



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2023 00154**

(22) Data de depozit: **31/03/2023**

(41) Data publicării cererii:
30/08/2023 BOPI nr. **8/2023**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA "TRANSILVANIA" DIN
BRAȘOV, BD.EROILOR NR.29, BRAȘOV,
BV, RO**

(72) Inventatori:
• **DAVID MELINDA, STR. CARPAȚILOR
NR.37, BL.R1, SC.A, AP.10, BRAȘOV, BV,
RO;**
• **FLORESCU MONICA,
STR.BRÂNDUȘELOR NR.41, BL.112,
AP.29, BRAȘOV, BV, RO**

(54) **SOLUȚIE COLOIDALĂ DE NANOPARTICULE DE AUR
ȘI PROCEDEU DE SINTEZĂ BIOLOGICĂ**

(57) **Rezumat:**

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui compus de tip nanoparticule de aur cu aplicații biomedicale și cosmetice. Procedeu, conform invenției, constă în etapele: obținerea extractului de nucă hidrosolubil prin metoda extracției cu ultrasunete în solvent hidro-alcoolic, obținerea AuNP pe cale biologică prin reducerea acidului cloroauric cu extractul de miez de nucă hidrosolubil (JsUS) rezultând o soluție coloidală (AuNP-JsUS) cu proprietăți catalitice și antioxidante

îmbunătățite, conținând 0,01% AuNP, 4,16% extract de nucă hidrosolubil și 95,83% apă ultrapură, având un maxim de absorbție la 530 nm, o morfologie sferică cu un diametru mediu al particulelor de aprox. 20 nm și stabilitate în timp de până la 90 zile la temperatura de 4...8°C.

Revendicări: 2
Figuri: 7



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr. a 2023 de 154	
1	Data depozit 3.1.-03.-2023.....

51

Soluție coloidală de nanoparticule de aur și procedeu de sinteză biologică

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui compus de tip nanoparticule de aur, care, datorită procesului de sinteză pe cale biologică, sunt funcționalizate cu grupări cu proprietăți antioxidante, destinat aplicațiilor din domeniul biomedical și/sau cosmetică. Aceste nanoparticule de aur prezintă și proprietăți catalitice îmbunătățite. **Produsul** obținut se referă la soluția coloidală de nanoparticule de aur.

Este cunoscut faptul că nanoparticulele de aur (AuNP) au interes crescut din cauza proprietăților lor optice și de cataliză unice. În esență, aurul este un metal inert și netoxic, fiind ideal pentru aplicații în medicină. Prin sinteza pe cale biologică, AuNP pot fi funcționalizate cu compuși activi ce pot avea funcționalități reducătoare sau stabilizatoare, proprietăți catalitice, antioxidante sau antibacteriene îmbunătățite [Jeevanandam, J.; Kiew, S.F.; Boakye-Ansah, S.; Lau, S.Y.; Barhoum, A.; Danquah, M.K.; Rodrigues J. Green approaches for the synthesis of metal and metal oxide nanoparticles using microbial and plant extracts. *Nanoscale* 2022, 14, 2534-2571, DOI: <https://doi.org/10.1039/D1NR08144F>]. O procedură simplă pentru sinteza pe cale biologică presupune amestecarea unui extract hidrosolubil din plante cu o soluție apoasă de sare metalică. Compușii activi din extract sunt responsabili pentru reducerea sării de aur, obținându-se nanoparticulele de aur [Dauthal, P.; Mukhopadhyay, M. *Noble Metal Nanoparticles: Plant-Mediated Synthesis, Mechanistic Aspects of Synthesis, and Applications*. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2016, 55, 36, 9557–9577, DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b00861>]. Extractele hidrosolubile din plante (în întregime sau în părți) sunt disponibile comercial sau pot fi obținute cu ușurință prin uscarea, fierbere și filtrare, sau prin extracție asistată de ultrasunete sau presiune [Radulescu, C.; Stihi, C.; Ilie, M.; Lazurcă, D.; Gruia, R.; Olaru, O.T.; Bute, O.C.; Dulama, I.D.; Stirbescu, R.M.; Teodorescu S.; Florescu, M. Characterization of Phenolics in *Lavandula angustifolia*. *Anal. Lett.* 2017, 50(17), 2839–2850, DOI: <https://doi.org/10.1080/00032719.2016.1264409>]. Forma și dimensiunea nanoparticulelor obținute pe cale biologică depinde de natura și cantitatea compușilor activi din extract [Hussain, I.; Singh, N.B.; Singh, A.; Singh, H.; Singh, S.C. Green synthesis of nanoparticles and its potential application. *Bio-technol. Lett.* 2016, 38(4), 545–560, DOI: <https://doi.org/10.1007/s10529-015-2026-7>].

Sunt cunoscute metodele clasice de sinteză a AuNP: metoda fizică și metoda chimică. Metoda fizică presupune aplicarea unor procedee termice de evaporare, frezare cu bile, piroliză



prin pulverizare, flacăra de difuzie, tehnici litografice sau tehnici ce presupun folosirea plasmei și a unor lasere puternice [Sepúlveda, B.; Angelomé, P.C.; Lechuga, L.M.; Liz-Marzán, L.M. LSPR-based nanobiosensors. *Nanotoday*, 4(3), 2009, 244-251, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2009.04.001>]. Metoda chimică este mai apropiată de cea biologică, însă presupune folosirea unor soluții chimice foarte reactive pentru tehnici precum electrodepunerea, hidroliza, co-precipitarea sau procese sol-gel [Sasidharan, S.; Raj, S.; Sonawane, S.; Pinjari, D.; Pandit, A.B.; Saudagar, P. Nanomaterial synthesis: chemical and biological route and applications. In: *Nanomaterials Synthesis*. Elsevier; 2019:27–51, DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S233789>].

Soluțiile cunoscute prezintă următoarele dezavantaje: necesită aparatură scumpă de laborator, procedee laborioase cu un consum de energie ridicat și costuri de fabricare ridicate în cazul metodelor fizice. Metodele chimice sunt mai versatile însă presupun folosirea multor reactivi chimici ce prezintă toxicitate, atât pentru mediu, cât și pentru organismul uman.

