



(11) RO 133559 A2

(51) Int.Cl.

C01B 33/12 (2006.01),

B01J 21/08 (2006.01),

C12N 11/14 (2006.01)

(12)

CERERE DE BREVET DE INVENTIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00094

(22) Data de depozit: 15/02/2018

(41) Data publicării cererii:
30/08/2019 BOPI nr. 8/2019

(71) Solicitant:

• INSTITUTUL DE CHIMIE FIZICĂ "ILIE MURGULESCU" AL ACADEMIEI ROMÂNE,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:

• ANASTASESCU CRINA,
BD. DIMITRIE CANTEMIR NR.2A, BL.P3,
SC.1, ET.3, AP.8, SECTOR 4, BUCUREȘTI,
B, RO;
• ZAHARESCU MARIA,
STR. VALEA IALOMITEI NR.2A, BL.417D,
SC.B, ET.2, AP.53, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• STROESCU HERMINE MARIA,
STR. BADEA CĂRTAN NR.9, BL. 18, ET.4,
SC.A, AP.21, SINAIA, PH, RO;
• GARTNER MARIUCA, STR.ION BERINDEI
NR.11, BL.1-2, SC.D, ET.7, AP.127,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• MUNTEANU CORNEL,
STR.TRAIAN DEMETRESCU NR. 42, SIBIU,
SB, RO;
• SOCOTEAU RADU PETRE,
ALEEA PLATANULUI NR.2, BL.A29, AP.1,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;

• BRATAN VERONICA,
STR.CÂMPIA LIBERTĂȚII NR.64, BL.34A,
SC.E, ET.1, AP.181, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• ATKINSON IRINA, BD. MIRCEA VODĂ
NR.48, BL.M 21, AP.12, ET.3, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• RUSU ADRIANA, STR.ISTRIEI NR.9,
BL.C 7, AP.53, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;
• PREDA SILVIU, SAT CĂTINA NR. 71,
COMUNA CĂTINA, BZ, RO;
• CULITA DANIELA CRISTINA,
ȘOS. PANTELIMON NR.256, BL.53, SC.A,
AP. 42, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• CALDERON- MORENO JOSE MARIA,
STR.CRINGULUI, NR.9-11, AP.2,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• ENACHE MĂDĂLIN IANCU,
STR.MIXANDREI NR.37, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
• NEAGU ELENA SIMONA,
STR.GLADIOLELOR NR.12, BL.7, ET.6,
AP.52, SAT ROŞU, CHIAJNA, IF, RO;
• ANASTASESCU MIHAI,
BD.DIMITRIE CANTEMIR NR.2 A, BL.P 3,
SC.1, ET.3, AP.8, SECTOR 4, BUCUREȘTI,
B, RO;
• BALINT IOAN, STR. BĂBEŞTI NR. 8, AP.2,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(54) OBȚINEREA PRIN PROCEDEUL SOL GEL A TUBURILOR
DE SiO₂ CU DIAMETRU NANOMETRIC, MODIFICAREA
ACESTORA CU GRUPURI FUNCȚIONALE ȘI METALE,
ÎN VEDEREA IMOBILIZĂRII DE ENZIME

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a nanotuburilor de SiO₂ cu diametru nanometric, modificate cu grupuri funcționale și metale, în vederea imobilizării de enzime. Procedeul conform inventiei constă în sinteza nanotuburilor de SiO₂, funcționalizarea cu 3-(trietoxisilil)-propilamină, modificarea cu aur a nanotuburilor funcționalizate, rezultând nanotuburi de SiO₂ funcționalizate și modificate cu Au care se calcinează la 500°C, timp de 1 h, după care pulberea de SiO₂ este

dispersată într-o soluție de 0, 01M K₂PO₄ în care este dizolvată lipaza porcină, rezultând nanotuburi cu diametrul intern mai mic de 50 nm, și lungimi de ordinul micrometrilor, care imobilizează eficient lipaza pe suprafața suportului solid.

