

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 580 009**

21 Número de solicitud: 201500119

51 Int. Cl.:

C01G 7/00 (2006.01)

B82Y 30/00 (2011.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

16.02.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

18.08.2016

Fecha de la concesión:

07.12.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

15.12.2016

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE CÁDIZ (100.0%)

C/ Ancha, 16

11001 Cádiz (Cádiz) ES

72 Inventor/es:

GIL MONTERO , María Luisa Almoraima;

LUNA AGUILERA, Manuel Jesús;

ZARZUELA SÁNCHEZ, Rafael;

CUBILLANA AGUILERA , Laura María ;

PALACIOS SANTANDER , José María ;

NARANJO RODRÍGUEZ , Ignacio ;

HIDALGO HIDALGO DE CISNEROS, José Luis;

GARRIDO CRESPO, Carlos;

CARBU ESPINOSA DE LOS MONTEROS , María ;

GONZÁLEZ RODRÍGUEZ , Victoria Eugenia y

CANTORAL FERNÁNDEZ, Jesús Manuel

54 Título: **Síntesis de nanopartículas de oro empleando extracto envejecido de hojas de Drago (Dracaena draco L): procedimiento de fabricación y utilización**

57 Resumen:

Síntesis de nanopartículas de oro mediante el empleo de extracto envejecido de hojas de Drago.

Entre las ventajas del procedimiento propuesto cabe destacar:

- El carácter ecológico/natural de la biosíntesis debido a la naturaleza de las sustancias utilizadas extracto envejecido de Drago (Dracaena Draco L.), la sencillez del proceso y del instrumental utilizado.

- La reducción drástica del tiempo de obtención de las nanopartículas.

- El reducido tamaño de las nanopartículas obtenidas, de diámetros ultra pequeños de 1.63 +/- 0.35 nm y por tanto su alta superficie específica.

- La buena estabilidad en el tiempo de las nanopartículas sintetizadas, mayor de 30 días.

- Las nanopartículas quedan recubiertas de biomoléculas provenientes del extracto vegetal envejecido.

Además del procedimiento se describe:

- El uso de estas nanopartículas en la fabricación de sensores y biosensores amperométricos modificados.

- El uso de estas nanopartículas en aplicaciones biomédicas: antimicrobiano o soporte para compuestos biofarmacéuticos.

ES 2 580 009 B2

DESCRIPCIÓN

SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO EMPLEANDO EXTRACTO ENVEJECIDO DE HOJAS DE DRAGO (*DRACAENA DRACO* L): PROCEDIMIENTO DE FABRICACIÓN Y UTILIZACIÓN.

5 SECTOR DE LA TÉCNICA.

La presente invención describe un método nuevo de síntesis de nanopartículas de oro que permite obtener nanopartículas de oro en solamente 15 minutos, partiendo de tetracloroaurato de potasio y utilizando extracto envejecido de hojas de Drago (*Dracaena draco* L) como agente reductor y estabilizador. La capacidad antioxidante y estabilizante del

10 extracto se ve enriquecida, por la presencia de bacterias incubadas durante el proceso de envejecimiento del extracto de Drago, implicando un proceso de síntesis en el que participan sustancias químicas de origen biológico producidas por dichas bacterias. Mediante este proceso, se consigue obtener bionanopartículas con un diámetro de 1.63 ± 0.35 nm, y cuya

15 estabilidad se mantiene a lo largo de más de 30 días, lo que garantiza su utilización en cualquiera de sus posibles aplicaciones. La síntesis emplea únicamente sustancias químicas completamente respetuosas con el medio ambiente, pudiendo considerarse, por tanto, una síntesis verde o ecológica. Las principales aplicaciones de estas nanopartículas podrían ser, entre otras, su utilización en la fabricación de sensores y biosensores amperométricos modificados, así como las propiedades antibióticas que puedan presentar, lo que posibilita su

20 uso biomédico como soporte para otros compuestos o bien como parte de la composición de productos tales como geles y fármacos, para tratamiento de tejidos, y material sanitario.

ESTADO DE LA TÉCNICA.

Una nanopartícula es una partícula microscópica cuyo tamaño se mide en nanómetros y en la

25 que al menos una de sus dimensiones es menor que 100 nm. Sus propiedades están determinadas principalmente por el comportamiento de su superficie y se caracterizan por una relación superficie/volumen extremadamente alta en comparación con las propiedades del material masivo.

