



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2013 00833**

(22) Data de depozit: **13.11.2013**

(41) Data publicării cererii:
29.05.2015 BOPI nr. **5/2015**

(71) Solicitant:
• **ACADEMIA ROMÂNĂ - INSTITUTUL DE
CHIMIE MACROMOLECULARĂ "PETRU
PONI" DIN IAȘI,**
*ALEEA GRIGORE GHICA VODĂ NR.41 A,
IAȘI, IS, RO*

(72) Inventatori:
• **CHIRIAC AURICA,**
*STR.ALEXANDRU VLAHUȚĂ NR.7B, AP.16,
IAȘI, IS, RO;*

• **NIȚĂ LOREDANA ELENA, BD.COPOU
NR.42, BL.A 3, SC.B, PARTER, AP.3, IAȘI,
IS, RO;**
• **NEAMȚU IORDANA,**
*STR.THEODOR PALLADY NR.8, SC.B,
ET.3, AP.9, IAȘI, IS, RO;*
• **TUDORACHI NIȚĂ, STR. DECEBAL
NR. 14, SC. A, AP. 19, IAȘI, IS, RO;**
• **DIACONU ALINA, STR. VIILOR NR. 17,
TÂRGU BUJOR, GL, RO;**
• **BĂLAN VERA, STR. HLINCEA NR. 23,
BL. 1054, SC. C, ET. 3, AP. 16, IAȘI, IS, RO;**
• **MUNTEANU CONSTANȚA,**
*STR SPRĂPUNGAREA SILVESTRU NR.56
BL.T3A SC.B ET.2 AP.9, IAȘI, IS, RO*

(54) **PROCEDEU DE SINTEZĂ A UNUI COMPOZIT MAGNETIC**

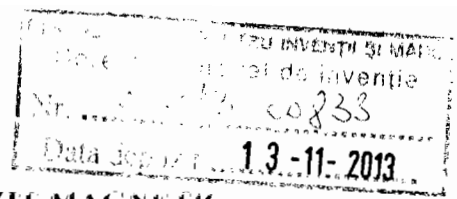
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de sinteză a unui compozit magnetic sub formă de microparticule de copolimer, cu caracteristici combinate de hidrofilie și hidrofobie, cu sensibilitate la temperatură și/sau pH, cu magnetită încapsulată în matricea polimerică, aplicabil ca instrument terapeutic magnetic în transportul la țintă și eliberarea controlată a medicamentelor. Procedeu conform invenției constă într-o reacție de copolimerizare, prin introducerea într-un vas de reacție a următoarelor componente exprimate în procente în greutate: 70...50% N-izopropilacrilamidă corespunzător a 30,9...22,1 mmol, 20...40% metacrilat de (2-dimetilamino) etil corespunzător a 6,6...12,9 mmol, și 10% acid itaconic cu 3,85 mmol solviți în 8 ml apă

distilată, și a magnetitei tratate la suprafață cu alcoxilan (3-amino propil-trietoxi-silan), sub formă de dispersie apoasă de concentrație 0,5%, în proporție de 1% față de cantitatea de polimer, corespunzător a 10 g dispersie magnetică, sub agitare de 250 rot/min și încălzire la 75°C, iar în faza a doua se adaugă un inițiator radicalic peroxidisulfat de amoniu în cantitate de 0,3% față de cantitatea de monomeri, corespunzător $6,57 \times 10^{-2}$ mmoli, solvit în 2 ml apă distilată, pentru un conținut teoretic în substanță solidă de maximum 20%, continuând reacția timp de 6 h, cu răcire, separare pe magnet, spălare cu apă distilată în exces și uscare.

