



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2013 00407**

(22) Data de depozit: **27/05/2013**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/03/2020** BOPI nr. **3/2020**

(41) Data publicării cererii:  
**30/01/2015** BOPI nr. **1/2015**

(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.D 19, AP.8, DEJ, CJ, RO;**  
• **TURCU RODICA PAULA,  
STR.TITU MAIORESCU NR.7, AP.4,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**  
• **LIEBSCHER JURGEN, STR.SOMEȘULUI  
NR.5A, BL.C1, AP.21, FLOREȘTI, CJ, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**RO 128880 B1; RO 128567 B1**

(54) **METODĂ DE ATAȘARE COVALENTĂ  
A MONOZAHARIDELOR PE SUPRAFEȚE CU GRUPĂRI  
HIDROXIL**



1 Prezenta invenție se referă la o metodă de atașare covalentă a monozaharidelor la  
 3 grupările hidroxil ale lanțului polimeric aflat pe suprafața nanostructurilor în prezență de  
 trifluoroborat eterat. Această metodă poate fi aplicată și în atașarea altor zaharide acetilate  
 pe suprafața nanoparticulelor magnetice care conțin grupări hidroxil.

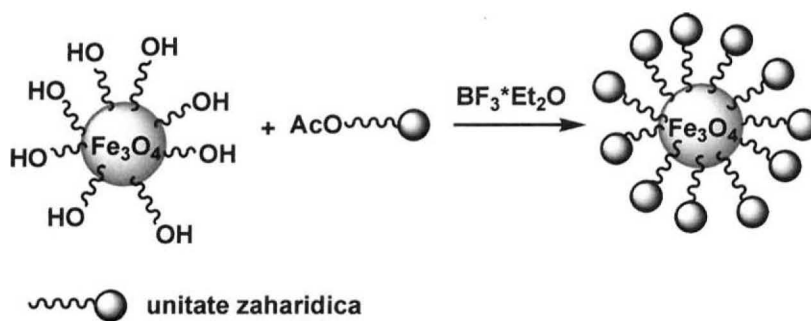
5 Datorită importanței pe care o au nanoparticulele magnetice având pe suprafață  
 unități monozaharide, în literatură au fost dezvoltate și descrise multe metode de atașare a  
 7 monozaharidelor pe suprafața nanoparticulelor magnetice, dar această metodă inovativă  
 este una foarte economică și care poate fi aplicată la o gamă largă de molecule cu  
 9 importanță aplicativă.

11 Metoda descrisă în cadrul acestei invenții este folosită pentru sinteza diferiților  
 derivați glicozilați (O-glicozilați, C-glicozilați, N-glicozilați sau S-glicozilați). Sinteza acestor  
 derivați glicozilați folosind ca și catalizator trifluoroborat eteratul în diferite condiții de reacție  
 13 este prezentată în câteva publicații, formarea legăturii glicozidice are loc prin condensarea  
 unei unități zaharidice cu o moleculă care conține o grupare hidroxil, tiol, amino sau alte  
 15 grupări nucleofile. Trifluoroboratul, ca acid Lewis, este folosit în chimia carbohidraților și  
 pentru deacetilarea selectivă a poziției anomerice a compușilor zaharidici, dar această  
 17 reacție decurge în condiții de reacție diferite de cele folosite pentru obținerea derivaților  
 glicozilați.

19 O primă descriere a acestei metode în literatură este făcută de către R. R. Schmidt  
 [1] în anul 1986, fiind primul exemplu de metodă în care se folosește trifluoroborat eteratul  
 21 pentru sinteza diferiților derivați glicozilați. În acest exemplu se folosește așa numita metodă  
 a tricloroacetamidei, în cazul acestei metode se formează un compus de tranziție activat  
 23 care este sub formă de sare a glicozilsulfonamoniu. Această metodă descrisă mai sus este  
 preluată și de alte grupuri de cercetare, fiind aplicată în sinteza altor derivați glicozilați. În  
 25 toate cazurile se formează, în primul rând, un derivat acetamidic, iar în prezență de  
 trifluoroborat eterat și un derivat hidroxilic, rezultând diferiți derivați glicozilați [2-8].

