



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2018 00094**

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/04/2022** BOPI nr. **4/2022**

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

(73) Titular:  
• **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 IALOMIȚEI NR.2A, BL.417D, SC.B, ET.2, AP.53, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **STROESCU HERMINE MARIA, STR.BADEA CÂRȚAN 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;**  
• **SOCOTEANU 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, SC.1, 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 CĂȚINA NR.71, COMUNA CĂȚINA, 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 ROȘU, 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. BĂBEȘTI NR. 8, AP.2, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**US 7585437 (B2); US 2012/0328502 (A1)**

(54) **PROCEDEU DE OBȚINERE A NANOTUBURILOR DE SiO<sub>2</sub> UTILIZATE PENTRU IMOBILIZAREA DE ENZIME**



# RO 133559 B1

1           Invenția are ca obiect obținerea nanotuburilor de silice, funcționalizarea acestora  
2 post-sinteză cu grupări  $\text{NH}_2$  și modificarea ulterioară cu aur pentru creșterea capacității de  
3 imobilizare enzimatică pe suprafață. Se obțin astfel, pe cale chimică, prin procedeul sol gel,  
4 pulberi amorfe de  $\text{SiO}_2$  formate din nanotuburi bine definite cu diametru mediu intern de ~  
5 18 nm și lungimi de ordinul micrometrilor.

6           Este bine cunoscut interesul manifestat pentru materialele cu morfologie tubulară  
7 datorită numeroasele lor aplicații în optoelectronică, senzorică, cataliză, fotocataliză.  
8 Avantajele conferite de morfologia tubulară sunt suprafața specifică ridicată, mezoporozitatea  
9 controlată, posibilitatea de funcționalizare/dopare/aditivare atât a suprafețelor interne cât și  
10 a acelor externe ale nanotuburilor, cu compuși chimici (metale, oxizi metalici etc.) și/sau  
11 biologic activi (enzime, anticorpi etc.).

12           Se impune și dezvoltarea de materiale biocompatibile (netoxice) care să beneficieze  
13 de particularitățile morfologiei tubulare și care să posedă reactivitate chimică și biologică  
14 predictibilă în anumite medii. Pentru aceste materiale complexe se preconizează aplicații în  
15 domenii de o mare importanță practică pentru asigurarea protecției ecosistemelor și a calității  
16 vieții (bioremedierea, biocataliza, biomedicina).

17           Este cunoscută din brevetul **US 7585437 (B2)** o metodă de obținere a unor nanofibre  
18 de  $\text{SiO}_2$ , prin spinning în câmp electrostatic înalt, pornind de la o soluție polimerică preparată  
19 prin metoda sol gel. Se obțin astfel fibre cu un diametru mediu de 170 nm și o suprafață  
20 specifică de 98,7  $\text{m}^2/\text{g}$ .

21           De asemenea este cunoscută din articolul **C. Anastasescu, M. Zaharescu, D.**  
22 **Angelescu, C. Munteanu, V. Bratan, T. Spataru, C. Negrița, N. Spataru, I. Balint, Sol**  
23 **Energ. Mat. Sol. C. 159 (2017), 325-335** o metoda prin care se formează nanotuburi cu o  
24 structură defectată și reactivitate chimică crescută, favorizând funcționalizarea ulterioară a  
25 suprafeței nanotuburilor, se pot obține nanotuburi cu proprietăți speciale (reactivitate optică)  
26 prin varierea parametrilor de sinteză.

27           Este cunoscută din cererea de brevet **US 2012/0328502 (A1)** obținerea nanotuburilor  
28 de  $\text{SiO}_2$  cu diametru mai mic de 1 micron, utilizate ca și suport pentru un catalizator activ în  
29 polimerizarea olefinelor, în procesul de sinteză utilizându-se fibre polimerice ca agent de  
30 direcționare a rețelei,  $\text{SiCl}_4$  ca și precursor de siliciu, lucrându-se în condiții de vid (presiunea  
31 variind între 253 mbar și 1 mbar) la temperatura camerei. Poate fi controlată suprafața speci-  
32 fică și se îndepărtează fibrele polimerice post sinteză pentru a se obține nanotuburi goale.