Actualmente la síntesis de nanopartículas metálicas constituye una parte fundamental en el

30 desarrollo de la nanotecnología, existiendo un creciente interés en sintetizar nanopartículas de diferentes composiciones químicas, tamaños y formas. En particular, debido a sus propiedades ópticas, magnéticas, electrónicas, catalíticas y químicas, las nanopartículas de oro se emplean en muy diversos campos [G. Schmid and B. Corain, *Eur. J. Inorg. Chem.*,

2003, **17**, 3081; P. Zhao, N. Li and D. Astruc, *Coordin. Chem. Rev.*, 2013, **257**, 638]. El gran inconveniente de la mayoría de las síntesis convencionales ya establecidas, es la utilización de reactivos químicos de marcada toxicidad. Dada la creciente utilización de estas nanopartículas de oro en el campo de la biomedicina durante la última década [K. Weintraub, *Nature*, 2013, **495**, 14], el establecimiento de procesos de síntesis verdes que no utilicen reactivos químicos tóxicos y que generen productos biocompatibles es de vital importancia. En este sentido, una alternativa a los métodos tradicionales de síntesis de nanopartículas es el uso de métodos biosintéticos empleando microorganismos [T. Klaus, R. Joerger, E. Olsson and C-G. Granqvist, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1999, **96**, 13611; Y. Konishi, K. Ohno, N. Saitoh, T. Nomura, S. Nagamine, H. Hishida, Y. Takahashi and T. Uruga, *J. Biotechnol.*, 2007, **128**, 648; B. Nair and T. Pradeep, *Cryst. Growth Des.*, 2002, **2**, 293], enzimas [I. Willner, R. Baron and B. Willner, *Adv. Mater.*, 2006, **18**, 1109.] y plantas o extractos de plantas [S. S. Shankar, A. Rai, A. Ahmad and M. Sastry, *Chem. Mater.*, 2005, **17**, 566; V. Reddy, R. S. Torati, S. Oh and C. Kim, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2013, **52**, 556; A. Rao, K. Mahajan, A. Bankar, R. Srikanth, A. Ravi Kumar, S. Gosavi and S. Zinjarde, *Mater. Res. Bull.*, 2013, **48**, 1166; S. Iravani, *Green Chem.*, 2013, **13**, 2638; M. N. Nadagouda and R. S. Varma, *Green Chem.*, 2008, **10**, 859; X. Huang, H. Wu, X. Liao and Bi Shia, *Green Chem.*, 2010, **12**, 395.].

La síntesis verde o ecológica que se muestra en la presente patente utiliza una ruta que permite obtener nanopartículas biocompatibles, debido a la utilización de un extracto vegetal proveniente del Drago (*Dracaena draco* L) al que se somete a un proceso de envejecimiento, basado en la incubación con bacterias ambientales, previo a su utilización en la biosíntesis. Este proceso de envejecimiento dota de nuevas características al extracto, lo que brinda las ventajas de las diversas propiedades que esta planta posee: hemostáticas, antiulcerosas, antimicrobianas, antivirales, cicatrizantes, antitumorales, antiinflamatorias y antioxidantes, que podrían transferirse a la nanopartículas sintetizadas. Además, el fuerte poder antioxidante que posee el extracto acuoso envejecido del Drago, lo hacen idóneo como agente reductor. [D. Gupta, B. Bleakley and R. K. Gupta, *J. Ethnopharmacol.*, 2008, **115**, 361; M. M. Sousa, M. J. Melo, A. J. Parola, J. S. Seixas de Melo, F. Catarino, F. Pina, F. E. M. Cook, M. S. J. Simmonds and J. Lopes, *Chromatogr., A* 2008, **1209**, 153; H. G. M.; Edward, L. F. C. De Oliveira and A. Quye, *Spectrochim. Acta Part. A*, 2001, **57**, 2831].

Hace unos años que se vienen desarrollando diversas síntesis de nanopartículas de oro utilizando diferentes tipos de extractos vegetales frescos, pero estas síntesis han presentado numerosos inconvenientes en cuanto a tiempo y calidad del producto obtenido. Entre los