27 O altă descriere a metodei de sinteză a derivaților glicozilați în prezență de  
 trifluoroborat eterat este făcută de către E. Smits et al. [9]. În acest caz, reacția de sinteză  
 29 este directă nu are loc prin sinteza în prealabil a derivatului tricloroacetamidic. Deci această  
 nouă metodă este mult mai rapidă și mai economică, ducând printr-un singur pas de reacție  
 31 la compusul glicozilat dorit. Ca și în cazul precedent, această metodă a fost preluată de mai  
 multe grupuri de cercetare fiind aplicată pentru obținerea mai multor tipuri de derivați  
 33 glicozidici [10-18].

35 Tema principală a invenției este implementarea unei metode inovative de legare  
 covalentă a monozaharidelor acetilate de grupările hidroxil aflate în lanțul polimeric situat la  
 suprafața nanoparticulelor magnetice, având formula descrisă mai jos (formula 1):



Formula 1

# RO 129983 B1

Obiectivul acestei invenții este acela de a aplica această metodă, dezvoltată pentru obținerea derivaților glicozilați, în prepararea materialelor hibride funcționalizate cu unități zaharice. În prealabil, se prepară nanoparticule, nanostructuri sau materiale hibride funcționalizate cu grupării hidroxil capabile să interacționeze cu unitățile zaharidice acetilate. După prepararea acestor nanoparticule, nanostructuri sau materiale hibride având pe suprafață grupări hidroxil acestea pot fi interacționate în prezența trifluoroborat eteratului cu unitățile zaharidice.

Prin aplicarea acestei metode se vor obține nanoparticule, nanostructuri sau materiale hibride funcționalizate cu unități zaharidice, acestea găsindu-și aplicații în nanotehnologie și medicină. Legătura glicozidică formată prin intermediul acestei metode între grupările hidroxil aflate pe suprafața nanoparticulelor, nanostructurilor sau materialelor hibride și unitățile zaharidice acetilate este o legătură covalentă puternică și stabilă. Stabilitatea acestei legături conferă stabilitate și nanoparticulelor, nanostructurilor sau materialelor hibride funcționalizate cu unități zaharidice în utilizarea lor pentru diferite aplicații.

Stabilitatea acestei legături glicozidice formate oferă posibilitatea folosirii nanoparticulelor, nanostructurilor sau materialelor hibride funcționalizate cu unități zaharidice în diferite medii de reacție, precum și în diferite medii biologice, unde vor fi aplicate fără ca acestea să sufere modificări structurale.

Un alt avantaj al acestor nanoparticule, nanostructuri sau materiale hibride funcționalizate derivă din proprietățile biologice active oferite de către unitățile zaharidice atașate covalent. Deci prin această metodă se vor prepara diferite tipuri de nanoparticule, nanostructuri sau materiale hibride funcționalizate cu unități zaharidice care sunt biocompatibile și care pot fi aplicate în separare magnetică celulară, recunoaștere biomoleculară, diagnosticarea celulelor canceroase etc.

Pentru demonstrarea aplicării acestei metode de legare covalente a unităților zaharidice pe suprafața nanoparticulelor, nanostructurilor sau materialelor hibride am realizat un exemplu demonstrativ, și anume funcționalizarea nanostructurilor de tip core-shell pe bază de magnetită și poli(hidroxietilmetacrilat) cu unități de galactoză pentaacetilată în prezență de trifluoroborat eterat. Nanostructurile magnetice funcționalizate preparate pentru demonstrarea funcționalității acestei metode au fost caracterizate din punct de vedere morfologic, structural și magnetic.

Explicarea pe scurt a schemei și figurilor:

- schema, metodă de legare covalentă a monozaharidelor acetilate de grupările hidroxil aflate în lanțul polimeric situat la suprafața nanoparticulelor magnetice;

- fig. 1, microscopia electronică de transmisie pentru nanoparticulele magnetice funcționalizate cu unități de galactoză **3** obținute prin metoda care este subiectul acestei invenții. Imaginea de microscopie a acestor nanostructuri magnetice funcționalizate obținută cu această metodă, arată nanoparticule individuale bine dispersate cu dimensiunea medie de 15...21 nm, fără formare de agregate;