33           Silicea este un material relativ bine studiat, foarte răspândit, cu stabilitate chimică  
34 crescută și care nu aduce prejudicii mediului inconjurător, rentabil din punct de vedere  
35 economic și disponibil într-o largă varietate de morfologii naturale sau conferite pe cale  
36 sintetică. Pentru aceste motive, silicea și în special cea mezoporoasă (cu suprafață specifică  
37 ridicată, de tip MCM 41, SBA 15) este intens utilizată, în special ca suport al diverselor faze  
38 active. Astfel, sunt cunoscute numeroasele biomateriale hibride, eficiente și cu timp de viață  
39 crescut, obținute prin asocierea matricilor anorganice de  $\text{SiO}_2$  cu diverși compuși biologic  
40 activi (enzime, anticorpi etc) [**N. Nassif, O. Bouvet, M.N. Rager, C. Roux, T. Coradin, J.**  
41 **Livage, Nat. Mater. 1 (2002), 42-44**].

42           Nanotuburile de  $\text{SiO}_2$  se pot obține atât prin metode fizice cât și chimice. Metoda sol-  
43 gel presupune utilizarea unor condiții blânde de sinteză și are avantajul unui consum redus  
44 de energie. Reacțiile chimice care conduc la fazele succesive de sol și cea de gel de silice  
45 se pot desfășura în prezența unor compuși care direcționează morfologia finală a materialelor  
46 cum ar fi:

47           - nanotuburi de carbon, membrane de alumină/policarbonat cu structura preformată  
48 [**O. Hitoshi, M. Sadakane, Y. Nodasaka, W. Ueda, Chem. Mater. 18(21), (2006), 4981-**  
49 **4983**] sau;

