



(12)

BREVET DE INVENȚIE

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

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/01/2023** BOPI nr. **1/2023**

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

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

(72) Inventatori:
• **ION IOANA, STR.LILIAULUI 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.LILIAULUI
7B, SAT PRUNI, MĂGURELE, IF, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**CN 104525965 (B); CN 101786170 (B);
US 2010/0297323 A1; CN 105618786 (A)**

(54) **AGREGATE PE BAZĂ DE NANOPARTICULE DE ARGINT
ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE A ACESTORA**



RO 134209 B1

1 Invenția se referă la agregate cu morfologie de tip "conopidă" formate din nano-
particule de argint biosintetizate extracelular *in situ* și la un procedeu de obținere cu aplicații
3 în industria farmaceutică, cosmetică, alimentară umană și animală și tratarea apelor poluate.

5 Este cunoscută din brevetul **CN 104525965 (B)** biosinteza nanoparticule de argint
utilizând diferite tipuri de alge limnotherix, scenedesmus quaciricauda printre care și *Chlorella*,
cu obținerea de nanoparticule de argint polidisperse neagregate în clustere.

7 De asemenea, este cunoscută din brevetul **CN 101786170 (B)** obținerea de
nanoparticule de aur-argint agregate în clustere cu morfologie 3D rugoasă de tip „conopidă”
9 cu o activitate de împrăștiere Raman îmbunătățită la suprafață, nanoparticulele obținute de
conopidă se pot menține stabile mai mult de 6 luni.

11 Este cunoscut din cererea de brevet **US 2010/0297323 A1** faptul că *Chlorella*
Sorokiniana este utilizată ca supliment alimentar în alimentația oamenilor și animalelor și prin
13 funcționalizarea acesteia cu nanoparticule de argint se lărgeste domeniul de utilizare prin
adăugarea de proprietăți antifungice și antibacteriene utilizabile în tratarea oamenilor,
15 animalelor și plantelor.

17 Din cererea de brevet **CN 105618786 (A)** este cunoscută o metodă de preparare a
unui aliaj de aur-argint nanometric utilizat ca un catalizator de colorant organic, aliajul are
activitate catalitică ridicată, poate fi utilizat pentru catalizarea degradării și decolorării
19 coloranților organici. Se cunosc numeroase soluții tehnice de sinteză a nanoparticulelor de
argint, acestea fiind folosite de foarte mult timp datorită multiplelor proprietăți fizice și chimice
21 cu multe posibilități de utilizare în industrie, medicină și farmacie. Nanoparticulele sunt
sintetizate prin diverse metode începând cu cele fizice (mecanice, iradiere cu UV, iradiere
23 cu microunde sau radiație gama, ablație laser), chimice și terminând cu metodele biologice.
Proprietățile sale chimice și fizice foarte variate se datorează posibilității de sinteză în diferite
25 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
27 alungită, triunghiulară, cubice, dodecaedrice.

29 Sinteza nanoparticulelor de argint conform invenției este făcută pe cale biologică
utilizând bioreducători din alge ne vom referi mai jos în mare măsură la metodele din cate-
goria „green chemistry” denumită și chimie ecologică.

31 Cele mai utilizate aplicații ale metalelor prețioase sub formă de nanoparticule au fost
acelea de materiale cu rol antibacterian (**Popa. et al. 2018, Soleimani M. et al. 2017,**
33 **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
35 **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
37 antibacteriene sunt folosite în diverse compozite polimetrice (**Kimberly A. et al. 201, Gagan**
Kaur et all 2015), ceramice (Lungu M. et al., 2014), carbonice (W.E. Jones et al 2010) și
39 **hibride (Wei X. et al. 2013).**

41 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.**
43 **2013; Parial D. et al. 2012; Rajeshkumar S. et al.2014)** dintre cele mai des întâlnite în
literatură 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.**
45 **Mukherjee et al.2001)** și bacterii (**Saifuddin N. et al.,2009**).

