



(11) RO 134209 A2

(51) Int.Cl.

B22F 9/24 (2006.01);

C01G 5/00 (2006.01)

(12)

CERERE DE BREVET DE INVENTIE

(21) Nr. cerere: **a 2018 00902**

(22) Data de depozit: **16/11/2018**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2020 BOPI nr. **6/2020**

(71) Solicitant:

• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
INGINERIE ELECTRICĂ ICPE-CA,
SPLAIUL UNIRII NR.313, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:

• ION IOANA, STR.LILIAČULUI NR.7B,
SAT PRUNI, MĂGURELE, IF, RO;

• LUNGU MAGDALENA VALENTINA,
BD. IULIU MANIU NR. 65, BL. 7P, SC. 7,
ET. 2, AP. 211, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;

• NICULA NICOLETA OANA,
STR.NICOLAE BĂLCESCU, NR.26, BL.50,
SC.A, AP.2, MIZIL, PH, RO;
• MARINESCU VIRGIL EMANUEL,
CALEA CĂLĂRAȘI NR.94, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• MITU CIPRIAN MIHAI, STR.LILIAČULUI
7B, SAT PRUNI, MĂGURELE, IF, RO

(54) NANOPARTICULE BIOSINTETIZATE DE ARGINT, ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor agregate pe bază de nanoparticule de argint biosintetizate extracelular cu aplicații în industria farmaceutică și tratarea apelor poluate. Procedeul, conform inventiei, constă în sinteza *in vivo* într-o soluție de *Chorella Sorokiniana* în mediu de cultură BG11, rezultând nanoparticule de argint agregate în clusteri cu structură

tridimensională 3D cu formă globulară și morfologie rugoasă de tip conopidă, cu dimensiuni de 100...500 nm.

Revendicări: 2

Figuri: 3

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 inventie a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de inventie este determinată de revendicările continute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



RO 134209 A2

Invenția se referă la agregate cu morfologie de tip „conopidă” formate din nanoparticule de argint biosintetizate extracelular in situ si la un proceșul de obținere cu aplicații in industria farmaceutică, cosmetică, alimentară umana si animală si tratarea apelor poluate.

Se cunosc numeroase soluții tehnice de sinteza a nanoparticulelor de argint, acestea fiind folosite de foarte mult timp datorită multiplelor proprietăți fizice și chimice cu multe posibilități de utilizare în industrie, medicina și farmacie. Nanoparticulele sunt sintetizate prin diverse metode începând cu cele fizice (mecanice, iradiere cu UV, iradiere cu microonde sau radiație gama, ablație laser), chimice și terminând cu metodele biologice. Proprietățile sale chimice și fizice foarte variate se datorează posibilității de sinteza în diferite forme și dimensiuni. De-a lungul anilor nanoparticulele de argint au fost sintetizate cel mai des sub formă de sferă, dar există numeroase articole cu particule sintetizate sub formă alungită, triunghiulară, cubice, dodecaedrice. Deoarece în aceasta cerere de brevet sinteza nanoparticulelor de argint este făcută pe cale biologică utilizând bioreducători din alge ne vom referi mai jos în mare măsură la metodele din categoria „green chemistry” denumita și chimie ecologică.

Cele mai utilizate aplicații ale metalelor prețioase sub formă de nanoparticule au fost aceleia de materiale cu rol antibacterian (Popa. et al. 2018, Soleimani M. et al. 2017, Ahmed S et al, 2015; Ion I. Et al, 20015; Ion I. Et al, 20014; Okafor F. Et, 2013; V.K. Sharma et al, 2009; S. Sarkar et al. 2007; Morones J.R. et al., 2005), antiviral (Lara HH et all ,2010; J. Mittal et al, 2014) și mai nouă sunt utilizate în controlul bolilor plantelor (Sang W. K. et al. 2012). În industrie datorită conductivității electrice mari și proprietăților antibacteriene sunt folosite în diverse compozite polimetrice (Kimberly A. et al. 201, Gagan Kaur et all 2015), ceramice (Lungu M. et al., 2014), carbonice (WE Jones et al 2010) și hibride (Wei X. et al. 2013).

De-a lungul anilor au fost făcute diverse încercări de biosintetizare a soluțiilor de argint coloidal sau pulberi folosind ca bioreducători extrase din diverse alge (Sudha S. et al. 2013; Parial D. et al. 2012; Rajeshkumar S. et al. 2014) dintre cele mai des întâlnite în literatura putem aminti următoarele alge: *Scenedesmus sp.* (Jenaet J. al. 2014;), *Spirulina platensis* (Mahdieh M. Et al. 2012), *Padina pavonica* (Sahayaa K., et al. 2012), fungi (P. Mukherjee et al. 2001) și bacterii (Saifuddin N. et al., 2009).

Chlorella este o microalgă monocelulară verde smarald, cu formă sferică, diametru de 2-10 µm și nu prezintă flageli. *Chlorella* conține în cloroplaste pigmenți fotosintetici de culoare verde – clorofila-a și clorofila-b. Se divide rapid prin procesul de fotosinteza, pentru reproducere având nevoie numai de bioxid de carbon, apă, lumină solară și o cantitate mică de minerale (Scheffler Jet al. 2007). Datorită eficienței sale în fotosintetă, care teoretic poate ajunge până la 8%, depășind chiar nivelul înregistrat de culturile cele mai eficiente, precum trestia de zahăr (Zelitch, I. et al. 1971).

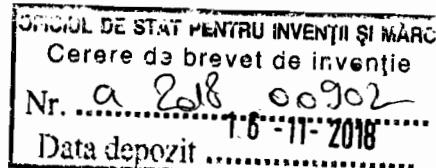
Chlorella poate reprezenta o sursă potențială de hrănă animală și umană, energie și materie prima pentru alte industrii. Aplicațiile speciei *Chlorella* sunt multiple cum ar fi epurarea apelor uzate prin absorbția metalelor grele, poluanților chimici de tip organic, aplicații agro-chimice, biocombustibili, nutriție umană și animală (Keffer J. E. et al. 2002; Aslan S. et al. 2006; Feng Y. et al. 2011; Lau P. S. et al. 1996; Lim S. L. et al. 2010; Valderrama L. T. et al. 2002; Yun Y.-S. et al. 1997).

