



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

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

(22) Data de depozit: **27.05.2013**

(41) Data publicării cererii:
30.01.2015 BOPI nr. **1/2015**

(71) Solicitant:
• 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

(54) **METODĂ DE ATAŞARE COVALENȚĂ A
MONOZAHARIDELOR PE SUPRAFEȚE CU GRUPĂRI
HIDROXIL**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de obținere a unor nanostructuri magnetice hibride, funcționalizate cu unități zaharice utilizate în biomedicină. Metoda conform inventiei constă din atașarea covalentă a mono-zaharidelor acetilate de grupări hidroxil aflate în lanțul

polimeric situat la suprafața particulelor magnetice.

Revendicări: 2

Figuri: 3

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 conjuinate în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



DESCRIEREA INVENȚIEI

METODĂ DE ATAŞARE COVALENȚĂ A MONOZAHARIDELOR PE SUPRAFAȚE CU GRUPĂRI HIDROXIL

Prezenta inventie se referă la o metodă inovativă de atașare covalentă a monozaharidelor la 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 contin grupări hidroxil.

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 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 importanță aplicativă.

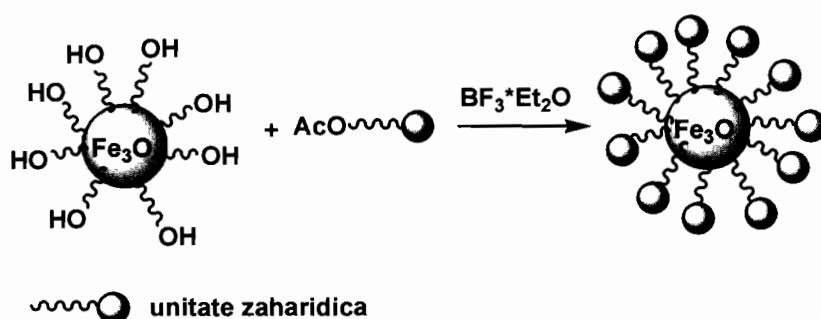
Metoda descrisă în cadrul acestei invenții este folosită pentru sinteza diferenților derivați glicozilați (O-glicozilați, C-glicozilați, N-glicozilați sau S-glicozilați). Sinteza acestor derivați glicozilați folosind ca și catalizator trifluoroborat eteratul în diferite condiții de reacție este prezentată 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 grupări nucleofile. Trifluoroboratul, ca și acid Lewis, este folosit în chimia carbohidraților și pentru deacetilarea selectivă a poziției anomerică a compușilor zaharidici, dar această reacție decurge în condiții de reacție diferite de cele folosite pentru obținerea derivațiilor glicozilați.

O primă descriere a acestei metode în literatură este facută de către R.R. Schmidt [1] în anul 1986 fiind primul exemplu de metodă în care se folosește trifluoroborat eteratul pentru sinteza diferenților derivați glicozilați. În acest exemplu se folosește aşa numita metodă a tricoloroacetamidei, în cazul acestei metode se formează un compus de tranziție activat 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 toate cazurile

se formează în primul rând un derivat acetamidic iar în prezentă de trifluoroborat eterat și un derivat hidroxilic rezultând diferenți derivați glicozilați [2-8].

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 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 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 glicozidici [10-18].

Tema principală a inventiei 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

Obiectivul acestei inventii 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 grupări 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 fară ca acestea să suferă modificări structurale.

Un alt avantaj al acestor nanoparticule, nanostructuri sau materiale hibride funcționalizate derivă din proprietățile biologic 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 covalentă 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(hidroxietilmecrilat) 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 schemelor și figurilor:

Schema 1: Metodă de legare covalentă a monozaharidelor acetilate de grupările hidroxil aflate în lanțul polimeric situat la suprafața nanoparticulele magnetice.

Figura 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 disperse cu dimensiunea medie de 15-21 nm, fără formare de agregate.