RO 134209 B1

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 fotosinteză, pentru reproducere având nevoie numai de bioxid de carbon, apă, lumină solară și o cantitate mică de minerale.

Datorită eficienței sale în fotosinteză, care teoretic poate ajunge până la 8%, depășind chiar nivelul înregistrat de culturile cele mai eficiente, precum trestia de zahăr.

Chlorella poate reprezenta o sursă potențială de hrană animală și umană, energie și materie primă 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).

Viteza de diviziune celulară este relativ mare, fiecare celulă divizându-se în 4 noi celule într-un timp de 17 până la 24 h.

Dezavantajele soluțiilor cunoscute sunt următoarele:

Nanoparticulele de argint biosintetizate sunt sintetizate în mod curent în laboratoarele de cercetare utilizând ca material reducător alga *Chlorella*.

Procedeu 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 biosintetizate *in situ* extracelular cu forma rotunjită, dimensiune între 15-60 nm, agregate în clustere cu structura tridimensională (3D) cu forma globulară și morfologie rugoasă de tip „conopidă” cu dimensiune între 100-500 nm, utilizând ca agent reducător fitochimicalele conținute în soluția *Chlorella Sorokiniana* în mediu de creștere BG11, la temperatura 30°C și iluminare constantă pe durata a 5 zile.

Agregate cu morfologie de tip „conopidă” formate din nanoparticule de argint biosintetizate înlătură dezavantajele menționate prin aceea că conțin nanoparticule de argint biosintetizate *in vivo* extracelular cu forma rotunjită cu dimensiune între 15-60 nm, agregate în clustere cu structura tridimensională (3D) cu forma globulară și morfologie rugoasă de tip „conopidă” cu dimensiune între 100-500 nm, în soluție de *Chlorella Sorokiniana* în mediu de creștere BG11, la temperatura 30°C și iluminare constantă pe durata a 5 zile, utilizând fitochimicalele conținute în algă ca agent reducător, disperant și stabilizator.

Procedeu de obținere pentru biosintetizarea nanoparticulelor de argint înlătură dezavantajele menționate prin aceea că constă în sinteza *in vitro* într-o soluție stoc de *Chlorella Sorokiniana* în mediul de cultura BG11 cu densitatea algei cuprinsă între 10-20 g/L în care se introduce soluție stoc de azotat de argint 5 mM, în cantități egale, menținute timp de 5 zile în camera climatică cu 30°C, iluminare constantă, cu agitare manuală de două ori pe zi, soluția își schimbă culoarea din verde smarald spre verde pal în primele 12 h, urmată de închiderea culorii până 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 și prin funcționalizarea acesteia cu nanoparticule de argint se lărgeste domeniul de utilizare prin adăugarea de proprietăți antifungice și antibacteriene utilizabile în tratarea oamenilor, animalelor și plantelor.

RO 134209 B1

1 Agregatele cu morfologie de tip „conopidă” formate din nanoparticule de argint
2 biosintetizate extracelular *in situ* sub acțiunea fitochemicalelor din *Chlorella Sorokiniana*
3 prezintă corpusculi globulari bine definiți atât la nivelul agregatelor cât și la nivelul particulelor
4 primare, ambele având suprafețe proprii disponibile pentru funcționalizarea sau/și reacții
5 chimice, biologice ducând la o mai mare reactivitate a acestora, având avantajul de a fi
6 sintetizată într-un mediu fără produși chimici determină o bună compatibilitate biologică a
7 acestui produs, excluzând etapele finale de purificare, separare, concentrare.

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

10 Procedul de realizare este simplu, eficient, ecologic, ieftin nu cuprinde etape supli-
11 mentare de preparare/purificare a materiei prime și a produșilor de reacție cum ar fi de sepa-
12 rare (extracție, filtrare, centrifugare) uscare, mărunțire, sterilizare, toate operațiile au loc fără
13 operații termice etc.