inconvenientes de la síntesis de nanopartículas de oro mediante extractos vegetales frescos está la necesidad de utilizar elevados tiempos de síntesis y la obtención de nanopartículas de tamaños superiores a 20 nm y/o distribuciones de tamaños grandes, lo que no da homogeneidad al producto y, por tanto, limita sus futuras aplicaciones. Con el metodo
5 presentado en esta patente, mediante el envejecimiento natural del extracto vegetal, la síntesis es extremadamente simple y rápida, con una duracion de solamente 15 minutos y se obtienen nanopartículas esféricas con tamaño homoganeo, de diámetros ultra pequeños de 1.63 ± 0.35 nm. El uso del extracto envejecido que hemos desarrollado mejora de forma significativa los resultados que se obtienen con respecto a otros extractos vegetales frescos,
10 incluido el del propio Drago, donde se obtiene una doble distribución de diámetros entre 3 ± 0.83 nm y 17.7 ± 4.37 nm. Además, tal y como se muestra en la Tabla 1, con el método que aquí se presenta se mejoran los resultados medios descritos hasta el momento en la literatura.

Planta	Condiciones de síntesis	Tiempo	Tamaño
<i>Ipomoea carnea</i> T. Abbasi, J. Anuradha, S.U. Ganaie, S. a. Abbasi, <i>J. King Saud Univ. - Sci.</i> , 2014, 27, 15-22	Temperatura ambiente	24 horas	3-40 nm
<i>Solanum nigrum</i> A. Muthuvel, K. Adavallan, K. Balamurugan, N. Krishnakumar, <i>Biomed. Prev. Nutr.</i> , 2014 4, 325-332	Ebullición	20 minutos	32±6 nm
<i>Platycladus orientalis</i> M. Noruzi, D. Zare, D. Davoodi, <i>Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.</i> , 2012 94, 84-8	Agitación a temperatura ambiente y ajuste de pH	20 minutos	5-94 nm
<i>Magnolia Kobus and Diopyros kaki</i> J.Y. Song, H.-K. Jang, B.S. Kim, <i>Process Biochem.</i> , 2009 44, 1133-1138	Baño María a 25-95°C con reflujo	3-600 minutos	40-300 nm
<i>Terminalia catappa</i> A. Muthuvel, K. Adavallan, K. Balamurugan, N. Krishnakumar, <i>Biomed. Prev. Nutr.</i> , 2014, 4 325-332	Temperatura ambiente	50 minutos	21.9±2 nm

<i>Salicornia brachiata</i> M. Noruzi, D. Zare, D. Davoodi, Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc., 2012, 94 84–8	Calentamiento a 60°C	15 minutos	25-35 nm
<i>Abelmoschus esculentus</i> A.L.I. Ayati, A.L.I. Ahmadpour, F.F. Bamoharram, M.M. Heravi, H. Rashidi, <i>Nano.</i> , 2012, 07 1250002.	Temperatura ambiente	10 minutos	45-75 nm
<i>Aloe Vera</i> S.P. Chandran, M. Chaudhary, R. Pasricha, A. Ahmad, M. Sastry, <i>Biotechnol. Prog.</i> , 2006, 22 , 577–583	Temperatura ambiente	25 horas	50-350 nm

Tabla 1. Comparación de los resultados obtenidos en distintas biosíntesis recogidas en la bibliografía.

Otro importante inconveniente en la síntesis con extractos vegetales frescos que se han
5 llevado a cabo hasta ahora es la baja estabilidad de las nanopartículas de oro generadas (extracto de rago fresco, solo entre 6 y 7 días de estabilidad). El método que aquí se presenta, mediante la utilización de un extracto de Drago envejecido utilizando bacterias ambientales, obtiene un notable aumento de la estabilidad de las nanopartículas obtenidas. A partir de
10 varias muestras de nanopartículas preparadas con distintos extractos envejecidos con las condiciones optimizadas, conservadas a 4°C y en oscuridad, se establece que el tiempo medio de estabilidad de las AuNPs optimizadas es de 30 días, lo que garantiza la utilización de las nanopartículas en cualquiera de sus posteriores aplicaciones.

En resumen, la novedad de la biosíntesis presentada se pone de manifiesto en los siguientes aspectos principales:

15 **Primero**, La sencillez del proceso y del instrumental utilizado.

Segundo, El carácter ecológico/natural de la biosíntesis debido a la naturaleza de las sustancias utilizadas: Extracto vegetal de Drago envejecido.

Tercero, El reducido tamaño de las nanopartículas obtenidas (1.63 ± 0.35 nm), y por tanto su alta superficie específica.

20 **Cuarto**, La reducción drástica del tiempo de obtención de las nanopartículas (15 minutos de síntesis).

Quinto, La buena estabilidad en el tiempo de las nanopartículas sintetizadas, mayor de 30 días.