Revendicări: 1





4

PROCEDEU DE SINTEZĂ A UNUI COMPOZIT MAGNETIC

Invenția se referă la un procedeu de sinteză a unui compozit magnetic sub formă de microparticule de copolimer cu caracteristici combinate de hidrofilie și hidrofobie și sensibilitate la temperatură și/sau pH, cu magnetită încapsulată în matricea polimerică în sinteză, aplicabil ca instrument terapeutic magnetic în transportul la țintă și eliberarea controlată a medicamentelor.

Documentația în domeniu prezintă sinteza de microparticule polimerice cu caracteristici magnetice cu aplicații atât tehnice (separare, transportul fluidelor, tonere) cât și biomedicale analitice sau clinice, cum sunt : transportul la o țintă specifică al medicamentelor, purificarea acizilor nucleici și a proteinelor, separarea celulară, extracția ADN-ului, imobilizarea enzimatică, sau ca sondă magnetică cu capacitatea de creștere a semnalului sau a contrastului în imagistica de rezonanță magnetică.

Astfel de particule pot fi funcționalizate în scopul de a interacționa cu entitatea biologică de interes. Datorită caracteristicilor magnetice, pot fi manipulate de către un câmp magnetic exterior așa cum se practică în transportul țintit al principiilor bioactive (medicamente), separarea magnetică celulară, hipotermie, etc. Aplicațiile biomedicale necesită biocompatibilitate, biodegradabilitate, absența reacțiilor imunitare și a toxicității. De asemenea, sunt necesare hidrofilia suprafeței și dimensiuni relativ reduse în așa fel încât să poată evada din țesutul reticuloendotelial.

Din punct de vedere tehnologic, s-au dezvoltat metode multifazice de preparare a particulelor polimerice cu caracteristici magnetice prin tehnica de polimerizare în fază eterogenă (emulsie, suspensie, dispersie, micro- și miniemulsie) sau depunere strat cu strat. Materialul compozit rezultat prezintă una dintre structuri: (1) material magnetic ca miez încapsulat în coaja polimerică, (2) material magnetic dispersat în matricea polimerică după polimerizare și (3) material magnetic coajă adsorbit în porii polimerului pre-format ca miez.

Proiectarea de matrici polimerice cu segmente hidrofile și hidrofobe, cu diferite funcționalități prezente de-a lungul lanțului macromolecular constituie o premiză pentru cerințele impuse de eliberarea controlată cu efect retard a principiilor active înglobate (prevenirea agregării, conservarea activității substanței înglobate, cinetica de eliberare) și pentru modelarea porozității și a dimensiunii porilor.

Totodată, polimerii responsivi la stimuli de asemenea numiți polimeri „inteligenti” sau „sensibili la mediu” suferă schimbări rapide de microstructură de la starea hidrofilă la cea hidrofobă, la mici perturbări de mediu. Modificarea unora dintre stimulii externi cum ar fi

[Handwritten notes and signatures on the right margin]

temperatura, pH-ul, produc schimbări macroscopice reversibile în structura polimerului, acesta fiind capabil să revină la starea inițială prin îndepărtarea elementului declanșator. Elementul cheie care asigură caracterul termo- sau pH senzitiv este prezența grupelor funcționale slab acide sau bazice ionizabile atașate pe catena hidrofobă.

O caracteristică esențială este temperatura critică LCST la care soluția de polimer are separare într-o fază (stare izotropică) sau în două faze (stare anizotropică), bogate sau sărace în polimer. La temperaturi plasate sub temperatura critică prin legăturile de hidrogen dintre polimer și moleculele de apă se realizează dizolvarea polimerului, în timp ce la valori peste temperatura critică polimerul poate precipita. Valoarea temperaturii critice poate fi modulată prin încorporarea de grupe funcționale hidrofobe sau hidrofile. Prin asigurarea unei balanțe a proprietăților hidrofil – hidrofobe, mici schimbări de temperatură în jurul temperaturii critice fac ca lanțurile macromoleculare fie să colapseze sau să se extindă, ca răspuns la noile aranjamente ale interacțiunilor hidrofobe și hidrofile dintre lanțurile polimerice și mediul apos. Astfel în domenii mici de temperatură sau pH, polimerii sensibili prezintă reorganizări abrupte, ce se pot traduce prin tranziții ale lanțului macromolecular între stările extinse și compactate de lanț. Proprietățile unice ale polimerilor sensibili la stimuli le oferă acestora multe aplicații în domeniul proceselor chimice și biologice ca suporturi pentru transportul țintit și eliberarea controlată a principiilor bioactive, bio-conjugare, inginerie tisulară, biosenzori, bio-separare, etc.