Este cunoscut că metoda de sinteză biologică poate oferi diverse beneficii, precum un consum redus de energie sau costuri de producție mai mici, metoda este prietenoasă cu mediul, iar compușii activi din plante conțin agenți reducători și stabilizatori ce permit adaptarea funcționalității nanoparticulelor pentru aplicația dorită [Jeevanandam, J.; Kiew, S.F.; Boakye-Ansah, S.; Lau, S.Y.; Barhoum, A.; Danquah, M.K.; Rodrigues J. Green approaches for the synthesis of metal and metal oxide nanoparticles using microbial and plant extracts. *Nanoscale* 2022, 14, 2534-2571, DOI: <https://doi.org/10.1039/D1NR08144F>]. Metoda de sinteză biologică a luat amploare în ultimii ani, însă cu toate acestea, potențialul plantelor pentru sinteza AuNP nu este încă pe deplin explorat din cauza diversității vaste a plantelor și a compoziției lor [Shreyash, N.; Bajpai, S.; Khan, M.A.; Vijay, Y.; Tiwary, S.K.; Sonker, M. Green Synthesis of Nanoparticles and Their Biomedical Applications: A Review. *ACS Appl. Nano Mater.* 2021, 4, 11, 11428–11457, DOI: <https://doi.org/10.1021/acsanm.1c02946>]. În general, s-a demonstrat până în prezent că AuNP-urile posedă o activitate catalitică excelentă, asemănătoare enzimelor, putând fi utilizate în cosmetică, pentru vindecarea rănilor [David, M.; Serban, A.; Radulescu, C.; Danet, A.F.; Florescu, M. Bioelectrochemical evaluation of plant extracts and gold nanozyme-based sensors for total antioxidant capacity determination. *Bioelectrochemistry* 2019, 129, 124-134, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2019.05.011>] sau în tratamente împotriva celulelor canceroase [8. Lian, M.; Shao, S.; Liu, M.; Shi, Y.; Zhang, H.; Chen, D. Cell membrane-coated nanoparticles as peroxidase mimetics for cancer cell targeted detection



A handwritten signature in black ink, consisting of stylized letters, located at the bottom right of the page.

and therapy. Talanta 2022, 238(P2), 123071, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.123071>].

Literatura de specialitate prezintă numeroase studii ale procedului de sinteză pe cale biologică a nanoparticulelor de aur folosind extracte vegetale [A.A. Dudhane, S.R. Waghmode, L.B. Dama, V.P. Mhaindarkar, A. Sonawane, S. Katariya, Synthesis and Characterization of Gold Nanoparticles using Plant Extract of Terminalia arjuna with Antibacterial Activity, Int. J. Nanosci. Nanotechnol., Vol. 15, No. 2, June. 2019, pp. 75-82; P. Boomi, R. Ganesan, G.P. Poorani, S. Jegatheeswaran, C. Balakumar, H.G. Prabu, K. Anand, N.M. Prabhu, J. Jeyakanthan, M. Saravanan, Phyto-Engineered Gold Nanoparticles (AuNPs) with Potential Antibacterial, Antioxidant, and Wound Healing Activities Under in vitro and in vivo Conditions, International Journal of Nanomedicine 2020:15 7553–7568, DOI: <http://doi.org/10.2147/IJN.S257499>], printre care cojile verzi de nucă [Z. Izadiyan, K. Shameli, H. Hara, S.H. Mohd Taib, Cytotoxicity assay of biosynthesis gold nanoparticles mediated by walnut (Juglans regia) green husk extract, Journal of Molecular Structure 1151 (2018) 97-105, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.09.039>] sau alte tipuri de nuci, precum nucile macadamia [H. Dang, D. Fawcett, G.E. Jai Poinern, Green synthesis of gold nanoparticles from waste macadamia nut shells and their antimicrobial activity against Escherichia coli and Staphylococcus epidermis, Int J Res Med Sci. 2019 Apr; 7(4):1171-1177, DOI: <http://dx.doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20191320>], dar nu și miezul de nucă autohton (Juglans Regia L. seed). S-a demonstrat că toate aceste nanoparticule au efecte antioxidante, antiinflamatorii și activități antitumorale și se presupune că aceste caracteristici sunt preluate din grupările funcționale ale compușilor activi din plante.

Atât în țară cât și în străinătate se cunosc cercetări (cu rezultate în domeniu și cu potențial pentru dezvoltare) privind diferite procedee de sinteză a AuNP. RO130210 (B1) se referă la un procedeu pentru obținerea unui material hibrid ce conține nanoparticule de aur complexate cu liganzi antociani, obținuți din extracte naturale din fructe, cu utilizare în medicină, pentru obținerea de creme în terapia leziunilor psoriatică. Moleculele organice cu grupări funcționale au ca rol modificarea suprafeței nanoparticulei și stabilizarea coloidului ce conține particule cu dimensiunea medie de 21-32 nm la 88% dintre nanoparticule. RO134304 (A0) se referă la un procedeu simplu și rapid de obținere a nanoparticulelor de magnetită cu un înveliș de aur, unde nanoparticulele de magnetită sunt acoperite cu aur prin reducerea acidului cloroauric HAuCl_4 folosind glucoza ca agent reducător. De asemenea, glucoza este folosită și ca agent stabilizator



