



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00571

(22) Data de depozit: 16/09/2019

(41) Data publicării cererii:
30/07/2020 BOPI nr. 7/2020

(71) Solicitant:
• SPITALUL CLINIC DE URGENȚĂ
CLUJ-NAPOCA, STR. CLINICILOR NR. 3-5,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• IANCU ȘTEFANIA, STR. ARMONIEI, NR.3,
BL.58, AP.4, BRAȘOV, BV, RO;
• MOISOIU VLAD, STR.BRAZILOR, NR.4,
BL.5, AP.1, COVASNA, CV, RO;

• ȘTEFANCU ANDREI,
LOC. MĂNĂSTIRENI, BOTOȘANI, BT, RO;
• LEOPOLD NICOLAE, STR.ALMAȘULUI
NR.5, AP.13, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• SZABO LASZLO, ALEEA RETEZAT, NR.3,
AP.16, CLUJ NAPOCA, CJ, RO;
• BALINT ZOLTAN, STR.BORHANCULUI,
NR.16 CORP 2, AP.2, CLUJ - NAPOCA, CJ,
RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE DE NANOPARTICULE CU MIEZ
DE MAGNETITĂ ȘI ÎNVELIȘ DE AUR STABILIZATE
CU GLUCOZĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a nanoparticulelor cu miez de magnetită și înveliș de aur nanometric, pentru aplicații senzorialice pentru diagnostic. Procedeu conform invenției constă în sinteza de particule de magnetită prin metoda coprecipitării, prin combinarea clorurii ferice și a clorurii feroase în mediu alcalin, nanoparticulele de magnetită rezultate sub formă de soluție coloidală având un diametru mediu de 5 nm, sunt stabilizate cu glucoză, acoperite cu aur în două

etape, prin reducerea acidului cloroauric folosind glucoza ca agent reducător, rezultând nanoparticule cu miez de magnetită și înveliș de aur, cu dimensiunea particulelor de 4...12 nm, morfologie preponderent sferică, având o bună stabilitate reprezentată de maximul distribuției potențialului Zeta la valoarea -12, 6 mV.

Revendicări: 2
Figuri: 4



PROCEDEU DE OBTINERE DE NANOPARTICULE CU MIEZ DE MAGNETITĂ ȘI ÎNVELIȘ DE AUR STABILIZATE CU GLUCOZĂ

Invenția se referă la un procedeu simplu și rapid de obținere a nanoparticulelor de magnetită cu un înveliș de aur nanometric. Procedeu de obținere prevede sinteza de nanoparticule de Fe_3O_4 prin metoda co-precipitării, prin combinarea clorurii ferice ($FeCl_3$) și a clorurii feroase ($FeCl_2$) într-un mediu alcalin după metoda publicată de Risbud și colaboratorii [1-2]. Nanoparticulele de magnetită rezultate, prezintă un diametru mediu în jurul valorii de 5 nm, sunt stabilizate cu glucoză, și sunt apoi acoperite cu aur prin reducerea acidului cloroauric $HAuCl_4$ folosind glucoza ca agent reducător. De asemenea, glucoza este folosită și ca agent stabilizator al soluției coloidale de nanoparticulele cu miez de magnetită și înveliș de aur, dimensiunea finală a majorității nanoparticulelor de tip miez-înveliș fiind în intervalul de dimensiune 4-12 nm. Distribuția potențialului Zeta al soluției coloidale de nanoparticule cu miez de magnetită și înveliș de aur prezintă un maxim la valoarea de -12.6 mV, indicând astfel o stabilitate bună a nanoparticulelor, conferită de agentul stabilizator glucoza.