Sexto, Las nanopartículas quedan recubiertas de biomoléculas provenientes del extracto vegetal envejecido.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION.

5 La presente invención se refiere a un nuevo método de biosíntesis *in situ* de nanopartículas de oro a partir de tetracloroaurato de potasio, que emplea un extracto envejecido de hojas de Drago (*Dracaena draco* L) como agente reductor y estabilizador. Mediante este nuevo método se obtiene una elevada homogeneidad en el tamaño de las nanopartículas, aumentando así su superficie específica y, por otro lado, se aumenta de forma considerable la
10 estabilidad de las mismas con respecto a las biosíntesis con extracto vegetal fresco de diferentes orígenes descritas hasta ahora en la bibliografía.

La novedad principal del procedimiento desarrollado, consiste en la utilización de un proceso de envejecimiento del extracto de hojas de Drago fresco. Este envejecimiento de las hojas de Drago se lleva a cabo mediante incubación del propio extracto, sin adición de ningún tipo de
15 sustancia, ni química ni biológica. La composición del extracto vegetal de Drago fresco cambia durante el proceso de envejecimiento, en el que se desarrollan en el seno de este extracto diferentes poblaciones bacterianas, que confieren al extracto nuevas propiedades que mejoran su carácter como agente reductor y estabilizador, siendo dicho método respetuoso con el medio ambiente, ya que todo tiene un origen natural. Por tanto, estas
20 sustancias son completamente inocuas para los seres vivos y el medio ambiente, reciclables y económicas. De este modo, la síntesis que aquí se presenta se considera como una síntesis verde o ecológica.

La utilización del extracto vegetal de Drago envejecido, implica la presencia de una alta concentración de biomoléculas que no están presentes en el extracto de Drago fresco antes
25 del envejecimiento. El proceso metabólico que producen las poblaciones bacterianas, al desarrollarse en el extracto durante el envejecimiento, dota al mismo de unas características físico-químicas diferentes, demostrándose que mejoran tanto el proceso de biosíntesis de las nanopartículas como las propias características de éstas.

Se ha llevado a cabo un estudio de identificación de las poblaciones bacterianas, mediante un
30 análisis microbiológico y molecular de las mismas. Se han aislado diferentes tipos de bacterias, mediante la extracción de ADN genómico, amplificación de los genes ribosómicos mediante PCR y su posterior secuenciación. Siguiendo esta metodología se han identificado varias especies de bacterias de origen medioambiental y que suelen desarrollarse de forma simbiótica con diferentes especies de plantas superiores, siendo las principales identificadas

Enterobacter ludwigii, *Enterobacter hormaechei* y *Lysinibacillus xylanilyticus*. En esta invención ha quedado demostrado que el conjunto formado por el extracto de Drago y su posterior modificación por la acción metabólica de estas poblaciones microbianas, confieren al extracto vegetal envejecido una serie de características físico-químicas muy interesantes para llevar a cabo la biosíntesis de nanopartículas de oro en las condiciones establecidas.

La determinación de la transformación de la composición del extracto tras el proceso de envejecimiento se ha llevado a cabo mediante espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) y espectroscopía UV-vis. El espectro UV-visible del extracto de hoja de Drago fresco (Figura 1) presenta una absorbancia tenue en todo el intervalo del espectro visible, aumentando paulatinamente a medida que nos aproximamos al ultravioleta para, finalmente, crecer bruscamente por debajo de los 400 nm. En la zona de alta absorción se distingue una banda con un hombro. A medida que el extracto envejece, la intensidad del espectro decrece globalmente y, adicionalmente, la banda comienza a desaparecer y el hombro se ensancha. Esto nos indica que las bacterias consumen los productos presentes en el extracto, especialmente los más absorbentes a menores longitudes de onda, y generan otros nuevos.

Mediante FTIR se pueden observar las diferencias entre los extractos antes y después del envejecimiento. En la Figura 2 y Tabla 2, se muestran los espectros FTIR obtenidos para ambos extractos y la ampliación de la zona donde se observan los cambios más notables, así como la asignación de bandas

Asignación de bandas	Picos FTIR (cm ⁻¹)	
	Extracto sin envejecer	Extracto envejecido
Estiramiento O-H (alcoholes y ácidos) y estiramientos N-H (amidas, banda amidas A)	~3400	~3400
Estiramiento C-H	2920	2800-2900
Estiramiento C=O (ésteres, cetonas, aldehídos)	—	~1725 (hombro)
Estiramiento C=O (carboxilatos y amidas, banda amidas I y superposición de amidas II)	1618	1612
Estiramiento C-N (amidas, banda amidas III)	1416	1370 y 1416
Estiramiento C-O (Alcoholes, éteres, ácidos, ésteres, carboxilatos)	1051, 1136 y 1396	1038, 1059, 1123 y 1263
Enlace O-H (ácidos)	940 y 1416	934 y 1416

Tabla 2. Bandas obtenidas mediante espectroscopía FTIR para los extractos fresco y envejecido.