Revendicări: 4

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozitivilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de inventie a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de inventie este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



RO 133559 A2

Obtinerea prin procedeul sol gel a tuburilor de SiO₂ cu diametru nanometric, modificarea acestora cu grupuri functionale si metale in vederea imobilizarii de enzime

Inventia are ca obiect obtinerea nanotuburilor de silice, functionalizarea acestora post-sinteza cu grupari NH₂ si modificarea ulterioara cu aur pentru cresterea capacitatii de imobilizare enzimatica pe suprafata. Se obtin astfel, pe cale chimica, prin procedeul sol gel, pulberi amorse de SiO₂ formate din nanotuburi bine definite cu diametru mediu intern de ~18 nm si lungimi de ordinul micrometrilor.

Este bine cunoscut interesul manifestat pentru materialele cu morfologie tubulara datorita numeroasele lor aplicatii in optoelectronica, senzoristica, cataliza, photocataliza. Avantajele conferite de morfologia tubulara sunt suprafata suprafata specifică ridicată, mezoporozitatea controlată, posibilitatea de functionalizare/dopare/aditivare/ atat a suprafetelor interne cat si a celor externe ale nanotuburilor, cu compusi chimici (metale, oxizi metalici, etc) si/sau biologici activi (enzime, anticorpi, etc.).

Se impune si dezvoltarea de materiale biocompatibile (netoxice) care sa beneficieze de particularitatile morfologiei tubulare si care sa posede reactivitate chimica si biologica predictibila in anumite medii. Pentru aceste materiale complexe se preconizeaza aplicatii in domenii de o mare importanta practica pentru asigurarea protectiei ecosistemelor si a calitatii vietii (bioremedierea, biocataliza, biomedicina).

Silicea este un material relativ bine studiat, foarte raspandit, cu stabilitate chimica crescuta si care nu aduce prejudicii mediului inconjurator, rentabil din punct de vedere economic si disponibil intr-o larga varietate de morfologii naturale sau conferite pe cale sintetica. Pentru aceste motive, silicea si in special cea mezoporoasa (cu suprafata specifica ridicata, de tip MCM 41, SBA 15) este intens utilizata, in special ca suport al diverselor faze active. Astfel, sunt cunoscute numeroase biomateriale hibride, eficiente si cu timp de viata crescut, obtinute prin asocierea matricilor anorganice de SiO₂ cu diversi compusi biologic activi (enzime, anticorpi, etc.) [N. Nassif, O. Bouvet, M.N. Rager, C. Roux, T. Coradin, J. Livage, Nat. Mater. 1 (2002) 42–44].

Nanotuburile de SiO₂ se pot obtine atat prin metode fizice cat si chimice. Metoda sol-gel presupune utilizarea unor conditii blande de sinteza si are avantajul de unui consum redus energie. Reactiile chimice care conduc la fazele succesive de sol si cea de gel de silice se pot desfasura in prezenta unor compusi care directioneaza morfologia finala a materialelor cum ar fi: (i) nanotuburi de carbon, membrane de alumina/policarbonat cu structura preformata [O. Hitoshi, M. Sadakane, Y. Nodasaka, W. Ueda, Chem. Mater. 18(21) (2006) 4981–4983] sau (ii) structuri formate in mediul de reactie cum ar fi acizi carboxilici, organogeluri, etc. [H. Nakamura, Y. Matsui, J. Am. Chem. Soc. 117 (1995) 2651–2652].

Este cunoscut ca prin metoda (ii) se formeaza nanotuburi cu o structura defectata si reactivitate chimica crescuta fata de metoda (i), favorizand functionalizarea ulterioara a suprafetei nanotuburilor. Alt avantaj al metodei (ii) este acela ca se pot obtine nanotuburi cu proprietati speciale (reactivitate optica) prin varierea parametrilor de sinteza [C. Anastasescu, M. Zaharescu, D. Angelescu, C. Munteanu, V. Bratan, T. Spataru, C. Negrila, N. Spataru, I. Balint, Sol. Energ. Mat. Sol. C. 159 (2017) 325 – 335].

