂLNICEANU GINA-CARMEN, STR. PAȘCANI NR. 5, BL. D7, SC. B, ET. 2, AP. 16, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **MITOI ELENA-MONICA, DRUMUL GĂZARULUI NR. 2, BL. 105, SC. F, ET. 2, AP. 64, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **HRISTEA GABRIELA, STR. TÂRGU NEAMȚ NR.34, BL.A 17, SC.D, ET.1, AP.50, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 2005009170 (A1); EP 2035567 (A1)

(54) **PROCEDEU BIOTEHNOLOGIC DE OBȚINERE A NANOPARTICULELOR DE ARGINT**



1 Invenția se referă la un procedeu biotehnologic de obținere a nanoparticulelor de
argint, cu aplicații în domeniul medical, cosmetic și farmaceutic.

3 Se cunosc procedee de obținere a nanoparticulelor de argint care constau în metode
ce includ utilizarea germenilor de creștere (1, 2), reducerea sărurilor (3), reducerea prin
5 utilizare de microunde (4), iradierea cu ultrasunete (5), radioliza (6, 7), metode solvotermale
(8), sinteze electrochimice (9, 10), etc.

7 Un procedeu cunoscut de sinteză a nanoparticulelor de Ag se bazează pe utilizarea
de precursori precum: AgNO_3 , citrat de sodiu și SDS (sodium dodecyl sulphat).

9 O soluție de nitrat de argint (cu concentrații ce pot varia între 1 mM și 6 mM) se
amestecă cu 8% SDS alături de un agent reducător (hidrazină); soluția de hidrazină poate
11 avea concentrații cuprinse între 2 mM și 12 mM. Se adaugă citrat de sodiu care are rol și de
stabilizator. La amestecarea precursorilor are loc o reacție de culoare ce virează de la
13 transparent la galben și, în final, către roșu-brun, indicând formarea nanoparticulelor de
argint. Purificarea nanoparticulelor de argint se realizează ulterior prin centrifugare. Pentru
15 îndepărtarea excesului de Ag ionic, coloidul rezultat este spălat cu apă deionizată și uscat
prin înghețare rapidă (freeze drying).

17 Dezavantajele procedurii prezentat sunt:

- 19 - utilizarea de substanțe toxice în protocolul de sinteză a nanoparticulelor de argint;
- 21 - controlul dificil al dimensiunii particulelor ca fiind direct dependent de condițiile de
sinteză și precursorii folosiți;
- 23 - dificultăți tehnologice în ceea ce privește posibilitatea de scale-up, producere pe
scară largă (industrială).

23 **US 2005009170 (A1)** se referă la utilizarea plantelor pentru obținerea de nano-
particule de metal. Un exemplu de realizare a invenției, cu privire la obținerea nano-
25 particulelor de argint prin metoda biologică, presupune utilizarea semințelor de lucernă din
soiul Mesa, care au fost imersate timp de 30 min într-o soluție de Captan (2 g/l) pentru a se
27 evita contaminarea fungică, au fost spălate de trei ori cu apă sterilizată deionizată, au fost
transferate în borcane cu capac conținând 75 ml mediu nutritiv steril agar-agar solidificat
29 conținând macro și microelemente, îmbogățit cu $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ și FeCl_3 , celelalte săruri de
clorură fiind substituite cu săruri pe bază de nitrat sau sulfat pentru a evita precipitarea
31 clorurii de argint. S-au adăugat ulterior 5 g masă de Difcobaocto (TM) agar pentru fiecare litru
de soluție nutritivă preparată. Sursa de ioni de argint în acest studiu a fost furnizată sub
33 formă de nitrat de argint (AgNO_3).

35 **EP 2035567 (A1)** se referă la utilizarea de bacterii probiotice selectate din grupul
Lactobacillus sp. pentru producerea unei compoziții care cuprinde nanoargint sau nanogold
sub formă coloidală la nivelul membranei bacteriene, având ca primă etapă incubarea
37 bacteriei probiotice selectate, cu o soluție apoasă care conține cel puțin 4 mM sare de argint
sau aur.

39 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în obținerea nanoparticulelor de
argint cu dimensiuni mici, uniforme, stabile și netoxice.

