



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2022 00699**

(22) Data de depozit: **31/10/2022**

(41) Data publicării cererii:
30/05/2024 BOPI nr. **5/2024**

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE
ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ DIN CLUJ-
NAPOCA, CALEA MĂNĂȘTUR NR.3-5,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• POP OANA LELIA,
STR.VALEA GĂRBĂULUI, NR.73,
FLOREȘTI, CJ, RO;

• CIONT CĂLINA, NR.112, BĂIȚA, GHERLA,
CJ, RO;
• MESAROS AMALIA, STR. ALEXANDRU
VLAHUȚĂ, NR.7, AP.43, CLUJ-NAPOCA,
CJ, RO;
• VODNAR DAN CRISTIAN,
STR.REPUBLICII, NR.11A, AP.5,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) **CARACTERIZAREA ȘI PROCEDEUL DE OBTINERE A
NANOPARTICULELOR DE OXID DE FIER
CU LACTOBACILLUS FERMENTUM**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor nanoparticule de $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ cu aplicații în domeniul medical. Procedeu, conform invenției, constă în etapele: biosinteza nanoparticulelor de oxid de fier prin cultivare a bacteriei probiotice *Lactobacillus fermentum* împreună cu un precursor de fier de tip acetilacetonat de fier, izolarea dispersiei de biomasa celulară și purificarea din mediul de cultivare prin ultrasonificare și

stabilizarea acestora într-un mediu lichid, rezultând nanoparticule de oxid feric cu structură de tip hematit $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$, cu dimensiune a nanoparticulei de aproximativ 10 nm și formă sferică, o concentrație de fier de 1,062 mg/ml, având o biodisponibilitate mare prin creșterea gradului de absorbție al fierului în organism.

Revendicări: 4

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).



OFICIUL DE SYMBOLE DE INVENȚII ȘI MĂRCI
Carte de inventie de invenție
Nr. a 2022 00699
Data 31-10-2022

RO 138194 A2

15

CARACTERIZAREA ȘI PROCEDEUL DE OBTINERE A NANOPARTICULELOR DE OXID DE FIER CU *LACTOBACILLUS FERMENTUM*

DESCRIEREA INVENȚIEI

Această invenție face obiectul unei noi soluții coloidale de nanoparticule de oxid de fier, cu dimensiune controlată și monodisperse, și utilizarea acestora în aplicațiile biomedicale și fotocatalitice. Invenția este reprezentată de nanoparticule de oxid de fier cu structură spinelică, Fe_3O_4 și respectiv perovskitică, Fe_2O_3 (1-3).

Diversitatea metodelor de obținere, printre care: precipitarea, metoda solvotermală, hidrotermală, metoda combustiei, sol-gel, ablația sau piroliza laser, precum și caracteristicile morfologice și structurale pe care le prezintă aceste nanomateriale magnetice sunt prezentate în brevetele EP1812336B1, EP2704992B1, RO126395A2, ES2666704A1.

În scopul obținerii unor nanoparticule de oxid de fier biocompatibile, cu o toxicitate redusă, ecologice, se utilizează metodele de sinteză biologice. Abordările se bazează pe utilizarea extractelor de plante sau a compușilor microbiologici, având o capacitate reducătoare în conectarea cu precursorii de fier. În bacterii, unele enzime extracelulare (celulaza, xilanaza, pectinaza, și lactaza) prezintă proprietăți redox excelente. Acestea se comportă ca un nanoreactor biologic, acționând prin transferul de electroni în reducerea ionilor metalici pentru a forma nanoparticule și stabilizându-le și ca agent de acoperire.

Utilizarea acestor nanoparticule în aplicații biomedicale reprezintă o provocare deoarece, biodisponibilitatea cea mai mare a fierului spre absorbție este reprezentată de forma Fe_2O_3 . Faza Fe_2O_3 este o fază extrem de rară printre oxizii de fier. Prin utilizarea bacteriei probiotice *Lactobacillus fermentum* în metoda de sinteză a nanoparticulelor de oxid de fier nu mai este necesară adăugarea unui alt compus pentru schimbarea formei fierului. Valența fierului este redusă direct de microorganism de la Fe^{3+} la Fe^{2+} datorită conținutului acestora de acid p-hidroxifenil lactic. Mai mult decât atât, aceste bacterii sunt foarte promițătoare pentru domeniul medical, deoarece, în primul rând, nanoparticulele atașate bacteriilor prezintă o dimensiune redusă (~10 nm) și o formă sferică. În al doilea rând, bacteriile probiotice sunt componente ale microbiotei intestinale și pot supraviețui sucurilor gastrice, fiind un purtător către tractul gastro-intestinal. Prin utilizarea

nanoparticulelor de oxid de fier sintetizate cu *L. fermentum* se obține forma Fe_2O_3 , asigurându-se astfel o biodisponibilitate mai mare a fierului spre absorbție în organism.

