



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2008 00401**

(22) Data de depozit: **30.05.2008**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28.02.2012** BOPI nr. **2/2012**

(41) Data publicării cererii:
30.11.2009 BOPI nr. **11/2009**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
TEHNOLOGII IZOTOPICE ȘI
MOLECULARE, STR.DONATH NR.65-103,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(72) Inventatori:
• **NAN ALEXANDRINA EMILIA, STR.TOMIS
NR. 16, BL.D19, AP.8, DEJ, CJ, RO;**
• **TURCU RODICA PAULA,
STR.TITU MAIORESCU NR.7, AP.4,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**

• **CRĂCIUNESCU IZABELL, STR.CIUCAȘ
NR.9, BL.R1, SC.5, AP.98, CLUJ-NAPOCA,
CJ, RO;**
• **LIEBSCHER JURGEN, STR.AM ALTEN
FRIEDHOF NR.51, BERLIN, DE**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**EP 0314009 A2; R. TURCU, Ș.A. -
JOURNAL OF NANOSTRUCTURES
POLYMERS AND NANOCOMPOSITES,
VOL.3, 2007 - "FUNCTIONALIZED
NANOSTRUCTURES WITH MAGNETITE
CORE AND PYRROLE COPOLYMERS
SHELL"**

(54) **NANOPARTICULE MAGNETICE PE BAZĂ DE MAGNETITĂ ȘI
COPOLIMER PIROLIC, ȘI PROCEDU DE OBTINERE A
ACESTORA**



1 Invenția se referă la nanoparticule magnetice pe bază de magnetită și copolimer
pirolic și la un procedeu de obținere a acestora, utilizate în separarea celulară magnetică,
3 recunoaștere biomoleculară, diagnosticare, precum și în organocataliză cu rolul de catalizatori
reciclabili. Mai exact, aceste nanoparticule sunt nanostructuri magnetice funcționalizate de
5 tip core-shell, având miezul magnetic constituit din magnetită, iar învelișul care acoperă
miezul este format din polipirol funcționalizat cu peptidă.

7 Nanostructurile magnetice de tip core-shell, compuse dintr-un miez magnetic,
magnetită, acoperite de un înveliș polipirol funcționalizat cu peptide nu este încă cunoscut.
9 Până în prezent, în literatură, s-a raportat doar atașarea directă a proteinelor pe particulele
de oxid de fier sau atașarea unor proteine prin intermediul polietilenglicolului [S. Y. Chang,
11 N.Y. Zheng, C.S. Chen, Y.Y. Chen, C.R. Cris Wang, J. Am. Soc. Mass Spectrom, 18,
910-918 (2007); E. Amstad, S. Zurcher, J. Y. Wong, M. Textor, E. Reimhult, European
13 Cells and Materials, Vol. 14, Suppl. 3, p. 43 (2007)].

15 Atașarea directă a proteinelor pe suprafața nanoparticulelor magnetice de oxid de
fier, raportate în literatură, se realizează prin adsorbția proteinelor pe suprafața nanoparti-
culei magnetice. Dezavantajul acestor nanostructuri descrise anterior în literatură constă în
17 instabilitatea lor. Nanostructurile preparate prin atașarea directă a proteinelor pe suprafața
nanoparticulei de oxid de fier pot suferi schimbări drastice sau blânde în funcție de condițiile
19 mediului în care se află (spre exemplu: temperatură, solvent, pH). Din cauza acestei
instabilități, aceste nanostructuri magnetice de tip core-shell, funcționalizate cu proteine nu
21 pot fi folosite pentru un timp îndelungat, în orice mediu și de asemenea nu pot fi reciclate în
scopul reutilizării.