Figura 2: Spectroscopia FTIR pentru nanostructurile magnetice funcționalizate cu unități de galactoză obținute prin metoda care este subiectul acestei invenții. În figura 2 sunt prezentate spre comparație spectrele FTIR ale nanostructurile magnetice core-shell pe baza de magnetita și poli(hidroxietilmacrilat) **1** precum și a nanoparticulelor magnetice hibride functionalizate cu β -(D)-galactoză-pentaacetate **3**. În ambele spectre FTIR apare banda de adsorbție specifică legăturii Fe-O la valoarea de 578 cm^{-1} prezentă în magnetită. La valoarea de 1066 cm^{-1} este prezentă banda de adsorbție specifică legăturii P-O, legătură prezentă în molecula bis[2-(metacriloiroi)etil] fosfatului aflat pe suprafața nanoparticulelor magnetice, moleculă folosită pentru inițierea pe suprafață a polimerizării hidroxietilmacrilatului. De asemenea la valoarea de 1716 cm^{-1} se află banda de adsorbție specifică grupării C=O prezentă atât în lanțul polimerului dar și în bis[2-(metacriloiroi)etil] fosfatului, aceasta banda se află în ambele spectre FTIR prezentate în figura 2. În intervalul valorii de $2886\text{ cm}^{-1} - 2990\text{ cm}^{-1}$ sunt prezente benzile specifice grupărilor -CH, -CH₂, -CH₃ și pot fi identificate în ambele spectre FTIR. Banda de adsorbție de la valoarea de 748 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.

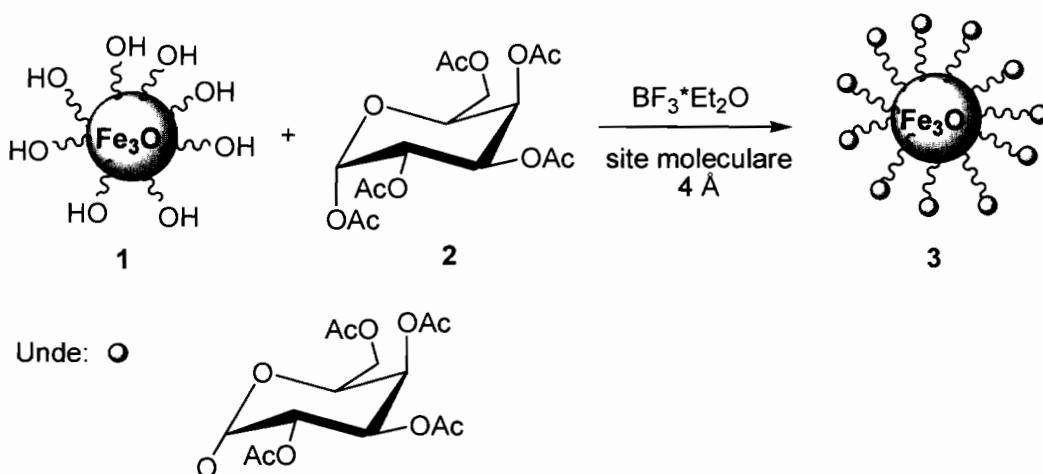
Figura 3: Comportarea magnetizării în funcție de câmpul magnetic aplicat la temperatura camerei pentru nanostructurile magnetice funcționalizate cu unități de galactoză **3**. Lipsa histerezisului indică faptul că nanostructurile magnetice functionalizate, obținute prin metoda pe care o propunem spre brevetare, au comportament superparamagnetic, iar valoarea magnetizării de saturatie 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-(metacriloiroi)etil] fosfat, acestea fiind folosite în continuare pentru inițierea pe suprafață a reacției de polimerizare a hidroxietilmacrilatului. Reacția de polimerizare a hidroxietilmacrilatului are loc

prin reacția de polimerizare radicalică liberă în prezență de nanoparticule magnetice stabilizate cu bis[2-(metacriiloiloxi)etil] fosfat. Reacția de polimerizare radicalică liberă a hidroxiletimetacrilatului este inițiată de către ammoniumpersulfat (APS) și tetrametiletilendiamină (TEMED) are loc la temperatura camerei timp de 48 de ore. 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:

Exemplul: Într-un balon se dispersează în 35 ml de diclorometan 0,232 g nanostructuri magnetice **1** pe baza de magnetita și polihidroxiletimetacrilat, 1,95 g β -(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. Dupa ce este atinsă temperatura de 0 °C se adaugă în picaturi o cantitate de 1,06 g (7,5 mmol) trifluoroborat eterat $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, după terminarea adăugării amestecul de reacție este lasat în continuare la temperatura camerei timp de 12 ore. 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