În prezenta invenție, originalitatea se datorează formulării unor noi tipuri de nanoparticule de oxid de fier împreună cu probiotice, care acoperă un segment de piață sensibil în domeniul medical cum sunt persoanele anemice.

Modul de obținere a nanoparticulelor de oxid de fier sintetizate cu *L. fermentum*

Nanoparticulele de oxid de fier prezintă o largă aplicabilitate în diferite domenii (industria medicală, industria farmaceutică, industria alimentară) ca potențiali catalizatori pentru o nouă revoluție științifică și tehnologică.

Etapele principale care au dus la concretizarea prezentei invenții au fost următoarele: (1) selectarea precursorului de fier pentru sinteză, (2) cultivarea tulpinii selectate împreună cu precursorul de fier în vederea sintezei, (3) izolarea și purificarea biomasei din mediul de cultivare, (4) distrugerea membrane celulare în vederea eliberării nanoparticulelor de oxid de fier, și (5) caracterizarea nanoparticulelor obținute.

- (1) În urma verificării precursorilor de fier s-a ales acetilacetonat de fier, $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2)_3$ datorită proprietății sale de catalizator eficient pentru acetilarea chimio-selectivă, cu randamente ridicate de obținere a nanoparticulelor și datorită patogenicității reduse asupra tulpinii microbiene.
- (2) Nanoparticulele de oxid de fier s-au obținut prin fermentarea bacteriei probiotice *L. fermentum* (10^8 cfu/ml) împreună cu $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2)_3$ la o concentrație de 200 mg/L. Procedeu a avut loc sub agitare continuă într-un incubator la temperatura de 37 °C, timp de 48h.
- (3) La finalul procesului de fermentație, dispersia de biomasa celulară obținută a fost centrifugată în mai multe reprize, pentru izolare de mediul de cultură și stabilizată prin mai multe spălări cu H_2O distilată.
- (4) Nanoparticulele de oxid de fier au fost separate de membranele celulare printr-un proces de ultrasonificare, eliberându-se astfel nanoparticulele. Ultrasonificarea s-a efectuat pe un volum de 25 ml soluție de biomasă și apă distilată la o putere de 500 W, amplitudine 50%, cu 2 impulsuri/min.
- (5) Caracterizarea structurală a probelor de oxid de fier obținute, s-a realizat prin Difrakție de Raze X (XRD), observându-se astfel că difractograma probei prezintă linii de

difracție corespunzătoare structurii hexagonale de tip hematit a Fe_2O_3 ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Formarea oxidului feric, Fe_2O_3 poate fi explicată prin oxidarea totală în cadrul procesului de fermentație a ionului de fier divalent datorită conținutului de acid p-hidroxifenil lactic al bacteriei. Dimensiunea medie a cristalitelor a fost calculată cu ajutorul formulei lui Scherrer, remarcându-se astfel un grad de cristalizare mic- $d_{\text{cristalite}} \sim 10$ nm. Natura chimică a nanoparticulelor sintetizate a fost investigată prin măsurători de spectroscopie FTIR, iar spectrele înregistrate sunt în acord cu datele din literatură, care prezintă două benzi apropiate ca intensitate, între 410 și 620 cm^{-1} pentru $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Analizele structurale și de natură chimică au fost completate de cele morfologice prin investigațiile de microscopie electronică în transmisie concretizate în imaginile TEM, identificându-se formațiuni pseudo-poliedrice, ușor aciculare. Soluția finală a avut o concentrație de fier de 1.062 mg/mL.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- datorită caracteristicilor electronice, optice și magnetice, nanoparticulele de oxid de fier prezintă potențial aplicativ în multe domenii, cum ar fi biomedicina, nanobiotehnologie, știința materialelor, chimie și fizică.
- Prin metoda de sinteză se mărește biodisponibilitatea și se reduce gradul de toxicitate.
- Obținerea nanoparticulelor de tip hematit $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ crește gradul de absorbție al fierului în organism.

REVENDICĂRI

1. Prin prezenta invenție se revendică procedeul de obținere a nanoparticulelor α -Fe₂O₃ cu aplicabilitate în domeniul medical, caracterizat printr-o sinteză ce implică utilizarea probioticului *Lactobacillus fermentum*.
2. Faptul că nanoparticulele obținute reprezintă un nou tip de compus utilizabil pentru anemie.
3. Revendicăm de asemenea faptul că acest tip de nanoparticule prezintă o biodisponibilitate crescută.
4. Revendicăm de asemenea faptul că acest tip de nanoparticule prezintă o citotoxicitate redusă.