41 Procedeu biotehnologic de obținere a nanoparticulelor de argint conform invenției
înlătură dezavantajele menționate în stadiul tehnicii prin aceea că sunt eliminate etapele de
43 izolare și purificare a nanoparticulelor de argint.

45 Procedeu biotehnologic de obținere a nanoparticulelor de argint conform invenției
constă în aceea că plantele de căpșun obținute prin germinarea aseptică a achenelor se
cultivă nesectionate pe mediu nutritiv solid Murashige-Skoog, calusul generat la nivelul
47 hipocotilului este reprodus și menținut prin pasaje la 3 săptămâni pe mediu bazal proaspăt
MS suplimentat cu 1...3 mg/l acid 2,4 diclorfenoxiacetic, 1...3 mg/l acid α -naftil acetic,
49 0,1...2,5 mg/l K, zaharoză 15%, glucoză 15%, agar 1...15 g/l, la temperaturi de $23...25 \pm$
 $\pm 2^\circ\text{C}$; 10 mg extract brut de calus de căpșun se mojarază cu apă distilată sterilă la
51 $25...100^\circ\text{C}$, se filtrează, se centrifughează 10 min la 24°C , se menține la temperatura
camerei până la inițierea sintezei de nanoparticule de argint, urmată de introducerea, în vase

Erlenmeyer de 250 ml, a 20 ml extract brut de calus de căpșun cu 180 ml azotat de argint 1 mM. Mediul nutritiv solid Murashige-Skoog, utilizat pentru cultivarea plantelor de căpșun, conține macroelemente, microelemente, vitamine Gamborg B5, zaharoză, agar, și este suplimentat cu 1 mg/l acid 2,4 diclorfenoxiacetic și 0,1 mg/l 6-benzilaminopurină.	1
Procedeul biotehnologic de obținere a nanoparticulelor de argint conform invenției prezintă următoarele avantaje:	3
- procedeul este rapid, cu productivitate ridicată, netoxic, nanoparticulele de argint fiind de dimensiuni mici (< 20 nm), uniforme, stabile, particularități utile pentru aplicații în medicină și industrie;	5
- materia primă reprezentată de calusul de căpșun este o sursă optimă de metaboliți secundari care asigură atât agenții reducători, cât și stabilizatori pentru biosinteza nanoparticulelor de argint. Cultura este stabilă, disponibilă pe toată durata anului și lipsită de contaminanți. Mediul controlat de creștere îi asigură o bună productivitate ca masă celulară și, implicit, ca metaboliți secundari;	7
- azotatul de argint la concentrația utilizată reprezintă o materie primă accesibilă și ieftină;	9
- condițiile de sinteză nu implică o temperatură sau presiune mare, nefiind necesare instalații speciale, ci doar echipamente uzuale de laborator;	11
- calusul de căpșun nefiind toxic, nanoparticulele se utilizează direct în amestecul de reacție având activitate antimicrobiană.	13
Se dă, în continuare, un exemplu de realizare a invenției, în legătură cu fig. 1...7, care reprezintă:	15
- fig. 1, virarea rapidă a culorii amestecului de reacție ca urmare a sintezei de nanoparticule de argint, conform invenției. Culoarea este rezultatul interacțiunii electromagnetice dintre lumina incidentă și electronii de conducție din nanoparticulele de argint;	17
- fig. 2, spectrele de absorbție pentru nanoparticulele de argint sintetizate de varianta A de extract brut de calus de căpșun;	19
- fig. 3, evoluția absorbantei maxime a nanoparticulelor de argint în funcție de timpul de reacție, în cazul variantei A de extract de calus de căpșun;	21
- fig. 4, spectrele de absorbție pentru nanoparticulele de argint sintetizate de varianta B de extract brut de calus de căpșun;	23
- fig. 5, evoluția absorbantei maxime a nanoparticulelor de argint în funcție de timpul de reacție, în cazul variantei B de extract de calus de căpșun;	25
- fig. 6, spectrele de absorbție pentru nanoparticulele de argint sintetizate de varianta C de extract brut de calus de căpșun;	27
- fig. 7, evoluția absorbantei maxime a nanoparticulelor de argint în funcție de timpul de reacție, în cazul variantei C de extract de calus de căpșun.	29
Conform invenției, pentru obținerea nanoparticulelor de argint prin procedeul pe bază de calus de căpșun se folosesc următoarele materii prime:	31
- Azotat de argint 1 mM (99,85%, Acros Organics);	33
- Extract brut de calus de căpșun.	35
Procedeul conform invenției cuprinde următoarele etape:	37
1. Obținerea calusului de căpșun.	39
Plantule obținute prin germinarea aseptică a achenelor au fost utilizate ca inocul pentru inițierea culturii de calus. Cultivarea lor neseționată pe mediu nutritiv solid Murashige-Skoog (macro- și micro-elemente MS, vitamine Gamborg B5, zaharoză, agar) suplimentat cu 1 mg/l acid 2,4 diclorfenoxiacetic și 0,1 mg/l 6-benzilaminopurină a generat calus la nivelul hipocotilului. Proliferarea și menținerea acestui calus s-a realizat prin pasaje la 3 săptămâni pe mediu proaspăt, reprezentat de mediu bazal MS suplimentat cu 1...3 mg/l acid 2,4 diclorfenoxiacetic, 1...3 mg/l acid α -naftil acetic, 0,1...2,5 mg/l K, zaharoză 15%, glucoză 15%, agar 1...15 g/l, la temperaturi de 23...25°C $\pm$ 2°C.	41