Poli(N-izopropilacrilamida) PNIPAM este cunoscută ca material termosensitiv, cu multe aplicații în domeniul tehnic cât și biomedical ca suport pentru biomolecule: proteine, enzime, anticorpi, în transportul țintit al principiilor bioactive în asociere cu particule magnetice, medii de cultură tisulară, produse cosmetice, agenți de reținere a apei, adezivi. Polimerul a fost selectat datorită prezenței grupelor amidice puternic polare, pentru a promova activitate programabilă termic. În apă acest polimer prezintă temperatura minimă critică a soluției LCST de aproximativ 32° C. La această temperatură sau mai jos, polimerul se dizolvă în apă. Peste temperatura critică suprafața polimerului devine mai hidrofobă și polimerul colapsează. Metacrilatul de (2-dimetilamino)etil (DMAEMA) este un monomer acrilic cu două grupe funcționale metacrilică și aminică. Acest monomer reacționează cu ușurință prin mecanism de adiție cu o mare varietate de compuși organici și anorganici și este folosit în sinteza de polimeri și copolimeri, conferindu-le adeziune față de suporturi metalice și materiale plastice, proprietăți filmogene și afinitate excelentă față de piele și păr. Grupa aminică din DMAEMA conferă solubilitate în apă prin cuaternizare la săruri de amoniu pentru preparare de polimeri cationici. Polimerul obținut din acest monomer poli[(metacrilatul de (2-dimetilamino)etil]

[Handwritten notes and signatures on the right margin]

azot ai polimerului solubil în apă și inițierea copolimerizării cu monomerul vinilic ce conține nanoparticulele magnetice, acestea urmând a fi încapsulate în matricea polimerică.

Brevetul US Pat 6.866.838 (2005) descrie nanosfere compozite cu dimensiuni de 50 – 1000 nm, tip coajă-miez, în care miezul constă dintr-o fază organică în care sunt distribuite nanoparticule anorganice, iar coaja este cel puțin un polimer hidrofil derivat din polimerizarea unui monomer solubil în apă, în particular o N-alkil acrilamida (cum ar fi N-izopropilacrilamida) sau o N-N-dialkilacrilamidă. Comonomerii ce intră în structura copolimerului sunt selectați din grupa alchil acriilaților sau a alchil metacriilaților și un monomer hidrofob selectat din grupa celor vinilaromatici. Reacția se desfășoară în prezența unui inițiator radicalic selectat din grupa sărurilor de peroxidisulfati. Nanosferele compozite coonform invenției au aplicații în domeniul tehnic (cerneluri, vopsele, plastice) iar când sunt funcționalizate în domeniul biomedical (separarea moleculelor biochimice sau biologice, teste de diagnosticare, compozitii terapeutice, profilactice sau cosmetice).

Aplicarea N-izopropilacrilamidei și a acidului itaconic în sinteza de materiale polimerice sub formă de geluri cu rezistență mecanică ridicată este descrisă în brevetul US Pat 6.960.617 (2005). Conform procedurii descris, amestecul de monomeri în prezența unui agent de întărire este supus condițiilor de reticulare pentru a genera hidrogelul.

În brevetul US Pat 5.814.687 (1998) se prezintă sinteza de particule polimerice magnetice pe bază de blocuri hidrofile și hidrofobe, de tip amidic cum ar fi: N-metilolacrilamida, acrilamida, metacrilamida, sau metilenbisacrilamida, și (met)acriilați cum ar fi metacrilatul de N,N'-diaminoetil.

