



## TÍTULO DE PATENTE NO. 345420

**Titular(es):** CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA; UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

**Domicilio:** Blvd. Enrique Reyna No. 140, 25253, Saltillo, Coahuila, MÉXICO; Hacienda Buenavista, Saltillo, Coahuila, 25315, MÉXICO

**Denominación:** PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS UTILIZANDO ÓRGANOS VEGETALES AISLADOS.

**Clasificación:** Int.Cl.8: B82Y30/00; C01F1/00; C08K3/08

**Inventor(es):** HORTENSIA ORTEGA ORTIZ; ADALBERTO BENAVIDES MENDOZA

### SOLICITUD

<b>Número:</b>	<b>Fecha de presentación:</b>	<b>Hora:</b>
NL/a/2006/000008	31 de enero de 2006	14:42

### PRIORIDAD

<b>País:</b>	<b>Fecha:</b>	<b>Número:</b>
--------------	---------------	----------------

**Vigencia:** Veinte años

**Fecha de Vencimiento:** 31 de enero de 2026

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 6º fracciones III y 7º bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación (D.O.F.) 27/06/1991, reformada el 02/08/1994, 25/10/1996, 26/12/1997, 17/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005, 25/01/2006, 06/05/2009, 06/01/2010, 18/06/2010, 28/06/2010, 27/01/2012 y 09/04/2012); artículos 1º, 3º fracción V inciso a), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 14/12/1999, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 7/09/2007); artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 27/12/1999, reformado el 10/10/2002, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007); 1º, 3º y 5º inciso a) del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 04/02/2000, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007).

**Fecha de expedición:** 17 de noviembre de 2016

**LA DIRECTORA DIVISIONAL DE PATENTES**

**NAHANNY CANAL REYES**



**PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE NANOPARTÍCULAS  
METÁLICAS UTILIZANDO ÓRGANOS VEGETALES AISLADOS**

**OBJETO DE LA INVENCION**



5 La invención tiene que ver con la fabricación biológica de nanopartículas metálicas en base a un sistema que utiliza órganos vegetales aislados, intactos o no. La presente invención permite la opción de utilizar soluciones saturadas o superconcentradas de sales metálicas en sistemas que no necesariamente se refieren a la germinación viable o al crecimiento factible de los órganos o tejidos  
10 vegetales utilizados. El sistema propuesto permite aprovechar los mecanismos naturales de absorción, acumulación, y concentración de los metales en tejidos vivos de órganos vegetales, intactos o no, para la producción de nanopartículas metálicas sin contar necesariamente con un sistema agrícola completo y viable de producción de plantas vivas. Se incluye como parte integral del sistema el proceso  
15 que permite el aislamiento de las nanopartículas metálicas por medio de la adsorción de las mismas en microesferas de quitosán o en complejos de quitosán.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Las plantas necesitan de metales como el Cu, Fe, Mn y Zn para desarrollar  
20 reacciones bioquímicas redox, de activación de enzimas y proteínas, como cofactores de las mismas y transporte de gases como el CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>, entre otras. Las raíces son los sitios en donde normalmente ocurre la captura de estos metales, y se sabe que los sistemas de absorción son capaces de atrapar otros metales como la plata cuando esta se encuentra en forma iónica (Ag<sup>+1</sup>). Una vez que se  
25 absorbe el metal este se acumula en el cortex y médula de la raíz o bien es transportado hacia el resto de la planta en donde se almacena y utiliza.

Se sabe también que la absorción de diversos compuestos, entre ellos los iones de metales, se lleva a cabo incluso en órganos, tejidos o hasta células aisladas *in vitro*, siempre y cuando aquellos tengan la suficiente energía libre para la  
30 reducción, absorción, transporte y acumulación de los metales. La concentración