2. Obținerea extractului brut de calus, țesut nediferențiat, non-morfogenetic, proliferativ, de căpșun din calus de căpșun, utilizat în sinteza de nanoparticule de argint.

Câte 10 g calus au fost mojarate împreună cu apă distilată sterilă, la temperatura de: 25°C (varianta A); 100°C (varianta B); 80°C (varianta C). Cele trei variante de extract au fost filtrate și apoi centrifugate 10 min la 24°C. Extractele au fost menținute la temperatura camerei până la momentul inițierii sintezei de nanoparticule de argint.

3. Sinteza nanoparticulelor de argint, rapidă, ecologică și eficientă, prin utilizarea extractelor brute de calus de căpșun.

Câte 20 ml extract brut de calus de căpșun din fiecare variantă au fost puși în contact cu 180 ml AgNO_3 1 mM, în vase Erlenmeyer de 250 ml.

Toate cele 3 variante de extract (varianta A, varianta B și varianta C) au mediat rapid formarea de nanoparticule de argint, fapt confirmat prin virarea culorii amestecului de sinteză de la ușor gălbui (aproape transparent) spre portocaliu, datorită rezonanței plasmonice de suprafață, caracteristică argintului nanoparticulat (fig. 1) și care determină apariția unei benzi de absorbție intensă în spectrul vizibil.

Se prezintă, în continuare, caracterizarea nanoparticulelor de argint obținute prin procedeul conform invenției:

Spectroscopie UV-VIS

Reducerea Ag^+ la Ag^0 și cinetica sintezei nanoparticulelor de argint a fost verificată periodic, la intervale de 30 min, față de apă ca referință, pentru toate cele 3 variante experimentale, la o viteză 10 nm/s, rezoluție de 1 nm, pe un domeniu de 300...600 nm, cu un spectrofotometru Analytik Jena. Datorită rezonanței plasmonice de suprafață caracteristice nanoparticulelor de argint, se formează o bandă de absorbție intensă în spectrul vizibil. Se constată creșterea absorbantei în funcție de timp (fig. 3, 5, 7), pe parcursul celor 6 h de măsurare, cu un maximum de absorbție în domeniul 420...440 nm. Varianta B reduce AgNO_3 mai repede decât celelalte două variante. După un timp de reacție de 24 h, absorbanta variantelor A și B este mai mare decât cea a variantei C, evidențiind o mai mare cantitate de nanoparticule de argint sintetizate de către extractele respective. Spectrele de absorbție UV-vis ale nanoparticulelor de argint sintetizate de cele 3 variante de extracte brute de calus de căpșun sunt prezentate în fig. 2, 4 și 6.

Microscopie electronică de baleiaj (SEM)

Analizarea prin microscopie electronică de baleiaj evidențiază sinteza unui număr mare de nanoparticule de argint, de formă predominant sferică, cu dimensiuni relativ uniforme, de până la 50 nm.