1. Viteza de diviziune celulară este relativ mare, fiecare celulă divizându-se în 4 noi celule într-un timp de 17 până la 24 ore. În anul 1951 fundația Rockfellar în colaborare cu guvernul japonez și dr. Hiroshi Tamiya au pus la punct o tehnologie de cultivare, recoltare și procesare a speciei *Chlorella sorokiniana* la scară largă, tehnologie fezabilă din punct de vedere economic (http://www.oilgae.com/ref/glossary/chlorella_sorokiniana.html). Aceasta fiind cercetată și pentru obținerea de biodiesel (Wu et al. US 2009/0211150 A1; US 2009/0298159 A1)

Dezavantajele soluțiilor cunoscute sunt următoarele:

Nanoparticulele de argint biosintetizate sunt sintetizate în mod curent în laboratoarele de cercetare utilizând ca material reducător alga *Chlorella* (Soleimani M. et al. 2017; Annamalai J. et al.; 2016; Patel V et al., 2015. Există și un brevet de invenție CN 104525965 A cu biosinteză utilizând diferite tipuri de alge *limnothrix*, *scenedesmus* *quaericauda* printre care și *Chlorella*, dar aceste prezintă obținerea de nanoparticule de argint polidisperse neagregate în clustere.

Nanoparticule de argint agregate în clustere cu morfologie 3D rugoasă de tip „conopidă” au fost obținute doar prin metode chimice de către S. Sarkar et al. 2007. Nanoparticule de aliaj cu Au-Ag agregate în clustere cu morfologie 3D rugoasă de tip „conopidă” a fost obținut tot prin metoda chimică în brevetul CN101786170A.



Procedeul de realizare deși foarte simplu, eficient, ecologic și ieftin are ca limitare faptul că acest procedeu de biosintetizare este strâns legat de tehnologia de creștere a algei. Este de preferat să fie implementată ca o prelungire a acestei tehnologii pentru a crește profitul.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în realizarea unor agregate cu morfologie de tip „conopidă” formate din nanoparticule de argint și procedeu de obținere a nanoparticulelor de argint biosintetizate in situ extracelular cu forma rotunjita, dimensiune intre 15-60 nm, agregate in clustere cu structura tridimensională (3D) cu forma globulară și morfologie rugoasă de tip „conopidă” cu dimensiune intre 100-500 nm, utilizând ca agent reducător fitochimicalele conținute în soluția stoc de Chlorella Sorokiniana în mediu de creștere BG11, la temperatură 30 de grade Celsius și iluminare constantă pe durata a 5 zile și nu folosește agenți reducători chimici toxici și dăunători mediului înconjurător și extind domeniului de utilizare a algei Chlorella Sorokiniana de la supliment alimentar la supliment alimentar cu proprietăți antibacteriene și antivirale și soluții ecologice de tratare a bolilor plantelor.

Agregate cu morfologie de tip „conopida” formate din nanoparticule de argint biosintetizate înălțatura dezavantajele menționate prin aceia că conțin nanoparticule de argint biosintetizate in vivo extracelular cu forma rotunjita cu dimensiune intre 15-60 nm, agregate in clustere cu structura tridimensională (3D) cu forma globulară și morfologie rugoasă de tip „conopida” cu dimensiune intre 100-500 nm, în soluție de Chlorella Sorokiniana în mediu de creștere BG11, la temperatură 30 de grade Celsius și iluminare constantă pe durata a 5 zile, utilizând fitochimicalele conținute în alga ca agent reducător, disperant și stabilizator.

Procedeu de obținere pentru biosintetizarea nanoparticulelor de argint **înălțatura dezavantajele menționate prin aceia că** constă în sinteza in vitro într-o soluție stoc de Chlorella Sorokiniana în mediul de cultură BG11 cu densitatea algei cuprinsă intre 10 – 20 g/l în care se introduce soluție stoc de azotat de argint 50 mM, în cantități egale, menținut timp de 5 zile în camera climatică cu 30 de grade Celsius, iluminare constantă, cu agitare manuală de două ori pe zi, soluția își schimbă culoarea din verde smarald spre verde pal în primele 12 h, urmata de închiderea culorii pana la negru brun în ziua 3, după care își menține culoarea.

Avantajele invenției sunt următoarele:

Chlorella Sorokiniana este utilizată ca supliment alimentar în alimentația oamenilor și animalelor (Brooks et US 2013/0122180 A1, US 2010/0297323 A1; US 2010/0297295 A1) și prin functionalizarea acesteia cu nanoparticule de argint se lărgesc domeniul de utilizare prin adăugarea de proprietățile antifungice și antibacteriene utilizabile în tratarea oamenilor, animalelor și plantelor.

Agregatele cu morfologie de tip „conopida” formate din nanoparticule de argint biosintetizate extracelular în situ sub acțiunea fitochemicalor din Chlorella Sorokiniana prezintă corpusculi globulari bine definiți atât la nivelul agregatelor cat și la nivelul particulelor primare, ambele având suprafete proprii disponibile pentru functionalizarea sau/si reacții chimice, biologice ducând la o mai mare reactivitate a acestora, având avantajul de a fi sintetizată într-un mediu fără produși chimici determina o bună compatibilitate biologică a acestui produs, excludând etapele finale de purificare, separare, concentrare.

Procedeul de realizare este simplu, ecologic, ieftin și nu utilizează nici un agent chimic sau toxic pentru sănătatea umană, animală și nu afectează mediu înconjurător.

Procedeul de realizare este simplu, eficient, ecologic, ieftin nu cuprinde etape suplimentare de preparare/purificare a materiei prime și a produșilor de reacție cum ar fi de separare (extracție, filtrare, centrifugare) uscare, mărunțire, sterilizare, toate operațiile au loc fără operații termice, etc.

Procedeul de biosintetizare este strâns legată de tehnologia de creștere a algei, poate fi implementată ca o prelungire a acestei pentru a crește profitul unității de creștere a algelor.

In continuare se dau 3 exemple de realizare a invenției în legătura cu Fig. 1...,Fig. 3 care reprezintă:

Fig. 1. Spectrul UV-VIS pentru:a) soluția 1, conform invenției; b)soluția 2; și c) pentru soluția 3.