Nanoparticulele cu miez de magnetită și înveliș de aur reprezintă o clasă de nanoparticule cu proprietăți duale, magnetice și plasmonice. Datorită acestor proprietăți, nanoparticulele cu miez de magnetită și înveliș de aur sunt propuse în literatura de specialitate pentru diverse aplicații medicale *in-vivo* de diagnostic și tratament [3-4]:

- Aplicații sezoristice pentru diagnostic: Nanoparticulele cu miez de magnetită și înveliș de aur sunt utilizate în dezvoltarea de biosenzori și teste rapide de detecție.
- Aplicații pentru tratament țintit: Suprafața de aur a nanoparticulelor poate fi funcționalizată pentru interacțiuni specifice cum ar fi cele de tip antigen-anticorp.
- Aplicații pentru tratament prin hipertermie: Atât miezul magnetic cât și învelișul de aur reprezintă agenți hipertermici. Miezul magnetic poate genera căldură în prezența unui câmp magnetic variabil, iar învelișul de aur, datorită proprietăților plasmonice poate transforma energia luminoasă în căldură.

- Agent de contrast pentru imagistică de rezonanță magnetică (IRM): Datorită proprietăților paramagnetice ale miezului de oxid de fier, nanoparticulele pot fi utilizate ca agent de contrast în IRM, deoarece pot varia atât timpul de relaxare longitudinal, cât și cel vertical [5].

Acoperirea nanoparticulelor Fe_3O_4 cu un strat nanometric de aur, crește biocompatibilitatea acestei nanostructuri de tip miez-înveliș, datorită faptului că aurul metallic este inert chimic și de asemenea prin faptul că învelișul de aur împiedică eliberarea ionilor de fier din miezul de magnetită. Învelișul de aur al nanoparticulelor poate fi în continuare modificat pentru a crește biocompatibilitatea, de exemplu cu proteine [6], sau funcționalizat cu structuri chimice specifice, cum ar fi structuri antigen-anticorp.

Scopul invenției constă în obținerea de nanoparticulele cu miez de magnetită și înveliș de aur de înaltă biocompatibilitate pentru aplicații *in-vivo*, cum ar fi la utilizarea acestora ca agent de contrast în IRM, în terapia țintită, în tratamentul prin hipertermie sau senzorială biomedicală.

Problema tehnică pe care o rezolvă prezenta invenție este legată de creșterea biocompatibilității nanoparticulelor cu miez de magnetită și înveliș de aur, conferită de proprietățile chimice și biologice ale învelișului de aur și de asemenea prin împiedicarea eliminării de ioni de fier prin acoperirea cu aur a miezului de magnetită, la utilizarea acestora în aplicații *in-vivo*.

Într-un alt aspect, agentul stabilizator, glucoza contribuie de asemenea la creșterea biocompatibilității nanoparticulelor cu miez de magnetită și înveliș de aur la utilizarea acestora în aplicații *in-vivo*.

În figurile anexate, care fac parte din prezenta invenție, sunt redate următoarele:

Figura 1 prezintă spectrul de absorbție UV-Vis al nanoparticulelor cu miez de magnetită și înveliș de aur, spectru ce conține două maxime de absorbție: unul caracteristic miezului de oxid de fier având maximul de absorbție la 383 nm, respectiv banda de absorbție plasmonică a învelișului de aur de la 602 nm.

Figura 2 prezintă distribuția diametrului hidrodinamic al nanoparticulelor cu miez de magnetită și înveliș de aur așa cum rezultă din măsurătorile de împrăștiere dinamică

a luminii (DLS), maximul distribuției diametrului hidrodinamic fiind la valoarea 241.7 nm.

Figura 3 prezintă distribuția potențialului Zeta al nanoparticulelor cu miez de magnetită și înveliș de aur, maximul distribuției fiind la valoarea -12.6 mV.

Figura 4 prezintă imaginea de microscopie electronică în transmisie (TEM) a nanoparticulelor cu miez de magnetită și înveliș de aur în care se observă morfologia preponderent sferică a acestora, iar diametrul majorității nanoparticulelor de tip miez-înveliș fiind în intervalul de dimensiune 4-12 nm.

Se prezintă în continuare un exemplu concret, nelimitativ, de realizare a invenției.

Nanoparticulele cu miez de magnetită și înveliș de aur sunt sintetizate pornind de la miezuri de Fe_3O_4 peste care se sintetizează un strat de aur. Miezul de Fe_3O_4 se obține prin metoda co-precipitării, prin combinarea clorurii ferice (FeCl_3) și a clorurii feroase (FeCl_2) într-un mediu alcalin după metoda publicată de Risbud și colaboratorii [1-2].