Referinte bibliografice:

1. Richard R. Schmidt, Angewandte Chemie International Edition in English, Vol. 25, 212-235 (1986).
2. Richard R. Schmidt, Willy Kinzy, Advances in Carbohydrates Chemistry and Biochemistry, Vol. 50, 21-123 (1994).
3. Richard R. Schmidt and Karl Heinz Jung, Carbohydrates in Europe, Vol. 27, 12-21 (1999).
4. Richard R. Schmidt, Julio C. Castro-Palomino, Oliver Retz, Pure and Applied Chemistry, Vol. 71(5), 729-744 (1999).
5. Nian-Huan Yao, Wen-Yi He, Kit S. Lam, Gang Liu, Journal of Combinatorial Chemistry, Vol. 6(2), 214-219 (2004).
6. Hilbert M. Branderhorst, Rob M. J. Liskamp, Gerben M. Visser and Roland J. Pieters, Chemical Communication, 5043–5045 (2007).
7. Matthew J. McKay, Benjamin D. Naab, Gregory J. Mercer, Hien M. Nguyen, Journal of Organic Chemistry, Vol. 74, 4705–4711 (2009).
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, Chemical Science, 2, 1952–1959 (2011).
9. Elly Smits, Jan B. F. N. Engberts, Richard M. Kellogg, Henk A. van Doren, Journal of Chemical Society, Perkin Trans. 1, 2873-2877 (1996).
10. Hari Babu Mereyala, Srinivas Reddy Gurrala, Carbohydrate Research, Vol. 307(3), 351-354 (1998).
11. David A. Fulton, Anthony R. Pease, J. Fraser Stoddart, Israel Journal of Chemistry, Vol. 40(3-4), 325-333 (2001).
12. Lan Guan, Miklós Sahin-Tóth, Tamás Kálai, Kálmán Hideg, H. Ronald Kaback, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 278(12), 10641–10648 (2003).
13. Francesco Babudri, Donato Colangiuli, Paolo A. Di Lorenzo, Gianluca M. Farinola, Omar Hassan Omar, Francesco Naso, Chemical Communications, 130-131 (2003).
14. Rauzah Hashim, Hind Hassan, Ahmad Sazali Hamzah, Volkmar Vill, Matthias Wulf, Electronic-Liquid Crystal Communications (2003).

15. Robert R. France, Richard G. Compton, Benjamin G. Davis, Antony J. Fairbanks, Neil V. Rees, Jay D. Wadhawan, *Organic and Biomolecular Chemistry*, Vol. 2, 2195-2202 (**2004**).
16. Ke Jiang, Dongmei Fan, Yamina Belabassi, Giridhar Akkaraju, Jean-Luc Montchamp, Jeffery L. Coffer, *ACS Applied Materials and Interfaces*, Vol. 1(2), 266-269 (2009).
17. Jiaxi Cui, Anhua Liu, Yan Guan, Jia Zheng, Zhihao Shen, Xinhua Wan, *Langmuir*, Vol. 26(5), 3615–3622 (**2010**).
18. Ana M. Gómez, Ana Pedregosa, Serafín Valverde, J. Cristóbal López, *ARKIVOC*, Vol. (iii), 33-41 (**2011**).