de metales en los sitios de absorción, de transporte y de almacenamiento, se encuentra bajo un control muy fino, ya que incluso en pequeñas concentraciones los iones de estos metales causan daño oxidativo extenso, por medio de los radicales libres y especies activas de oxígeno producidos a través de reacciones Fenton. Esto quiere decir que aunque se encuentren en forma iónica en la solución del suelo o en la solución nutritiva y se absorban en forma iónica, los metales no se mantienen libres en los tejidos vegetales. Los sitios naturales de almacenamiento de los metales son las paredes celulares, vacuolas, cloroplastos y mitocondrias, las cuales son de manera natural fábricas de nanoestructuras biológicas. El desarrollo de procesos biológicos para la síntesis de nanopartículas metálicas se está convirtiendo en una rama importante de la nanotecnología. Klaus *et al.* (1999) reportaron la obtención de cristales de plata de diferentes formas y tamaños en células bacterianas cuando estas se ponían en contacto con una solución de iones  $Ag^+$ . Por su parte Shankar *et al.* (2003) reportaron el uso de extractos foliares de geranio (*Pelargonium graveolens*) para el tratamiento de soluciones de nitrato de plata, obteniendo una rápida reducción de los iones plata, así como la formación de nanocristales de plata en la solución. Los análisis de microscopía electrónica de transmisión indicaron que dichas partículas de plata, en tamaños de 16 a 40 nanómetros, se ensamblaron en superestructuras cuasilineales. La tasa de reducción de los iones plata por el extracto foliar de geranio fue mayor a la reportada para el hongo *Fusarium oxysporum*. Esto posibilita utilizar las plantas o sus partes aisladas como dispositivos de síntesis de nanopartículas. Gardea-Torresdey *et al.* (Solicitud de Patente US 2005/0009170) estudiaron la obtención y el aislamiento de nanocristales de oro, plata y platino en plantas dicotiledóneas, en particular la alfalfa, utilizando un medio sólido o líquido enriquecido con el metal en forma iónica. Por otra parte, el grupo de Benavides-Mendoza (2003, patente en trámite PA/a/2003/009164) describió un sistema para aplicar ácidos orgánicos y compuestos de la vía de los fenilpropanoides para producir plantas o tejidos en condiciones incluso de alta concentración de sales,

como los que se pueden utilizar en sistemas biológicos de producción de nanocristales.

5 Se han realizado numerosos trabajos encaminados a incrementar la capacidad de enlace y selectividad del quitosán a los iones metálicos mediante la introducción de modificaciones químicas a través de sus grupos amino e hidroxilo (Mitani *et al.*, 1992; Argüelles *et al.*, 1993). Las microesferas de quitosán y de complejos de quitosán se preparan con el objetivo principal de encapsular sustancias para producir sistemas de dosificación que son de aplicación en la industria, la agricultura, en medicina, farmacia y biotecnología.

10 Aunque ya se ha demostrado que es posible la formación de nanocristales de metales pesados en células vivas y viables de plantas dicotiledóneas con crecimiento factible, o bien con los extractos celulares de las mismas. No se consideró sin embargo la utilización de partes de las plantas, intactas o no, tampoco se incluyó la posibilidad de utilizar soluciones saturadas o  
15 superconcentradas de sales metálicas en sistemas que no necesariamente se refieren a la germinación viable o al crecimiento factible o a la reproducción viable de las semillas y plantas, por último no se describieron específicamente los procesos, equipos o modelos que permitan la producción y aislamiento de los nanocristales.

20 Asimismo, restan los problemas prácticos derivados de la determinación de las condiciones de crecimiento de las plantas que hagan óptima la absorción, la acumulación, la estabilidad y el tamaño de los nanocristales, los sitios de acumulación, la tasa de recuperación, así como los involucrados con el aislamiento y purificación de los nanocristales.

25

30

## DESCRIPCIÓN

El sistema propuesto para la producción de nanopartículas metálicas utilizando órganos vegetales aislados se refiere a dos alternativas no necesariamente excluyentes. Por una parte es posible utilizar los mecanismos naturales de absorción, acumulación y concentración de los metales en tejidos vivos de órganos intactos, principalmente órganos reproductivos con capacidad de rápido crecimiento y gran cantidad de energía libre. Por otro lado, es factible utilizar el potencial reductor intrínseco (potencial redox negativo) de los tejidos vivos de órganos no intactos segmentados en diversa forma y volumen. Este potencial reductor permite que incluso los segmentos de órganos vegetales no intactos absorban, acumulen y concentren los metales en el volumen viable. La invención aquí descrita consiste en:

1. Para la producción de nanopartículas metálicas utilizando tejidos vivos de órganos intactos, principalmente órganos reproductivos con capacidad de crecimiento rápido y gran cantidad de energía libre como las semillas, bulbos, esquejes, tubérculos, cormos, tallos cortados, rizomas y cladodios, se aplicará una solución que contiene hasta  $35000 \text{ mg L}^{-1}$  de un ión metálico como el cromo, manganeso, hierro, cobalto, níquel, cobre, zinc, plata, cadmio, iridio, platino, oro o mercurio, entre otros. En dicho sistema es posible añadir ácidos orgánicos como el ácido benzoico o el ácido cítrico en concentraciones de  $10^{-10}$  hasta  $10^{-2}$  molar así como otros agentes promotores de la absorción de metales. Esta solución se utilizará para la pregerminación o germinación de las semillas, o bien para la saturación de los tejidos de órganos vegetativos en un esquema que no necesariamente requiere la germinación o el crecimiento viable. Se aplicarán de 0.5 a 50 kg de semillas u otros órganos vegetativos por metro cuadrado de un contenedor o recipiente sin perforar y sin drenaje que contiene o no un sustrato inerte así como la solución antes indicada. Los órganos vegetales intactos, que de origen pueden ser viables o no serlo, permanecen en el contenedor con la solución enriquecida del metal durante un lapso de hasta 10 días, bajo las