Procedeu de sinteză al nanoparticulelor de magnetită constă în combinarea a 0.85 mL soluție HCl 12.1 N cu 25 mL de apă ultrapură, iar în această soluție se dizolvă succesiv, sub agitare, 5.2 g FeCl_3 și 2.0 g FeCl_2 . Soluția obținută se adaugă prin picurare la 250 mL soluție de NaOH 1.5 M, rezultând instantaneu un precipitat negru intens format din nanoparticule de magnetită cu un diametru mediu în jurul valorii de 5 nm.

Pentru spălarea nanoparticulelor de magnetită, precipitatul este izolat pe peretele de la baza vasului, folosind un magnet puternic, supernatantul fiind eliminat prin scurgere. Apoi, precipitatul este resuspendat în aceeași cantitate de apă ultrapură, 250 mL.

După repetarea procedurii de spălare a nanoparticulelor de magnetită de trei ori, pH-ul soluției coloidale de nanoparticule de magnetită are o valoare acidă, pH 3.5. Pentru creșterea pH-ului la o valoare bazică, aflată la o valoare între pH 11 și pH 12, se adaugă 1 mL de soluție de NaOH 1.5 M la soluția coloidală de nanoparticule de Fe_3O_4 .

Pentru a evita agregarea nanoparticulelor, soluția coloidală de nanoparticule de Fe_3O_4 obținută anterior, se stabilizează prin amestecare în raport 1:1 cu o soluție de glucoză 0.1 M.

Nanoparticulele de magnetită stabilizate cu glucoză, sunt apoi acoperite cu aur prin reducerea acidului cloroauric HAuCl_4 folosind glucoza ca agent reducător.

Acoperirea nanoparticulelor Fe_3O_4 cu aur este realizată iterativ în două etape: În prima etapă de acoperire cu aur, 20 mL de nanoparticule de magnetită stabilizate cu glucoză, din soluția obținută anterior, sunt dispersați în 40 mL apă ultrapură, amestecul fiind încălzit la 85°C . Apoi, se adaugă 2 mL HAuCl_4 1%, sub agitare magnetică. Soluția este menținută la temperatura de 85°C și 300 rotații/minut timp de 20 de minute pentru a asigura reducerea completă a aurului pe suprafața nanoparticulelor de magnetită. Se obțin astfel nanoparticule cu miez de magnetită și înveliș de aur, ce sunt apoi spălate, procesul constând în folosirea unui magnet pentru separarea nanoparticulelor, scurgerea supernatantului și redispersarea nanoparticulelor în aceeași cantitate de apă ultra pură. După repetarea procedurii de spălare de trei ori, se adaugă nanoparticulelor cu miez de magnetită și înveliș de aur 500 μL soluție de glucoză 0.1 M pentru stabilizare.

A doua etapă de acoperire cu aur a nanoparticulelor, constă în dispersarea a 20 mL din soluția de nanoparticule cu miez de magnetită și înveliș de aur, obținută la finalul primei etape, în 40 mL apă ultra pură, amestecul fiind încălzit la 85°C , sub agitare magnetică 300 rotații/minut. Apoi, se adugă amestecului 30 mL soluție de glucoză 0.1 M și 5 mL HAuCl_4 1%. Soluția este menținută la temperatura de 85°C și 300 rotații/minut timp de 20 de minute după care soluția coloidală de nanoparticule cu miez de magnetită și înveliș de aur este spălată de trei ori după procedeul descris în etapa anterioară. După repetarea procedurii de spălare de trei ori, se adaugă nanoparticulelor cu miez de magnetită și înveliș de aur 1 mL soluție de glucoză 0.1 M pentru stabilizare.