Brevetul de inventie CZ 20032421, 10.11. 2004 face cunoscuta o metoda de obtinere a unor nanofibre de SiO₂, prin spinning in camp electrostatic inalt, pornind de la

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENTII SI MARCI	
Cerere de brevet de inventie	
Nr. a	8018 00094
Data depozit	15 -02-2018.

o solutie polimerica preparata prin metoda sol gel. Se obtin astfel fibre cu un diametru mediu de 170 nm si o suprafata specifica de $98.7\text{m}^2/\text{g}$.

Lucrarea [L. Brázda, J. Studničková, P. Exnar, A. Helebran, Adv. Mat. Res. 39-40 (2008) 347-350] raporteaza interactia acestora cu tesutul pulmonar evidentiind biocompatibilitatea acestor materiale.

Din cererea de brevet de inventie WO2011076357 A1 se face cunoscuta obtinerea nanotuburilor de SiO_2 cu diametru mai mic de 1 micron, utilizate ca si suport pentru un catalizator activ in polimerizarea olefinelor. In procesul de sinteza se utilizeaza fibre polimerice ca agent de directionare a retelei, SiCl_4 ca si precursor de siliciu, lucrandu-se in conditii de vid (presiunea variind intre 253 mbari si 1mbar) la temperatura camerei. Poate fi controlata suprafata specifica si se indeparteaza fibrele polimerice post sinteza pentru a se obtine nanotuburi goale.

Caracterul inovativ al prezentului patent provine din faptul ca are ca obiect obtinerea de nanotuburi de SiO_2 cu diametrul intern mic, de aproximativ ~ 18 nm, deschise la ambele capete, folosind un agent de templare format in situ, in mediul de reactie. Materialele rezultate au o structura defectata conducand la o reactivitate chimica crescuta, fiind adecvate functionalizarii cu grupari NH_2 prin intermediul gruparilor silanol prezente pe suprafatele expuse.

Prezenta cerere de patent descrie: (i) **sintetiza nanotuburilor de SiO_2** , (ii) **functionalizarea** acestora cu 3-(triethoxi-silil)-propilamina, (iii) **modificarea cu aur** a nanotuburilor functionalizate si (iv) **imobilizarea lipazei** porcine pe nanotuburile functionalizate si apoi modificate cu aur.

(i) In procesul de **sinteza** a nanotuburilor de SiO_2 s-a utilizat acidului DL tartric ca agent de directionare al structurii tubulare, tetraetil ortosilikatul (TEOS) ca sursa de siliciu si etanolul absolut ca solvent. Cantitatea de apa si de NH_4OH utilizeaza au asigurat derularea optima a reactiei de hidroliza si de formare a solului de silice care printr-un proces de policondensare a condus in final la un gel. Gelul a fost maturat, filtrat si uscat iar pulberea obtinuta a fost calcinata.

(ii) **Functionalizarea** s-a realizat prin refluxarea suspensiei pulberii de silice calcinata in etanol absolut in care a fost dizolvata in prealabil 3-(triethoxi-silil)-propilamina. Produsul rezultat a fost spalat cu etanol, filtrat si uscat.

(iii) **Modificarea cu aur** a probelor functionalizate s-a realizat prin adaugarea unei solutii de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ la SiO_2 functionalizat cu 3-(triethoxi-silil)-propilamina. Suspensia obtinuta a fost omogenizata prin agitare usoara timp de 2h urmata dupa care a fost adaugata treptat o solutie de NaBH_4 pentru reducerea Au^{3+} la Au metalic. Produsul obtinut a fost recuperat prin filtrare si calcinat.

(iv) **Imobilizarea lipazei** porcine s-a realizat prin adaugarea, sub agitare usoara, unei solutii de K_2HPO_4 cu lipaza peste nanotuburile de SiO_2 functionalizate si modificate cu aur.

Exemplul 1

Nanotuburile de SiO_2 functionalizate si modificate cu aur conform inventiei imobilizeaza eficient lipaza.

In procesul de sinteza a nanotuburilor de SiO_2 se dizolva acidul DL tartric in etanol absolut si apa si se adauga sub agitare usoara tetraetil ortosilikatul in picatura. La

solul de silice format ca urmare a reactiei de hidroliza se adauga lent NH₄OH 28%, la 0°C, pentru obtinerea unui gel. Gelul format este lasat 1h sa se matureze, apoi este spalat, filtrat, uscat la 100°C si calcinat la 500°C timp de 1h.