condiciones ambientales encontradas de forma natural en el lugar de producción o bien bajo las condiciones modificadas con un sistema de regulación ambiental en un laboratorio, invernadero, u otra instalación. Una vez transcurrido el lapso de hasta 10 días los órganos vegetales intactos se colectan por decantación recuperando la solución sobrante para su posterior uso. Las semillas y otros órganos reproductivos reunidos, cuyos tejidos contienen las nanopartículas metálicas son entonces llevadas al proceso de recuperación de los mismos que será descrito más adelante.

2. Para la producción de las nanopartículas metálicas utilizando el potencial reductor intrínseco (potencial redox negativo) de los tejidos vivos de órganos no intactos segmentados en diversa forma y volumen el procedimiento es el siguiente. Los tejidos vivos de órganos vegetales como hojas, tallos, bulbos, tubérculos, cormos, rizomas y cladodios son obtenidos en forma de segmentos de diferente forma y volumen, pero siempre aumentando al máximo el cociente superficie/volumen de tal forma que la absorción de la solución con los iones del metal sea rápida. Dichos segmentos son colocados en contacto con una solución que contiene hasta  $45000 \text{ mg L}^{-1}$  del ión metálico como el cromo, manganeso, hierro, cobalto, níquel, cobre, zinc, plata, cadmio, iridio, platino, oro o mercurio, entre otros. En dicho sistema es posible añadir ácidos orgánicos como el ácido benzoico o el ácido cítrico en concentraciones de  $10^{-10}$  hasta  $10^{-2}$  molar así como otros agentes promotores de la absorción de metales. Se logra entonces la saturación de los tejidos vegetales en un esquema diseñado para promover la absorción y acumulación de metales en las células pero que excluye el crecimiento viable del tejido o segmento de órgano. Se aplicarán de 0.5 a 50 kg de los segmentos de órganos vegetales por metro cuadrado de un contenedor o recipiente sin perforar y sin drenaje, que contiene o no un sustrato inerte o cualquier otro sistema de acomodo de los segmentos vegetales que aumente su contacto superficial con la solución saturada, así como la presencia o no de un sistema de turbulencia o mezclado que permita la adecuada recirculación e intercambio de gases de la solución antes indicada. Los segmentos de los órganos

- vegetales permanecen en el contenedor con la solución enriquecida del metal durante un lapso de hasta 10 días, bajo las condiciones ambientales encontradas de forma natural en el lugar de producción o bien bajo las condiciones modificadas con un sistema de regulación ambiental en un laboratorio, invernadero, u otra instalación. Una vez transcurrido el lapso de hasta 10 días los segmentos de los órganos vegetales intactos se colectan por decantación recuperando la solución sobrante para su posterior uso. Los segmentos de tejidos reunidos, cuyas células contienen las nanopartículas metálicas son entonces llevadas al proceso de recuperación de los mismos que será descrito más adelante.
3. Para la recuperación de las nanopartículas metálicas de los tejidos vegetales frescos o secos. Los tejidos frescos o secos de las plantas que contienen las nanopartículas metálicas se muelen en un molino de aspas, los tejidos molidos se dispersan por lo menos durante 2 horas en agua destilada o solución buffer para extraer las nanopartículas metálicas; así como todos los compuestos del tejido vegetal solubles en el agua o la solución buffer. Se filtra para eliminar la materia sólida. Posteriormente al filtrado se le ajusta el pH de 4 a 6 y se agregan de 25 a 500 mg (peso seco) de microesferas de quitosán con grado de desacetilación alto o de 25 a 500 mg (peso seco) de complejos de quitosán, manteniendo el sistema en agitación constante no vigorosa por lo menos 12 horas para adsorber las nanopartículas metálicas. Las microesferas con las nanopartículas adsorbidas se filtran y se colocan en otra solución buffer de diferente pH; las cuales se mantienen en agitación constante para liberar las nanopartículas metálicas. Secar a vacío y analizar las nanopartículas metálicas obtenidas en un microscopio electrónico de transmisión para definir su tamaño y morfología.
4. Otro procedimiento para la extracción de las nanopartículas metálicas es a partir de su adsorción en las microesferas del quitosán o en complejos de quitosán, se filtran y se ponen a secar las microesferas con las nanopartículas adsorbidas a vacío o a 60 °C durante 24 horas. Las nanopartículas metálicas aun adsorbidas en las microesferas secas de quitosán o en los complejos de quitosán se analizan en un microscopio electrónico de transmisión para definir su tamaño y morfología.