Spectrul de absorbție UV-Vis din Figura 1 ilustrează prin banda plasmonică a aurului de la valoarea 602 nm acoperirea cu aur a nanoparticulelor de magnetită în urma celor două etape de acoperire descrise anterior. Figura 2 prezintă rezultatul măsurărilor de împrăștiere dinamică a luminii (dynamic light scattering - DLS), maximul distribuției diametrului hidrodinamic al nanoparticulelor cu miez de

magnetită și înveliș de aur fiind la valoarea 241.7 nm. Maximul distribuției potențialului Zeta al nanoparticulelor cu miez de magnetită și înveliș de aur, de la valoarea -12.6 mV, prezentat în Figura 3, indică o bună stabilitate a nanoparticulelor cu miez de magnetită și înveliș de aur, în urma stabilizării acestora cu glucoză. Imaginea de microscopie electronică în transmisie (TEM) a nanoparticulelor cu miez de magnetită și înveliș de aur (Figura 4) prezintă morfologia preponderent sferică a acestora, iar diametrul majorității nanoparticulelor de tip miez-înveliș fiind intervalul de dimensiune 4-12 nm.

Referințe bibliografice

1. Kang, Y. S.; Risbud, S.; Rabolt, J. F.; Stroeve, P., Synthesis and Characterization of Nanometer-Size Fe₃O₄ and γ -Fe₂O₃ Particles. *Chemistry of Materials* 1996, 8 (9), 2209-2211.
2. Kang, Y. S.; Risbud, S.; Rabolt, J. F.; Stroeve, P., Synthesis and Characterization of Nanometer-Size Fe₃O₄ and γ -Fe₂O₃ Particles. *Chemistry of Materials* 1998, 10 (6), 1733-1733.
3. El-Gendy, A. A., Chapter 2 - Core/Shell Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications. In *Magnetic Nanostructured Materials*, El-Gendy, A. A.; Barandiarán, J. M.; Hadimani, R. L., Eds. Elsevier: 2018; pp 41-58.
4. Lima-Tenório, M. K.; Gómez Pineda, E. A.; Ahmad, N. M.; Fessi, H.; Elaissari, A., Magnetic nanoparticles: In vivo cancer diagnosis and therapy. *International Journal of Pharmaceutics* 2015, 493 (1), 313-327.
5. Javed, Y.; Akhtar, K.; Anwar, H.; Jamil, Y., MRI based on iron oxide nanoparticles contrast agents: effect of oxidation state and architecture. *Journal of Nanoparticle Research* 2017, 19 (11), 366.
6. Marisca, O. T.; Kantner, K.; Pfeiffer, C.; Zhang, Q.; Pelaz, B.; Leopold, N.; Parak, W. J.; Rejman, J., Comparison of the in Vitro Uptake and Toxicity of Collagen- and Synthetic Polymer-Coated Gold Nanoparticles. *Nanomaterials (Basel)* 2015, 5 (3), 1418-1430.

REVENDICĂRI

1. Soluție coloidală de nanoparticule cu miez de magnetită și înveliș de aur de dimensiune 4-12 nm, stabilizate cu glucoză.
2. Procedeu de acoperire a nanoparticulelor de magnetită cu dimensiunea medie de 5 nm cu un strat nanometric de aur, obținut prin reducerea acidului cloroauric în prezența glucozei.