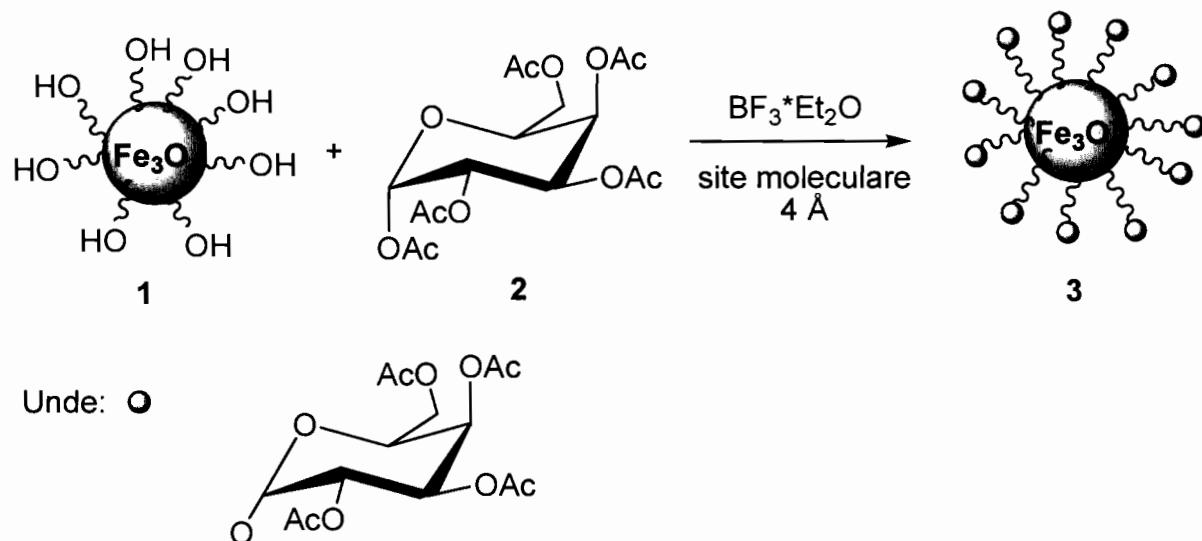
REVENDICĂRI:

**METODĂ DE ATAŞARE COVALENȚĂ A MONOZAHARIDELOR PE
SUPRAFAȚE CU GRUPĂRI HIDROXIL**

1. Metodă de legare covalentă a monozaharidelor la grupările hidroxil aflate pe suprafața nanoparticulelor, nanostructurilor sau materialelor hibride.