al soluției coloidale de nanoparticule. RO135570 (A2) se referă la un procedeu de obținere a unor nanoparticule bimetalice (aur-argint) funcționalizate cu mannan pentru aplicații antibacteriene-antituberculoase. Inițial, nanoparticulele de aur se obțin prin reducerea sării de aur cu citrat de sodiu, după care se efectuează depunerea unor straturi successive de Ag metalic în prezența acidului L-ascorbic la un pH bazic. Concomitent se efectuează carboxilarea soluției apoase de mannan în vederea cuplării ulterioare a acestuia pe suprafața nanoparticulelor bimetalice de tip Au-Ag, prin co-incubarea acestora. AU2021103073A4 se referă la metoda implicată în producția de nanoparticule de aur și argint funcționalizate cu curcumină pentru aplicații biomedicale. S-au demonstrat proprietățile anticancerigene, antimicrobiene, antiinflamatorii și antioxidante ale compozitelor, și o stabilitate prelungită, chiar și după diluții succesive. KR101882849B1 se referă la un procedeu de obținere a nanoparticulelor metalice (aur și argint) cu un extract de ginseng negru. KR101843764B1 se referă la un procedeu de obținere a nanoparticulelor de aur cu un extract de *Bambusae Caulis in Taeniam* pentru aplicații cosmetice. US2017100338A1 se referă la o metodă de tratare a rănilor diabetice cu ajutorul unor nanoparticule de aur sintetizate cu ajutorul unui extract de plante obținut din *Solenostemma argel*, *Trigonella foenum -graecum* și *Cinnamomum cassia*. CN105057692A se referă la un procedeu de obținere a nanoparticulelor de aur cu suc natural de fructe citrice, fără a se adăuga agenți chimici de protecție (pentru stabilitate și dispersabilitate).

Scopul invenției este de a genera un nou tip de nanoparticule de aur cu grupări funcționale obținute în urma sintezei pe cale biologică, care prezintă proprietăți catalitice îmbunătățite și proprietăți antioxidante, fiind astfel utilizabile pentru aplicații biomedicale (dermatologie, vindecarea rănilor, biosensing) și cosmetice, care prezintă avantajul unui procedeu de sinteză simplu și rapid, cu costuri reduse și un nivel scăzut de poluare a mediului.

Problema pe care o rezolvă procedeul este legată de evitarea metodelor laborioase, costisitoare și poluante, înlocuindu-le pe acestea cu o metodă simplă, rapidă și ecologică. De asemenea, utilizarea extractului de nucă ca agent reducător al sării de aur conferă o biocompatibilitate crescută, care acționează și ca agent stabilizator, eliminând necesitatea de a folosi agenți stabilizatori de natură chimică. Grupările funcționale rămase pe suprafața AuNP în urma folosirii extractului de nucă (JsUS) conferă o capacitate antioxidantă ridicată, ce permit utilizarea acestora în aplicații *in-vivo*.

Procedeul se definește ca o succesiune de etape și constă în optimizarea parametrilor pentru sinteza biologică a AuNP. Prima etapă se referă la obținerea extractului de nucă: acesta



trebuie sa fie hidrosolubil, poate fi achiziționat din comerț sau se poate obține prin metoda extracției cu ultrasunete, folosind ca solvent un amestec hidro-alcoolic [M. David, A. Șerban, C.V. Popa, M. Florescu, A Nanoparticle-Based Label-Free Sensor for Screening the Relative Antioxidant Capacity of Hydrosoluble Plant Extracts, Sensors 2019, 19, 590; DOI: <https://doi.org/10.3390/s19030590>]. A doua etapă se referă la obținerea AuNP pe cale biologică. Extractul de nucă a fost adăugat lent sub agitare continuă la o soluție apoasă de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ încălzită la $\sim 70^\circ\text{C}$. Încălzirea a fost oprită o dată cu schimbarea culorii soluției din galben-transparent în roșu-violet, iar soluția a fost lăsată să se răcească la temperatura camerei sub agitare. Soluția coloidală a fost apoi purificată prin centrifugare, iar precipitatul sedimentat a fost redispersat în apă ultrapură și sonicat pentru a asigura o distribuție omogenă. Soluția finală se păstrează la temperaturi de $4-8^\circ\text{C}$, în recipiente din sticlă brună și poate fi utilizată până la 3 luni de la data fabricației, în aceleași condiții de stabilitate.

Produsul se definește prin compoziția soluției coloidale (AuNP-JsUS) ce conține 0.01% AuNP, 4.16% extract de nucă hidrosolubil și 95.83% apă ultrapură; și ce prezintă următoarele caracteristici: un maxim de absorbție la 530 nm, o morfologie sferică cu o mărime medie a diamterului AuNP-JsUS de 19.6 ± 0.3 nm pentru 62% din proba analizată.

Produsul obținut prin procedeul de sinteză biologică prezintă următoarele avantaje: s-a demonstrat că grupările funcționale de pe AuNP-JsUS rezultate în urma reducerii sării de aur cu extract hidrosolubil de nucă prezintă proprietăți antioxidante. De asemenea, AuNP obținute prezintă omogeneitate, o distribuție a mărimii bună și au o stabilitate ridicată de până la 3 luni, păstrate la temperaturi de $4-8^\circ\text{C}$. De asemenea, AuNP-JsUS obținute prezintă proprietăți catalitice îmbunătățite.

În figurile anexate, care fac parte din prezenta invenție, sunt redată următoarele:

Figura 1 prezintă spectrul de absorbție UV-Vis al nanoparticulelor de aur obținute cu extract hidrosolubil de nucă, prin comparație cu cele obținute cu 1% citrat cu inserția unei poze cu soluția finală de AuNP-JsUS.

Figura 2 prezintă: a) imaginea de microscopie electronică în transmisie (TEM) a AuNP-JSUS; b) histograma de distribuție a mărimii diametrului ale AuNP cu inserarea potrivirii distribuției gaussiene.

Figura 3 prezintă studiul de stabilitate al AuNP-JsUS monitorizând intensitatea maximului de absorbție la 530 nm în funcție de timp.



A large, stylized handwritten signature in black ink, located to the right of the official seal.

Figura 4 prezintă spectrele FTIR-ATR (Spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier cu modul de reflectanță totală atenuată) ale regiunii de amprentă specifică între 1800 – 800 cm^{-1} pentru extractul hidrosolubil de nucă și AuNP-JsUS obținute cu ajutorul acestuia.

Figura 5 prezintă voltametria ciclică ale AuNP-JsUS în comparație cu cele sintetizate prin metoda chimică în prezența apei oxigenate (H_2O_2).