Fig. 2. a, b, c, d Micrografii SEM pentru soluția 1, conform invenției;

Fig. 3. a, b, c, d Micrografii SEM pentru soluția 2,

Tabel. 1. Parametrii spectrali pentru spectrul UV-Vis de absorbție pentru soluția 1-3;

In continuare se dau 3 exemple de realizare a invenției în care diferența constă în compoziția soluției stoc de azotat de argint și modul de prepararea acestora.

Pentru biosinteza nanoparticulelor de argint au fost utilizate două soluții stoc de alge Chlorella Sorokiniana și soluție stoc de azotat de argint 50 mM în cantități egale.

Mediul de cultură utilizat pentru creșterea microalgei monocelulare verzi de Chlorella Sorokiniana cuprinde între 10-100 ml soluție BG11 (Blue Green medium 11) adăugate la 1000 ml de apă. Soluția stoc constă în mediul de cultură cu alga *Chlorella sorokiniana* cu densitatea algei cuprinsă între 10 – 20 g/l. Soluția stoc de Chlorella Sorokiniana are dublu rol de reducător (bio-reducător prin fitochimicalele care le conține) și rol de agent de dispersare și stabilizare.

Exemplul 1: 25 ml soluție stoc de azotat de argint 50 mM a fost amestecată cu 25 ml soluție stoc de Chlorella Sorokiniana. Soluția astfel formată se va denumi **soluția 1**. Soluția 1 este menținută timp de 5 zile în camera climatică în următoarele condiții: 30 de grade Celsius și atmosferă cu oxigen, iluminare constantă și atmosferă oxigenată. Soluția își schimbă culoarea din verde smarald spre verde pal în primele 12 h, urmată de închiderea culorii până la negru bun în ziua 3. Soluția a fost caracterizată prin spectroscopie UV-Vis pentru determinarea parametrilor optici ai soluției și prin microscopie SEM pentru determinarea dimensiunii de particule a nanoparticulelor de argint biosintetizate și morfologia acestora.

Tabel 1 . Prezinta parametrii spectrali optici UV-Vis pentru soluția 1-3.

Tabel. 1. Parametrii spectrali pentru spectrul UV-Vis.

Soluția	Spectru UV-Vis.-reprezentat grafic in fig.1a,b,c	$\lambda_{\text{max}} [\text{nm}]^{\#}$	$I_{\text{abs}} [\text{ua}]^*$	observații
1	a	-----	-----	fără aditiv/fără sonicare
2	b	448	0.568	fără aditiv/cu sonicare
3	c	463	1.465	cu aditiv/cu sonicare

#plasmonul de rezonanță, lungimea de undă unde are loc absorbția maximă exprimată în nm,

*intensitatea spectrului de absorbție exprimată în unități arbitrară a.u.

În figura 1a este reprezentat spectrul UV-Vis pentru soluția 1 după 5 zile. Spectrul prezintă o formă specifică determinată de caracteristica fractală a agregatului 3D cat și de mărimea acestuia(Richard Darienzo et al.2018).

În figura 2 a-c. sunt prezentate micrografiile obținute prin tehnica SEM pentru nanoparticulele de argint biosintetizate conform exemplului 1, soluția 1.

Din microscopiiile SEM, fig. 2a-c, la magnificări cuprinse între 5.00K -400.00K se poate vedea clar că sinteza nanoparticulelor de argint este extracelulară. Materialul organic cu aspect corpuscular globular cu dimensiuni micronice de culoare gri închis constând în reziduuri ale algei- *Chlorella Sorokiniana*, este înconjurat și acoperit de particulele mai mici albe strălucitoare din argint.

La creșterea magnificării se vede clar morfologia nanoparticulelor de argint cu forme rotunjite, dimensiunii între 15-60 nm aggregate în clustere cu structură tridimensională (3D), cu formă globulară și morfologie rufoasă de tip „conopida” cu dimensiune între 100-500nm.

Exemplul 2: 25 ml soluție stoc de azotat de argint 50 mM a fost amestecată cu 25 ml soluție stoc de Chlorella Sorokiniana. Soluția astfel formată se va denumi **soluția 2**. Soluția 2 a fost menținută timp de 5 zile în laborator în următoarele condiții: 20-35 de grade Celsius, iluminare circadiană, sonicată 30 de minute de două ori pe zi. Soluția a fost caracterizată prin spectroscopie UV-Vis pentru determinarea parametrilor optici ai soluției și prin microscopie SEM pentru determinarea dimensiunii de particule a nanoparticulelor de argint biosintetizat și morfologia acestora.

În figura 1b este prezentat spectrul UV-Vis pentru soluția 2 după 5 zile. Spectrul prezintă un maxim de absorbție la 448 nm specific nanoparticulelor de argint. [Magdalena Lungu et al. 2014]

Din microscopiiile SEM, fig. 3 a-c, , la magnificări cuprinse între 5.00K -400.00K se poate vedea clar că sinteza nanoparticulelor de argint este extracelulară, nu sunt vizibile reziduuri de alge, nanoparticulele de argint biosintetizate în situ sunt polisperse cu formă rotunjita și dimensiuni cuprinse între 16-210 nm.

Exemplul 3. Exemplul 2: 25 ml soluție stoc de azotat de argint 50 mM și 0.01-0.5 mg/ml PV P a fost amestecată cu 25 ml soluție stoc de Chlorella Sorokiniana. Soluția astfel formată se va denumi **soluția 3**. Soluția 3 a fost manipulată în aceleși condiții ca soluția 2. Soluția a fost caracterizată prin spectroscopie UV-Vis pentru determinarea parametrilor optici.

În figura 1C este prezentat spectrul UV-Vis pentru soluția 3 după 5 zile. Spectrul prezintă un maxim de absorbție la 463 nm specific nanoparticulelor de argint. [Magdalena Lungu et al. 2014]

Soluția 3 nu a putut fi investigată prin microscopie deoarece polimerul adăugat dus la scădereea conductivității peliculei formate prin uscare.