- fig. 2, spectroscopia FTIR pentru nanostructurilor magnetice funcționalizate cu unități de galactoză obținute prin metoda care este subiectul acestei invenții. În fig. 2 sunt prezentate spre comparație spectrele FTIR ale nanostructurilor magnetice core-shell pe bază de magnetită și poli(hidroxietilmetacrilat) **1**, precum și a nanoparticulelor magnetice hibride funcționalizate cu  $\beta$ -(D)-galactoză-pentaacetate **3**. În ambele spectre FTIR apare banda de adsorbție specifică legăturii Fe-O la valoarea de  $578\text{ cm}^{-1}$ , prezentă în magnetită. La valoarea de  $1066\text{ cm}^{-1}$  este prezentă banda de adsorbție specifică legăturii P-O, legătură prezentă în molecula bis[2-(metacrililoiloxi)etil] fosfatului aflat pe suprafața nanoparticulelor magnetice, moleculă folosită pentru inițierea pe suprafață a polimerizării hidroxietilmetacrilatului. De asemenea, la valoarea de  $1716\text{ cm}^{-1}$  se află banda de adsorbție specifică grupării C = O prezentă atât în lanțul polimerului, dar și în bis[2-(metacrililoiloxi)etil] fosfatului, această bandă

se află în ambele spectre FTIR prezentate în fig. 2. În intervalul valorii de 2886...2990  $\text{cm}^{-1}$  sunt prezente benzile specifice grupărilor -CH, -CH<sub>2</sub>, -CH<sub>3</sub> și pot fi identificate în ambele spectre FTIR. Banda de adsorbție de la valoarea de 748  $\text{cm}^{-1}$  cu o intensitate mare și nu apare în spectrul FTIR al nanostructurilor magnetice de plecare **1** este specifică legăturii C-O-C prezentă în unitatea de galactoză.

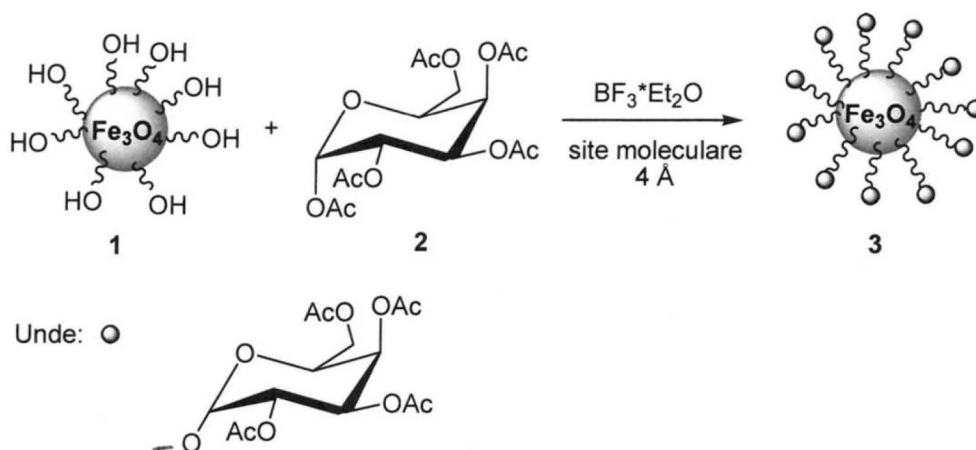
- fig. 3, comportarea magnetizării în funcție de câmpul magnetic aplicat la temperatura camerei pentru nanostructurile magnetice funcționalizate cu unități de galactoză **3**. Lipsa histerezisului indică faptul că nanostructurile magnetice funcționalizate, obținute prin metoda pe care o propunem spre brevetare, au comportament superparamagnetic, iar valoarea magnetizării de saturație  $M_s$  pentru nanostructurile magnetice **3** este 24 emu/g; aceste două caracteristici corespund cerințelor pentru aplicații în biomedicină ale nanoparticulelor magnetice funcționalizate cu unități zaharidice.