Peste pulberea de SiO₂ calcinata, dispersata in etanol absolut, se adauga 3-(triethoxi-silil)-propilamina. Suspensia rezultata este omogenizata prin agitare si refluxata la 70°C timp de 12 h, dupa care este filtrata, spalata cu etanol, si uscata la 60°C. La probele uscate se adauga o solutie de 0.01M HAuCl₄ 3H₂O. Dupa agitarea suspensiei timp de 2h se adauga 10 mL de solutie 0.2M de NaBH₄ pentru a reduce aurul retinut pe suprafata din forma ionica in cea metalica. Suspensia este apoi filtrata, spalata si calcinata la 500°C timp de 1h, viteza de incalzire fiind de 0.5 grade/minut.

Imobilizarea lipazei pe suportul solid s-a realizat prin adaugarea sub agitare a unei solutii 0.01M K₂HPO₄, continand lipaza dizolvata, peste pulberea de SiO₂ functionalizata si modificata cu Au (Au/SiO₂). Suspensia rezultata este supusa agitarii usoare si apoi mentinuta la 2-4°C timp de 6h.

Caracteristicile morfologice si structurale ale nanotuburilor de SiO₂ sunt prezентate in figurile si tabelul care urmeaza:

Figura 1. prezinta imaginile SEM care evidențiază morfologia predominant tubulară a SiO₂. Diametrul nanotuburilor este mai mic de 50 nm, diametrul mediu fiind ~18 nm.

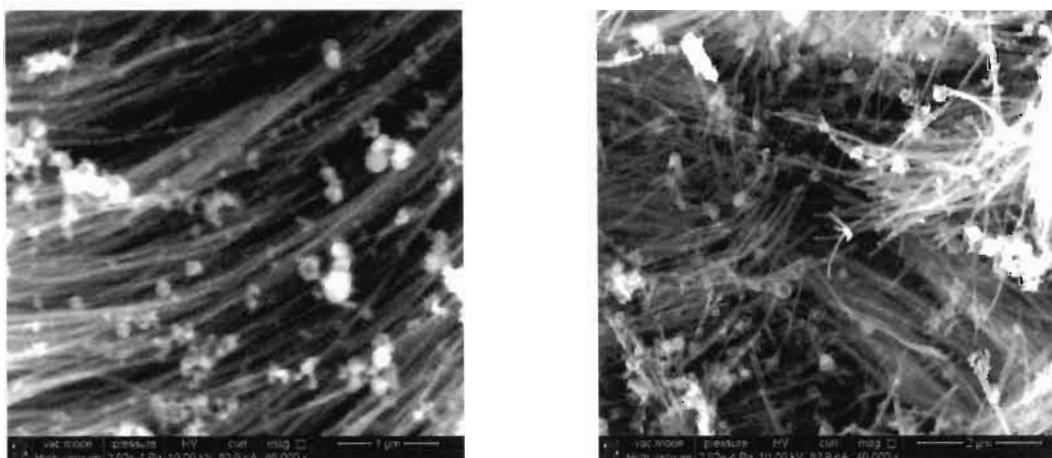


Figura 1. Imaginele obtinute prin microscopia electronica de baleaj (SEM) ale SiO₂ cu morfologie predominant tubulara (la doua scale diferite).

Figura 2 prezinta izotermele de adsorbție ale N₂ (A) și distribuția de pori (B) obtinute pe nanotuburile de SiO₂.

Ramurile adsorbției și desorbției apropiate și relativ paralele indică prezența porilor cilindrici, apropiati ca dimensiune, deschisi la ambele capete. Ramura de desorbție prezintă un maxim larg între 10-50 nm, corespunzând diametrului intern al tuburilor. Maximul ingust situat la 3.5 nm este generat de mezoporozitatea prezentă în peretii nanotuburilor. Conform măsurătorilor BET, suprafața specifică a SiO₂ tubular este de 102.27 m²/g.