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

17 În continuare se dau 3 exemple de realizare a invenției în legătura cu fig. 1...3, care
18 reprezintă:

19 - fig. 1, spectrul UV-Vis pentru: a) soluția 1, conform invenției; b) soluția 2; și c) pentru
20 soluția 3;

21 - fig. 2. a, b, c, d, micrografii SEM pentru soluția 1, conform invenției;

22 - fig. 3. a, b, c, d Micrografii SEM pentru soluția 2;

23 - tabelul 1, parametrii spectrali pentru spectrul UV-Vis de absorbție pentru soluția 1-3.

24 În continuare se dau 3 exemple de realizare a invenției în care diferența constă în
25 compoziția soluției stoc de azotat de argint și modul de preparare a acestora.

26 Pentru biosinteza nanoparticulelor de argint au fost utilizate două soluții stoc de alge
27 *Chlorella Sorokiniana* și soluție stoc de azotat de argint 5 mM în cantități egale.

28 Mediul de cultură utilizat pentru creșterea microalgei monocelulare verzi de *Chlorella*
29 *Sorokiniana* cuprinde între 10-100 ml soluție BG11 (Blue Green medium 11) adăugate la
30 1000 ml de apă. Soluția stoc constă în mediul de cultură cu alga *Chlorella Sorokiniana* cu
31 densitatea algei cuprinsă între 10-20 g/L. Soluția stoc de *Chlorella Sorokiniana* are dublu rol
32 de reducător (bio-reducător prin fitochimicalele care le conține) și rol de agent de dispersare
33 și stabilizare.

Exemplul 1

34 25 ml soluție stoc de azotat de argint 5 mM a fost amestecată cu 25 ml soluție stoc
35 de *Chlorella Sorokiniana*. Soluția astfel formată se va denumi soluția 1. Soluția 1 este
36 menținută timp de 5 zile în camera climatică în următoarele condiții: 30°C și atmosfera cu
37 oxigen, iluminare constantă și atmosfera oxigenată. Soluția își schimbă culoarea din verde
38 smarald spre verde pal în primele 12 h, urmată de închiderea culorii până la negru bun în
39 ziua 3. Soluția a fost caracterizată prin spectroscopie UV-Vis pentru determinarea
40 parametrilor optici ai soluției și prin microscopie SEM pentru determinarea dimensiunii de
41 particule a nanoparticulelor de argint biosintetizate și morfologia acestora.

43

Soluția	Spectru UV-Vis.-reprezentat	λ_{\max} [nm] [#]	I_{abs} [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 exprimat în nm,

^{*} intensitate spectrului de absorbție exprimată în unități arbitrare a.u.

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

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

Din microscopiile SEM, fig. 2a-c, la magnificații cuprinse între 5,00-400,00 K 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 algelor - *Chlorella Sorokiniana*, este înconjurat și acoperit de particulele mai mici albe strălucitoare din argint.

La creșterea magnificației se vede clar morfologia nanoparticulelor de argint cu forme rotunjite, dimensiunii între 15-60 nm agregate în clustere cu structura tridimensională (3D), cu forma globulară și morfologie rugoasă de tip „conopidă” cu dimensiune între 100-500 nm.

Exemplul 2

25 ml soluție stoc de azotat de argint 5 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°C, iluminare circadiană, sonicată 30 min 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 fig. 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 microscopiile SEM, fig. 3 a-c, la magnificații cuprinse între 5,00-400,00 K se poate vedea clar că sinteza nanoparticulelor de argint este extracelulară, nu sunt vizibile reziduuri de alge, nanoparticulele de argint biosintetizate *in situ* sunt polidisperse cu forma rotunjită și dimensiuni cuprinse între 16-210 nm.

Exemplul 3

25 ml soluție stoc de azotat de argint 5 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 aceleași condiții cu soluția 2. Soluția a fost caracterizată prin spectroscopie UV-Vis pentru determinarea parametrilor optici.