Efect antimicrobian

Efectul inhibitor al nanoparticulelor de argint sintetizate din extracte brute de calus de căpșun a fost testat asupra culturilor de microorganisme patogene: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* și *Bacillus licheniformis*.

Activitatea antimicrobiană a nanoparticulelor de Ag a fost testată împotriva unor tulpini de: *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella panama*, *Escherichia coli*, *Bacillus licheniformis* și *Pseudomonas aeruginosa*, prin metoda disc-difuziei în agar. Se constată o activitate inhibitorie a nanoparticulelor de argint mai intensă în cazul tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* și *Staphylococcus aureus*, similară celei exercitate de AgNO_3 , ceea ce confirmă faptul că efectul inhibitor al amestecului de sinteză este datorat nanoparticulelor de argint. Se menționează că extractele inițiale de calus de căpșun nu au activitate antimicrobiană.

Procedeul poate fi aplicat și la sinteza de nanoparticule de metale nobile (Au, Pt, Pd).

RO 130067 B1

Revendicări

- | | |
|---|------------------------|
| | 1 |
| 1. Procedeu biotehnologic de obținere a nanoparticulelor de argint, caracterizat prin aceea că plantele de căpșun obținute prin germinarea aseptică a achenelor se cultivă nesectionate pe mediu nutritiv solid Murashige-Skoog, calusul generat la nivelul hipocotilului este reprodus și menținut prin pasaje la 3 săptămâni pe mediu bazal proaspăt MS, suplimentat cu 1...3 mg/l acid 2,4 diclorfenoxiacetic, 1...3 mg/l acid α -naftil acetic, 0,1...2,5 mg/l K, zaharoză 15%, glucoză 15%, agar 1...15 g/l, la 23...25°C $\pm$ 2°C, 10 mg extract brut de calus de căpșun se mojarază cu apă distilată sterilă la 25...100°C, se filtrează, se centrifughează 10 min la 24°C, se menține la temperatura camerei până la inițierea sintezei de nanoparticule de argint, urmată de introducerea, în vase Erlenmeyer de 250 ml, a 20 ml extract brut de calus de căpșun cu 180 ml azotat de argint 1 mM. | 3
5
7
9
11 |
| 2. Procedeu biotehnologic de obținere a nanoparticulelor de argint conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că mediul nutritiv solid Murashige-Skoog, utilizat pentru cultivarea plantelor de căpșun, conține macroelemente, microelemente, vitamine Gamborg B5, zaharoză, agar, este suplimentat cu 1 mg/l acid 2,4 diclorfenoxiacetic și 0,1 mg/l 6-benzilaminopurină. | 13
15
17 |

(51) Int.Cl.
C12P 3/00 (2006.01);
A01H 4/00 (2006.01);
C07F 1/00 (2006.01);
B82Y 40/00 (2011.01)