23 În literatură, a fost raportată, de către W. Khan ș. a. [W. Khan, M. Kapoor, N. Kumar,
Acta Biomaterialia, 3, 541-549 (2007)], acoperirea unei suprafețe metalice cu polipirol care
25 avea atașat covalent proteina. Pentru acoperirea acestei suprafețe metalice cu polipirol
având proteina atașată covalent, autorii au folosit reacția de electropolimerizare a pirolului.
27 Dar această reacție de electropolimerizare a pirolului nu poate fi aplicată pentru prepararea
nanostructurilor magnetice de tip core-shell pe bază de oxid de fier și polipirol funcționalizat
29 [M. Koneracká, P. Kopčansky, M. Timko, C. N. Ramchand, A. De Sequeira, M. Trevan,
J. Mol. Cat. B, 18, 13-18 (2002)].

31 Proteinele au fost fixate de asemenea și pe nanosfere având miez magnetic
înconjurat de polipirol, dar în acest caz, legarea covalentă a proteinelor s-a făcut pe
33 moleculele de surfactant care dopeză lanțul polipirol [S. C. Wuang, K.G. Neoh, E.T.
Kang, D. W. Pack, D. E. Leckband, **Macromol. Rapid. Commun.**, 28, 816-821 (2007)].

35 În articolul, "*Functionalized nanostructures with magnetite core and pyrrole
copolymers shell*" R. Turcu ș.a. - **Journal of nanostructured polymers and
37 nanocomposites**, vol. 3, 2, 2007, se prezintă sinteza și caracterizarea unor nanostructuri
anorganice-organice obținute prin acoperirea unor nanoparticule de magnetită cu un strat
39 de polimer conjugat, destinate utilizării în biotehnologie; nanostructurile magnetice funcțio-
nalizate au fost obținute prin polimerizarea oxidativă a pirolului substituit și nesubstituit într-o
41 soluție apoasă care conține drept oxidant peroxodisulfat de amoniu și fluidul magnetic.
Polimerii funcționalizați au fost obținuți de la monomeri precum acid (1-pirolil)propanoic și 3-
43 metil-4-(1H-pirol-3-il)butanamido)pentanoic. Dezavantajul acestor nanostructuri constă în
faptul că nu formează coloizi stabili.

45 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în creșterea stabilității
nanostructurilor magnetice pe bază de magnetită și polipirol funcționalizat.

RO 125022 B1

Nanoparticulele magnetice pe bază de magnetită și copolimer pirolic înlătură dezavantajele menționate, prin aceea că, copolimerul pirolic este constituit din pirol nefuncționalizat și pirol funcționalizat la azot cu o dipeptidă precum glicin-leucină, prin intermediul unui agent de legătură alchilic, precum acid propionic, într-un raport molar de 1:1... 1:3.

Procedeul de obținere a nanoparticulelor magnetice constă în aceea că, copolimerul pirolic se formează la suprafața nanoparticulelor magnetice stabilizate din fluidul magnetic adus în contact cu copolimerul pirolic într-un raport masic de 1:10, în prezența persulfatului de amoniu, utilizat ca oxidant, timp de 20 h, la temperatura ambiantă.

Prin aplicarea invenției, se obțin nanostructuri magnetice care formează coloizi stabili în apă, care prin atașarea unor peptide sau proteine active devin biologic active și pot fi folosite în recunoașterea biomoleculară și separarea celulară magnetică.

Semnificația schemelor și figurilor:

- Schema 1: Sinteza acidului 3-(pirol-1-il)-propanoic;
- Schema 2: Sinteza esterului 2,5-dioxopirolidin-1-il-3-(pirol-1-il)propanoat;
- Schema 3: Sinteza acidului 2-(2-(3-(pirol-1-il) propanamido) acetamido)-4-metil pentanoic;
- Schema 4: Prepararea nanostructurilor magnetice core-shell funcționalizate pe bază de polipirol;

