



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

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

(22) Data de depozit: **16.05.2013**

(41) Data publicării cererii:  
**27.02.2015** BOPI nr. **2/2015**

(71) Solicitant:

• **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**

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

(57) Rezumat:

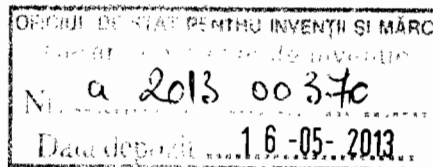
Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor nanoparticule de argint, cu aplicații în domeniul medical. Procedeu conform invenției constă în aceea că se pun în contact 20 ml azotat de argint 1 mM și 180 ml extract brut de calus de căpșun - țesut nediferențiat, nonmorfogenic, proliferativ, provenit din calus de căpșun, din

care rezultă nanoparticule de argint având dimensiuni de maximum 20 nm, relativ uniforme și stabile.

Revendicări: 1  
Figuri: 7

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).





## Procedeu biotehnologic de obținere a nanoparticulelor de argint

Invenția se referă la un procedeu biotehnologic de obținere a nanoparticulelor de argint, prin utilizarea calusului de căpșun cu aplicații în domeniu medical, cosmetic și farmaceutic.

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

Un procedeu cunoscut de sinteza a nanoparticulelor de Ag se bazează pe utilizarea de precursori precum:  $\text{AgNO}_3$ , citrat de sodiu și SDS (sodium dodecyl sulphate) .

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

Dezavantajele procedeelelor cunoscute sunt:

- metodele menționate mai sus nu pot evita utilizarea de substanțe toxice în protocolul de sinteza a nanoparticulelor de argint;
- controlul dificil al dimensiunii particulelor ca fiind direct dependent de condițiile de sinteza și precursorii folosiți.
- dificultăți tehnologice în ceea ce privește posibilitatea de scale-up, producere pe scară largă (industrială)

Problema pe care o rezolvă invenția constă în realizarea unui procedeu pentru producerea de nanoparticule de argint cu: dimensiune, formă, distribuție, uniformitate, stabilitate controlate prin utilizarea calusului de căpșun pentru sinteza de nanoparticule de argint, nemaifiind nevoie de izolarea și purificarea nanoparticulelor de argint.

Procedeu biotehnologic de obținere a nanoparticulelor de argint, conform invenției înlătură dezavantajele menționate, prin aceea că, se folosesc ca materii prime azotat de argint 1 mM și extract brut de calus (țesut nediferențiat, non-morfogen, proliferativ) de căpșun care se procesează conform următoarelor etape :

- obținerea calusului de căpșun -plantele realizate prin germinarea aseptică a achinelor sunt utilizate ca inocul pentru inițierea culturii de calus, cultivarea lor nesecționată pe mediu nutritiv solid Murashige-Skoog (macro- și micro-elemente MS , vitamine Gamborg B5, zaharoză, agar) suplimentat cu 1 mg/l 2,4 D (acid 2,4 diclorfenoxiacetic) și 0,1 mg/l BAP (6-benzilaminopurina) a generat calus la nivelul hipocotilului, proliferarea și menținerea acestui calus se realizează prin pasaje la 3 săptămâni pe mediu proaspăt reprezentat de mediu bazal MS suplimentat cu 1-3 mg/l 2,4D, 1-3 mg/l NAA (acid  $\alpha$ -naftil acetic), 0,1-2.5 mg/l K, zaharoză 15%, glucoză 15%, agar: 1-15 g/l, la temperaturi de  $23-25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ;

- obținerea extractului brut de calus (țesut nediferențiat, non-mofogenic, proliferativ) de căpșun din calus de capsuni, utilizat în sinteza de nanoparticule de argint - câte 10g calus au fost mojarate împreună cu apă distilată sterilă, la temperatura de: 25...100°C, apoi sunt filtrate și centrifugate la 24°C, timp de 10 minute și menținute la temperatura camerei până în momentul începerii sintezei de nanoparticule de argint;
- sinteza nanoparticulelor de argint: câte 20 ml extract brut de calus de căpșun din fiecare varianta sunt puse în contact cu 180 ml AgNO<sub>3</sub> 1 mM, în vase Erlenmeyer de 250 ml.