În fig. 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].

RO 134209 B1

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

3 Agregatele de nanoparticule de argint biosintetizarea cu morfologie de tip „conopidă”
și procedeul de obținere conform invenției constă în biosintetizarea extracelulară de
5 nanoparticule de argint *in situ* cu forma rotunjită, dimensiune între 15-60 nm, agregate în
clustere cu structura tridimensională (3D), cu forma globulară și morfologie rugoasă de tip
7 „conopidă” cu dimensiune între 100-500 nm, utilizând ca agent reducător, disperant și
stabilizator fitochimicalele conținute în soluții de *Chlorella Sorokiniana* în mediu de creștere
9 BG11, la temperatura de 30°C și iluminare constantă.

11 Agregatele cu morfologie de tip „conopidă” formate din nanoparticule de argint
biosintetizate extracelular *in situ* sub acțiunea fitochemicalelor din *Chlorella Sorokiniana*
prezintă corpusculi globulari bine definiți atât la nivelul agregatelor cât și la nivelul particulelor
13 primare, ambele având suprafețe proprii disponibile pentru functionalizarea sau/și reacții
chimice, biologice ducând la o mai mare reactivitate a acestora, având avantajul de a fi
15 sintetizată într-un mediu fără produși chimici determină o bună compatibilitate biologică a
acestui produs, excluzând etapele finale de purificare, separare, concentrare.

RO 134209 B1

Revendicări

1. Agregate pe bază de nanoparticule de argint cu structura tridimensională 3D cu forma globulară și morfologie rugoasă de tip „conopidă” **caracterizate prin aceea că**, au o formă rotunjită cu dimensiune între 15...60 nm, sunt agregate în clustere cu formă globulară și morfologie rugoasă de tip „conopidă”, cu dimensiune între 100...500 nm, având suprafețe proprii disponibile pentru funcționalizare în reacții chimice și biologice.
2. Procedeu de obținere a agregatelor pe bază de nanoparticule de argint conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, biosinteza are loc *in vivo* într-o soluție de *Chlorella Sorokiniana* într-un mediu de cultură BG11 cu o densitate a algei cuprinsă între 10...20 g/l în care se introduce o soluție de azotat de argint 50 M, în cantități egale, soluția obținută se menține timp de 5 zile în camera climatică cu 30°C, se iluminează constant, se agită manual de două ori pe zi, în aceste condiții soluția își schimbă culoarea din verde smarald spre verde pal în primele 12 h, urmată de închiderea culorii până la negru brun în ziua a 3-a.