Figura 3 prezintă spectrul FTIR comparativ al nanotuburilor de SiO₂ simple și functionalizate (SiO₂-F) (Figura 3A). În Figura 3B se observă că după functionalizare vibratiile caracteristice grupărilor Si-OH de la 960 cm⁻¹ dispar, ceea ce dovedește

ancorarea 3-(triethoxy-silil)-propilaminei de gruparile -OH de pe suprafata tuburilor de SiO_2 .

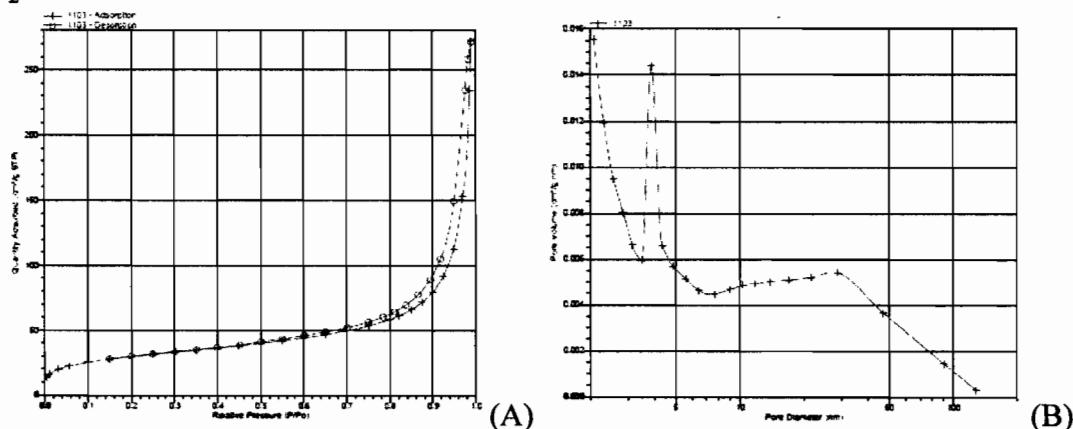


Figura 2. Izotermele de adsorptie-desorptie a N_2 (A) si distributia de pori (B) determinate pentru pe SiO_2 tubular.

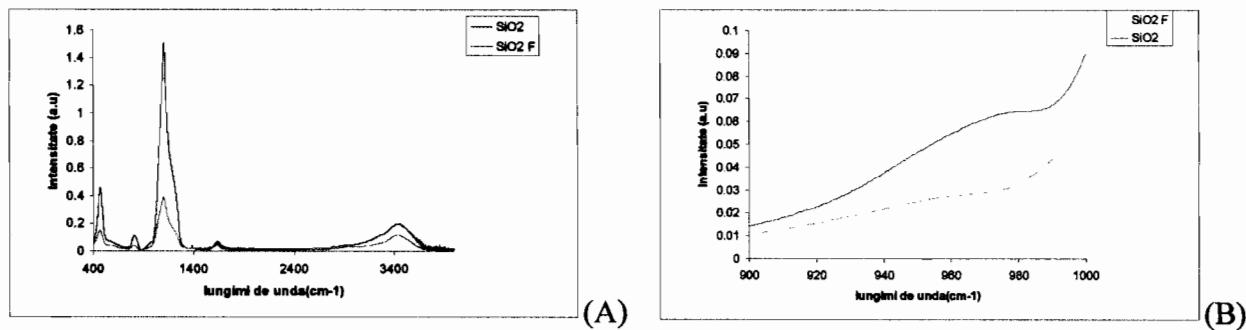


Figura 3 Spectrele FTIR comparative ale SiO_2 tubular simplu (SiO_2) si functionalizat cu 3-(triethoxy-silil)-propilamina ($\text{SiO}_2\text{-F}$). Spectrele FTIR generale al celor doua probe (A) si spectrele FTIR in domeniul de interes 900-1000 cm⁻¹ (B).