În scopul aplicării acestei metode de atașare covalentă a unităților zaharidice pe suprafața nanostructurilor magnetice funcționalizate cu grupări hidroxil, a fost necesară prepararea nanostructurilor magnetice având grupări hidroxil pe suprafață. Prepararea acestor nanostructuri magnetice presupune ca prim pas prepararea nanoparticulelor magnetice stabilizate cu bis[2-(metacrililoixi)etil] fosfat, acestea fiind folosite în continuare pentru inițierea pe suprafață a reacției de polimerizare a hidroxietilmetacrilatului. Reacția de polimerizare a hidroxietilmetacrilatului are loc prin reacția de polimerizare radicalică liberă în prezență de nanoparticule magnetice stabilizate cu bis[2-(metacrililoixi)etil] fosfat. Reacția de polimerizare radicalică liberă a hidroxietilmetacrilatului este inițiată de către amoniu persulfat (APS) și tetrametiletildiamină (TEMED) are loc la temperatura camerei timp de 48 h. După terminarea reacției de polimerizare, nanostructurile magnetice obținute se separă magnetic și sunt spălate succesiv cu apă, etanol și acetonă. După preparare, aceste nanostructuri magnetice sunt folosite în continuare pentru legarea covalentă a unităților zaharidice acetilate.

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

### Exemplu

Într-un balon se dispersează în 35 ml de diclorometan 0,232 g nanostructuri magnetice **1** pe bază de magnetită și polihidroxietilmetacrilat, 1,95 g  $\beta$ -(D)-galactose-pentaacetate **2** (5 mmol) și 100 mg de site moleculare cu dimensiunea de 4 Å, amestecul de reacție format se agită magnetic sub argon și se aduce la temperatura de 0°C. După ce este atinsă temperatura de 0°C se adaugă în picături o cantitate de 1,06 g (7,5 mmol) trifluorborat eterat  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , după terminarea adăugării amestecul de reacție este lăsat în continuare la temperatura camerei timp de 12 h. După terminarea reacției nanostructurile magnetice **3** rezultate sunt separate magnetic din masa de reacție și mai apoi spălate succesiv cu diclorometan, apă și acetonă.