DESENE

**METODĂ DE ATAŞARE COVALENȚĂ A MONOZAHARIDELOR PE
SUPRAFAȚE CU GRUPĂRI HIDROXIL**



Schema 1

Q-2013-00437

27-05-2013

27

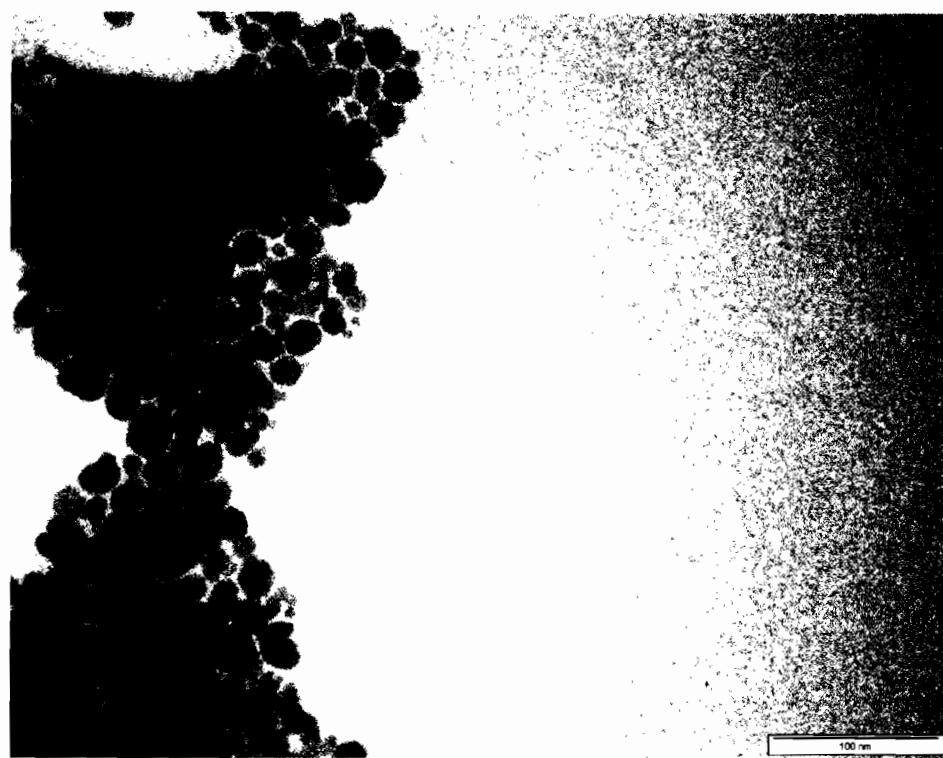


Figura 1

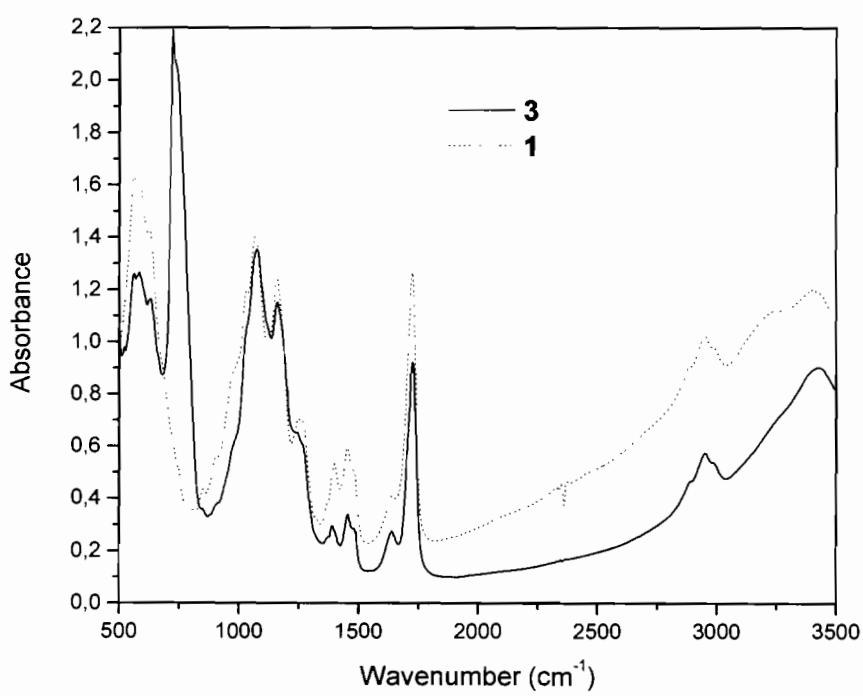


Figura 2

0 - 2 0 1 3 - 0 0 4 0 7
2 7 -05- 2013

26

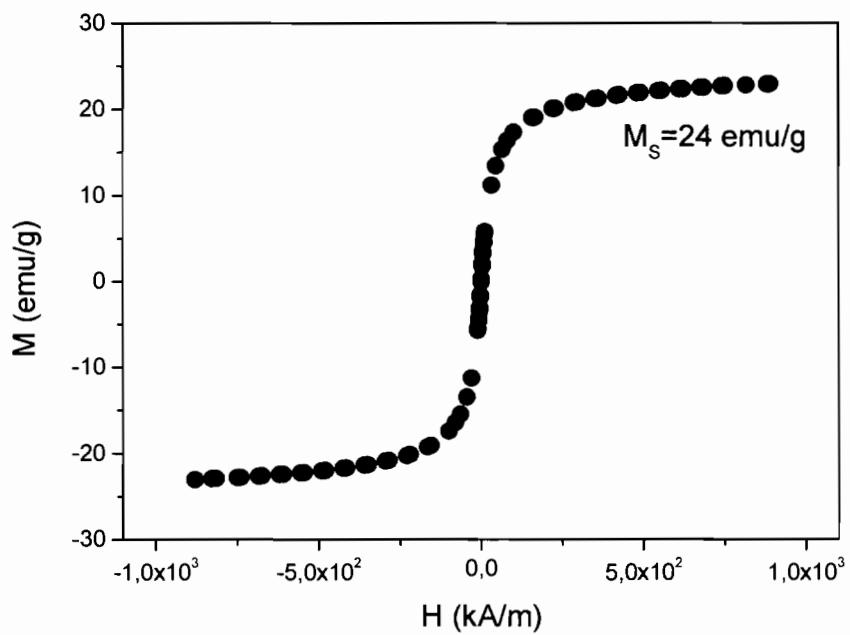


Figura 3