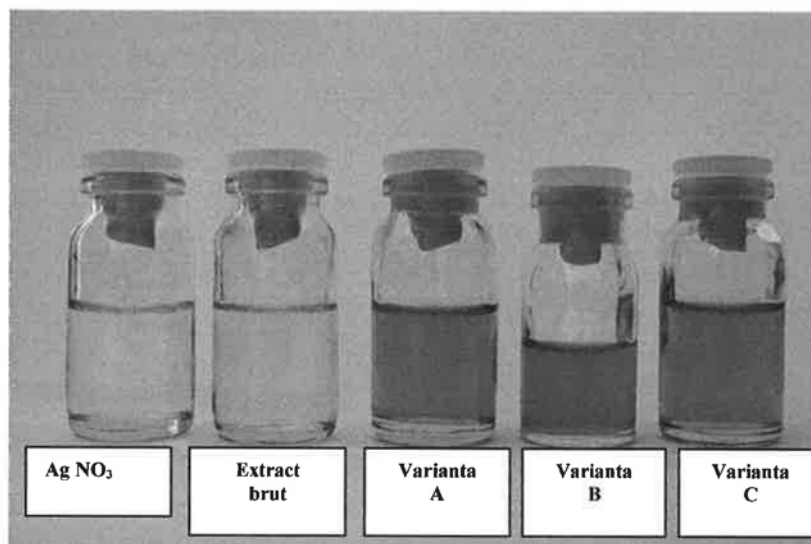


Fig. 1

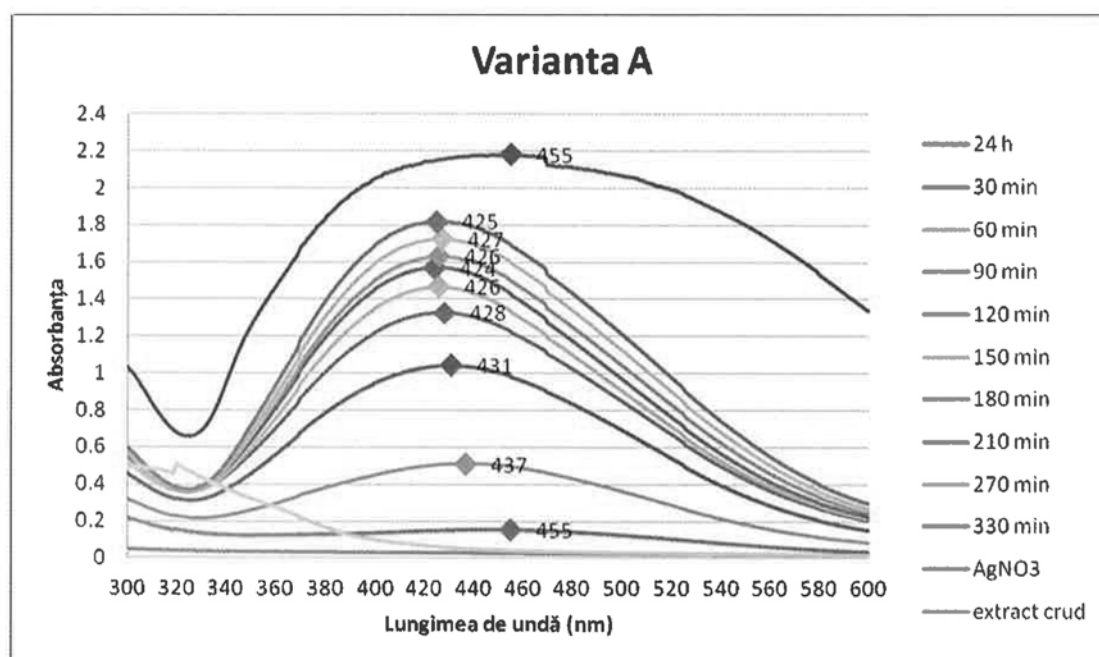


Fig. 2

(51) Int.Cl.
C12P 3/00 (2006.01).
A01H 4/00 (2006.01).
C07F 1/00 (2006.01).
B82Y 40/00 (2011.01)