Spectrele FTIR-ATR ale $\text{SiO}_2\text{-F}$ din **Figura 4** evidentaaza vibratia specifica gruparilor functionale amidice (NH) ale 3-(triethoxy-silil)-propilaminei legate de SiO_2 tubular la 1245, 1521 si 1635 cm⁻¹.

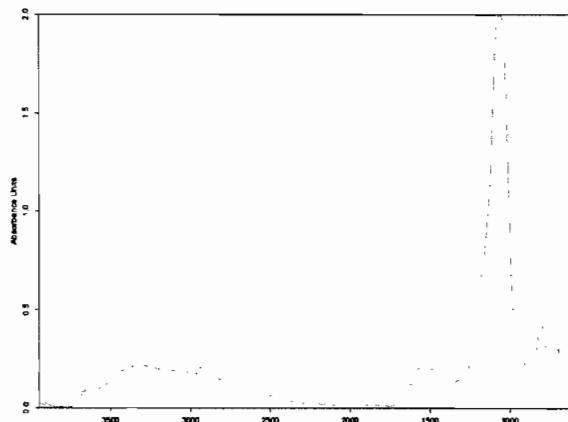


Figura 4 Spectrul FTIR-ATR al nanotuburilor de SiO_2 functionalizate cu 3-(triethoxy-silil)-propilamina.

Figura 5 prezinta difractograma de raze X a probei SiO_2 functionalizate cu 3-(triethoxi-silil)-propilaminei si apoi modificate cu Au ($\text{Au/SiO}_2\text{-F}$)

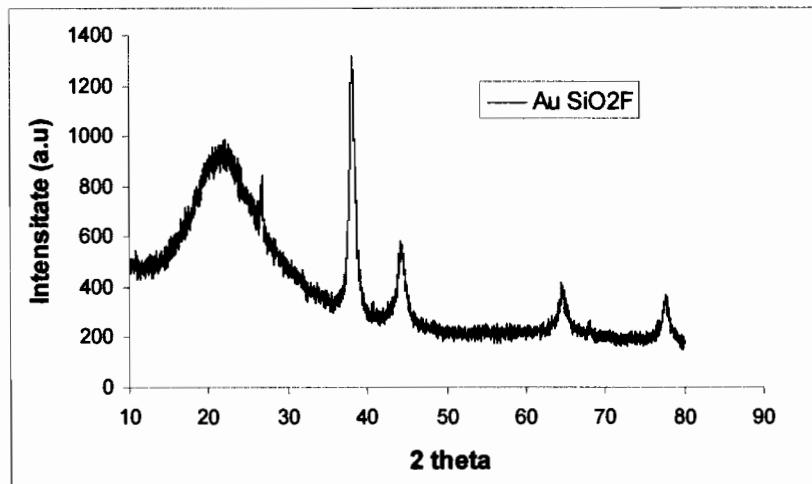


Figura 5 difractograma de raze X a probei SiO_2 functionalizate cu 3-(triethoxi-silil)-propilaminei si apoi modificate cu Au ($\text{Au/SiO}_2\text{-F}$)

Banda larga de difractie situata la aproximativ $2\theta = 21.5^\circ$ din Figura 5 evidentaiza structura amorfa a SiO_2 . Maximele de difractie de la $2\theta = 38.17$, 44.3 , 64.5 , 77.5° sunt caracteristice aurului aflat in stare metalica. Dimensiunea medie a nanoparticulelor de Au, determinata prin metoda Williamson Hall, de 7.5 nm este mult mai mica comparativ cu cea obtinuta prin impregnarea SiO_2 simplu, nefunctionalizat.

Imobilizarea lipazei pe SiO_2 si $\text{Au/SiO}_2\text{-F}$ a fost pusa in evidenta prin masuratori UV-VIS. Din analiza maximului de absorptie al lipazei de la 265 nm din **Figura 6**, reiese ca, concentratiei lipazei din supernatant scade mai mult in prezenta $\text{Au/SiO}_2\text{-F}$ comparativ cu SiO_2 . Acest lucru arata ca modificarea cu Au a probei de SiO_2 functionalizate creste capacitatea de imobilizare a lipazei pe suprafata.