- Por otro lado, también es interesante observar los cambios que tienen lugar en el extracto envejecido tras la síntesis. En la Figura 3, se comparan los espectros FTIR del extracto antes y después de la síntesis con el obtenido para las nanopartículas recubiertas con biomoléculas, así como la ampliación de la zona donde se observan los mayores cambios. Puede verse cómo las modificaciones que se producen en el espectro del extracto tras la síntesis se observan también en el realizado sobre las nanopartículas, lo que indica la participación de biomoléculas presentes en el mismo que, posteriormente, forman la cubierta que las estabiliza, la cual puede apreciarse claramente en las microcopias mostradas en la Figura 4.
- Los cambios más notables son los referentes a las bandas de los grupos C=O y C-O que cambian de frecuencia y disminuyen en intensidad al producirse la síntesis. De esta observación se puede concluir que algunos compuestos oxigenados, tales como alcoholes o/y fenoles, han sido oxidados a grupos carbonilos. Así mismo el desplazamiento de la banda asignada a las amidas puede indicar que se ha producido un cambio en compuestos proteínicos como, por ejemplo, su desnaturalización.

Asignación de picos	Picos FTIR (cm ⁻¹)		
	Antes de la síntesis	Tras la síntesis	Nanopartículas
Estiramiento O-H (alcoholes y ácidos) y estiramientos N-H (amidas, banda amidas A)	~3400	~3400	~3400
Estiramiento C-H	2800-2900	2800-2900	2800-2900
Estiramiento C=O (ésteres, cetonas, aldehídos)	~1725 (hombro)	1722	-
Estiramiento C=O (carboxilatos y amidas, banda amidas I y superposición de amidas II)	1612	1640	1640
Estiramiento C-N (amidas, banda amidas III)	1370 y 1416	1362 y 1408	1423
Estiramiento C-O (Alcoholes, éteres, ácidos, ésteres, carboxilatos)	1038, 1059, 1123 y 1263	1065 y 1258	1084
Enlace O-H (ácidos)	934 y 1416	930 y 1408	-

Tabla 3. Bandas obtenidas mediante espectroscopia FTIR para el extracto envejecido antes y después de la síntesis y para las nanopartículas recubiertas con biomoléculas.

Por otro lado, tal y como se ha dicho anteriormente, el proceso de envejecimiento mejora notablemente el tamaño y la homogeneidad de las nanopartículas que se obtienen. En la Figura 4, se incluyen micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las nanopartículas obtenidas con los extractos fresco y envejecido. Se puede observar la notable diferencia de tamaño en las nanopartículas generadas a partir de los distintos extractos: mientras que con el extracto fresco se obtiene una doble distribución de diámetros entre 3 ± 0.83 nm y 17.7 ± 4.37 nm, el extracto envejecido permite obtener nanopartículas esféricas con tamaño homogéneo, con diámetros ultra pequeños de 1.63 ± 0.35 nm.

En resumen, la novedad principal del procedimiento desarrollado consiste en la utilización de extracto envejecido de hojas de Drago, mediante la incubación natural con bacterias ambientales, para la obtención de nanopartículas de oro que presentan, además de distribución regular, un tamaño uniforme y forma esférica. Esta síntesis presenta las siguientes ventajas:

- Las nanopartículas sintetizadas presentan un tamaño uniforme, mostrando, un diámetro medio de 1.63 ± 0.35 nm.
- Las nanopartículas obtenidas tienen geometría esférica.
- Las nanopartículas muestran un tiempo de vida media de más de 30 días, el cual se encuentra dentro de los límites aceptados en la bibliografía.
- Las nanopartículas sintetizadas siguiendo nuestro procedimiento pueden incorporarse fácilmente tanto dentro de un material base de electrodo (pasta de carbono, Sonogel-Carbono, etc.), como sobre su superficie. De este modo, pueden fabricarse sensores y biosensores amperométricos modificados con estas nanopartículas de oro.
- Las nanopartículas sintetizadas pueden utilizarse como agente antibiótico y como soporte de otros agentes antibióticos.