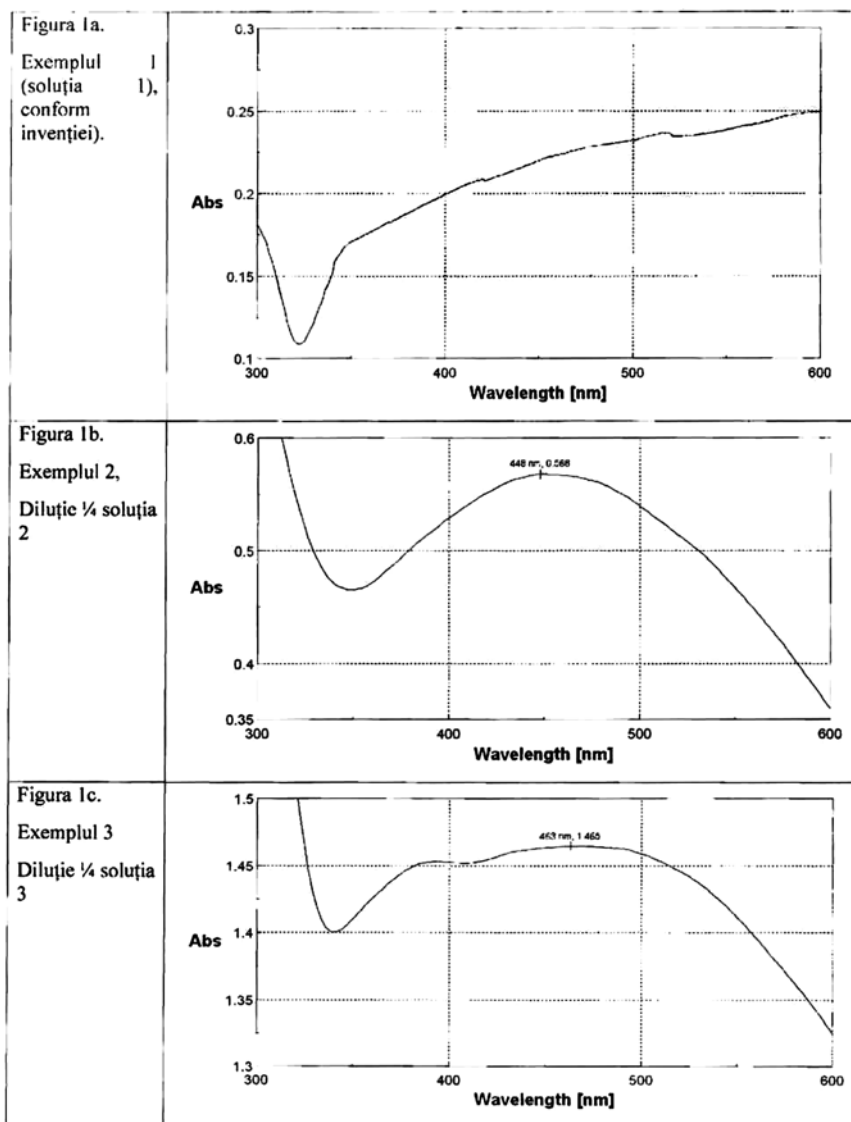


Fig. 1

(51) Int.Cl.

B22F 9/24 (2006.01);

C01G 5/00 (2006.01)