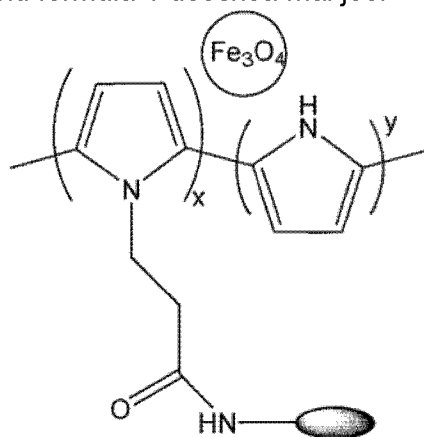
- Fig. 1: Microscopia electronică în transmisie de înalta rezoluție pentru nanostructura magnetică funcționalizată pe bază de polipirol FP-DP 1. În imaginea de microscopie a nanostructurii magnetice funcționalizate FP-DP 1 putem observa structura de tip core-shell, având miezul magnetic cristalin de Fe_3O_4 acoperit de un strat de polipirol funcționalizat;

- Fig. 2: Spectroscopia FTIR pentru toate nanostructurile magnetice pe bază de polipirol funcționalizat descrise în tabelul 1 precum și a monomerului pirolic funcționalizat compusul 4. În spectrul FTIR se poate observa la 570 cm^{-1} banda de adsorbție a magnetitei, iar la 1705 cm^{-1} apare banda de adsorbție specifică grupării C=O, ceea ce demonstrează includerea în structura polipirolului care înconjoară nanoparticula magnetică a pirolului funcționalizat cu glicil-leucină în structura căruia este prezentă această grupare;

- Fig. 3: Comportarea magnetizării în funcție de câmpul magnetic aplicat la temperatura camerei pentru nanostructura magnetică FP-DP 2. Lipsa histerezisului ne indică faptul că nanoparticulele magnetice funcționalizate au comportament superparamagnetic;

- Fig. 4: Comportarea magnetizării în funcție de câmpul magnetic aplicat la temperatura camerei pentru nanostructura magnetică FP-DP 3. Lipsa histerezisului ne indică faptul că nanoparticulele magnetice funcționalizate au comportament superparamagnetic.

Obiectivul principal al invenției este dezvoltarea și prepararea unor nanostructuri magnetice cu structură core-shell având miezul de oxid de fier și invelișul de polipirol funcționalizat cu peptide, având formula 1 descrisă mai jos:



Formula 1

RO 125022 B1

1 Aceste peptide sunt fixate covalent pe polipirol care polimerizează chimic pe
2 suprafața nanoparticulelor magnetice de oxid de fier. Aceste nanoparticule magnetice sunt
3 stabilizate în prealabil cu strat dublu de surfactanți (acid dodecilbensulfonic, acid lauric
și acid oleic) sub forma unui fluid magnetic în apă. Prepararea acestor fluide magnetice este
5 descrisă în referințele RO 90078, 1985 [D. Bica, RO 90078, 1985; și D. Bica, L. Vékás, M.
6 V. Avdeev, O. Marinică, V. Socoliuc, M. Bălășoiu, V. M. Garamus, J. Magn. Magn.
7 Mater., 311, 17-21 (2007)]. Reacția de polimerizare chimică a pirolului are loc pe suprafața
nanoparticulei magnetice, datorită existenței surfactanților care au rol de dopant.

9 Pentru utilizarea nanoparticulelor magnetice funcționalizate în diferite domenii (sepa-
10 rarea celulară magnetică, recunoaștere biomoleculară sau folosirea lor în organocataliză),
11 este necesar ca atașarea grupării funcționale pe suprafața nanoparticulei magnetice să se
realizeze printr-o legătură stabilă. Utilizarea polipirolului ca linker al grupării funcționale
13 conferă o stabilitate bună în diferite medii de reacție a nanoparticulelor magnetice funcțio-
nalizate.

15 Această invenție prezintă o metodă nouă de funcționalizare a nanoparticulelor
magnetice pe bază de polipirol conținând grupările funcționale atașate covalent. Această
17 metodă prezintă avantaje față de metodele existente în ceea ce privește stabilitatea nano-
structurii magnetice funcționalizate în diferite medii de reacție.