Con esta solicitud también se reivindica el uso de las nanopartículas obtenidas por el método descrito, para la fabricación de sensores y biosensores amperométricos modificados, así como su utilización como agente antibiótico y como soporte de otros agentes antibióticos.

DESCRIPCIÓN DEL CONTENIDO DE LAS FIGURAS.

Figura 1.- Espectros UV-visible de un extracto de hoja de Drago tomados durante su envejecimiento.

5

Figura 2.- Espectro infrarrojo mediante transformada de Fourier (FTIR) de los extractos envejecido y fresco.

Figura 3.- Espectro infrarrojo mediante transformada de Fourier (FTIR) del extracto envejecido antes y después de la síntesis y de las nanopartículas obtenidas.

10

Figura 4.- Micrografías obtenidas mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), correspondientes a nanopartículas de oro producidas mediante el extracto envejecido (a, b), y utilizando el extracto fresco (c, d).

15

MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION.

Procedimiento de preparación del extracto de Drago:

- a) Extracción a partir de 2 g de hojas fresca de Drago (*Dracaena draco L*) trituradas y 40 mL de agua mili-Q estéril, previamente introducidas en un recipiente de vidrio introduciendo una sonda de ultrasonidos en la mezcla y manteniendo la insonación durante 10 minutos.
- b) Filtrado del extracto obtenido empleando embudo y papel de filtro estériles.
- c) Almacenamiento en un bote de ensayo estéril hasta un volumen de 40 mL., entre 15 y 25 días a temperatura ambiente y un ciclo de luz/oscuridad de 12 h.

20

25

Procedimiento de preparación de las nanopartículas de oro:

- a) Colocar en un vaso de precipitado de 25 mL, 5 mL de agua mili-Q y (5-x) mL de disolución de KAuCl_4 en agua (siendo x un número entre 1 y 4 mL), en un intervalo de concentración entre 0,5 mM y 1,5 mM; llegados a este punto se pueden considerar dos alternativas: mantener la disolución a temperatura ambiente o bien calentar en una placa calefactora a una temperatura comprendida entre 50°C y 70°C.
- b) Añadir inmediatamente, si se realiza la síntesis a temperatura ambiente o alcanzada la temperatura antes indicada, x mL (siendo x un número entre 1 y 4 mL) de un extracto acuoso de hojas de Drago.
- c) Transcurrido entre 10 y 30 minutos de calentamiento (en función del volumen de extracto empleado en la síntesis) o tras 24 horas a temperatura ambiente detener el proceso. Utilizando espectroscopia UV/Vis, medir la longitud de onda a la cual aparece el máximo de absorbancia característico del plasmón de resonancia superficial de las nanopartículas de oro formadas, situado en el intervalo 520-570 nm.

APLICACIÓN INDUSTRIAL.

Actualmente, la investigación científica encaminada hacia la síntesis y aplicación de nanopartículas presenta una elevada demanda debido a sus singulares propiedades con respecto al material masivo, siendo susceptible de aplicación industrial en multitud de campos. Estas aplicaciones pueden llevarse a cabo tanto mediante el empleo directo de las nanopartículas en sí, como para la fabricación de dispositivos adaptados a una amplia gama de muestras de interés de muy diverso tipo: biológico, agroalimentario, medioambiental, y un amplio etcétera. En este caso, además, la obtención de nanopartículas metálicas mediante un proceso de biosíntesis podría permitir la aplicación de las nanopartículas obtenidas en biomedicina y/o biocosmética, con el valor añadido que el extracto de Drago envejecido puede aportar de forma sinérgica en el organismo, mejorando las cualidades del producto obtenido.

REIVINDICACIONES

1.- Síntesis ecológica de nanopartículas de oro empleando extracto envejecido de hojas de Drago, que comprende las siguientes etapas:

- 5
 - Preparación de una disolución acuosa de oxoácidos u oxisales de oro en un rango de concentraciones comprendidas entre 0,5-1,5 mM.
 - Adición a temperatura ambiente o con calentamiento de la disolución previa, de una disolución de extracto envejecido de hojas de Drago, obtenido mediante incubación del propio extracto, sin adición de ningún tipo de sustancia química
- 10
 - ni biológica, como agente reductor de Au (III) a Au (0) y estabilizador de las nanopartículas.