Figura 6 prezintă activitatea antioxidantă in vitro a AuNP-JsUS comparativ cu cea a vitaminei C, în prezența radicalului liber DPPH. S-au înregistrat maximele de absorbție la 519 nm, iar neutralizarea radicalilor DPPH a fost exprimată ca procent în comparație cu controlul negativ.

Figura 7 prezintă a) activitatea de neutralizare a radicalului liber H_2O_2 . S-a realizat curba de calibrare a diluțiilor H_2O_2 prin înregistrarea maximului de absorbție la 225 nm în prezența (inserție a) și absența unei concentrații de 0.005% AuNP-JsUS; b) ilustrează procentul de captare/neutralizare a H_2O_2 în funcție de concentrație, permițând determinarea EC_{50}

Se prezintă în continuare un exemplu concret, nelimitativ, de realizare a invenției:

Procedeul de sinteză al nanoparticulelor de aur cu ajutorul unui extract de nucă hidrosolubil obținut după [M. David, A. Șerban, C.V. Popa, M. Florescu, A Nanoparticle-Based Label-Free Sensor for Screening the Relative Antioxidant Capacity of Hydrosoluble Plant Extracts, Sensors 2019, 19, 590; DOI: <https://doi.org/10.3390/s19030590>], dar nu limitat la acest procedeu de extracție, constă în combinarea a 12 μL soluție apoasă HAuCl_4 (1g/mL - $\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$; 99.9%; MW = 393.83 g/mol dizolvat în apă ultrapură) cu 11.5 mL apă ultrapură și soluția este adusă la 90°C sub agitare continuă. Odată atinsă temperatura de 90°C, aceasta este coborâtă la 70°C pentru a nu denatura proprietățile extractului. După stabilizarea soluției la 70°C se adaugă prin picurare 0.5 mL extract de nucă hidrosolubil (JsUS). Încălzirea este oprită la scurt timp după adăugarea extractului (< 1 min) deoarece soluția finală își schimbă culoarea de la galben pal la violet (inserție figura 1), indicând formarea AuNP-JsUS. Soluția se lasă la răcit timp de 60 min, sub agitare continuă, pentru stabilizarea nanoparticulelor cu grupările funcționale. Pentru spălarea AuNP-JsUS, soluția coloidală este transferată în tuburi Eppendorf și centrifugată cu o viteză de 13400 rpm timp de 20 min. După centrifugare se scoate supernatantul cu ajutorul unei pipete, iar precipitatul este resuspendat în aceeași cantitate de apă ultrapură. Un ciclu de spălare este suficient pentru înlăturarea compușilor rămași în urma reducerii acidului cloroauric cu extract hidrosolubil de nucă. Ulterior, soluția finală poate fi păstrată până la 3 luni la temperaturi de 4-8°C.



Spectrul de absorbție UV-Vis din Figura 1 ilustrează prin banda plasmonică a aurului de la valoarea 530 nm (pentru reducerea cu extract JsUS) și 520 nm (pentru reducerea prin metoda chimică clasică cu citrat) formarea nanoparticulelor de aur. De asemenea valoarea intensității maximului de absorbție este mult mai mare în cazul AuNP-JsUS (1.03 u.i. față de 0.4 u.i.).

Figura 2 a) prezintă rezultatul măsurătorilor de microscopie electronică în transmisie (TEM) ilustrând forma și mărimea AuNP-JsUS. Nanoparticulele prezintă forme sferice, nu prezintă aggregate și prezintă o distribuție a diametrelor între 17 – 59 nm, cu o medie de 20 nm pentru 62% din nanoparticule ce a fost determinată cu ajutorul distribuției gaussiene din figura 2 b).

Figura 3 prezintă studiul de stabilitate al AuNP-JsUS monitorizând intensitatea maximului de absorbție în funcție de timp, acesta scăzând 6% în 3 luni.

Figura 4 prezintă spectrele FTIR-ATR (Spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier cu modul de reflectanță totală atenuată) ale regiunii de amprentă specifică între 1800 – 800 cm^{-1} pentru extractul de nucă și AuNP-JsUS obținute cu ajutorul acestuia. Spectrele arată grupările funcționale din extract păstrate și pe suprafața AuNP, aceștia reprezentând: vibrația carbonilului C=O caracteristică legăturilor amidice din banda 1639 cm^{-1} ; hidrocarburi C-H între 1500 – 1440 cm^{-1} caracteristice ringurilor aromatice (amide terțiare ale grupării methyl) și grupări ale derivaților fenolici O-H, C-O și C=C între 1440 – 900 cm^{-1} .

Figura 5 prezintă comportamentul catalitic îmbunătățit al AuNP-JsUS sintetizate pe cale biologică în comparație cu cele sintetizate prin metoda chimică în prezența H_2O_2 cu ajutorul metodei electrochimice de voltametrie ciclică. Ambele tipuri de AuNP au un profil redox bine definit însă, în prezența H_2O_2 , acesta s-a schimbat în funcție de caracteristicile AuNP. Pentru AuNP-urile sintetizate chimic (a) vârful de reducere al H_2O_2 scade semnificativ, în timp ce vârful de oxidare crește ușor. În cazul AuNP-JsUS (b), vârful de reducere al H_2O_2 scade și se deplasează către un potențial mai ridicat, în timp ce vârful de oxidare crește semnificativ, ilustrând proprietățile catalitice îmbunătățite și, în același timp, sugerând o oxidare ireversibilă a H_2O_2 .