US Pat 6.048.522 (2000) prezintă o compoziție pentru aplicații în transportul de medicament cu eliberare controlată, sub formă de emulsie, ce cuprinde: 5 – 70% monomer vinilic în soluție a unui ulei (siliconic, mineral sau ester organic insolubil în apă), cu un inițiator radicalic și un agent tensioactiv, în mediu apos pentru a se realiza emulsia. Monomerul vinilic este vinil amida sau vinil lactama, optional cu un comonomer cum ar fi metacrilatul de N,N' – diaminoetil.

Brevetul US Pat 7.160.971 (2007) descrie copolimeri metacrilici multifuncționali care manifestă o comportare cationică pH-senzitivă, cât și solubilitate în apă în mediu acid. Copolimerii sunt alcătuiți din metacriilați de dietilaminoetil sau dimetilaminoetil și sunt propuși pentru aplicații biomedicale la transportul țintit al medicamentelor. De asemenea pot fi asociați cu material genetic pentru a genera un vector de transformare genetică, cu proteine în vederea separării lor sau cu medicamente pentru eliberare controlată. Avantajul este faptul

Handwritten notes in the right margin, including a checkmark and several lines of illegible cursive text.

că sunt pH-senzitivi iar eliberarea principiului bioactiv este asociată cu pH-ul mediului înconjurător. Alt avantaj subliniat în brevet este lipsa de citotoxicitate.

Problema pe care o rezolvă invenția este realizarea unei reacții de sinteză a unui compozit magnetic sub formă de microparticule în dispersie apoasă, cu caracteristici combinate de hidrofilie și hidrofobie și sensibilitate la temperatură și/sau pH, prin copolimerizarea unui sistem de comonomeri : N-izopropilacrilamida (NIPAM), metacrilatul de (2-dimetilamino)etil (DMAEMA) și acidul itaconic (AI), care extinde gama de compozite magnetice cu matrici polimerice pentru biomateriale.

Procedeul de sinteză a compozitului magnetic conform invenției, înlătură dezavantajele menționate prin aceea că se copolimerizează la 75 °C, sub agitare de 250 rotații/minut timp de 6 ore, cu inițiator radicalic peroxidisulfat de amoniu 0,3 % față de monomeri și magnetita stabilizată și tratată la suprafață cu un alcoxisilan (3-amino propil-trietoxi-silan) sub formă de dispersie apoasă 0,5%, în proporție de 1% față de monomeri, un amestec de monomeri : N-izopropilacrilamida 30,9 – 22,1 mmoli, metacrilat de (2-dimetilamino)etil 6,6 – 12,9 mmoli, acid itaconic 3,85 mmoli, în dispersie apoasă pentru un conținut teoretic în substanță solidă de maxim 20%.

Handwritten notes:
Lubr
in
reducer
de
pH
util.

Procedeul conform invenției prezintă următoarele avantaje :

- Este un procedeu ecologic, fără emanații toxice, simplu de aplicat pe instalații existente, cu un număr redus de faze tehnologice.
- Prezența segmentelor hidrofile și hidrofobe în structura copolimerului, respectiv selectarea monomerilor cu anumite funcționalități permite modelarea caracteristicilor de sensibilitate la factorii de mediu (temperatura, pH), a cineticii de eliberare a principiilor bioactive ce urmează să fie înglobate, cât și prevenirea agregării.
- Conținutul de oxid metalic poate fi modificat conform aplicației.
- Stabilitate la stocare cât și operațională în decursul unei potențiale utilizări.

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției.