2.- Síntesis ecológica de nanopartículas de oro empleando extracto envejecido de hojas de Drago, según reivindicación 1, en la que el procedimiento de preparación de la disolución acuosa de oxácidos u oxisales de oro consiste en colocar en un vaso de precipitado de 25 mL 5 mL de agua mili-Q y (5-x) mL de disolución de KAuCl_4 en agua (siendo x un número entre 1 y 4 mL), en un intervalo de concentración entre 0,5 mM y 1,5 mM

3.- Síntesis ecológica de nanopartículas de oro empleando extracto envejecido de hojas de Drago, según reivindicación 1, en la que el procedimiento de preparación del extracto empleado comprende las siguientes etapas:

- a) Extracción a partir de 2 g de hojas frescas de Drago (*Dracaena draco L*) trituradas y 40 mL de agua mili-Q estéril, previamente introducidas en un recipiente de vidrio introduciendo una sonda de ultrasonidos en la mezcla y
- 25
 - manteniendo la insonación durante 10 minutos.
 - b) Filtrado del extracto obtenido empleando embudo y papel de filtro estériles.
 - c) Almacenamiento en un bote de ensayo estéril hasta un volumen de 40 mL., entre 15 y 25 días a temperatura ambiente y un ciclo de luz/oscuridad de 12 h.

30

- 4.- Síntesis ecológica de nanopartículas de oro empleando extracto envejecido de hojas de Drago, según reivindicaciones 1 a 3, en la que cuando el extracto envejecido de hojas de Drago se añade a la disolución acuosa de oxoácidos u oxisales a temperatura ambiente, la mezcla se mantiene durante 24 horas a la misma temperatura.
- 5
- 5.- Síntesis ecológica de nanopartículas de oro empleando extracto envejecido de hojas de Drago, según reivindicaciones 1 a 3, en la que cuando a la disolución acuosa de oxoácidos u oxisales, previamente calentada en una plaza calefactora a una temperatura de entre 50°C y 70°C, se añade el extracto envejecido de hojas de Drago, se mantiene la mezcla a esa
- 10 temperatura durante un tiempo de entre 10 y 30 minutos.
- 6.- Nanopartículas de oro, obtenidas según reivindicaciones 4 ó 5, caracterizadas porque los diámetros tienen un tamaño medio de 1.63 ± 0.35 nm.
- 15 7.-Nanopartículas de oro, obtenidas según reivindicaciones 4 ó 5, caracterizadas por presentar geometría esférica.
- 8.-Uso de las nanopartículas sintetizadas, según reivindicaciones 4 ó 5, para la fabricación de nuevos sensores y biosensores amperométricos modificados.
- 20 9.- Uso de las nanopartículas sintetizadas, según reivindicaciones 4 ó 5 en el campo de la biomedicina como agente antimicrobiano o como soporte para otros compuestos biofarmacéuticos.
- 25 10.- Uso de extracto envejecido de hojas de Drago, obtenido según reivindicación 2, para aprovechar el proceso metabólico que producen las poblaciones bacterianas que se desarrollan durante el envejecimiento, en la síntesis ecológica de nanopartículas de oro, evitando la formación de agregados y la necesidad de adicionar agentes químicos estabilizantes altamente contaminantes.
- 30



- ②① N.º solicitud: 201500119
②② Fecha de presentación de la solicitud: 16.02.2015
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C01G7/00** (2006.01)
B82Y30/00 (2011.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ZAYED, Mervat F.; EISA, Wael H. Phoenix dactylifera L. leaf extract phytosynthesized gold nanoparticles; controlled synthesis and catalytic activity. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2014, vol. 121, p. 238-244; apartado Experimental.	1-10
A	JAYASEELAN, Chidambaram, et al. Green synthesis of gold nanoparticles using seed aqueous extract of Abelmoschus esculentus and its antifungal activity. Industrial Crops and Products, 2013, vol. 45, p. 423-429; apartado 2-3.	1-10
A	KRISHNAMURTHY, Sneha, et al. Yucca-derived synthesis of gold nanomaterial and their catalytic potential. Nanoscale research letters, 2014, vol. 9, no 1, p. 1-9; páginas 2 y 7.	1-10
A	ELIA, Paz, et al. Green synthesis of gold nanoparticles using plant extracts as reducing agents. International journal of nanomedicine, 2014, vol. 9, p. 4007; apartado "GNP preparation", Tabla 3-4.	1-10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
22.02.2016