# RO 133559 B1

- structuri formate în mediul de reacție cum ar fi acizi carboxilici, organogeluri etc. [H. Nakamura, Y. Matsui, J. Am. Chem. Soc. 117, (1995), 2651-2652].	1
Lucrarea [L. Brazda, J. Studnicková, P. Exnar, A. Helebran, Adv. Mat. Res. 39-40, (2008), 347-350] raportează interacția acestora cu țesutul pulmonar evidențiind biocompatibilitatea acestor materiale.	3 5
Problema tehnică pe care o rezolvă invenția, așa cum reiese din prezentarea descrierii și a revendicărilor constă în obținerea de nanotuburi de SiO <sub>2</sub> cu o structură defectată conducând la o reactivitate chimică crescută și morfologie de tuburi cu diametrul nanometric, în vederea imobilizării de enzime.	7 9
Obținerea de nanotuburi de SiO <sub>2</sub> cu diametrul intern mic, de aproximativ ~ 18 nm, deschise la ambele capete, se realizează conform invenției folosind un agent de templare format <i>in situ</i> , în mediul de reacție. Materialele rezultate au o structură defectată conducând la o reactivitate chimică crescută, fiind adecvate funcționării cu grupări NH <sub>2</sub> prin intermediul grupărilor silanol prezente pe suprafațele expuse.	11 13
Procedeele, conform invenției cuprinde următoarele etape:	15
- sintetiza nanotuburilor de SiO <sub>2</sub> ;	
- funcționalizarea acestora cu 3-(trietoxi-silil)-propilamina;	17
- modificarea cu aur a nanotuburilor funcționalizate;	
- imobilizarea lipazei porcine pe nanotuburile funcționalizate și apoi modificate cu aur.	19
În procesul de sinteză a nanotuburilor de SiO <sub>2</sub> s-a utilizat acidului DL tartric ca agent de direcționare al structurii tubulare, tetraetil ortosilicatul (TEOS) ca sursă de siliciu și etanolul absolut ca solvent. Cantitatea de apă și de NH <sub>4</sub> OH utilizate au asigurat derularea optimă a reacției de hidroliză și de formare a solului de silice care printr-un proces de policondensare a condus în final la un gel. Gelul a fost maturat, filtrat și uscat iar pulberea obținută a fost calcinată.	21 23 25
Funcționalizarea s-a realizat prin refluxarea suspensiei obținute din pulbere de silice calcinată în etanol absolut în care a fost dizolvată în prealabil 3-(trietoxi-silil)-propilamina. Produsul rezultat a fost spălat cu etanol, filtrat și uscat.	27
Modificarea cu aur a probelor funcționalizate s-a realizat prin adăugarea unei soluții de HAuCl <sub>4</sub> 3H <sub>2</sub> O la SiO <sub>2</sub> funcționalizat cu 3-(trietoxi-silil)-propilamina. Suspensia obținută a fost omogenizată prin agitare ușoară timp de 2 h după care a fost adăugată treptat o soluție de NaBPH <sub>4</sub> pentru reducerea Au <sup>3+</sup> la Au metalic. Produsul obținut a fost recuperat prin filtrare și calcinat.	29 31 33
Imobilizarea lipazei porcine s-a realizat prin adăugarea, sub agitare ușoară, a unei soluții de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> cu lipaza peste nanotuburile de SiO <sub>2</sub> funcționalizate și modificate cu aur.	35
<b>Exemplul 1</b>	
Nanotuburile de SiO <sub>2</sub> funcționalizate și modificate cu aur conform invenției imobilizează eficient lipaza.	37
În procesul de sinteză a nanotuburilor de SiO <sub>2</sub> se dizolvă acidul DL tartric în etanol absolut și apă și se adaugă sub agitare ușoară tetraetil ortosilicatul în picătură. La solul de silice format ca urmare a reacției de hidroliză se adaugă lent NH <sub>4</sub> OH 28%, la 0°C, pentru obținerea unui gel. Gelul format este lăsat 1 h să se matureze, apoi este spălat, filtrat, uscat la 100°C și calcinat la 500°C timp de 1 h.	39 41 43
Peste pulberea de SiO <sub>2</sub> calcinată, dispersată în etanol absolut, se adaugă 3-(trietoxi-silil)-propilamina. Suspensia rezultată este omogenizată prin agitare și refluxată la 70°C timp de 12 h, după care este filtrată, spălată cu etanol, și uscată la 60°C. La probele uscate se	45

# RO 133559 B1

1 adaugă o soluție de 0,01 M  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . După agitare suspensiei timp de 2 h se adaugă  
10 mL de soluție 0,2 M de  $\text{NaBH}_4$  pentru a reduce aurul reținut pe suprafață din forma ionică  
3 în cea metalică. Suspensia este apoi filtrată, spălată și calcinată la  $500^\circ\text{C}$  timp de 1 h, viteza  
de încălzire fiind de 0,5 g/min.

5 Imobilizarea lipazei pe suportul solid s-a realizat prin adăugarea sub agitare a unei  
soluții 0,01 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  conținând lipaza dizolvată peste pulberea de  $\text{SiO}_2$  funcționalizată și  
7 modificată cu Au ( $\text{Au/SiO}_2$ ). Suspensia rezultată este supusă agitării ușoare și apoi menținută  
la  $2-4^\circ\text{C}$  timp de 6 h.

9 Caracteristicile morfologice și structurale ale nanotuburilor de  $\text{SiO}_2$  sunt prezentate în  
figurile și tabelul care urmează:

11 - fig. 1, prezintă imaginile SEM care evidențiază morfologia predominant tubulară a  
 $\text{SiO}_2$ . Diametrul nanotuburilor este mai mic de 50 nm, diametrul mediu fiind  $\sim 18$  nm,

13 - fig. 2, prezintă izotermele de adsorbție ale  $\text{N}_2$  (A) și distribuția de pori (B) obținute  
pentru nanotuburile de  $\text{SiO}_2$ .