Figura 6 prezintă evaluarea activității antioxidante a AuNP-JsUS, comparativ cu cea a vitaminei C, cu ajutorul radicalului liber DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), de culoare violet, care se decolorează prin interacția cu un antioxidant. S-a preparat o soluție stoc de 0.1 mM DPPH (în ethanol) din care s-au amestecat 750 μL cu 10, 40 și 80 μL soluție stoc vitamina C 0.1 mM (în ethanol), respectiv soluție coloidală de 0.01% AuNP-JsUS, și s-a adus la un volum final de 3 mL cu ethanol. S-au înregistrat maximele de absorbție la 519 nm după un timp

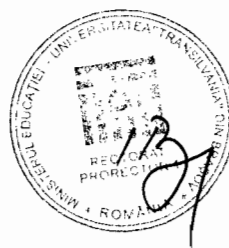


44

de incubare de 30 min. Captarea radicalilor DPPH a fost exprimată ca procent în comparație cu controlul negativ fără adăugarea de probă, iar vitamina C a fost utilizată ca martor pozitiv. S-au calculat procentele de activitate antioxidantă după cum urmează: $\% \text{ DPPH} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$, unde A_0 a fost absorbanta controlului pozitiv (vit C) și A_1 a fost absorbanta în prezența probei (AuNP-JsUS). Pentru vitamina C controlul a fost DPPH [S.M. Nabavi, M.A. Ebrahimzadeh, S.F. Nabavi, M. Jafari, Free Radical Scavenging Activity and Antioxidant Capacity of *Eryngium Caucasicum* Trautv and *Froripia Subpinnata*, Pharmacologyonline 3: 19-25 (2008)]. S-a confirmat capacitatea antioxidantă a activității de neutralizare a radicalilor DPPH în prezența vit C și a AuNP-JsUS. Deși vitamina C prezintă o activitate antioxidantă mai ridicată față de AuNP-JsUS, activitatea de neutralizare a radicalilor DPPH a crescut cu creșterea concentrației de nanoparticule. Prin urmare, s-a confirmat că nanoparticulele de aur sintetizate cu ajutorul extractului de nucă au avut un efect antioxidant.

Figura 7 prezintă evaluarea activității de neutralizare a radicalilor liberi H_2O_2 . S-a folosit o soluție stoc de 8.8 M H_2O_2 ce a fost ulterior diluată în soluție tampon fosfat (pH 7.4) la concentrații crescătoare între 0.25 și 7 mM. S-a realizat curba de calibrare pentru diluțiile H_2O_2 prin înregistrarea absorbantei maxime de absorbție la 225 nm cu ajutorul unui spectrofotometru. S-a repetat aceeași măsurătoare în prezența unei concentrații de 0.005% AuNP-JsUS. Procentul de neutralizare a peroxidului de hidrogen a nanoparticulelor de aur a fost calculat după cum urmează: $\% \text{ H}_2\text{O}_2 \text{ Scavenging} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$, unde A_0 a fost absorbanta standardului (H_2O_2) și A_1 a fost absorbanta în prezența probei (AuNP-JsUS) și standard. S-a reprezentat procentul de neutralizare a H_2O_2 în funcție de logaritmul concentrației H_2O_2 , obținându-se o curbă sigmoidă („DoseResp”). Din grafic, se determină $\text{EC}_{50} = 0.9 \text{ mM}$, ce reprezintă concentrația de H_2O_2 necesară pentru a obține jumătate din răspunsul maxim (50%) ce poate fi neutralizat cu 0.005% AuNP-JsUS. Prin urmare, s-a confirmat că AuNP-JsUS în concentrație de 0.005% (echivalent a 0.125 mM) pot neutraliza în mod eficient H_2O_2 datorită grupărilor funcționale cu proprietăți antioxidante.

Deși prezenta invenție a fost prezentată și descrisă în mod special cu referire la exemplele de realizare ale acesteia, se înțelege că acestea sunt cu titlu de ilustrare și exemplu și, nu trebuie luate ca limitare, scopul prezentei invenției fiind indicat de revendicările anexate. În consecință, scopul real al prezentei invenții va fi definit de revendicările anexate și echivalentele acestora.

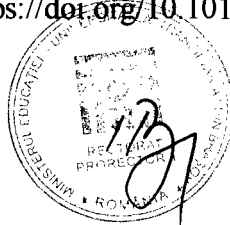


Scopul prezentei invenții este definit de revendicările anexate, și toate modificările sau modificările derivate din semnificația și domeniul de aplicare al revendicărilor și echivalentele acestora trebuie interpretate ca fiind incluse în scopul prezentei invenții.



Bibliografie

1. Jeevanandam, J.; Kiew, S.F.; Boakye-Ansah, S.; Lau, S.Y.; Barhoum, A.; Danquah, M.K.; Rodrigues J. Green approaches for the synthesis of metal and metal oxide nanoparticles using microbial and plant extracts. *Nanoscale* 2022, 14, 2534-2571, DOI: <https://doi.org/10.1039/D1NR08144F>
2. Dauthal, P.; Mukhopadhyay, M. Noble Metal Nanoparticles: Plant-Mediated Synthesis, Mechanistic Aspects of Synthesis, and Applications. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2016, 55, 36, 9557–9577, DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b00861>
3. Radulescu, C.; Stihi, C.; Ilie, M.; Lazurcă, D.; Gruia, R.; Olaru, O.T.; Bute, O.C.; Dulama, I.D.; Stirbescu, R.M.; Teodorescu S.; Florescu, M. Characterization of Phenolics in *Lavandula angustifolia*. *Anal. Lett.* 2017, 50(17), 2839–2850, DOI: <https://doi.org/10.1080/00032719.2016.1264409>
4. Hussain, I.; Singh, N.B.; Singh, A.; Singh, H.; Singh, S.C. Green synthesis of nanoparticles and its potential application. *Biotechnol. Lett.* 2016, 38(4), 545–560, DOI: <https://doi.org/10.1007/s10529-015-2026-7>
5. Sepúlveda, B.; Angelomé, P.C.; Lechuga, L.M.; Liz-Marzán, L.M. LSPR-based nanobiosensors. *Nanotoday*, 4(3), 2009, 244-251, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2009.04.001>
6. Sasidharan, S.; Raj, S.; Sonawane, S.; Pinjari, D.; Pandit, A.B.; Saudagar, P. Nanomaterial synthesis: chemical and biological route and applications. In: *Nanomaterials Synthesis*. Elsevier; 2019:27–51, DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S233789>
7. Shreyash, N.; Bajpai, S.; Khan, M.A.; Vijay, Y.; Tiwary, S.K.; Sonker, M. Green Synthesis of Nanoparticles and Their Biomedical Applications: A Review. *ACS Appl. Nano Mater.* 2021, 4, 11, 11428–11457, DOI: <https://doi.org/10.1021/acsanm.1c02946>
8. David, M.; Serban, A.; Radulescu, C.; Danet, A.F.; Florescu, M. Bioelectrochemical evaluation of plant extracts and gold nanozyme-based sensors for total antioxidant capacity determination. *Bioelectrochemistry* 2019, 129, 124-134, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2019.05.011>
9. Lian, M.; Shao, S.; Liu, M.; Shi, Y.; Zhang, H.; Chen, D. Cell membrane-coated nanoparticles as peroxidase mimetics for cancer cell targeted detection and therapy. *Talanta* 2022, 238(P2), 123071, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.123071>