## REIVINDICACIONES

Habiendo descrito suficientemente la invención, considerando como novedad la misma, reclamamos como de exclusiva propiedad, lo contenido en las siguientes  
5 cláusulas:

1. El proceso para la producción y aislamiento de nanopartículas metálicas en  
órganos vegetales aislados, intactos o no (bulbos, esquejes, tubérculos, cormos,  
tallos cortados, rizomas, cladodios y hojas), semilla viable o inviable, mediante  
10 microesferas de quitosán o en complejos de quitosán, caracterizado por que  
comprende los siguientes pasos:

- a. Un primer paso que consiste en inmersión en soluciones de iones metálicos  
como el cromo, manganeso, hierro, cobalto, níquel, cobre, zinc, plata, cadmio,  
iridio, platino, oro o mercurio, entre otros.
- 15 b. Un segundo paso que consiste en la homogenización del órgano vegetal,
- c. Un tercer paso que consiste en lograr la adsorción de las nanopartículas  
metálicas.

2. El proceso para la producción y aislamiento de nanopartículas metálicas en  
20 órganos vegetales aislados, intactos o no (bulbos, esquejes, tubérculos, cormos,  
tallos cortados, rizomas, cladodios y hojas), semilla viable o inviable, mediante  
microesferas de quitosán o en complejos de quitosán, de acuerdo a la  
reivindicación # 1, caracterizado por que se comprende de un primer paso  
consistente en la inmersión de cualquiera de los órganos mencionados en  
25 soluciones de iones metálicos hasta una concentración de 45,000 mg L<sup>-1</sup>.

3. El proceso para la producción y aislamiento de nanopartículas metálicas en  
órganos vegetales aislados, intactos o no (bulbos, esquejes, tubérculos, cormos,  
tallos cortados, rizomas, cladodios y hojas), semilla viable o inviable, mediante  
30 microesferas de quitosán o en complejos de quitosán, de acuerdo a la



reivindicacion # 1, caracterizado por que se comprende de un segundo paso consistente en el aislamiento de nanopartículas metálicas de los órganos vegetales aislados, intactos o no (bulbos, esquejes, tubérculos, cormos, tallos cortados, rizomas, cladodios y hojas), semilla viable o inviable.

5

4. El proceso para la producción y aislamiento de nanopartículas metálicas en órganos vegetales aislados, intactos o no (bulbos, esquejes, tubérculos, cormos, tallos cortados, rizomas, cladodios y hojas), semilla viable o inviable, mediante microesferas de quitosán o en complejos de quitosán, de acuerdo a la reivindicacion # 1, caracterizado por que se comprende de un tercer paso en el cual una de las maneras para realizar la adsorción de las nanopartículas metálicas consiste en el uso de 25 a 500 mg de microesferas de quitosán con grado de desacetilación alto en una solución buffer con un pH de 4 a 6; manteniendo el sistema en agitación constante no vigorosa por lo menos 12 horas.

10

15

5. El proceso para la producción y aislamiento de nanopartículas metálicas en órganos vegetales aislados, intactos o no (bulbos, esquejes, tubérculos, cormos, tallos cortados, rizomas, cladodios y hojas), semilla viable o inviable, mediante microesferas de quitosán o en complejos de quitosán, caracterizado por que se comprende un tercer paso en el cual otra de las maneras para realizar la adsorción de las nanopartículas metálicas consiste en la adsorción de las nanopartículas metálicas en complejos de quitosán solución buffer con un pH de 4 a 6; manteniendo el sistema en agitación constante no vigorosa por lo menos 12 horas.

20

25

### RESUMEN DE LA INVENCION

Se describe un procedimiento para la producción y aislamiento de nanopartículas metálicas utilizando un método que incluye el uso de una solución de hasta 45000  
5 mg L<sup>-1</sup> de iones metálicos, usando un sistema de producción que utiliza por un lado los mecanismos naturales de absorción, acumulación, y concentración de los metales en tejidos vivos de órganos aislados e intactos, principalmente órganos reproductivos con capacidad de rápido crecimiento y gran cantidad de energía libre. Por otra parte hace uso del potencial reductor intrínseco de los tejidos vivos  
10 de órganos no intactos segmentados en diversa forma y volumen. Sea partiendo de órganos aislados intactos o de segmentos de órganos no intactos se describe un sistema de recuperación de las nanopartículas metálicas mediante su adsorción en microesferas de quitosán o en complejos de quitosán.

15