15 Ramurile adsorbției și desorbției apropiate și relativ paralele indică prezența porilor  
cilindrici, apropiați ca dimensiune, deschiși la ambele capete. Ramura de desorbție prezintă  
17 un maxim larg între 10-50 nm, corespunzând diametrului intern al tuburilor. Maximul îngust  
situat la 3,5 nm este generat de mezopozitatea prezentă în pereții nanotuburilor. Conform  
19 măsurătorilor BET suprafața specifică a  $\text{SiO}_2$  tubular este de  $102,27 \text{ m}^2/\text{g}$ .

Fig. 3, prezintă spectrul FTIR comparativ al nanotuburilor de  $\text{SiO}_2$  simple și funcționa-  
21 lizate ( $\text{SiO}_2\text{-F}$ ) (fig. 3A). În fig. 3B, se observă că după funcționalizare vibrațiile caracteristice  
grupărilor Si-OH de la  $960 \text{ cm}^{-1}$  dispar, ceea ce dovedește ancorarea 3-(trietoxi-silil)-pro-  
23 pilaminei de grupările -OH de pe suprafața tuburilor de  $\text{SiO}_2$ .

25 Spectrele FTIR-ATR ale  $\text{SiO}_2\text{-F}$  din fig. 4 evidențiază vibrația specifică grupărilor  
funcționale amidice (NH) ale 3-(trietoxi-silil)-propilaminei legate de  $\text{SiO}_2$  tubular la  $1245$ ,  $1521$   
și  $1635 \text{ cm}^{-1}$ .

27 Fig. 5, prezintă difractograma de raze X a probei  $\text{SiO}_2$  funcționalizate cu 3-(trietoxi-  
silil)-propilaminei și apoi modificate cu Au ( $\text{Au/SiO}_2\text{-F}$ ).

29 Banda largă de difracție situată la aproximativ  $2\theta = 21,5^\circ$  din fig. 5 evidențiază  
structura amorfă a  $\text{SiO}_2$ . Maximele de difracție de la  $2\theta = 38,17$ ,  $44,3$ ,  $64,5$ ,  $77,5^\circ$  sunt carac-  
31 teristice aurului aflat în stare metalică. Dimensiunea medie a nanoparticulelor de Au, deter-  
minată prin metoda Williamson Hall, de 7,5 nm este mult mai mică comparativ cu cea obținută  
33 prin impregnarea  $\text{SiO}_2$  simplu, nefuncționalizat.

Imobilizarea lipazei pe  $\text{SiO}_2$  și  $\text{Au/SiO}_2\text{-F}$  a fost pusă în evidență prin măsurători UV-  
35 VIS. Din analiza maximului de absorbție al lipazei de la 265 nm din fig. 6, reiese că, concen-  
trației lipazei din supernatant scade mai mult în prezența  $\text{Au/SiO}_2\text{-F}$  comparativ cu  $\text{SiO}_2$ . Acest  
37 lucru arată că modificarea cu Au a probei de  $\text{SiO}_2$  funcționalizate crește capacitatea de  
imobilizare a lipazei pe suprafață.

39 Fig. 7 (a), (b), (c) prezintă spectrele FTIR-ATR pentru sistemele:

41 a. Lipaza în soluție de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ;

b.  $\text{SiO}_2$  funcționalizat și Lipaza în soluție de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - ( $\text{SiO}_2\text{F}$ );

43 c.  $\text{SiO}_2$  modificat cu Au după funcționalizare și Lipaza în soluție de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - ( $\text{Au}$   
 $\text{SiO}_2\text{F}$ ).