10. A.A. Dudhane, S.R. Waghmode, L.B. Dama, V.P. Mhaindarkar, A. Sonawane, S. Katariya, Synthesis and Characterization of Gold Nanoparticles using Plant Extract of Terminalia arjuna with Antibacterial Activity, Int. J. Nanosci. Nanotechnol., Vol. 15, No. 2, June. 2019, pp. 75-82
11. P. Boomi, R. Ganesan, G.P. Poorani, S. Jegatheeswaran, C. Balakumar, H.G. Prabu, K. Anand, N.M. Prabhu, J. Jeyakanthan, M. Saravanan, Phyto-Engineered Gold Nanoparticles (AuNPs) with Potential Antibacterial, Antioxidant, and Wound Healing Activities Under in vitro and in vivo Conditions, International Journal of Nanomedicine 2020:15 7553–7568, DOI: <http://doi.org/10.2147/IJN.S257499>
12. Z. Izadiyan, K. Shameli, H. Hara, S.H. Mohd Taib, Cytotoxicity assay of biosynthesis gold nanoparticles mediated by walnut (*Juglans regia*) green husk extract, Journal of Molecular Structure 1151 (2018) 97-105, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.09.039>
13. H. Dang, D. Fawcett, G.E. Jai Poinern, Green synthesis of gold nanoparticles from waste macadamia nut shells and their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermis*, Int J Res Med Sci. 2019 Apr;7(4):1171-1177, DOI: <http://dx.doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20191320>
14. M. David, A. Şerban, C.V. Popa, M. Florescu, A Nanoparticle-Based Label-Free Sensor for Screening the Relative Antioxidant Capacity of Hydrosoluble Plant Extracts, Sensors 2019, 19, 590; DOI: <https://doi.org/10.3390/s19030590>
15. S.M. Nabavi, M.A. Ebrahimzadeh, S.F. Nabavi, M. Jafari, Free Radical Scavenging Activity and Antioxidant Capacity of *Eryngium Caucasicum Trautv* and *Froripia Subpinnata*, Pharmacologyonline 3: 19-25 (2008)



A handwritten signature in black ink, consisting of a long horizontal stroke followed by a loop and a vertical stroke.

Revendicări

- 1. Soluție coloidală de nanoparticule de aur** obținută printr-un procedeu de sinteză biologică cu ajutorul unui extract din miez de nucă hidrosolubil, cu proprietăți catalitice și antioxidante cu aplicații din domeniul biomedical și/sau cosmetică **caracterizată prin aceea că: (i)** are în componență nanoparticule de AuNP-JsUS cu o morfologie sferică cu un diametru mediu de ~ 20 nm, **(ii)** prezintă pe suprafață grupări funcționale preluate din extractul din miez de nucă hidrosolubil **(iii)** au o stabilitate în timp de până la 90 zile; **(iv)** cu un maxim de absorbție UV-vis al AuNP-JsUS la 530 nm.
- 2. Procedeu de sinteză biologică a soluției coloidale de nanoparticule de aur conform revendicării 1**, care constă în: **(i)** combinarea a 12 μL soluție apoasă HAuCl_4 (1g/mL - $\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$; 99.9%; MW = 393.83 g/mol dizolvat în apă ultrapură) cu 11.5 mL apă ultrapură, după care **(ii)** soluția este adusă la 90°C sub agitare continuă, după care **(iii)** soluția este lăsată să se răcească până la temperatura de 70°C când se oprește sursa de încălzire și **(iv)** se adaugă prin picurare 0.5 mL extract din miez de nucă hidrosolubil (JsUS) și soluția finală își schimbă culoarea de la galben pal la violet (inserție figura 1), indicând formarea AuNP-JsUS, urmând ca **(v)** soluția să fie lăsată la răcit timp de 60 min, sub agitare continuă, pentru stabilizarea nanoparticulelor cu grupările funcționale, după care **(vi)** pentru spălarea AuNP-JsUS, soluția coloidală este transferată în tuburi Eppendorf și centrifugată cu o turație de 13400 rpm timp de 20 min, după care **(vii)** pentru spălarea AuNP-JsUS se scoate supernatantul, ce conține apa cu compuși rămași în urma reducerii acidului cloroauric, cu ajutorul unei pipete, iar precipitatul ce conține nanoparticulele AuNP-JsUS este resuspendat cu apă ultrapură până la același volum final ca la punctul (vi), ulterior, soluția finală putând fi păstrată până la 3 luni la temperatură de 4-8°C, în recipiente din sticlă brună.