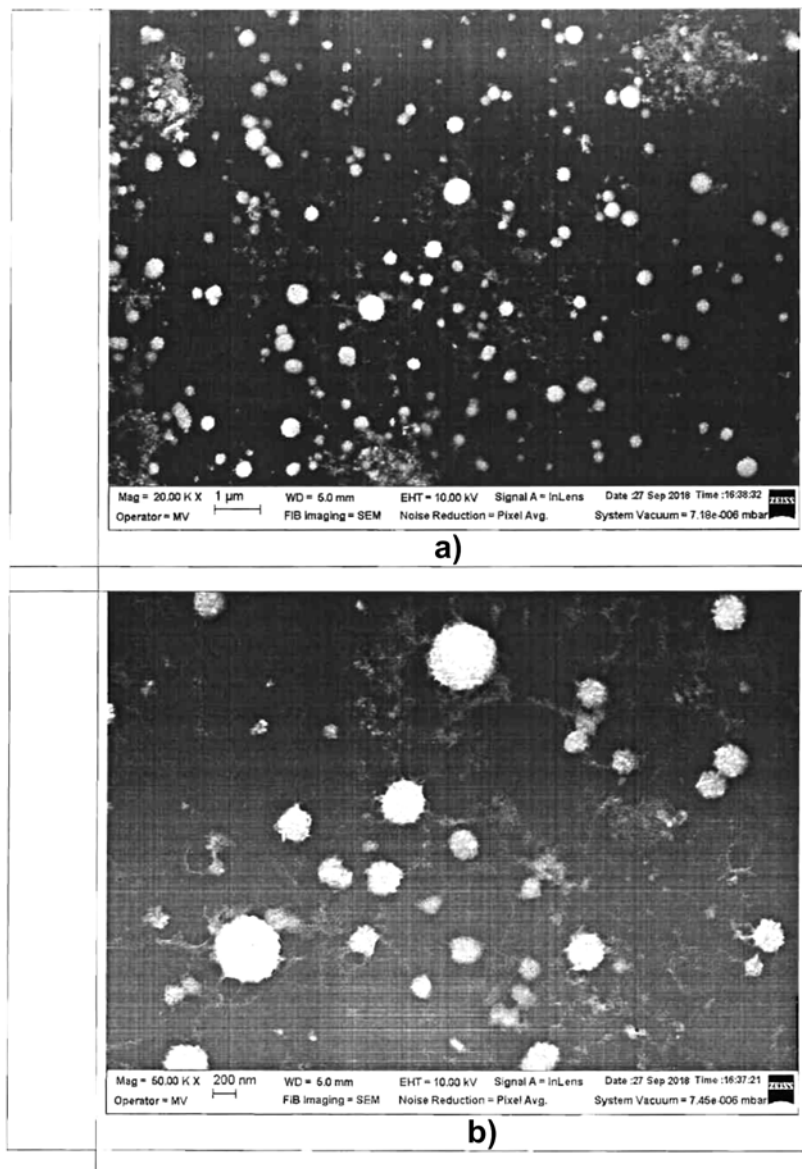
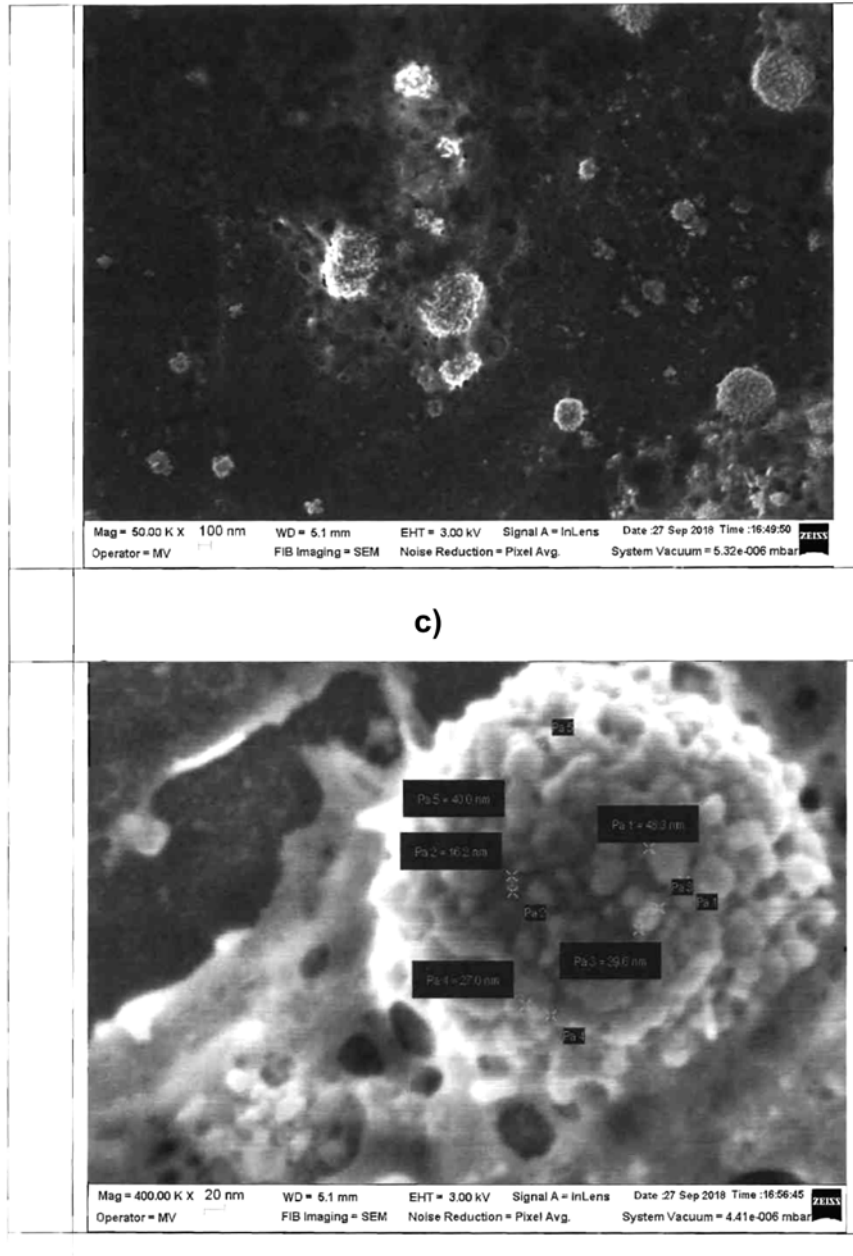