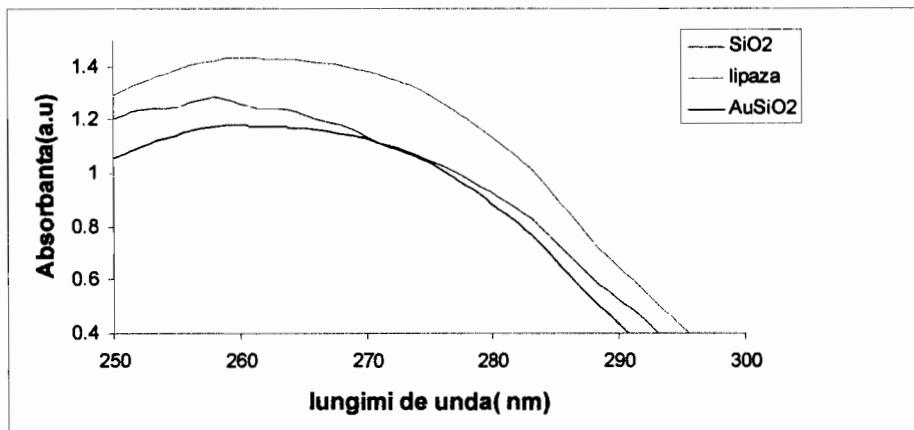


Figura 6 Spectrul UV-VIS, detaliat in regiunea $250\text{-}300$ nm, pentru probele de SiO_2 , Lipaza, si $\text{Au/SiO}_2\text{-F}$

Figura 7 (a), (b), (c) prezinta spectrele FTIR-ATR pentru sistemele:

- (a) Lipaza in solutie de K_2HPO_4 ,
- (b) SiO_2 functionalizat si Lipaza in solutie de K_2HPO_4 - (SiO_2F)
- (c) SiO_2 modificat cu Au dupa functionalizare si Lipaza in solutie de K_2HPO_4 - ($Au SiO_2F$)