Figuri

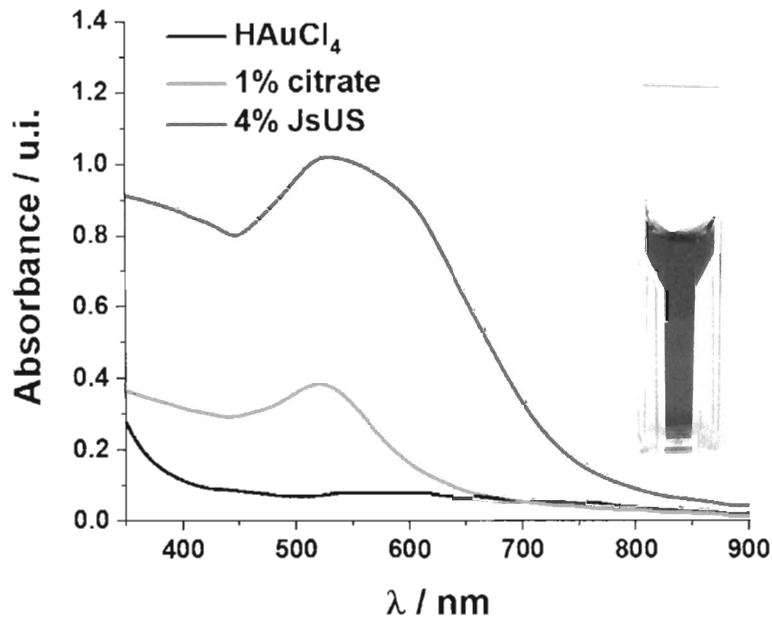


Figura 1

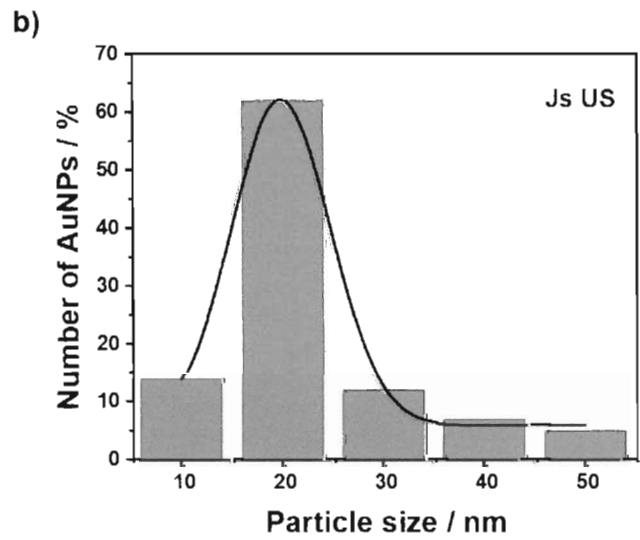
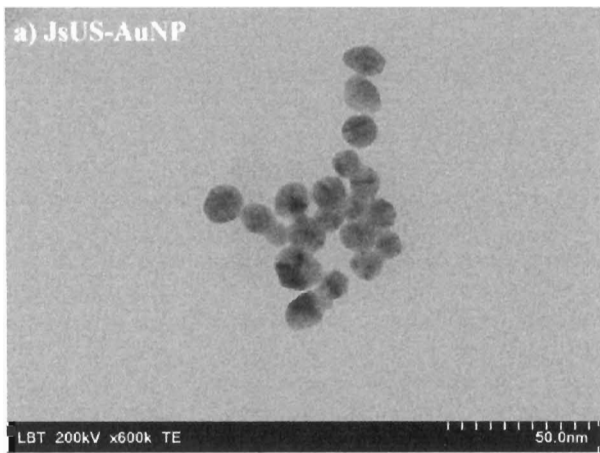


Figura 2



Handwritten signatures and initials.