45 Tabelul 1 prezintă valorile caracteristice maximelor IR (cu identificarea semnalelor  
caracteristice) pentru Lipază.

# RO 133559 B1

## Benzile de vibrație și atribuirea acestora pentru Lipază

Tabelul 1

Valoarea maximului (cm <sup>-1</sup> )	Atribuire (tip vibrație)
3273	N-H ( $\gamma$ )
2930	C-H ( $\gamma$ )
1635	Amida I, N-H def., ( $\delta$ )
1521	Amida II, N-H strch., ( $\gamma$ )
1245	Amida III, C-N strch., ( $\gamma$ )
1060	C-O-C ( $\gamma$ )
1395	C-OH bending
650-600	C-C bending

Se observă că semnalele caracteristice lipazei (fig. 7a) sunt atenuate în al 3-lea spectru (fig. 7c) care corespunde sistemului constituit din proba modificată cu aur după funcționalizare (AuSiO<sub>2</sub>F) și lipaza în soluție de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, evidențiind o imobilizare mai accentuată a lipazei pe matricea anorganică.

# RO 133559 B1

1

## Revendicare

3

Procedeu de obținere de nanotuburi de  $\text{SiO}_2$  cu diametrul nanometric pentru imobilizarea eficientă a lipazei porcine, **caracterizat prin aceea că**, cuprinde următoarele etape:

5

- sinteza nanotuburilor de  $\text{SiO}_2$  utilizând tetraetil ortosilicat, apă, etanol,  $\text{NH}_4\text{OH}$ , acidul tartric DL ca agent de direcționare al morfologiei este condusă la temperatură scăzută ( $0^\circ\text{C}$ ), pentru obținerea unui gel care este lăsat 1 h să se matureze, apoi este spălat, filtrat, uscat la  $100^\circ\text{C}$  și calcinat la  $500^\circ\text{C}$  timp de 1 h;

7

7

9

- funcționalizarea nanotuburilor de  $\text{SiO}_2$  cu 3-(trietoxi-silil)-propilamina dizolvată în etanol prin grefare pe  $\text{SiO}_2$  cu morfologie tubulară prin refluxare timp de 12 h la  $70^\circ\text{C}$ , iar produsul obținut se spală cu etanol, se filtrează și se usucă la  $60^\circ\text{C}$ ;

11

11

13

- modificarea nanotuburilor de  $\text{SiO}_2$  cu nanoparticule de aur a prin suspendarea pulberii de nanotuburi într-o soluție de  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , sub agitare timp de 2 h, după care se adaugă o soluție de  $\text{NaBH}_4$  pentru reducerea ionilor de aur adsorbiți, iar amestecul rezultat este spălat cu apă, filtrat și calcinat la  $500^\circ\text{C}$  timp de 1 h, cu viteza de încălzire de  $0,5 \text{ g/min}$ ;

15

15

17

- imobilizarea lipazei porcine pe suprafața nanotuburilor de  $\text{SiO}_2$  prin dispersarea sub agitare a pulberii de  $\text{SiO}_2$  într-o soluție de  $0,01 \text{ M K}_2\text{HPO}_4$  în care a fost dizolvată lipaza și apoi menținut amestecul la  $2-4^\circ\text{C}$  timp de 6 h.

19

19

(51) Int.Cl.

**C01B 33/12** (2006.01),

**B01J 21/08** (2006.01),

**C12N 11/14** (2006.01)

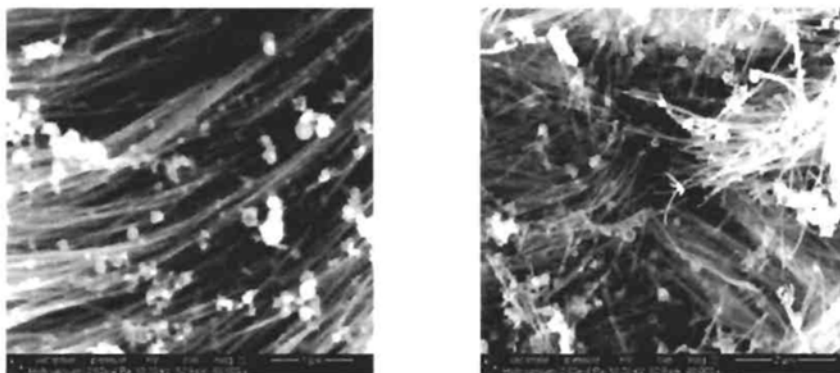


Fig. 1

(51) Int.Cl.