Agregatele de nanoparticule de argint biosintetizarea cu morfologie de tip „conopida” și proceul de obținere conform invenției constă în biosintetizarea extracelulară de nanoparticule de argint in situ cu forma rotunjita, dimensiune intre 15-60 nm, aggregate in clustere cu structura tridimensională (3D), cu forma globulară și morfologie rugoasa de tip „conopida” cu dimensiune intre 100-500 nm, utilizând ca agent reducător, disperant și stabilizator fitochimicalele conținute in soluții de Chlorella Sorokiniana in mediu de creștere BG11, la temperatura 30 de grade și iluminare constantă.

Agregatele cu morfologie de tip „conopida” formate din nanoparticule de argint biosintetizate extracelular in situ sub acțiunea fitochemicalor din Chlorella Sorokiniana prezinta corpusculi globulari bine definiți atât la nivelul agregatelor cat și la nivelul particulelor primare, ambele având suprafete proprii disponibile pentru functionalizarea sau/si reacții chimice, biologice ducând la o mai mare reactivitate a acestora, având avantajul de a fi sintetizata intr-un mediu fără produși chimici determina o buna compatibilitate biologică a acestui produs, excluzând etapele finale de purificare, separare, concentrare.

Revendicări

1. Agregate de argint **caracterizate prin aceea ca sunt alcătuite din nanoparticule de argint biosintetizate extracelular in situ cu forma rotunjita cu dimensiune intre 15-60 nm, aggregate in clustere cu structura tridimensională (3D) cu forma globulara si morfologie rugoasa de tip „conopida” cu dimensiune intre 100-500 nm, in soluție de Chlorella Sorokiniana in mediu de creștere BG11, la temperatura de 30 de grade si lumina constanta, utilizând fitochimicalele conținute in alga ca agent reducător, disperant si stabilizator; astfel materialul obținut conține alga Chlorella Sorokiniana si nanoparticulele de argint biosintetizate.**
2. Procedeu de obținere **conform revendicării 1, caracterizat prin aceia ca sinteza are loc in vivo intr-o soluție stoc de Chlorella Sorokiniana in mediul de cultura BG11 cu densitatea algei cuprinsa intre 10 – 20 g/l in care se introduce soluție stoc de azotat de argint 50 mM, in cantități egale, menținute timp de 5 zile in camera climatica cu 30 de grade Celsius, iluminare constanta, este agitata manual de doua ori pe zi, soluția își schimba culoarea din verde smarald spre verde pal in primele 12 h, urmata de închiderea culorii pana la negru bun in ziua 3.**

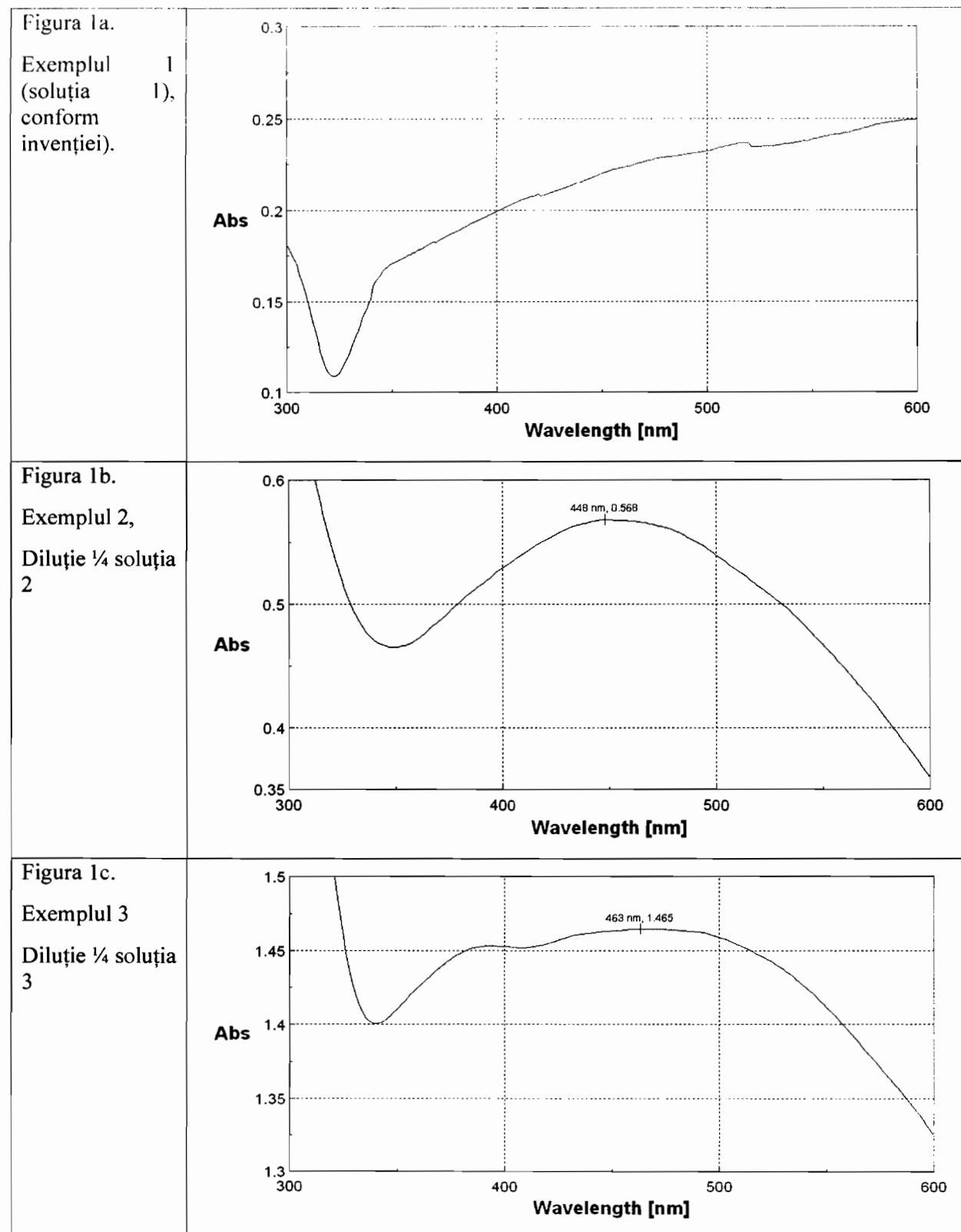


Figura 1. Spectre UV-Vis pentru exemplu 1-3.