Examinador
V. Balmaseda Valencia

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C01G, B82Y

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 22.02.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-10	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-10	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ZAYED, Mervat F.; EISA, Wael H. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. vol. 121, p. 238-244.	2014
D02	JAYASEELAN, Chidambaram, et al. Industrial Crops and Products, vol. 45, p. 423-429.	2013
D03	KRISHNAMURTHY, Sneha, et al. Nanoscale research letters, 2014, vol. 9, no 1, p. 1-9.	2014
D04	ELIA, Paz, et al. International journal of nanomedicine, vol. 9, p. 4007.	2014

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la presente invención es la síntesis ecológica de oro empleando extracto envejecido de hojas de Drago, las nanopartículas resultantes de dicha síntesis y el uso de las mismas como sensores, como agente microbiano y como soporte para otros compuestos biofarmacéuticos.

El documento D01 describe las síntesis de nanopartículas de oro basada en el uso del extracto envejecido de hojas de Phoenix dactylifera L. El envejecimiento de las hojas de Phoenix dactylifera comprende su maceración durante 7 días en una mezcla al 70% de etanol/agua, su filtrado y su almacenamiento a 4°C. Posteriormente, se añade en distintas proporciones (100, 200 y 400 microlitros) a una solución acuosa de hidrógeno tetracloroaurato. Las nanopartículas resultantes presentan una geometría esférica y un tamaño comprendido entre 32nm-45nm en función de la cantidad de extracto empelada (apartado Experimental).

En el documento D02 se estudia la síntesis ecológica de nanopartículas de oro basada en el uso del extracto acuoso de semillas de Abelmoschus esculentus y la actividad antifúngica de las nanopartículas resultantes. La síntesis de las nanopartículas comprende hervir las semillas en agua desionizada, enfriar la mezcla resultante y filtrarla. Se añaden 40ml del líquido resultante a 60 ml de solución acuosa de hidrógeno tetracloroaurato (1 mM) y se agita la mezcla a temperatura ambiente. Las nanopartículas de oro resultantes son predominantemente esféricas y su tamaño está comprendido entre 45nm-75nm (apartado 2-3).

El documento D03 divulga la síntesis de un nanomaterial de oro empleando extractos derivados de la Yucca (Hemerocallis fulva, Ilex verticillata, Hedera hélix e Y. filamentosa). Cada uno de los extractos se preparan de forma independiente y siguiendo el mismo procedimiento: Se lavan las hojas, se secan, se pulverizan y se tamizan para conseguir un tamaño uniforme de partícula. A continuación 2,5 g del extracto resultante se diluye en 100ml de agua, se hierve y se enfría. Posteriormente, se hacen reaccionar distintas concentraciones de KAuCl₄ (0.5, 1, 1.5 y 2 mM) con distintos volúmenes de la solución del extracto (0.25, 0.5, 0.75, 1.0 y 1.25mL), a pH entre 1-6 y un régimen de temperaturas de 10°C, 20°C, 30°C, 40°C y 100°C) Se obtiene una fracción monodispersa de nanopartículas esféricas con un diámetro medio de 80nm (páginas 2 y 7).

En el documento D04 se estudia la síntesis ecológica de nanopartículas de oro utilizando extractos de plantas como agentes reductores. En concreto, se utilizan cuatro extractos de plantas de jardín (Salvia officinalis, Lippia citriodora, Pelargonium graveolens y Punica granatum). Dichos extractos se obtienen a partir de su lavado, triturado en agua hasta conseguir un fluido homogéneo y se completa el volumen con agua hasta alcanzar los 50ml. La solución extraída se homogeniza, se centrifuga, se filtra y se congela. A continuación, se prepara una disolución de hidrógeno cloraurato (0.1g/L) y 10ml de la misma se mezclan con 0.75ml del extracto. Las nanopartículas resultantes presentan un tamaño comprendido entre 29nm-45nm en función del extracto empleado (36nm para el extracto de Salvia officinalis, 29nm para el de Lippia citriodora, 45nm para el de Pelargonium graveolens y 32 nm para el extracto de Punica granatum) (apartado "GNP preparation" y Tablas 3-4).

Ninguno de los documentos D01-D04 divulga una síntesis de nanopartículas de oro basada en el uso del extracto envejecido de hojas de Drago (Dracaena draco L), conforme a la presente invención, que permita obtener nanopartículas de oro estables con geometría esférica y un tamaño de 1.63 +- 0.35nm.

Además, dicha síntesis no sería obvia para un experto en la materia a partir de los documentos citados.

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1-10 es nuevo e implica actividad inventiva conforme establecen los Artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.