12

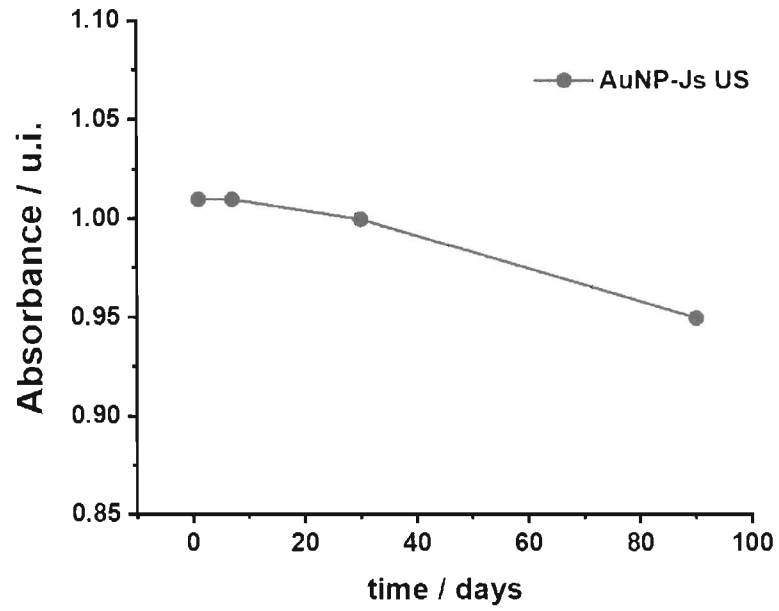


Figura 3

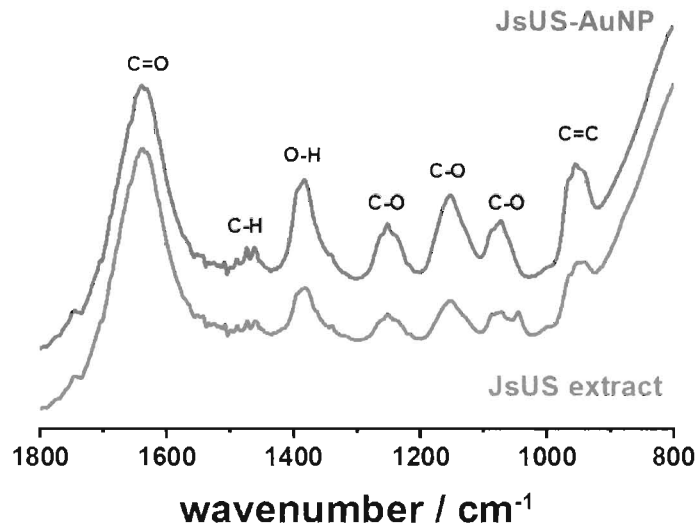


Figura 4



34

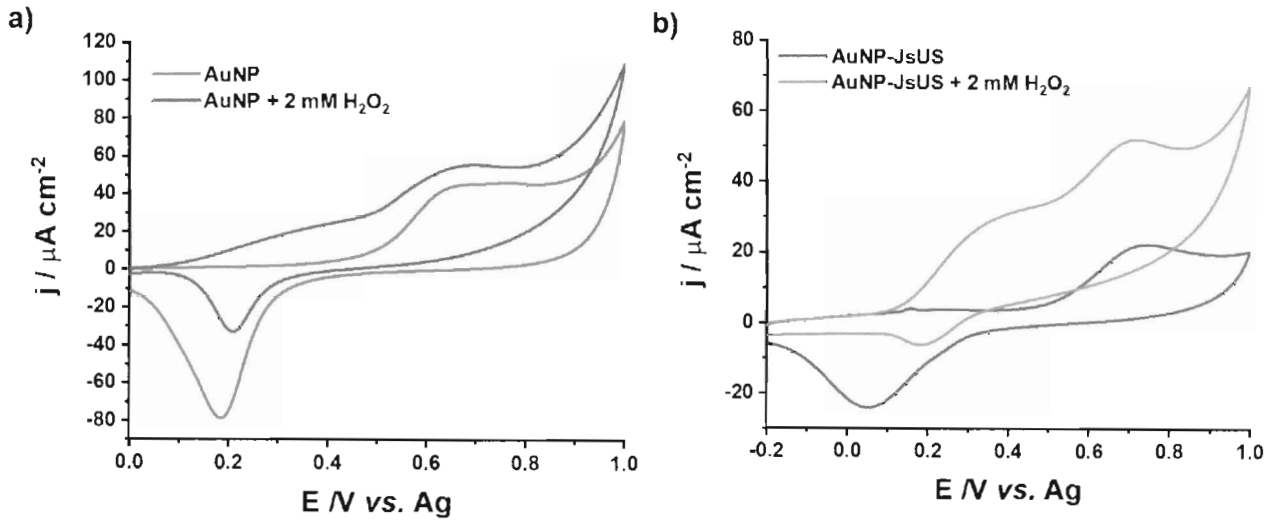


Figura 5

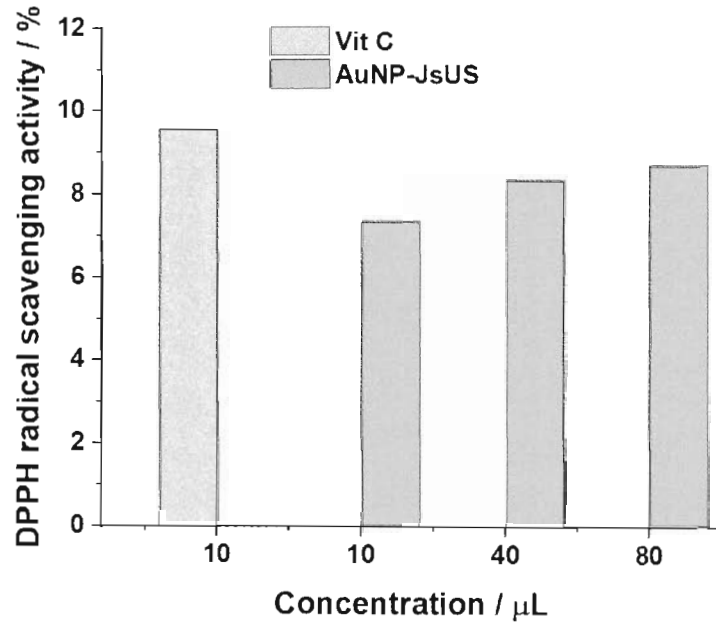


Figura 6



36

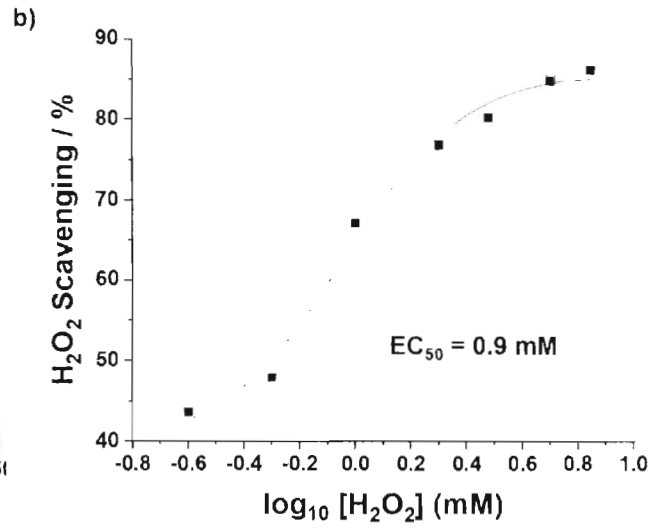
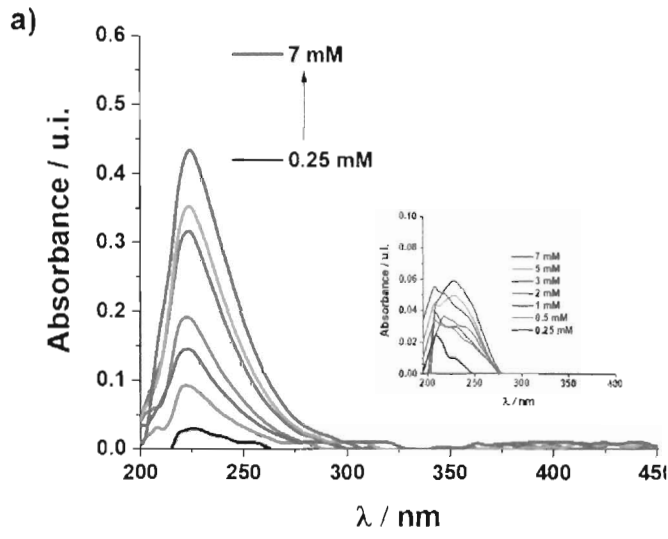


Figura 7