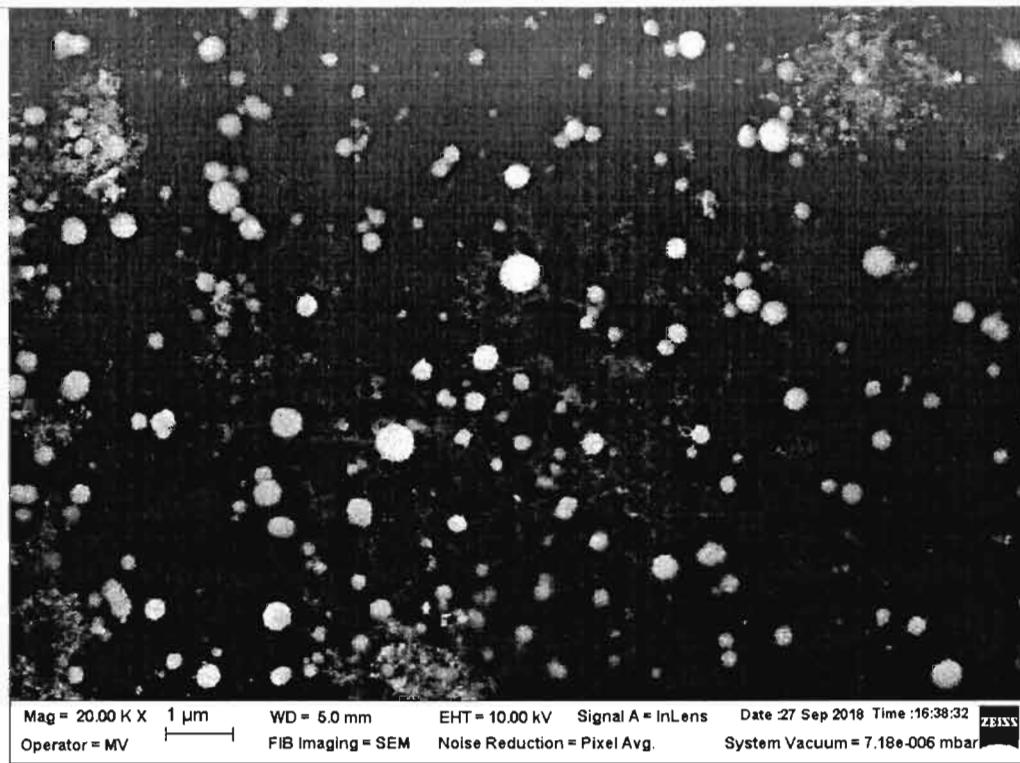


Fig.2.A

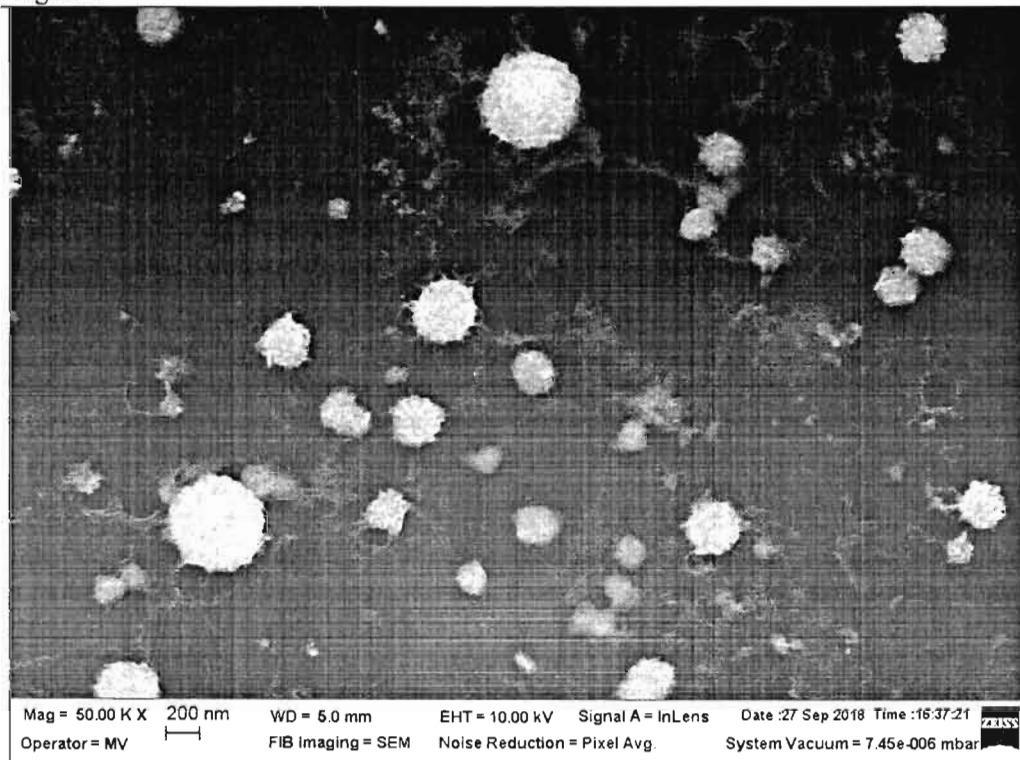


Fig.2.B

a 2018 00902