19 Chiar dacă au fost dezvoltate multe tipuri de particule care pot fi folosite în diferite
aplicații în tehnologie sau biotehnologie, totuși este o mare nevoie de a dezvolta noi nano-
21 structuri magnetice funcționalizate. De exemplu, prin aplicarea acestei invenții, putem atașa
peptide biologice active pe suprafața nanoparticulelor magnetice, aceasta fiind o strategie de
23 dezvoltare a unor noi nanostructuri magnetice funcționalizate care devin biologice active. De
asemenea, funcționalizarea nanoparticulelor magnetice cu peptide sau proteine antigen
25 poate fi folosită în identificarea anticorpilor sau pentru diagnosticarea diferitelor boli.

În scopul preparării nanostructurilor magnetice funcționalizate de tip core-shell pe
27 bază de polipirol, se utilizează ca materii prime de plecare: fluid magnetic în apă, pirol
nesubstituit și acidul 2-(2-(3-(pirol-1-il)propanamido)acetamido)-4-metil pentanoic (compusul
29 4 din schema 3).

În sinteza compusului 4, s-a pornit de la adiția Michael a acrilonitrilului la atomul de
31 azot al inelului pirolic în prezența hidroxidului de trimetilbenzen amoniu. Această adiție duce
la obținerea intermediarului nitrilic 1, care nu este izolat, ci este supus unei hidrolize bazice
33 și apoi tratat cu acid clorhidric, rezultând astfel compusul carboxilic 2 acidul (3-(pirol-1-il)-
propanoic (schema 1). Sinteza compusului 2 a fost realizată în conformitate cu procedeul de
35 sinteză descris de Blume [8].

Următoarea etapă este atașarea N-hidroxisuccinimidei la gruparea carboxil grefată
37 la atomul de azot al inelului pirolic (schema 2), printr-o reacție de esterificare între gruparea
carboxil și gruparea hidroxil a N-hidroxisuccinimidei obținându-se compusul esteric 3.

39 Este știut faptul că gruparea N-hidroxisuccinimidice este ușor de înlocuit de către un
compus care conține grupări nucleofilice de tipul (amino sau tiol). Folosind această
41 proprietate chimică a grupării N-hidroxisuccinimidice, s-a realizat reacția de înlocuire a
grupării N-hidroxisuccinimida din compusul esteric 3 cu dipeptida glicil-leucină care conține
43 o grupare amino liberă (schema 3), rezultând astfel compusul pirolic funcționalizat 4 cu
peptidă.

45 Se prezintă, în continuare, trei exemple concrete nelimitative, de realizare a invenției.

Exemplele 1...3. Într-un pahar Berzelius, se dizolvă în apă și alcool etilic, acid 2-(2-
47 (3-(pirol-1-il)propanamido)acetamido)-4-metil pentanoic, pirolul nesubstituit (schema 4),
nanofluid magnetic, amestecul se agită timp de 30 min la temperatura camerei. În suspensia
49 formată, se adaugă în picături oxidantul (persulfatul de amoniu). Pentru cele trei exemple,

RO 125022 B1

reacția are loc la temperatura camerei, timp de 20 h. Raportul masic fluid magnetic: monomeri pirolici funcționalizat și nefuncționalizat este de 10, păstrându-se constant în cazul celor trei exemple. Reacția se oprește cu metanol, obținându-se un precipitat negru, specific polipirolului. Precipitatul este separat magnetic din soluție și spălat cu metanol și apă de mai multe ori, până soluția de spălare devine limpede. Diferențele dintre cele trei exemple sunt date în tabelul următor.