Inventia prezinta urmatoarele avantaje:

- Procedul este rapid, cu productivitate ridicata, netoxic, nanoparticulele de argint fiind de dimensiuni mici (<20nm) relativ uniforme, stabile, particularități utile pentru aplicații în medicină și industrie.
- Calusul de căpșun (materie primă) reprezintă o sursă optimă de metaboliți secundari care asigură atât agenții reductori, cât și stabilizatori pentru biosinteza nanoparticulelor de argint. Cultura este stabilă, fiind menținută în colecția de germoplasmă a Institutului de Biologie – Academia Română de 5 ani, este disponibilă pe toată durata anului, este lipsită de contaminanți. Mediul controlat de creștere îi asigură o bună productivitate ca masă celulară și implicit ca metaboliți secundari.
- Azotatul de argint la concentrația utilizată reprezintă o materie primă accesibilă și ieftină.
- Condițiile de sinteză nu implică temperatură sau presiune mare, neneccitând instalații speciale, ci doar echipamente uzuale de laborator.
- Calusul de căpșun nefiind toxic, nanoparticulele se utilizează direct în amestecul de reacție având activitate antimicrobiană.

Se da în continuare un exemplu de realizare a invenției în legătura cu fig. 1-7, care reprezintă:

Fig.1 – Virarea rapidă a culorii amestecului de reacție ca urmare a sintezei de nanoparticule de argint, conform invenției. Culoarea este rezultatul interacției electromagnetice dintre lumina incidentă și electronii de conducție din nanoparticulele de argint.

Fig.2 - Spectrele de absorbție pentru nanoparticulele de argint sintetizate de varianta A de extract brut de calus de capsun

Fig.3– Evoluția absorbției maxime a nanoparticulelor de argint în funcție de timpul de reacție în cazul variantei A de extract de calus de căpșun

Fig.4- Spectrele de absorbție pentru nanoparticulele de argint sintetizate de varianta B de extract brut de calus de căpșun

Fig.5- Evoluția absorbției maxime a nanoparticulelor de argint în funcție de timpul de reacție, în cazul variantei B de extract de calus de căpșun

Fig.6 - Spectrele de absorbție pentru nanoparticulele de argint sintetizate de varianta C de extract brut de calus de căpșun

Fig.7 - Evoluția absorbției maxime a nanoparticulelor de argint în funcție de timpul de reacție în cazul variantei C de extract de calus de căpșun

Conform invenției, pentru obținerea nanoparticulelor de argint prin procedeul pe bază de calus de căpșun se folosesc următoarele materii prime:

- Azotat de argint 1mM (99,85%, Acros Organics)
- Extract brut de calus de căpșun

Procedeele conform inventiei cuprinde urmatoarele etape:

### 1. Obținerea calusului de căpșun

Plantule obținute prin germinarea aseptică a achenelor au fost utilizate ca inocul pentru inițierea culturii de calus. Cultivarea lor nesectionate pe mediu nutritiv solid Murashige-Skoog (macro- și micro-elemente MS, vitamine Gamborg B5, zaharoză, agar) suplimentat cu 1 mg/l 2,4 D și 0,1 mg/l BAP 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 2,4D, 1-3 mg/l NAA (acid  $\alpha$ -naftil acetic), 0,1-2,5 mg/l K, zaharoză 15%, glucoză, 15%, agar: 1-15g/l la temperaturi de  $23-25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

### 2. Obținerea extractului brut de calus (țesut nediferențiat, non-mofogenic, proliferativ) de căpșun din calus de capsuni, utilizat în sinteza de nanoparticule de argint

Câte 10 g calus au fost mojarate împreună cu apă distilată sterilă, la temperatura de:  $25^{\circ}\text{C}$  (varianta A);  $100^{\circ}\text{C}$  (varianta B);  $80^{\circ}\text{C}$  (varianta C). Cele trei variante de extract, au fost filtrate și apoi centrifugate la  $24^{\circ}\text{C}$ , 10 minute. Extractele au fost menținute la temperatura camerei pînă în momentul inițierii sintezei de nanoparticule de argint.

### 3. Sinteza nanoparticulelor de argint, (rapid, ecologic și eficient) prin utilizarea extractelor brute de calus de căpșun

Câte 20 ml extract brut de calus de căpșun din fiecare varianta au fost puși în contact cu 180 ml  $\text{AgNO}_3$  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.