Fig. 2

(51) Int.Cl.

B22F 9/24 (2006.01);

C01G 5/00 (2006.01)



(51) Int.Cl.

B22F 9/24 (2006.01);

C01G 5/00 (2006.01)

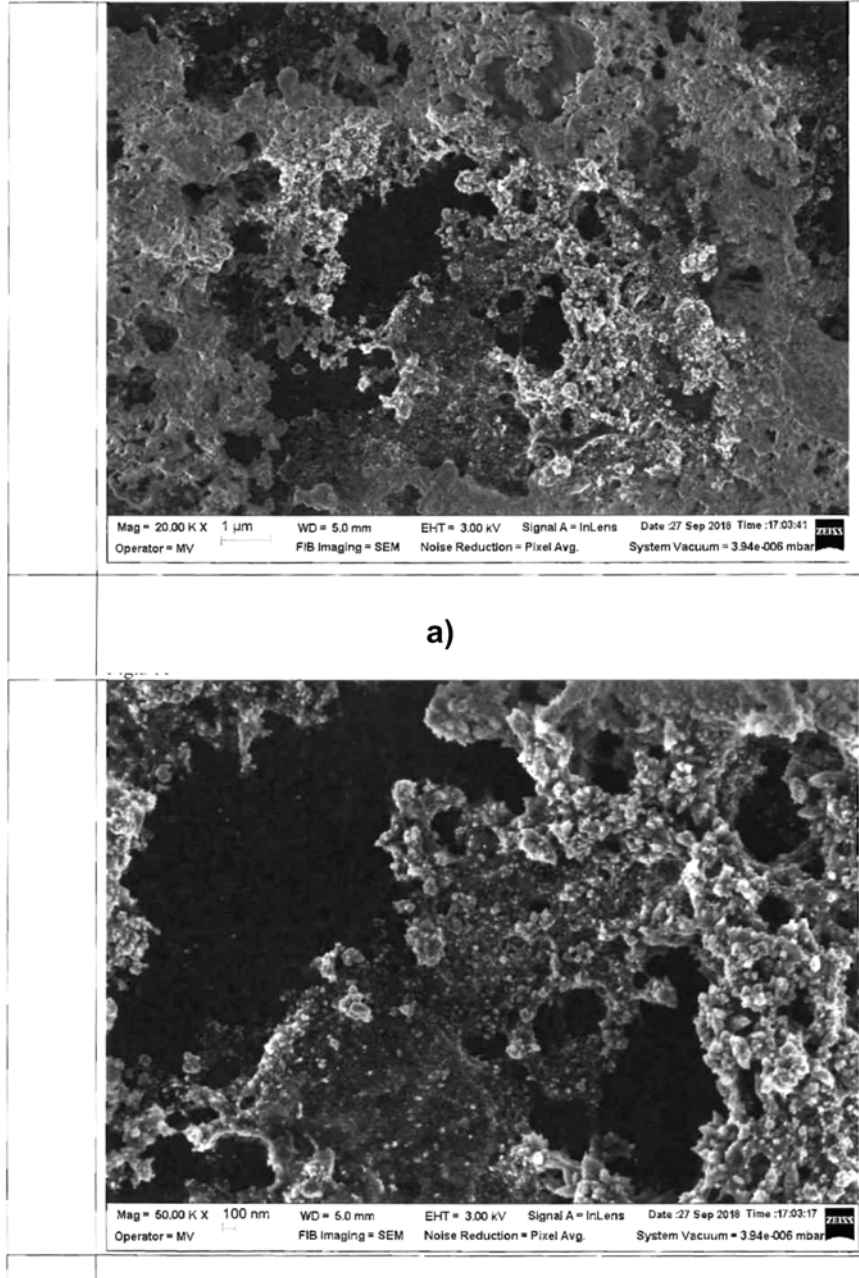


Fig. 3

