



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2020 00591**

(22) Data de depozit: **18/09/2020**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/05/2024** BOPI nr. **5/2024**

(41) Data publicării cererii:
30/03/2021 BOPI nr. **3/2021**

(73) Titular:
• **UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE
ASACHI" DIN IAȘI, STR. PROF. DR. DOC.
DIMITRIE MANGERON NR. 67, IAȘI, IS, RO**

(72) Inventatori:
• **STAN CORNELIU SERGIU, STR. ȚUȚORA
NR.7C, BL.E3, SC.C, ET.3, AP.16, IAȘI, IS,
RO;**
• **SECUA MARIUS-SEBASTIAN,
STR. MUȘATINI NR. 4, BL. M8, SC. A,
ET. 4, AP. 18, IAȘI, IS, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**SHUANGJIAO SUN, QINGWEN GUANB,
YAO LIU, BIN WEIB, YUANYUAN YANG,
ZHIQIANG YU, "HIGHLY LUMINESCENCE
MANGANESE DOPED CARBON DOTS",
CHINESE CHEMICAL LETTERS, VOL. 30,
PP. 1051-1054, 2019; RINKI KUMARI,
KUNAL PAL, PARIMAL KARMAKAR AND
SUMANTA KUMAR SAHU, "RESPONSIVE
Mn-DOPED CARBON DOTS FOR
WHITE-LIGHT-EMITTING DIODES,
FINGERPRINTING, AND BIOIMAGING",
APPLIED NANO MATERIALS pH, 2019**

(54) **PROCEDEU DE OBȚINERE A NANOSTRUCTURILOR
DE CARBON DOTS DOPATE CU MANGAN**



1 Inventția se referă la nanostructuri de carbon tip „Carbon Dots” dopate cu Mn^{2+} , care
2 prezintă activitate antitumorală permițând concomitent și creșterea contrastului în imagistica
3 medicală RMN, obținându-se astfel o platformă teranostică de tratare și investigare; precum
4 și la un procedeu de preparare a acestora. Nanostructurile de carbon sunt preparate prin
5 piroliza parțială a unui complex al Mn^{2+} cu N-Hidroxiftalimida. Efectul antitumoral al nano-
6 structurilor de carbon de tip „Carbon Dots” obținute prin piroliza parțială a unor precursori
7 imidici (N-Hidroxisuccinimida, N-Hidroxiftalimida) [C. S. Stan, P. Horlescu, L. E. Ursu, M.
8 Popa, C. Albu, *Facile preparation of highly luminescent composites by polymer*
9 *embedding of carbon dots derived from – hydroxyphthalimide*, Springer - Journal of
10 *Material Science* 52(1), pp. 185-196, 2017. doi10.1007/s1 0853-016-0320-y; C. S. Stan,
11 A. Coroaba, M. Popa, C. Albu, D. Sutiman, *One step synthesis of fluorescent Carbon*
12 *Dots through pyrolysis of N-hydroxysuccinimide*, RSC-Journal of Materials Chemistry
13 C 3, pp.789-795, 2014, doi: 10.1039/C4TC02382J] a fost evidențiat în prealabil de teste *in*
14 *vitro* și *in vivo* [C. E. Tiron, G. Luta, M. Butura, F. Zugun-Eloae, C. S. Stan, A. Coroaba,
15 E. L. Ursu, G. D. Stanciu, A. Tiron, *NHF-derived carbon dots: prevalidation approach*
16 *in breast cancer treatment*, Nature-Scientific Reports 10:12662, 2020, doi.10.1038/
17 s41598-020-69670-z; C. L. Savin, C. Tiron, E. Carasevici, C. S. Stan, S. A. Ibanescu, B.
18 Simionescu, C. A. Peptu, *Entrapment of N-Hydroxyphthalimide Carbon Dots in*
19 *Different Topical Gel Formulations: New Composites with Anticancer Activity*,
20 *Pharmaceutics* 11(7):303, 2019. doi: 10.3390/pharmaceutics1 1070303; C. E. Tiron, F.
21 Zugun-Eloae, C. A. Peptu, C. S. Stan, A. Tiron, *Imide derived carbon dots-a new*
22 *promising approach in cancer treatment*, Nano Sci Nano Tech Ind. J., 2019]. Prezența
23 Mn^{2+} în configurația chimică specifică acestor nanostructuri conduce la creșterea contrastului
24 în imagistica medicală obținută prin tehnici RMN.