16/11/2018

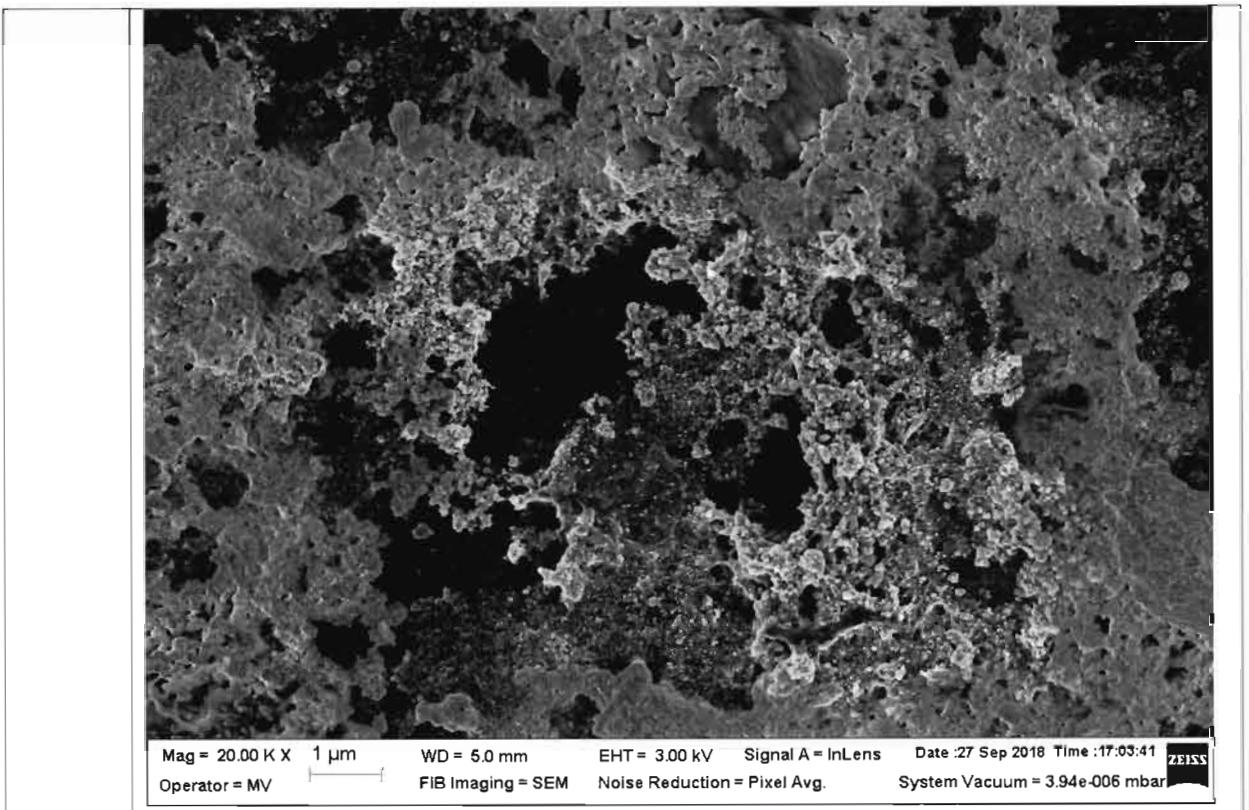


Fig.3 A

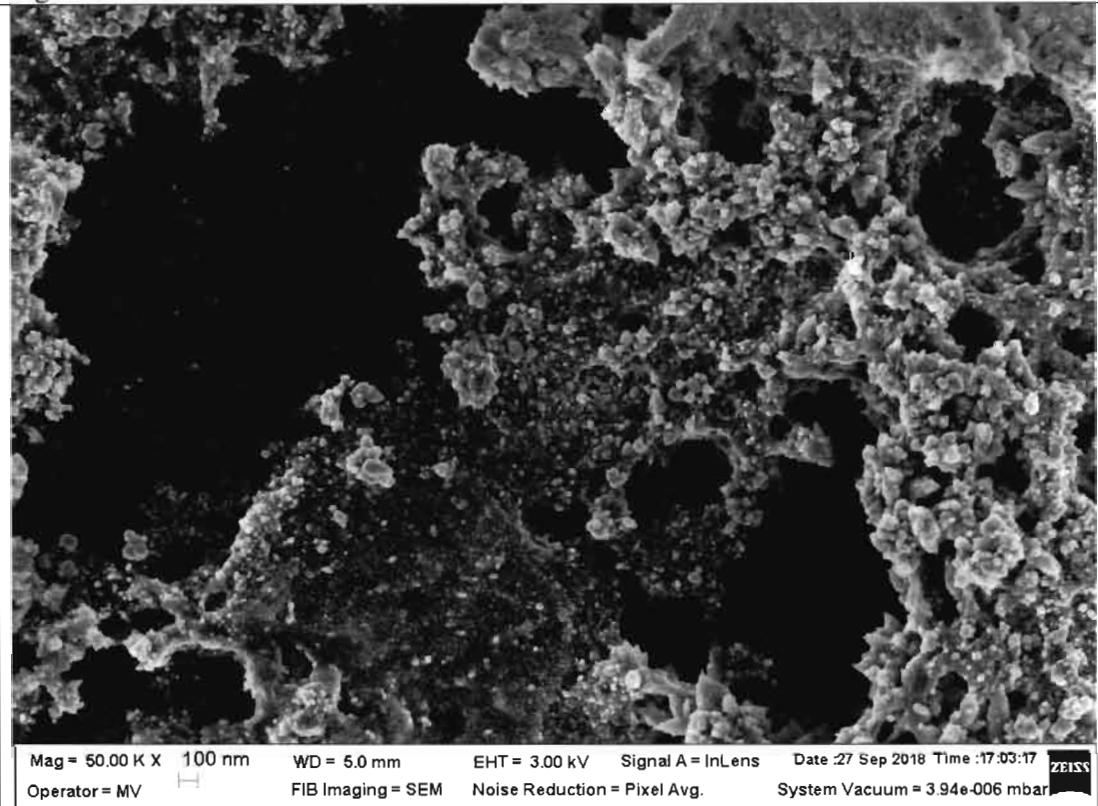


Fig.3 D

a 2018 00902