Procedeele conform inventiei asigură obținerea nanoparticulelor de argint cu dimensiune, formă, stabilitate, dispersie, uniformitate utile pentru utilizare în medicină, cosmetica, industrie, fiind eficient, rapid, nontoxic (ecologic), prin consumarea unor materii prime accesibile și ieftine.

Datorită faptului că materia primă biologică, respectiv calusul de capsun nu are nici un fel de toxicitate, ci dimpotrivă, conține compuși cu valoare nutritivă, antioxidantă, și terapeutică pentru diferite afecțiuni, amestecul de reacție în care se sintetizează nanoparticulele de argint poate fi utilizat ca atare în cosmetică, farmacie, nemaifiind nevoie de izolarea și purificarea nanoparticulelor de argint.

Se prezinta in continuare caracterizarea nanoparticulelor de argint obtinute prin procedeul conform inventiei:

#### Spectroscopie UV-VIS:

reducerea  $\text{Ag}^+$  la  $\text{Ag}^0$  și cinetica sintezei nanoparticulelor de argint a fost verificată periodic, la intervale de 30 minute, față de apă ca referință, pentru toate cele 3 variante experimentale, la o viteză 10 nm/s, rezoluție de 1 nm, pe un domeniu: 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 absorbției în funcție de timp (Fig. 3,5,7), pe parcursul celor 6 ore de măsurare, cu un maxim de absorbție în domeniul 420 - 440 nm. Varianta B reduce  $\text{AgNO}_3$

mai repede ca celelalte două variante. După 24 ore timp de reacție, absorbanta variantelor A și B este mai mare decât cea a variantei B, 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 electronica de baleiaj evidențiază sinteza unui număr mare de nanoparticule de argint, de forma predominant sferică, cu dimensiuni relativ uniforme, de până la 50 nm

#### **Efect antimicrobian**

Conform inventiei se obtine un efect antimicrobian al particulelor de argint sintetizate de extractele brute de calus de căpșun.

*Efectul inhibitor* al nanoparticulelor de argint sintetizate de către extractele 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  $\text{AgNO}_3$ , ceea ce confirmă faptul că efectul inhibitor al amestecului de sinteză este datorat nanoparticulelor de argint. Se mentioneaza ca extractele initiale de calus de căpșun nu au activitate antimicrobiană.

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

## Revendicare

Procedeu biotehnologic de obținere a nanoparticulelor de argint **caracterizat prin aceea ca**, se folosesc ca materii prime azotat de argint 1 mM si extract brut de calus (țesut nediferențiat, non-mofogenic, proliferativ) de căpșun care se proceseaza conform urmtoarelor etape :

- obținerea calusului de căpșun -plantele realizate prin germinarea aseptică a achenelor sunt utilizate ca inocul pentru inițierea culturii de calus, cultivarea lor nesectionate pe mediu nutritiv solid Murashige-Skoog (macro- și micro-elemente MS , vitamine Gamborg B5, zaharoză, agar) suplimentat cu 1 mg/l 2,4 D (acid 2,4 diclorfenoxiacetic )și 0,1 mg/l BAP (6-benzilaminopurina) a generat calus la nivelul hipocotilului, proliferarea și menținerea acestui calus se realizeaza prin pasaje la 3 săptămâni pe mediu proaspăt reprezentat de mediu bazal MS suplimentat cu 1-3 mg/l 2,4D, 1 -3 mg/l NAA, 0,1-2.5 mg/l K, zaharoză 15%, glucoză 15%, agar: 1-15 g/l, la temperaturi de 23-25°C ± 2°C;
- obținerea extractului brut de calus (țesut nediferențiat, non-mofogenic, proliferativ) de căpșun din calus de capsuni, utilizat în sinteza de nanoparticule de argint - câte 10 g calus au fost mojarate împreună cu apă distilată sterilă, la temperatura de: 25...100°C , apoi sunt filtrate și centrifugate la 24 °C, timp de 10 minute, si menținute la temperatura camerei până în momentul initierii sintezei de nanoparticule de argint;
- sinteza nanoparticulelor de argint: câte 20 ml extract brut de calus de căpșun din fiecare varianta sunt puse in contact cu 180 ml AgNO<sub>3</sub> 1 mM, în vase Erlenmeyer de 250 ml.