Schema 1

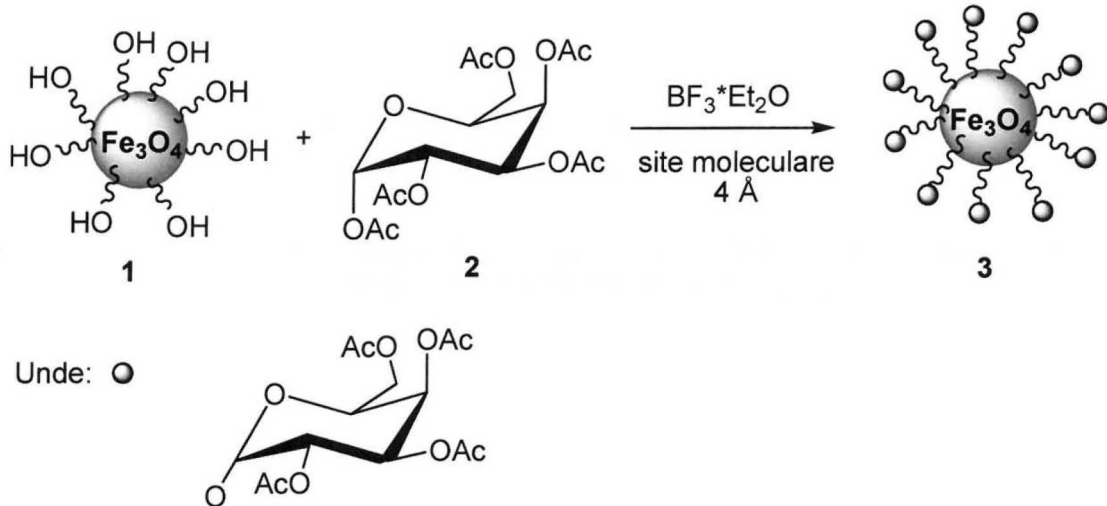
# RO 129983 B1

<b>Bibliografie</b>	<b>1</b>
1. Richard R. Schmidt, <i>Angewandte Chemie International Edition in English</i> , Vol. 25, 212-235 (1986).	3
2. Richard R. Schmidt, Willy Kinzy, <i>Advances in Carbohydrates Chemistry and Biochemistry</i> , Vol. 50, 21-123 (1994).	5
3. Richard R. Schmidt and Karl Heinz Jung, <i>Carbohydrates in Europe</i> , Vol. 27, 12-21 (1999).	7
4. Richard R. Schmidt, Julio C. Castro-Palomino, Oliver Retz, <i>Pure and Applied Chemistry</i> , Vol. 71(5), 729-744 (1999).	9
5. Nian-Huan Yao, Wen-Yi He, Kit S. Lam, Gang Liu, <i>Journal of Combinatorial Chemistry</i> , Vol. 6(2), 214-219 (2004).	11
6. Hilbert M. Branderhorst, Rob M. J. Liskamp, Gerben M. Visser and Roland J. Ieters, <i>Chemical Communication</i> , 5043-5045 (2007).	13
7. Matthew J. McKay, Benjamin D. Naab, Gregory J. Mercer, Hien M. Nguyen, <i>Journal of Organic Chemistry</i> , Vol. 74, 4705-4711 (2009).	15
8. Margherita Fais, Rositsa Karamanska, Sarah Allman, Shirley A. Fairhurst, Paolo Innocenti, Antony J. Fairbanks, Timothy J. Donohoe, Benjamin G. Davis, David A. Russell, Robert A. Field, <i>Chemical Science</i> , 2, 1952-1959 (2011).	17
9. Elly Smits, Jan B. F. N. Engberts, Richard M. Kellogg, Henk A. van Doren, <i>Journal of Chemical Society, Perkin Trans. 1</i> , 2873-2877 (1996).	19
10. Hari Babu Mereyala, Srinivas Reddy Gurrala, <i>Carbohydrate Research</i> , Vol. 307(3), 351-354 (1998).	21
11. David A. Fulton, Anthony R. Pease, J. Fraser Stoddart, <i>Israel Journal of Chemistry</i> , Vol. 40 (3-4), 325-333 (2001).	23
12. Lan Guan, Miklós Sahin-Toth, Tamas Kalai, Kalman Hideg, H. Ronald Kaback, <i>The Journal of Biological Chemistry</i> , Vol. 278(12), 10641-10648 (2003).	25
13. Francesco Babudri, Donato Colangiuli, Paolo A. Di Lorenzo, Gianluca M. Farinola, Omar Hassan Omar, Francesco Naso, <i>Chemical Communications</i> , 130-131 (2003).	27
14. Rauzah Hashim, Hind Hassan, Ahmad Sazali Hamzah, Volkmar Vill, Matthias Wulf, <i>Electronic-Liquid Crystal Communications</i> (2003).	29
15. Robert R. France, Richard G. Compton, Benjamin G. Davis, Antony J. Fairbanks, Neil V. Rees, Jay D. Wadhawan, <i>Organic and Biomolecular Chemistry</i> , Vol. 2, 2195-2202 (2004).	31
16. Ke Jiang, Dongmei Fan, Yamina Belabassi, Giridhar Akkaraju, Jean-Luc Montchamp, Jeffery L. Coffey, <i>ACS Applied Materials and Interfaces</i> , Vol. 1(2), 266-269 (2009).	33
17. Jiayi Cui, Anhua Liu, Yan Guan, Jia Zheng, Zhihao Shen, Xinhua Wan, <i>Langmuir</i> , Vol. 26(5), 3615-3622 (2010).	35
18. Ana M. Gomez, Ana Pedregosa, Serafin Valverde, J. Cristobal Lopez, <i>ARKIVOC</i> , Vol. (iii), 33-41 (2011).	37
	39
	41

# RO 129983 B1

## Revendicare

Procedeu de legare covalentă a monozaharidelor la grupările hidroxil aflate pe orice tip de suprafață, **caracterizat prin aceea că** are loc în diclorometan în prezența sitelor moleculare cu dimensiunea de 4 Å, utilizându-se ca și catalizator trifluorboratul eterat ( $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ), adăugarea catalizatorului se face la temperatura de 0°C, iar după terminarea adăugării catalizatorului amestecul de reacție este lăsat sub agitare magnetică la temperatura camerei timp de 12 h.