25 Se cunosc nanostructuri de tip „Carbon Dots” dopate cu Fe^{3+} , cu emisie foto-
26 luminescentă intensă în zona albastră și verde a spectrului vizibil, dependentă de gradul de
27 hidratare, obținute prin piroliza parțială a unui complex Fe^{3+} -N-Hidroxiftalimida [C. S. Stan,
28 A. Coroaba, E. L. Ursu, M. S. Secula, B. C. Simionescu, *Fe(III) doped carbon nanodots*
29 *with intense green photoluminescence and dispersion medium dependent emission*,
30 *Nature-Scientific Reports* 9, 18893, 2019 doi: 10.1038/s41598-019-55264-x]. Au fost
31 preparate printr-un procedeu hidrotermal, nanostructuri fotoluminescente de tip „Carbon
32 Dots” dopate cu Mn^{2+} din citrat de sodiu și clorură de mangan utilizabile în detecția ionilor de
33 fier [S. Sun et al., *Highly luminescence manganese doped carbon dots*. Chin. Chem.
34 *Lett.* 30, 1051-1054, 2019, doi.10.1016/j.cclet.2019.01.014]. Nanostructuri de tip „Carbon
35 Dots” dopate cu Mn^{2+} cu fotoluminescență intensă în zona verde-portocalie a spectrului vizi-
36 bil, dependentă de pH, cu aplicații potențiale în domeniile dispozitivelor optice și pigmentilor
37 pentru amprentare, au fost preparate printr-un procedeu solvotermal din acid piromelitic și
38 clorură de mangan [R. Kumari, K. Pal, P. Karmakar, S KumarSahu, *pH-Responsive Mn-*
39 *Doped Carbon Dots for White-Light-Emitting Diodes, Fingerprinting, and Bioimaging*].
40 În alte abordări asemănătoare au fost preparate nanostructuri de tip „Carbon Dots” dopate
41 cu Zn^{2+} , cu aplicații în terapia osoasă și imagistica medicală [Y. Meng, M. Yang, X. Liu, W.
42 Yu, B. Yang, *Zn²⁺-Doped Carbon Dots, a Good Biocompatibility Nanomaterial Applied*
43 *for Bio-Imaging and Inducing Osteoblastic Differentiation in vitro*, Nano 14(03),
44 1950029, 2019, doi.10.1142/S1793292019500292] și „Carbon Dots” dopați cu Cu^{2+} obținuți
45 prin degradarea termică parțială a acidului citric în prezența azotatului de cupru, utilizabili la
46 detecția glucozei din probe biologice [Y. Duan, Y. Huang, S. Chen, W. Zuo, B. Shi, *Cu-*
47 *Doped Carbon Dots as Catalysts for the Chemiluminescence Detection of Glucose*,
ACS Omega 4(6), 9911-9917, 2019, doi.10.1021/acsomega.9b00738].