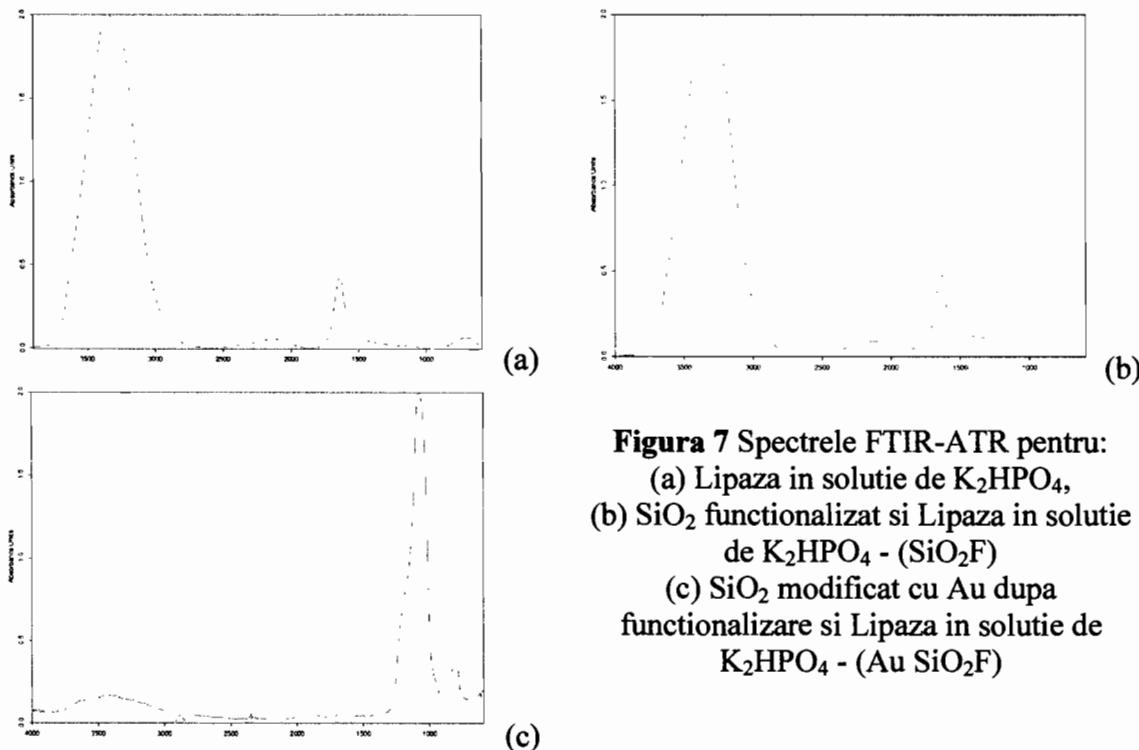


Figura 7 Spectrele FTIR-ATR pentru:
 (a) Lipaza in solutie de K_2HPO_4 ,
 (b) SiO_2 functionalizat si Lipaza in solutie
 de K_2HPO_4 - (SiO_2F)
 (c) SiO_2 modificat cu Au dupa
 functionalizare si Lipaza in solutie de
 K_2HPO_4 - ($Au SiO_2F$)

Tabelul 1 prezinta valorile caracteristice maximelor IR (cu identificarea semnalelor caracteristice) pentru Lipaza**Tabel 1** Benzile de vibratie si atribuirea acestora pentru Lipaza

Valoarea maximului (cm^{-1})	Atribuire (tip vibratie)
3273	N-H ($\tilde{\nu}$)
2930	C-H ($\tilde{\nu}$)
1635	Amida I, N-H def., (δ)
1521	Amida II, N-H strch., ($\tilde{\nu}$)
1245	Amida III, C-N strch., ($\tilde{\nu}$)
1060	C-O-C ($\tilde{\nu}$)
1395	C-OH bending
650-600	C-C bending

Se observa ca semnalele caracteristice lipazei (Figura 7a) sunt atenuate in al 3-lea spectru (Figura 7c) care corespunde sistemului constituit din proba modificata cu aur dupa functionalizare ($AuSiO_2F$) si lipaza in solutie de K_2HPO_4 , evidentiind o imobilizare mai accentuata a lipazei pe matricea anorganica.

Revendicari

1. Procedeu de obtinere a pulberilor cu morfologie de nanotuburi de SiO₂ cu diametrul intern mai mic de 50 nm, **caracterizat prin aceea ca**, sinteza, care implica folosirea tetraetil ortosilicatului, apei, etanolului, NH₄OH, acidului tartric DL ca agent de directionare al morfologiei, este condusa la temperatura scazuta (0 °C).
2. Procedeu de functionalizare a nanotuburilor de SiO₂ obtinute conform procedeului descris la Revendicarea 1, **caracterizat prin aceea ca** 3-(trietoxi-silil)-propilamina dizolvat in etanol se grefeaza pe SiO₂ cu morfologie tubulara prin refluxare timp de 12h la 70 °C iar produsul obtinut se spala cu etanol, se filtreaza si se usuca la 60°C.
3. Procedeu de modificare cu nanoparticule de aur a nanotuburilor de SiO₂ obtinute conform procedeului din Revendicarea 1 si functionalizate conform procedeului din Revendicarea 2, **caracterizat prin aceea ca** pulberea de nanotuburi de SiO₂ functionalizate se suspenda intr-o solutie de HAuCl₄ 3H₂O, se agita timp de 2h, dupa care se adauga o solutie de NaBH₄ pentru reducerea ionilor de aur adsorbuti, iar amestecul rezultat este spalat cu apa, filtrat si calcinat la 500°C timp de 1h, cu viteza de incalzire de 0.5 grade/minut.
4. Procedeu de imobilizarea a lipazei porcine pe suprafata nanotuburilor de SiO₂ obtinute conform procedeului de la Revendicarea 1, functionalizate conform procedeului de la Revendicarea 2 si modificate cu aur conform procedeului de la Revendicarea 3, **caracterizat prin aceea ca** pulberea de SiO₂ este dispersata sub agitare usoara intr-o solutie de 0.01M K₂HPO₄ in care a fost dizolvata lipaza si apoi mentinuta la 2-4 °C timp de 6h.