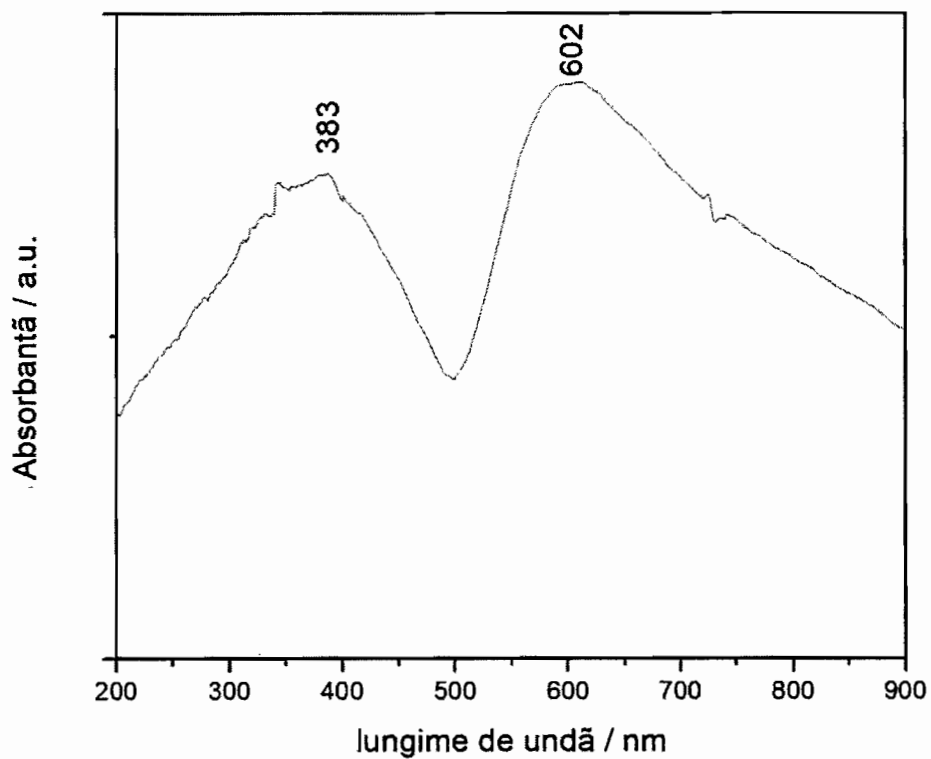


Figura 1.

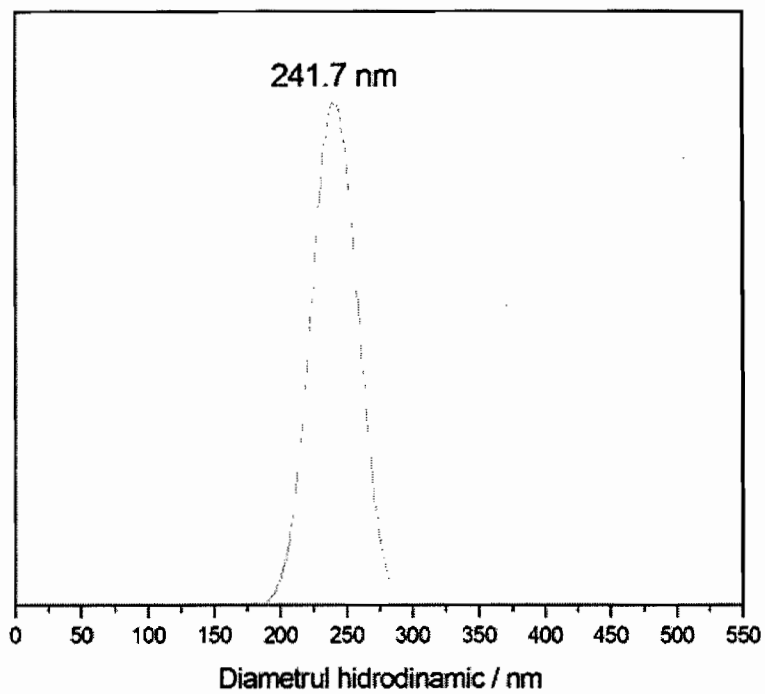


Figura 2.

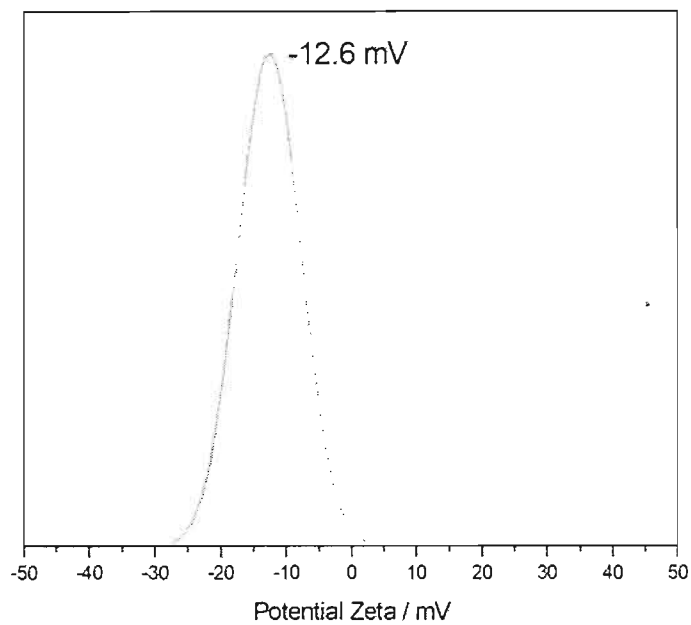


Figura 3.