16/11/2018

27

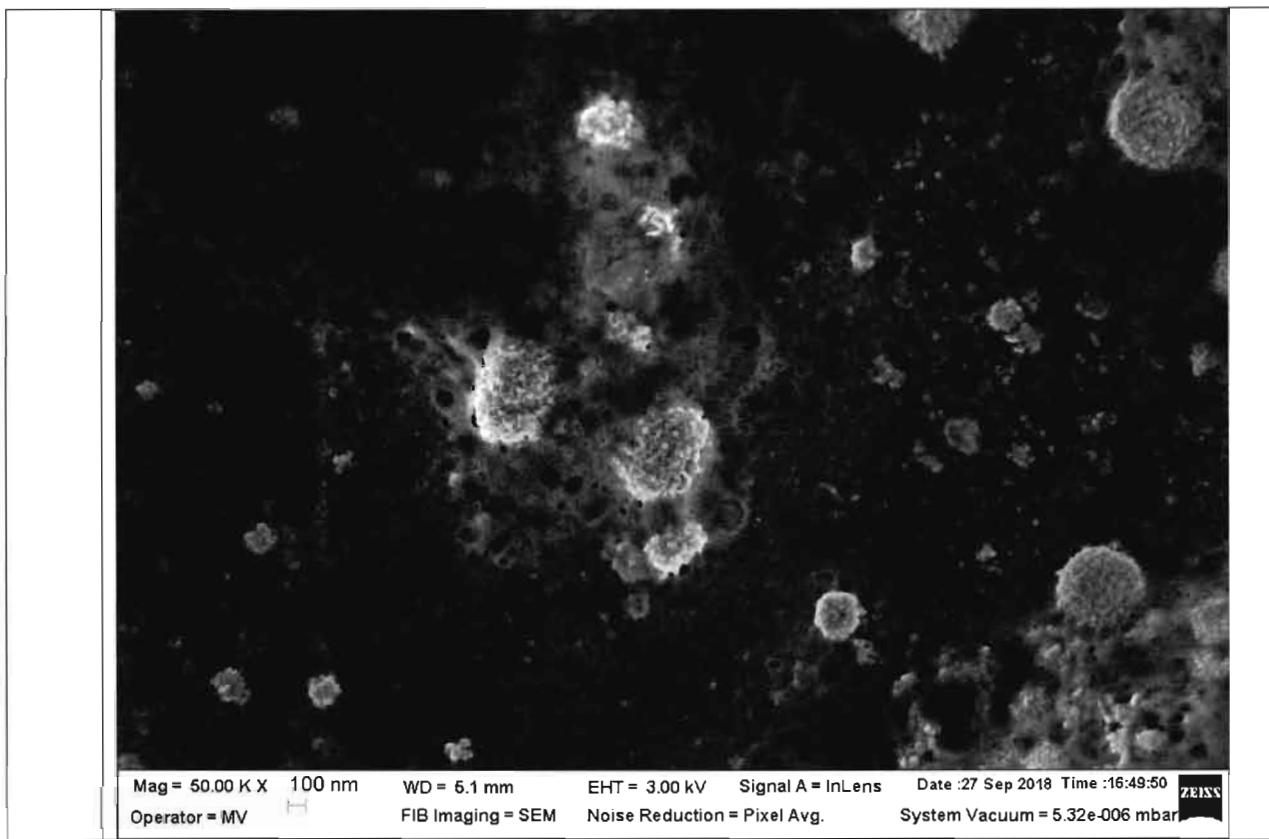


Fig.2.C

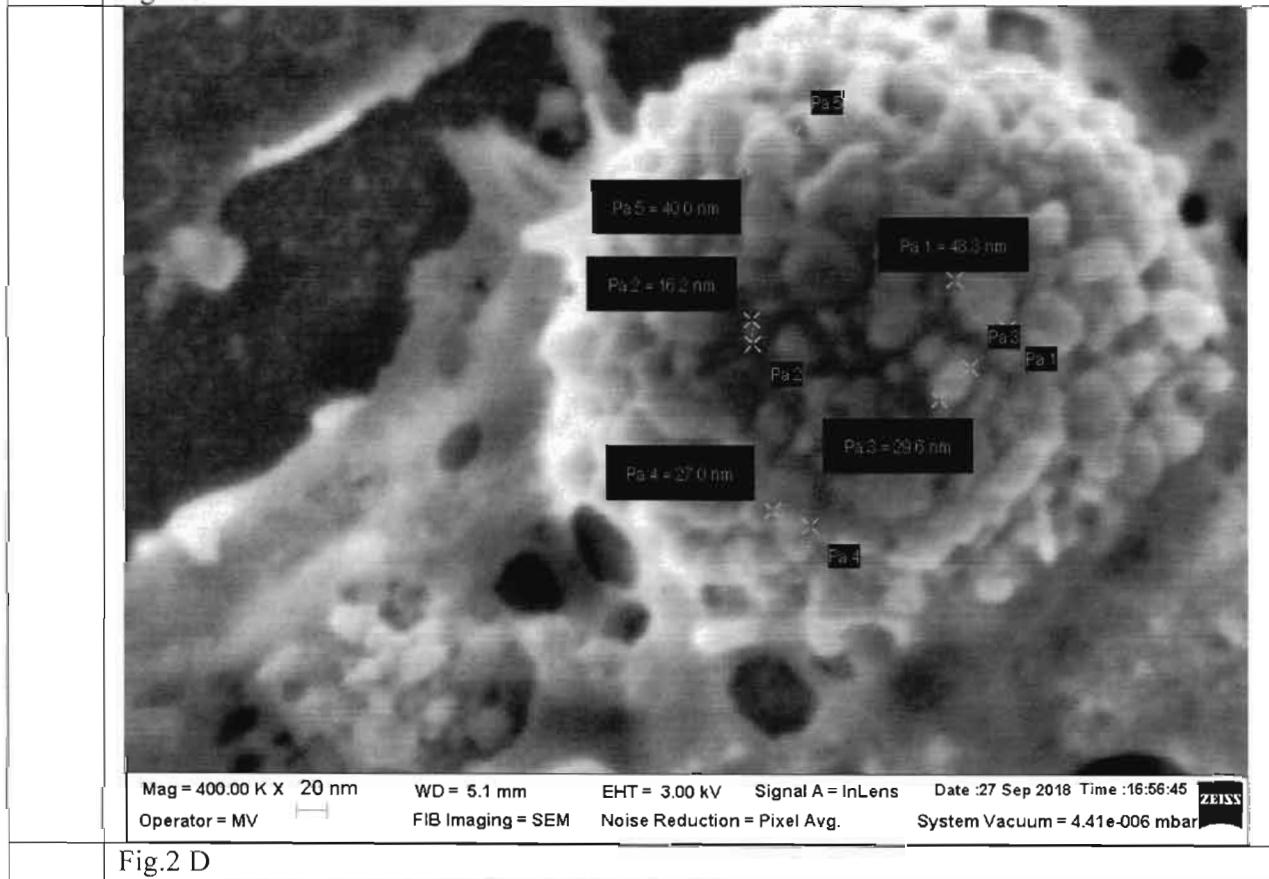


Fig.2 D