C01B 33/12 (2006.01);

B01J 21/08 (2006.01);

C12N 11/14 (2006.01)

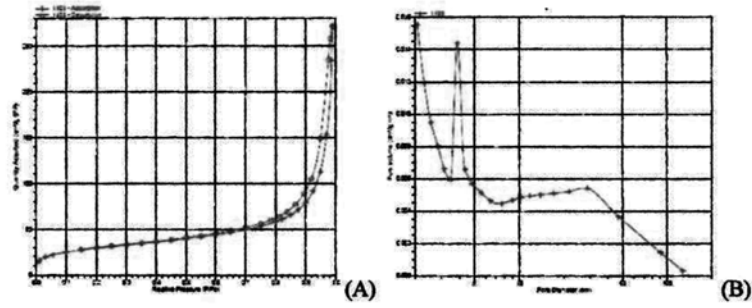


Fig. 2

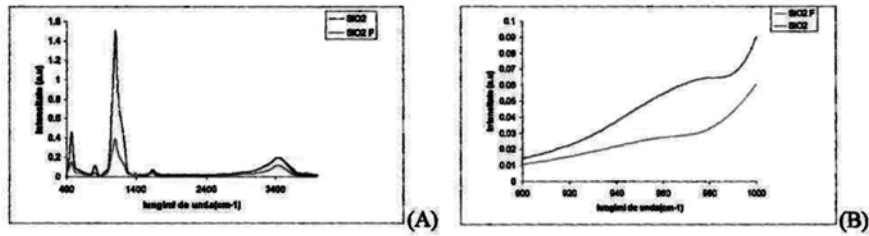


Fig. 3

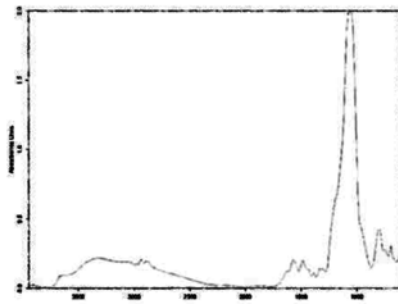


Fig. 4



(51) Int.Cl.