Parametrii de sinteză pentru nanostructurile magnetice pe bază de polipirol funcționalizat

Probă	Raport molar Py nesubst. : Py subst.	Tipul de fluid magnetic
FP-DP 1	1 : 1	Nanoparticule de Fe ₃ O ₄ stabilizat cu dublu strat de acid oleic
FP-DP 2	1 : 3	Nanoparticule de Fe ₃ O ₄ stabilizat cu dublu strat de acid lauric
FP-DP 3	1 : 1	Nanoparticule de Fe ₃ O ₄ stabilizat cu dublu strat de acid dodecil benzensulfonic

RO 125022 B1

Revendicări

1

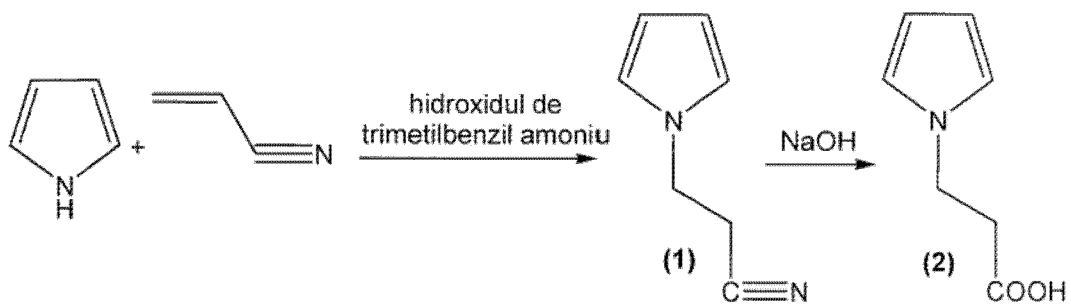
3

1. Nanoparticule magnetice pe bază de magnetită și copolimer pirolic, **caracterizate prin aceea că**, copolimerul pirolic este constituit din pirol nefuncționalizat și pirol funcționalizat la azot cu o dipeptidă precum glicin-leucină, prin intermediul unui agent de legătură alchilic precum acid propionic, într-un raport molar de 1:1... 1:3.

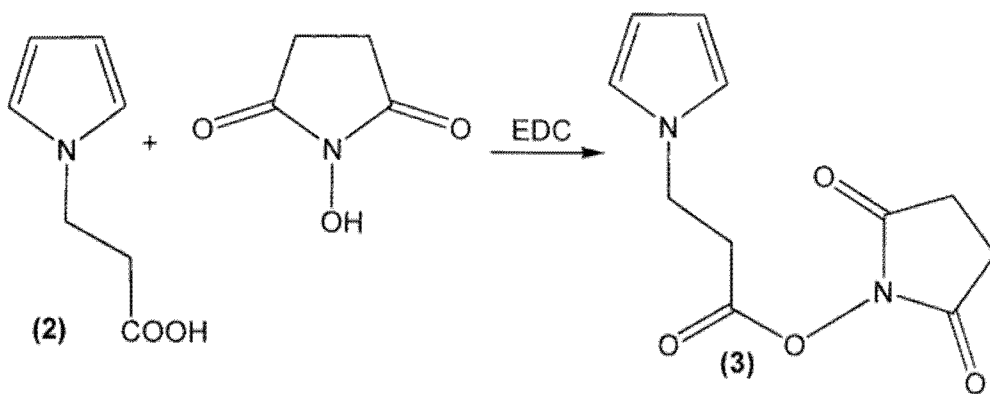
7

2. Procedeu de obținere a nanoparticulelor magnetice definite în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că**, copolimerul pirolic se formează la suprafața nanoparticulelor magnetice stabilizate din fluidul magnetic adus în contact cu copolimerul pirolic într-un raport masic de 1:10, în prezența persulfatului de amoniu utilizat ca oxidant, timp de 20 h, la temperatura ambiantă.