Au fost preparate nanostructuri de tip „Carbon Dots” cu acțiune antitumorală prin procesarea hidrotermală a uleiului de nuc [E. Arkan, A. Barați, M. Rahmanpanah, L. Hosseinzadeh, S. Moradi, M. Hajialyani, <i>Green Synthesis of Carbon Dots Derived from Walnut Oil and an Investigation of Their Cytotoxic and Apoptogenic Activities toward Cancer Cells</i> , <i>Adv. Pharm. Bull.</i> 8(1), pp.149-155, 2018, doi: 10.15171/apb.2018.018]. A	1
fost evidențiată activitatea antitumorală a unor nanostructuri de tip „Carbon Dots” obținute prin procesarea pirolitică a celulozei rezultate din frunze de bambus încărcate ulterior cu doxorubicină și acid 4-carboxibenzilborat [M. Z. Fahmi, A. Haris, A. J. Permana, D. L. NorWibowo, B. Purwanto, Y. L. Nikmah, A. Idris, <i>Bamboo leaf-based carbon dots for efficient tumor imaging and therapy</i> , <i>RSC Adv.</i> , 8, pp. 38376-38383, 2018, doi.10.1039/C8RA07944G]. Într-o abordare asemănătoare au fost preparate nanostructuri de tip „Carbon Dots” încărcate cu doxorubicină prin procesarea termică a unui amestec de citrat de sodiu și uree [Y. Sun, S. Zheng, L.Liu, Y. Kong, A. Zhang, K. Xu, C. Han, <i>The Cost-Effective Preparation of Green Fluorescent Carbon Dots for Bioimaging and Enhanced Intracellular Drug Delivery</i> , <i>Nanoscale Res. Leit.</i> , 15, 55, 2020, doi.10.1186/s11671-020-3288-0]. Nanostructurile de tip „Carbon Dots” dopate cu sulf prezintă interes în terapia fotodinamică neinvazivă în cazul tumorilor cu localizare bucală, fiind preparate prin metoda hidrotermală utilizând poli-tiofenul ca precursor [Q. Li, R. Zhou, Y. Xie, Y. Li, Y. Chen, X. Cai, <i>Sulphur-doped carbon dots as a highly efficient nanophotodynamic agent against oral squamous cell carcinoma</i> , <i>Cell Proliferation</i> 53(4), 2020, doi.10.1111/cpr.12786]. Platforme teranostice antitumorale pe bază de „Carbon Dots” dopate cu Ru ²⁺ au fost preparate prin metoda hidrotermală utilizând ca precursori acidul citric și un complex Ru(II)-5-amino-1,10-fenantrolină [L. Yue, H. Li, Q. Sun, J. Zhang, X. Luo, F. Wu, X. Zhu, <i>Red-Emissive Ruthenium-Containing Carbon Dots for Bioimaging and Photodynamic Cancer Therapy</i> , <i>ACS Appl. Nano Mater.</i> 3(1), pp. 869-876, 2020, doi.10.1021/acsnm.9b02394].	3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25
Agenții de contrast utilizați curent în imagistica medicală RMN sunt în majoritate complecși chimici de tip chelați ai unor elemente cu proprietăți paramagnetice precum Gd ³⁺ sau Mn ²⁺ [Y-D. Xiao, R. Paudel, J. Liu, C. Ma, Z-S. Zhang, S-K. Zhou, <i>MRI contrast agents: Classification and application (Review)</i> , <i>International J. of Molecular Medicine</i> 38(5), pp. 1319-1326, 2016, doi: 10.3892/ijmm.2016.2744; H-K. Kim, G. H. Lee, Y. Chang, <i>Gadolinium as an MRI contrast agent</i> , <i>Future Medicinal Chem.</i> 10(6), 2018, doi. 10.4155/fmc-2017-0215].	27 29 31 33
Principalele dezavantaje ale nanostructurilor de tip „Carbon Dots” utilizabile ca platforme teranostice antitumorale raportate până în prezent sunt:	35
- activitatea antitumorală este relativ limitată sau obținută prin adaos de compuși antitumorali clasici (exemplu: doxorubicină);	37
- utilizarea în imagistica medicală asociată este limitată la tehnici de fluorescență fiind neutilizabile în tehnici de investigare RMN;	39
- în unele cazuri există un potențial toxicologic crescut datorat conținutului suplimentar de compuși organici sau organo-metalici [D. V. Bower, J. Richter, K. Johannes, H. von Tengg-Kobligk, J. Heverhagen, M. V. Runge, <i>Gadolinium-Based MRI Contrast Agents Induce Mitochondrial Toxicity and Cell Death in Human Neurons, Toxicity Increases With Reduced Kinetic Stability of the Agent</i> , <i>Investigative Radiology</i> 54(8), pp. 453-463, 2019 doi: 10.1097/RLI.0000000000000567].	41 43 45