**C01B 33/12** (2006.01),

**B01J 21/08** (2006.01),

**C12N 11/14** (2006.01)

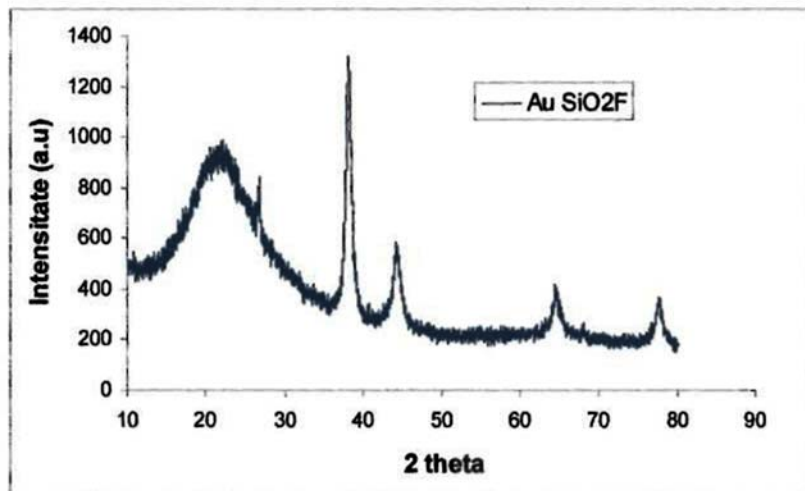


Fig. 5

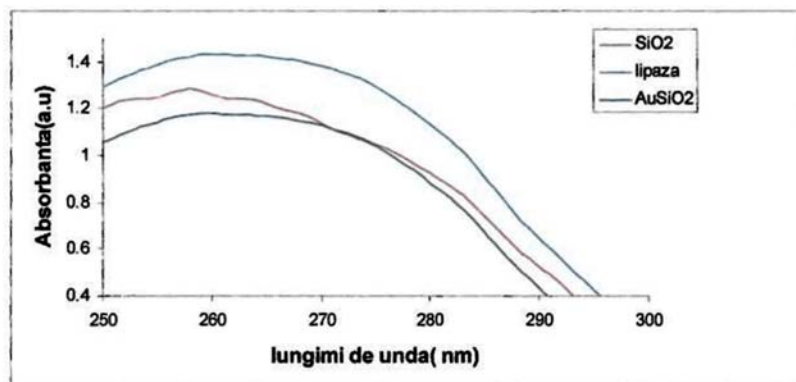


Fig. 6

(51) Int.Cl.

**C01B 33/12** (2006.01);

**B01J 21/08** (2006.01);

**C12N 11/14** (2006.01)

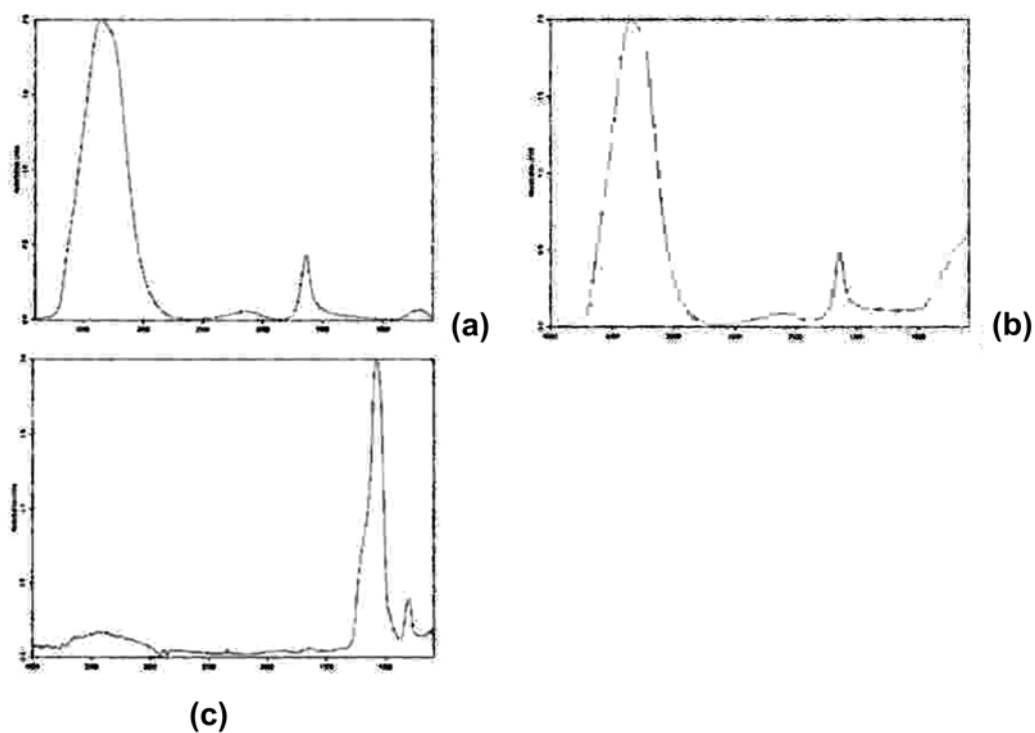


Fig. 7