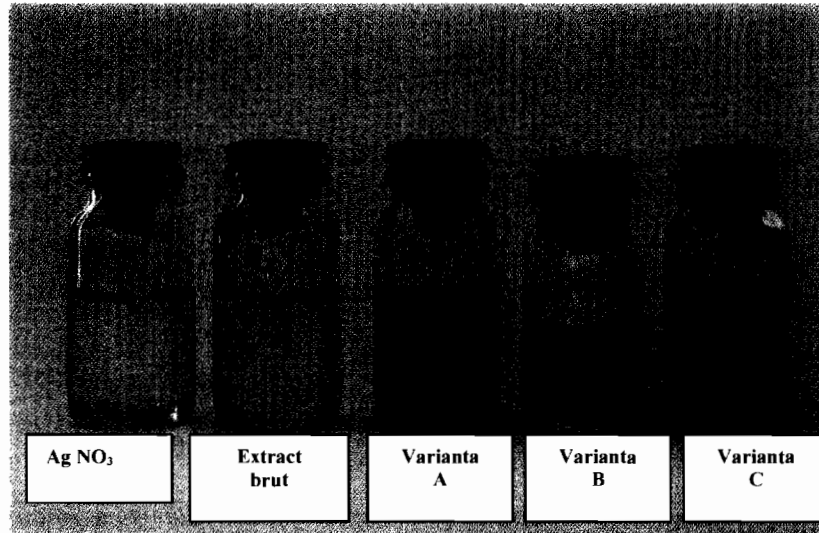


Fig.1

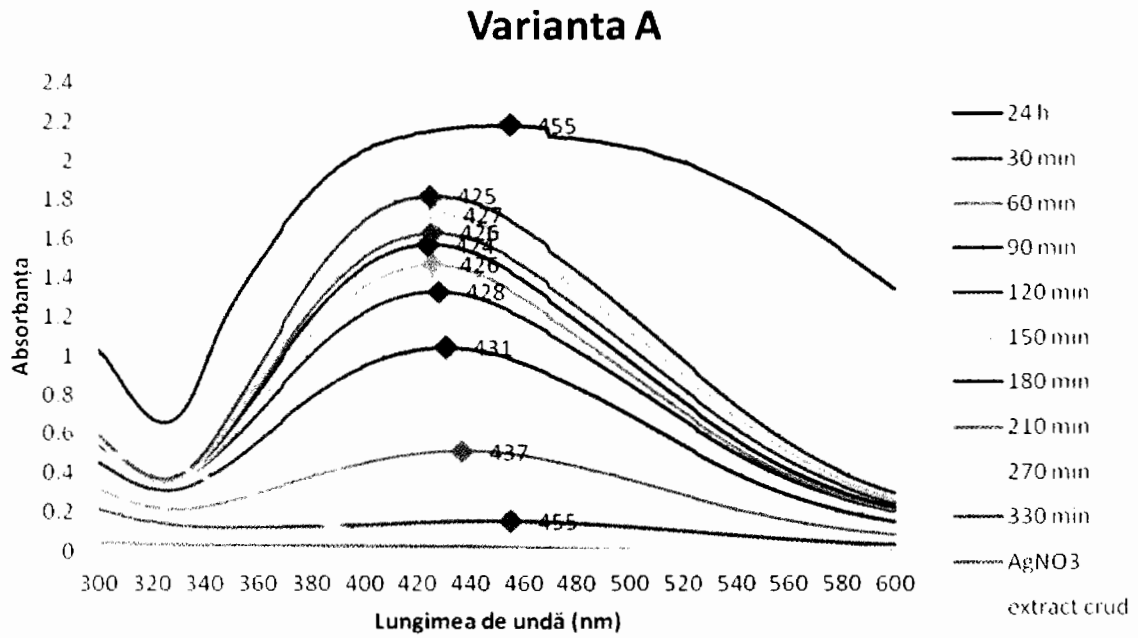


Fig.2