11

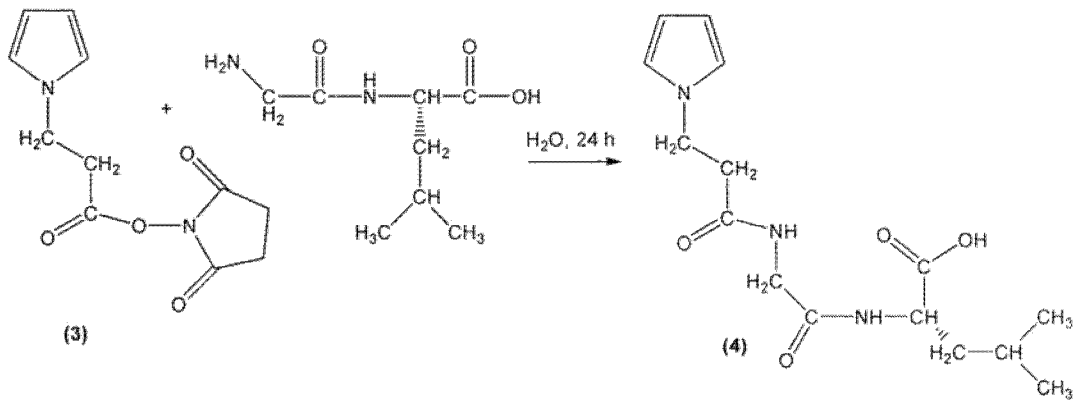


Schema 1

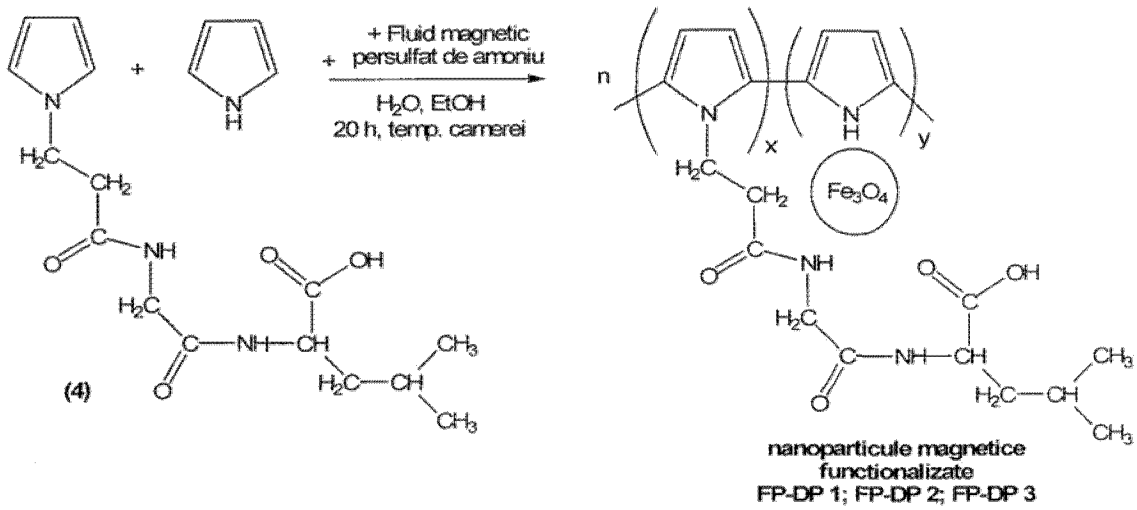


Schema 2

1
3
5
7
9
11
13
15
17
19
21
23
25
27
29
31
33
35
37



Schema 3



Schema 4

(51) Int.Cl.

C09C 1/24 (2006.01),

G01N 33/53 (2006.01)