EXEMPLU

Intr-o instalație de laborator în sine cunoscută, compusă dintr-un vas de reacție de 100 ml cu fund rotund și trei găuri, echipat cu agitator, condensator de reflux și termometru, plasat în baia de apă pentru încălzire, în prima fază se alimentează monomerii: N-izopropilacrilamida

(NIPAM), metacrilatul de (2-dimetilamino)etil (DMAEMA) și acidul itaconic (AI), solviți în 8 ml apă distilată, sub agitare de 250 rotații/minut. Se adaugă magnetita stabilizată și tratată la suprafață cu un alcoxisilan (3-amino propil-trietoxi-silan), sub formă de dispersie apoasă. Cantitățile componentelor conform rețurii în % gravimetrice, grame și mmol sunt prezentate în Tabelul 1.

Tabelul 1. Rețura în sinteza compozitului magnetic

Componenta	Cantitate		
	%	grame	mmol
NIPAM	70 – 50	3,50 – 2,50	30,9 – 22,1
DMAEMA	20 - 40	1,00 – 1,96	6,6 – 12,9
AI	10	0,50	3,85
Peroxidisulfat de amoniu ¹⁾	0,3	0,015	$6,57 \times 10^{-2}$
Apa ²⁾	20	20	110
Magnetita silanizată în dispersie apoasă ³⁾	1 ⁴⁾	10	-

- 1) – calculat față de cantitatea de monomeri
- 2) – calculat pentru un conținut teoretic de substanță solidă de 20%
- 3) – concentrație magnetită în dispersie apoasă este de 0,5 %
- 4) - calculat față de cantitatea de monomeri

Handwritten notes:
 1) 10
 2) 20
 3) 0,5
 4) 10

Se încălzește sistemul la 75 ° C menținând sub agitare. Când temperatura de reacție atinge valoarea de 75 ° C, în faza a doua se adaugă cantitatea de inițiator radicalic peroxidisulfat de amoniu dizolvat în 2 ml apă distilată.

Se continuă reacția pentru durată totală de 6 ore, sub agitare de 250 rotații/minut, la 75 ° C; în final se răcește amestecul de reacție menținând agitare. Rezultă un material compozit care se separă din mediul de reacție pe un magnet și se spală repetat cu apă distilată în exces pentru îndepărtarea reactanților nereacționați. Spălarea se realizează până când analiza prin spectroscopie UV a apelor reziduale nu indică prezența monomerilor. Urmează uscarea la vid la temperatura de 60 ° C și 500mmHg, timp de 24 ore. Compozitul magnetic se păstrează în excicator, în vederea analizelor și a prelucrării ulterioare (încapsulare de substanțe bioactive).

Copolimerul poli(NIPAM- DMAEMA- AI) cu magnetită încapsulată sintetizat ca instrument terapeutic, purtător magnetic de substanțe bioactive pentru transportul la țintă și eliberarea controlată a medicamentelor, a fost caracterizat din punct de vedere al distribuției

dimensiunilor prin difuzia luminii laser, potențialului zeta în dispersie apoasă, a magnetizării și a stabilității termice. În Tabelul 2 sunt prezentate unele proprietăți ale probelor de compozit magnetic cu 50 – 70 % grav. NIPAM, iar în Tabelul 3 sunt înregistrate principalele caracteristici deduse din analiza termogravimetrică realizată pe variantele ce conțin cantitatea minimă și cea maximă de NIPAM în amestecul de comonomeri (50% grav NIPAM și 70% NIPAM).