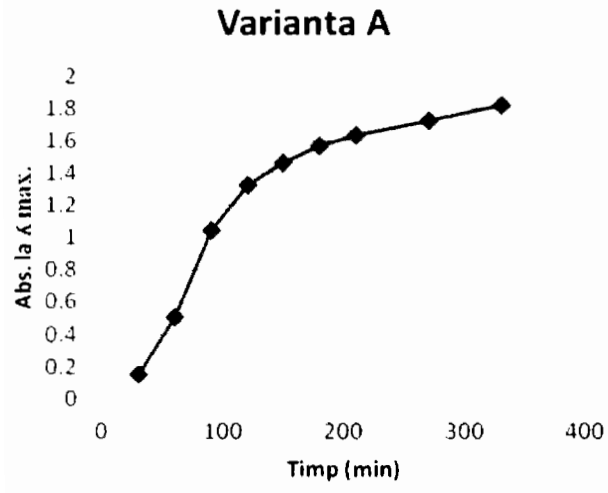


Fig.3

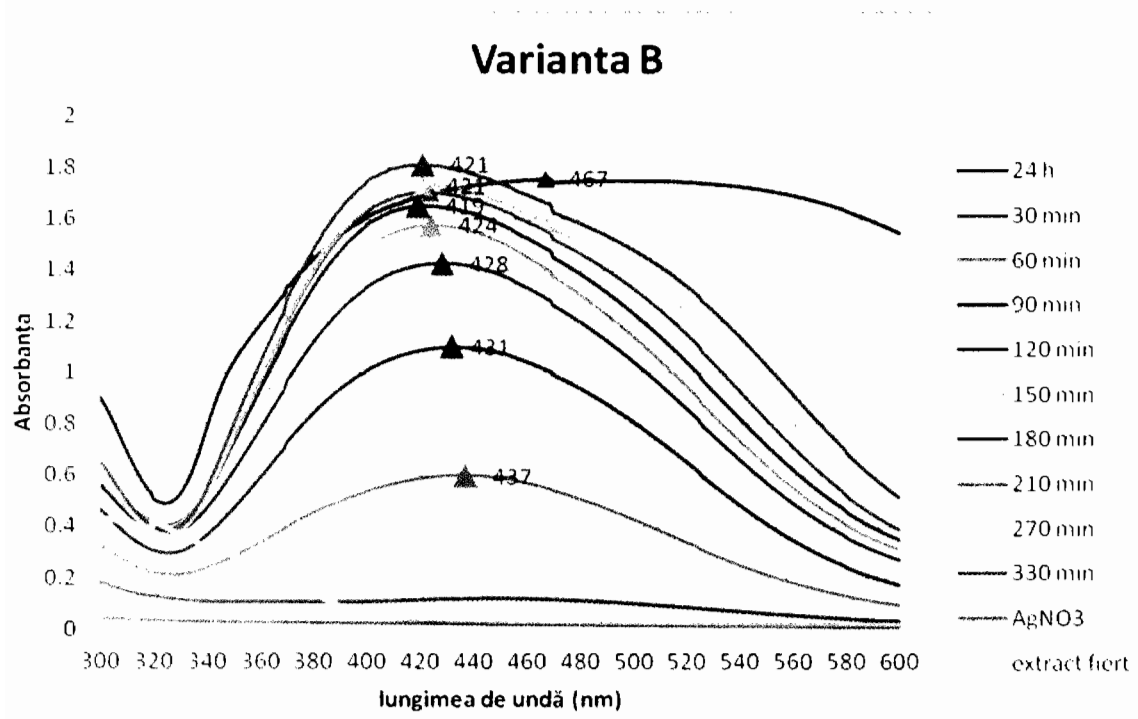


Fig.4.