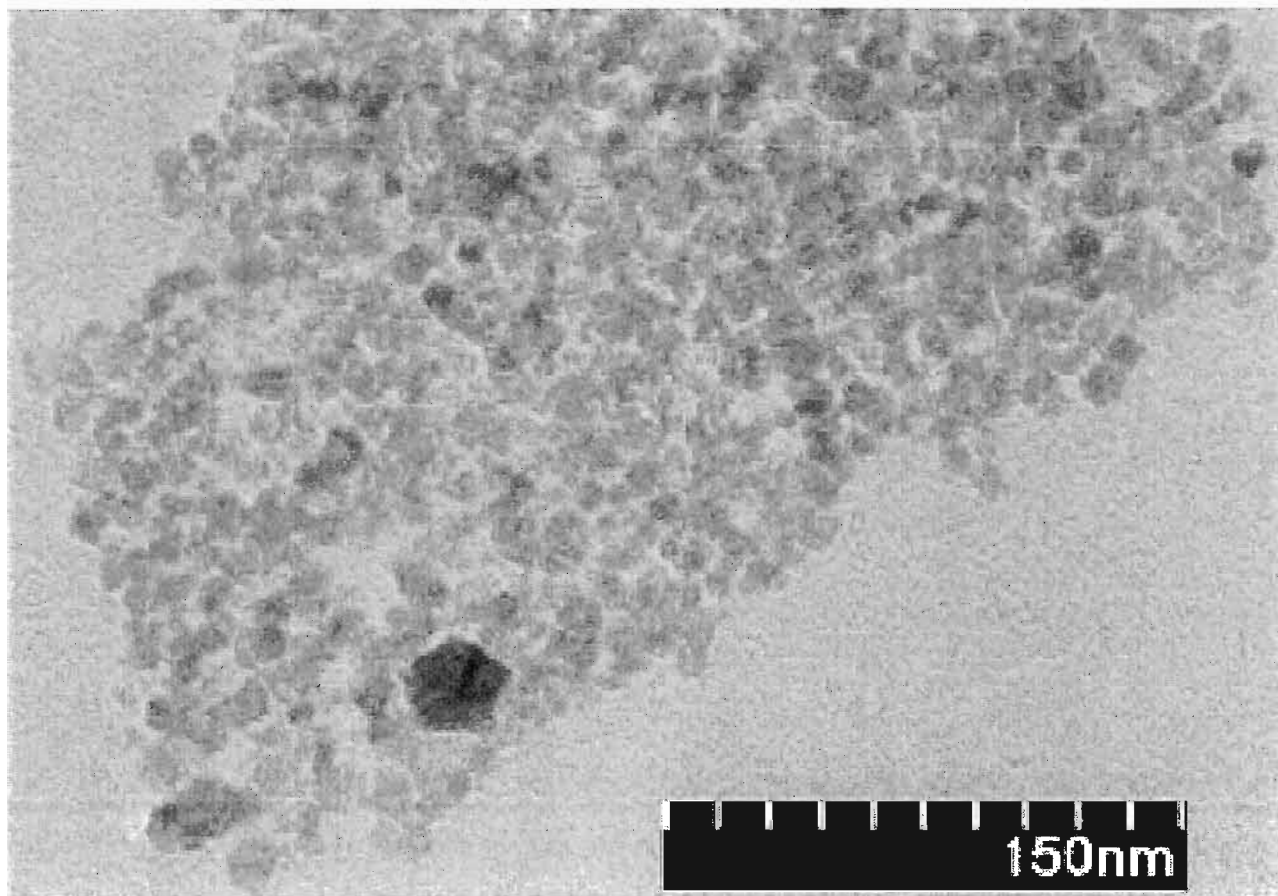


Figura 4.