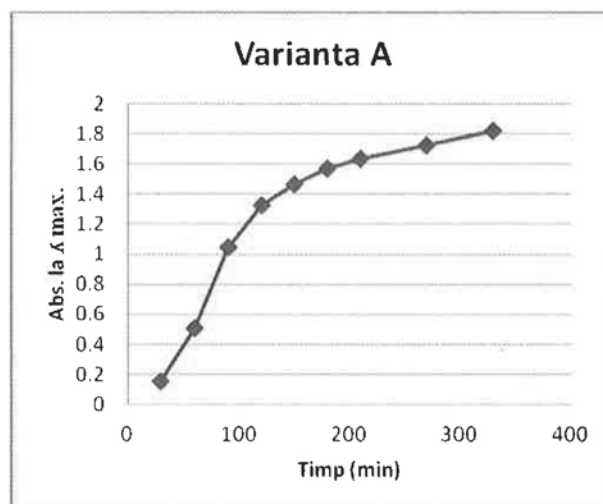


Fig. 3

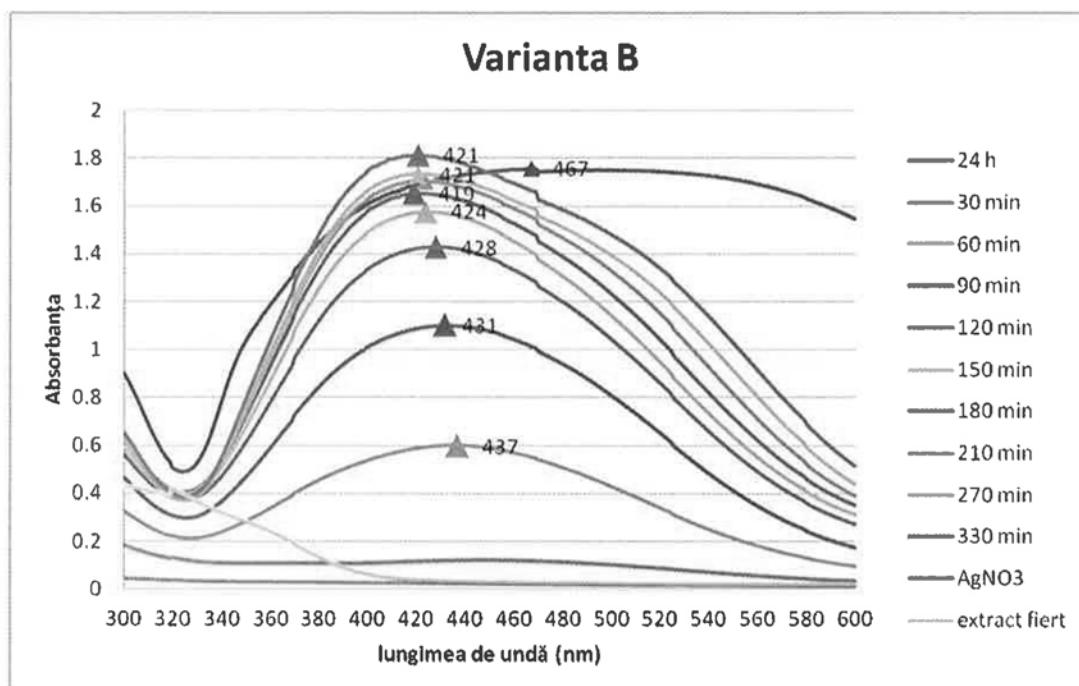


Fig. 4

(51) Int.Cl.
C12P 3/00 (2006.01);
A01H 4/00 (2006.01);
C07F 1/00 (2006.01);
B82Y 40/00 (2011.01)