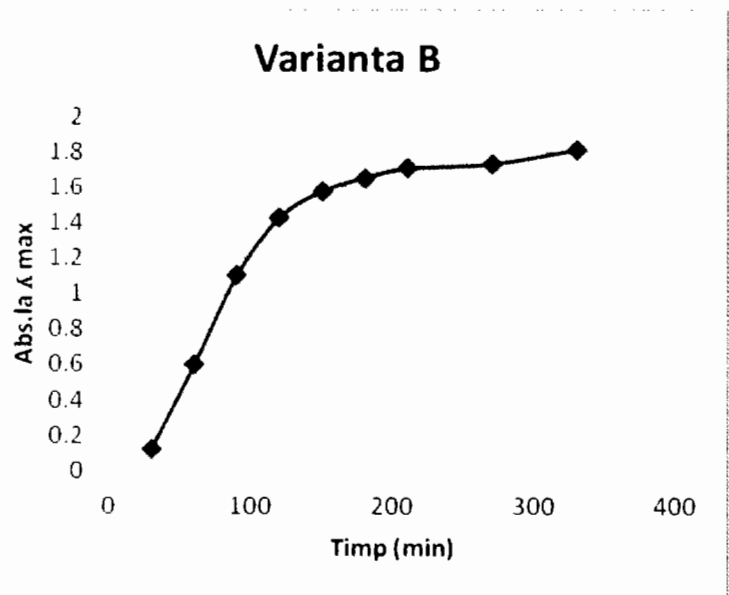


Fig.5

### Varianta C

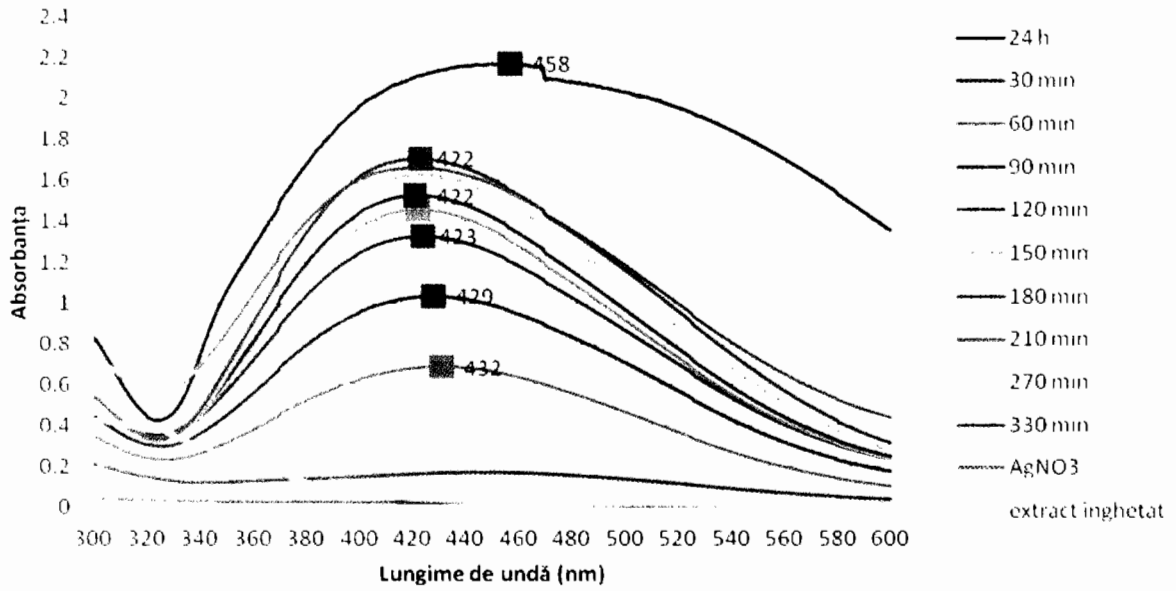


Fig.6

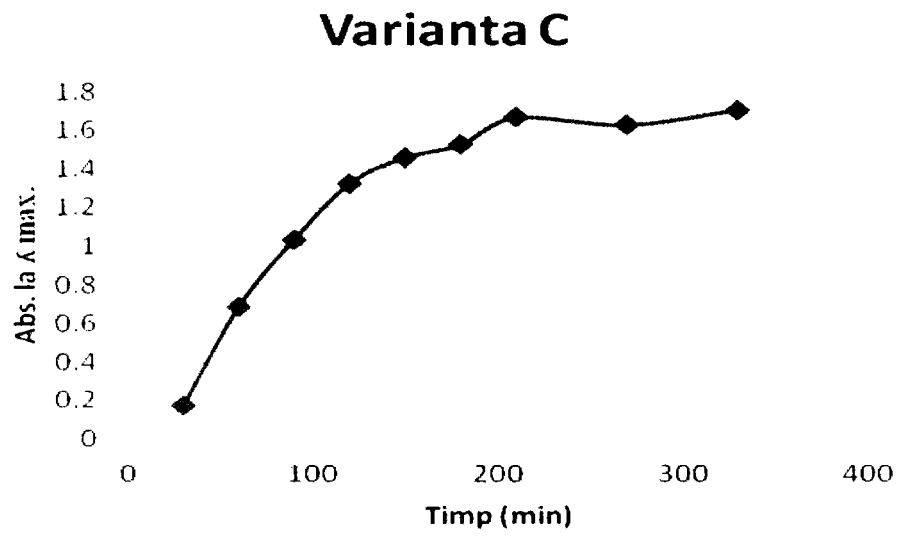


Fig.7.