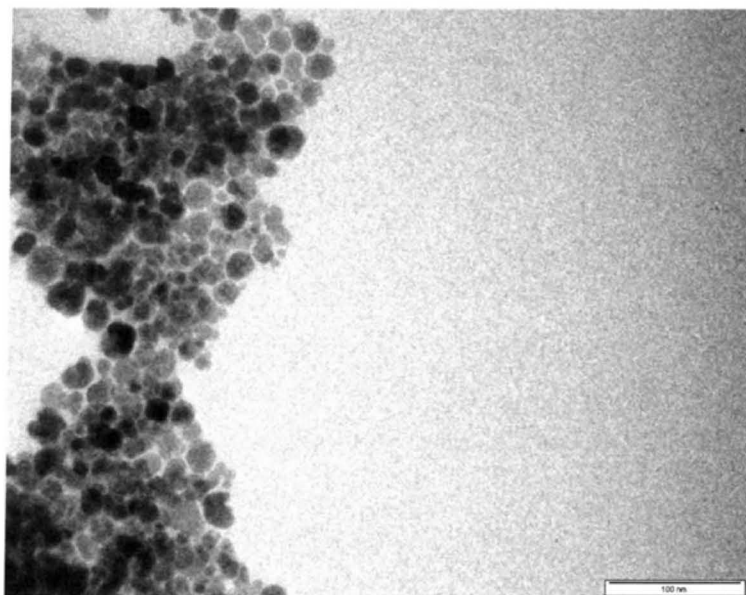


Schema 1

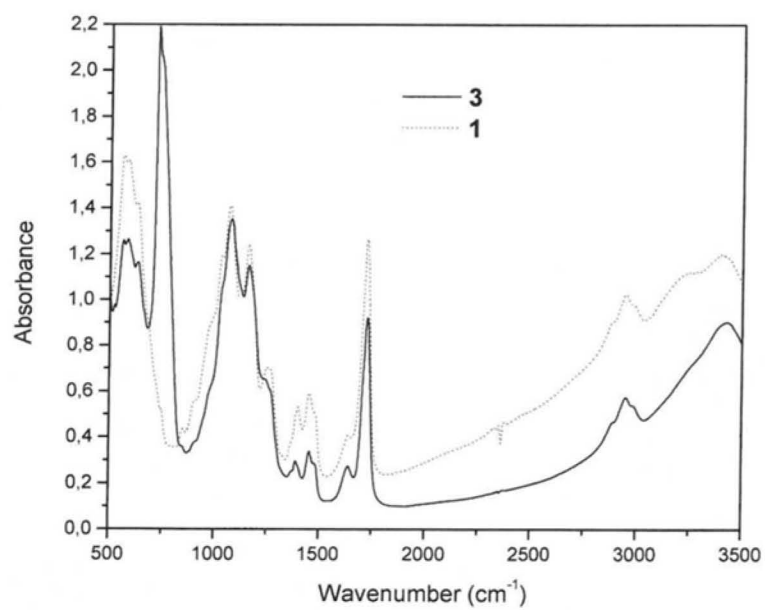
(51) Int.Cl.

**A61K 31/7004** (2006.01),

**B82B 3/00** (2006.01)



**Fig. 1**



**Fig. 2**

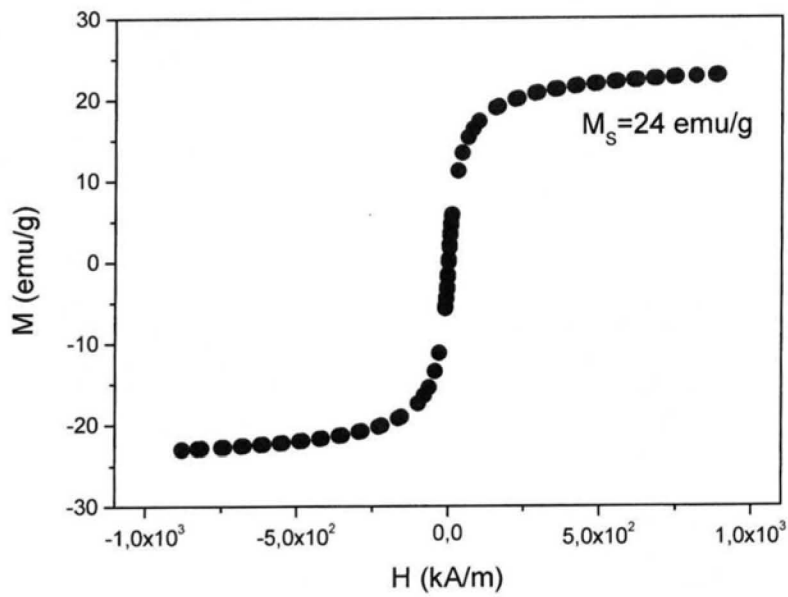


Fig. 3