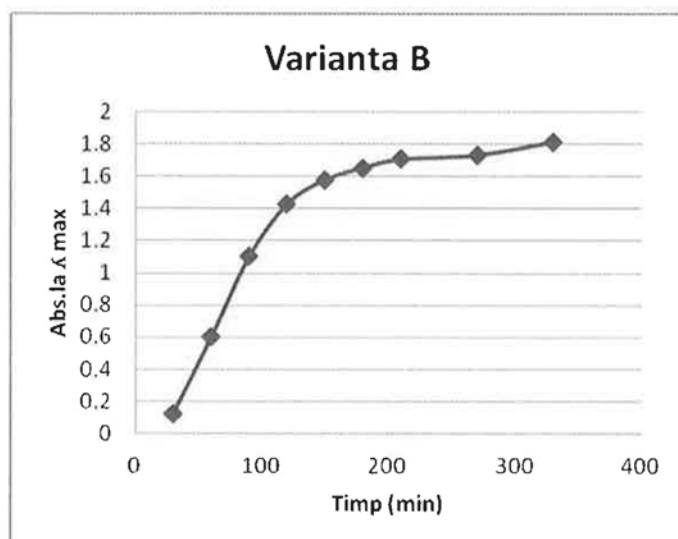


Fig. 5

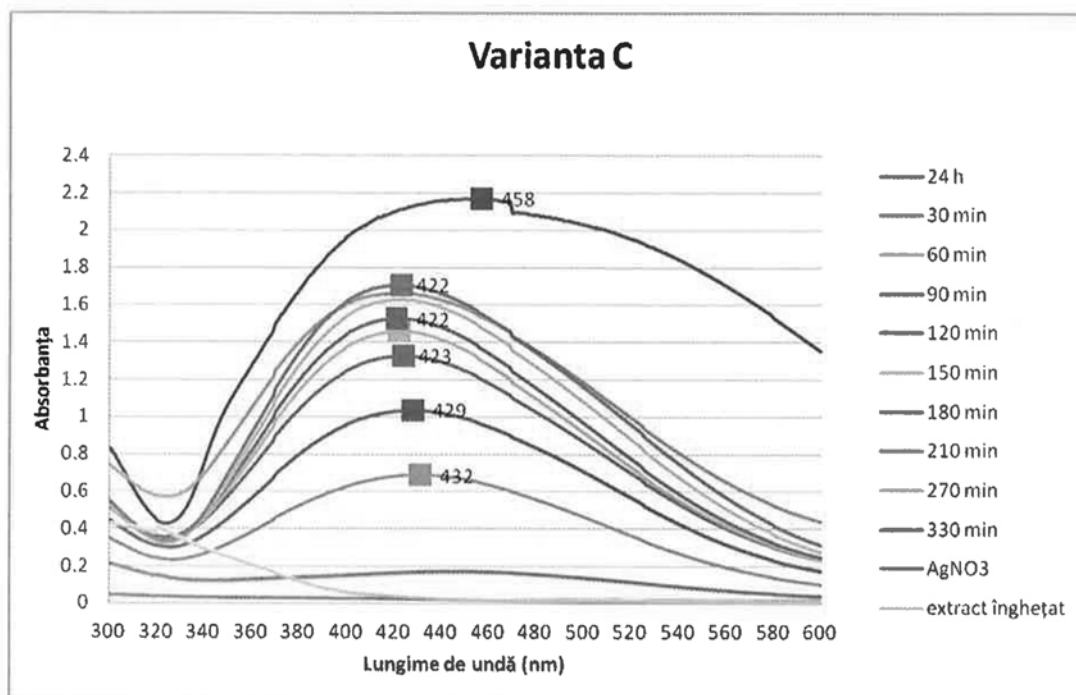


Fig. 6

(51) Int.Cl.

C12P 3/00 (2006.01).
A01H 4/00 (2006.01).
C07F 1/00 (2006.01).
B82Y 40/00 (2011.01)

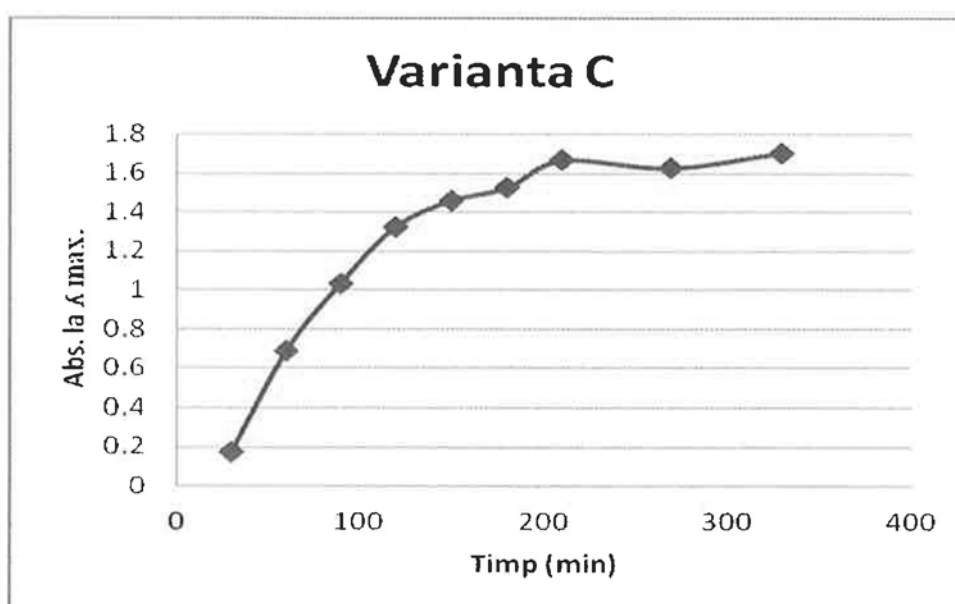


Fig. 7



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
 Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
 sub comanda nr. 509/2017