Tabelul 2. Unele proprietăți ale probelor de compozit magnetic cu 50 – 70 % grav. NIPAM

Diametru hidrodinamic mediu, nm		5240 - 5300
Indice de polidispersitate PDI ^{a)}		0,575 – 0,673
Potențial zeta, mV ^{b)}		26 - 27
Magnetizare ^{c)}	Susceptibilitate magnetică σ , uem/g	9,92 – 10,1
	Intensitatea câmpului magnetic H, Oe	15413

a) – Reflectă caracterul monodispers ca dimensiune al probei

b) - Determinat la pH 5,5 și 25 °C

c) - Determinată pe un magnetometru cu vibrație, proba fiind înglobată în ceară pentru a se evita vibrațiile

Tabelul 3. Analiza termogravimetrică a probelor de compozit magnetic cu 50 și 70 % grav. NIPAM

Proba	Viteza de incalzire [°C/min ⁻¹]	Etape de degradare	Ti °C	Tm °C	Tf °C	ΔW %	T ₁₀ °C	T ₅₀ °C
Copolimer cu 50 % NIPAM	10	I	42	68,0	90	5,45	136	253
		II	139	168,3	191	35,30		
		III	224	250,4	290	19,35		
		IV	355	378,3	414	31,40		
		reziduu				8,50		
Copolimer cu 70% NIPAM	10	I	39	78,4	97	5,70	139	341
		II	139	173,4	201	39,90		
		III	337	385,9	410	37,16		
		IV	599	640,2	663	5,10		
		reziduu				12,14		

x) - Analiza TGA s-a realizat în intervalul de temperatură 30 - 600 °C, în azot, cu o viteză de încălzire de 10 grade /minut. Ti, Tm, Tf - temperatura inițială, temperatura vitezei maxime de pierdere în greutate și temperatura finală a proceselor principale de descompunere termică; ΔW – pierderi în greutate pe intervalul Ti – Tf; T₁₀ și T₅₀ – temperatura corespunzătoare pierderilor în greutate de 10%, respective 50%.

Handwritten notes:
 a) - Reflectă caracterul monodispers ca dimensiune al probei
 b) - Determinat la pH 5,5 și 25 °C
 c) - Determinată pe un magnetometru cu vibrație, proba fiind înglobată în ceară pentru a se evita vibrațiile

Analizând rezultatele procesului de degradare termică, se observă că acesta prezintă 4 trepte de descompunere pentru ambele variante de compozit magnetic: procesul de descompunere termică debutează în prima treaptă cu pierderi în greutate reduse, în timp ce etapele următoare decurg cu pierderi în greutate mari, cu valori comparabile pentru ambele variante, în final cantitatea de reziduu fiind de 8,50% pentru copolimerul cu 50% grav. NIPAM, respectiv 12,14% pentru varianta cu 70% grav. NIPAM.

[Handwritten signature]

REVENDICARE

Procedeu de sinteză a unui compozit magnetic sub forma de microparticule ale unui copolimer pe bază de N-izopropilacrilamidă, metacrilat de dimetilaminoetil si acid itaconic cu magnetită încapsulată în matricea polimerică în sinteză, *caracterizat prin aceea că* se realizează reacția de copolimerizare prin alimentare în vasul de reacție în prima fază, a N-izopropilacrilamidei (70-50 % gravimetric, corespunzător 30,9 - 22,1 mmol), metacrilatului de (2-dimetilamino)etil (20 - 40% gravimetric, corespunzător 6,6 - 12,9 mmol) si a acidului itaconic (10% gravimetric, corespunzator 3,85 mmol) solviți în 8 ml apă distilată și a magnetitei tratată la suprafață cu un alcoxisilan (3-amino propil-trietoxi-silan), sub formă de dispersie apoasă de concentrație 0,5% în proporție de 1% față de cantitatea de polimer (corespunzător 10 g dispersie magnetită), sub agitare de 250 rotații/min și încălzire la 75 ° C, iar în faza a doua se adaugă un inițiator radicalic peroxidisulfat de amoniu în cantitate de 0,3 % față de cantitatea de monomeri (corespunzător $6,57 \times 10^{-2}$ mmoli) solvit în 2 ml apă distilată, pentru un conținut teoretic în substanță solidă de maxim 20%, continuând reacția timp de 6 ore, cu răcire, separare pe magnet, spălare cu apă distilată în exces, uscare.

[Handwritten signatures and notes on the right margin]