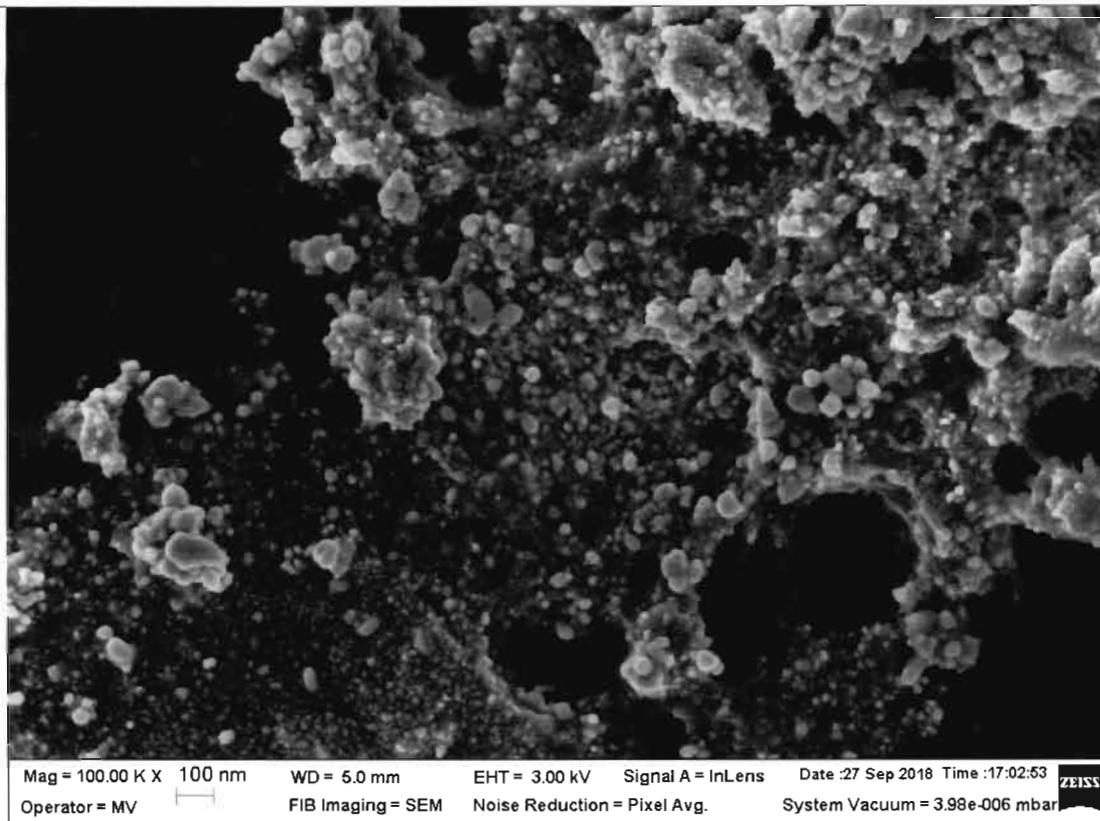


Fig.3 C

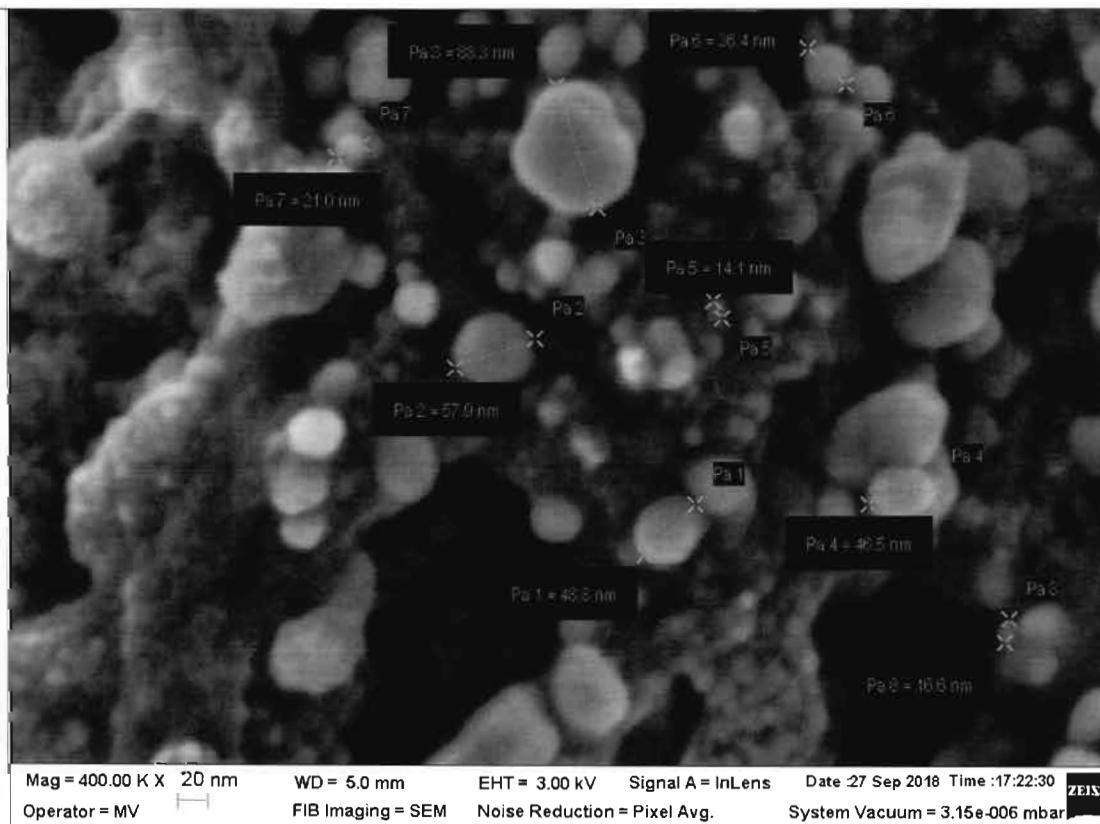


Fig.3 D

a 2018 00902

16/11/2018