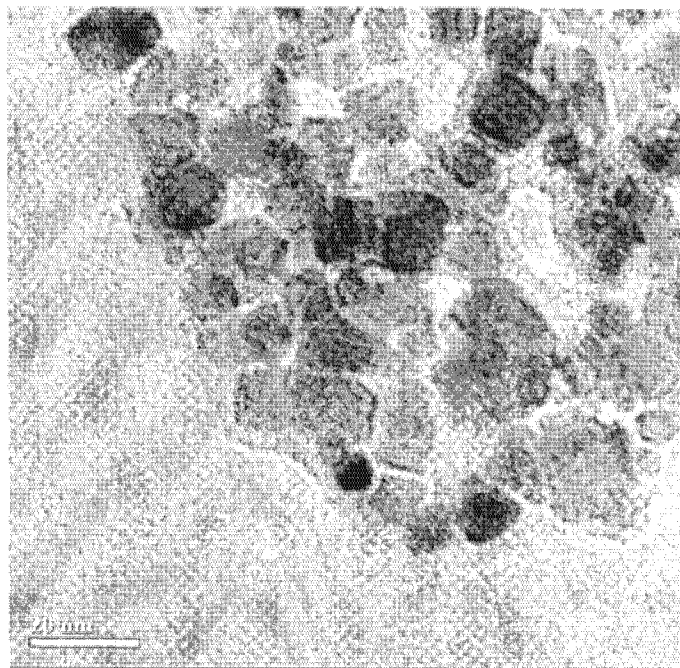


Fig. 1

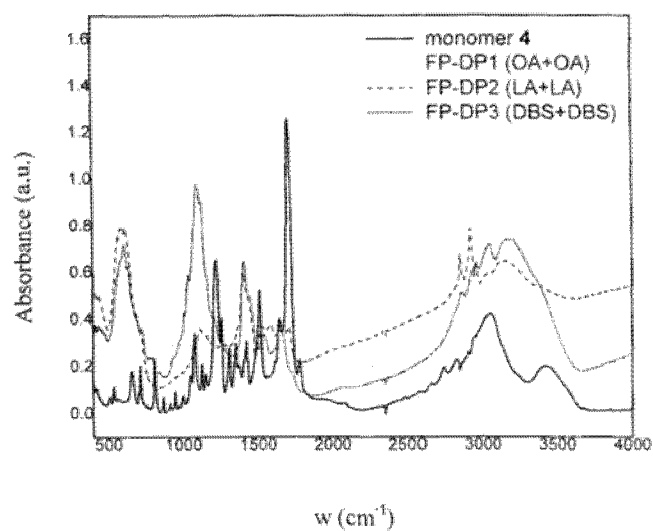


Fig. 2

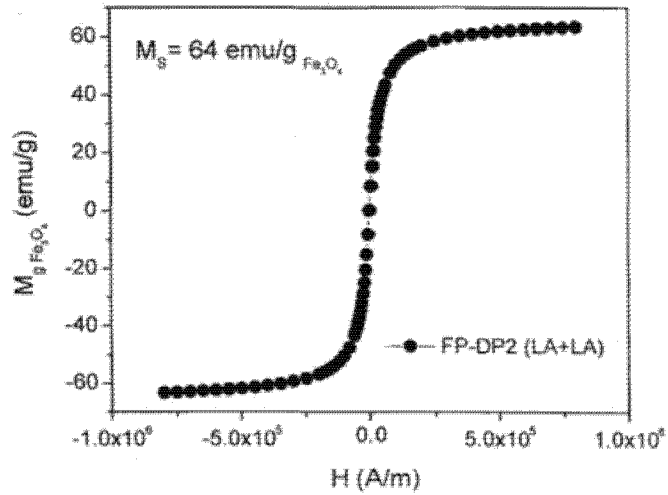


Fig. 3

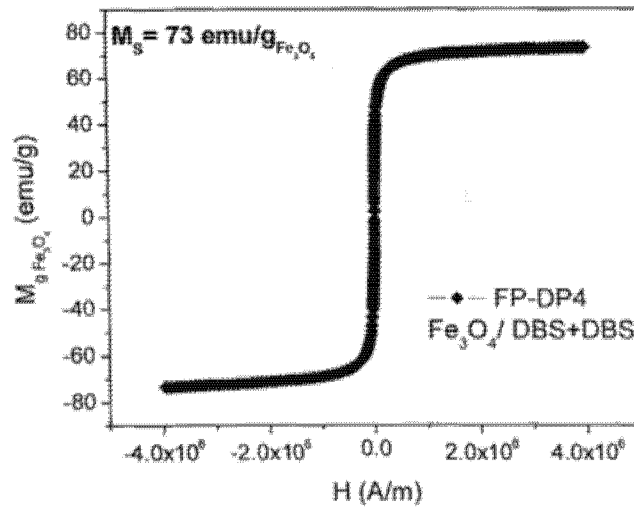


Fig. 4