(51) Int.Cl.

B22F 9/24 (2006.01),

C01G 5/00 (2006.01)

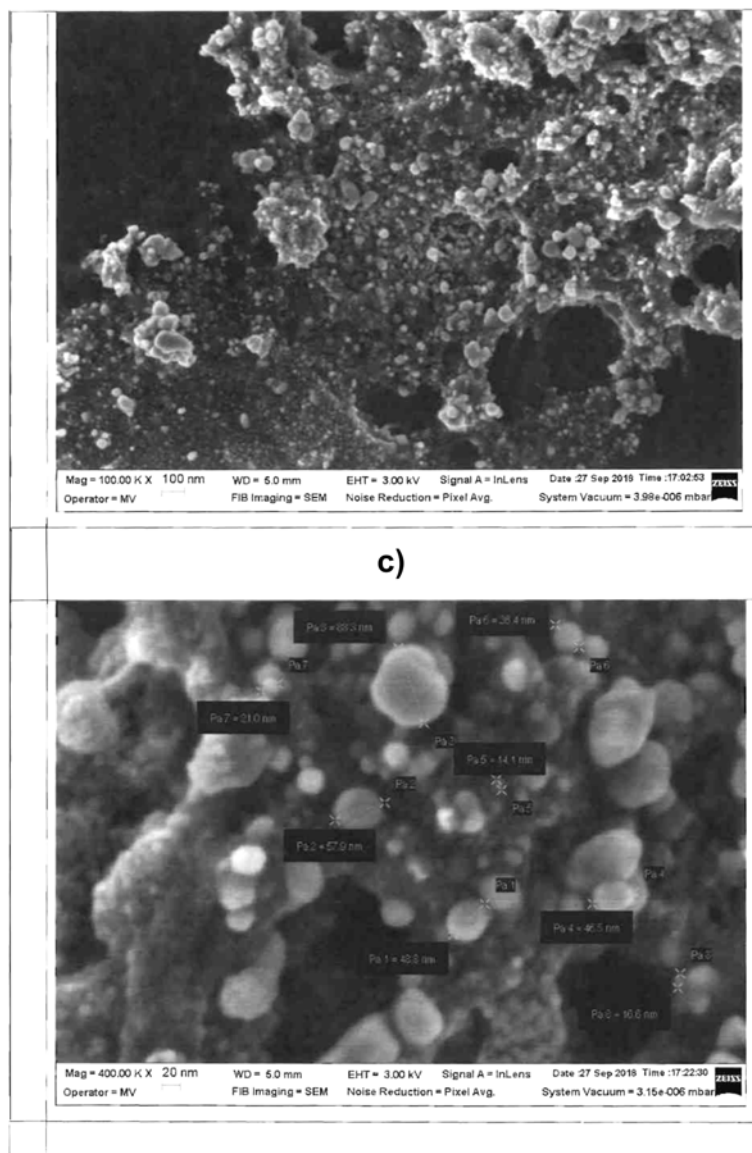


Fig. 3



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 32/2023