RO 134818 B1

1 Cele mai asemănătoare nanostructuri de tip „Carbon Dots” cu conținut de cationi din
grupele tranzitionale sunt cele dopate cu Fe^{3+} obținute dintr-un complex Fe^{3+} -N-Hidroxiftali-
3 midă la un raport de combinare metal/ligand de 1/3 [C. S. Stan, A. Coroaba, E. L. Ursu, M.
S. Secula, B. C. Simionescu, *Fe(III) doped carbon nanodots with intense green*
5 *photoluminescence and dispersion medium dependent emission*, *Nature-Scientific*
Reports 9, 18893, 2019 doi: 10.1038/s41598-019-55264-x] și cele preparate din acid citric
7 și un complex Ru(II)-5-amino-1,10-fenantrolină [L. Yue, H. Li, Q. Sun, J. Zhang, X. Luo, F.
Wu, X. Zhu, *Red-Emissive Ruthenium-Containing Carbon Dots for Bioimaging and*
9 *Photodynamic Cancer Therapy*, *ACS Appl. Nano Mater.* 3(1), pp. 869-876, 2020,
doi.10.1021/acsnm.9b02394].

11 Problema tehnică pe care își propune să o rezolve invenția este descrierea unui proce-
deu de obținere a unor nanostructuri de tip „Carbon Dots” care să prezinte concomitent atât
13 un efect antitumoral relevant cât și posibilitatea utilizării acestora ca agent de contrast în
investigațiile medicale prin tehnici RMN în condițiile menținerii unui nivel scăzut de toxicitate.

15 Procedeu conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că
complexul Mn(II)-N-hidroxiftalimidă este supus pirolizei parțiale la o temperatură de
17 235...240°C timp de 6 min, urmată de inundarea masei rezultate cu apă distilată răcită la
5...6°C iar dispersia rezultată este centrifugată în vederea selecției dimensionale a nano-
19 structurilor în intervalul 10...60 nm, urmată de liofilizarea acestora pentru obținerea nano-
structurilor de carbon dots dopate cu mangan în stare uscată sub forma unei pulberi fine
21 și care pot fi supuse re-dispersiei în mediu biologic compatibil.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

23 - obținerea unei platforme teranostice de investigare medicală prin imagistică RMN
și tratament antitumoral eficient;

25 - investigările preliminare indică un grad de toxicitate redus, acțiunea terapeutică
antitumorală afectează minimal celulele și țesuturile sănătoase;

27 - procedeu de preparare facil și scalabil la capacități de producție industrială.

29 Soluția problemei tehnice constă în obținerea unor nanostructuri de tip „Carbon Dots”
dopate cu Mn^{2+} prin procesarea pirolitică în condiții controlate de expunere termică a unui
31 complex al Mn^{2+} cu N-Hidroxiftalimida la un raport de combinare metal/ligand de 1/2 urmată
de dispersia inițială în mediul apos, selecție dimensională, uscare și re-dispersie într-un
33 mediu compatibil cu utilizarea în aplicații medicale ca agent antitumoral și de contrast în
imagistica RMN.

35 Conform invenției, prepararea nanostructurilor teranostice anti-tumorale implică
piroliză parțială la o temperatură de 235-240°C, în atmosferă de N_2 , a unui complex obținut
37 prin reacția într-un mediu format dintr-un amestec apă/etanol, dintre $MnCl_2$ și N-hidroxiftali-
midă la un raport de combinare de 1/2 care este în prealabil purificat și uscat. Complexul
este preparat prin dizolvarea sub agitare a cantităților corespunzătoare de MnCb și N-
39 Hidroxiftalimidă obținerii unui raport de combinare de 1/2, într-un amestec de apă/etanol
(60/40% volumetric). După finalizarea reacției de complexare, precipitatul rezultat este spălat
41 de 2-3 ori cu apă distilată și uscat la vid. Complexul Mn(II)-N-Hidroxiftalimidă este procesat
termic printr-un procedeu de piroliză parțială în atmosferă protectoare de N_2 la temperatura
43 de 235-240°C. Durata de expunere termică a precursorului (Mn(II)-N-Hidroxiftalimidă) este
de 6 min (+/-30 s) fiind esențială pentru obținerea unor nanostructuri de tip „Carbon Dots”
45 cu configurația fizico-chimică favorabilă aplicării ca agent de contrast RMN și tratament anti-
tumoral. După finalizarea fazei de piroliză, produsul rezultat este inundat brusc cu apă
47 distilată la temperatura de 5-6°C, dispersia rezultată fiind colectată din recipientul de piroliză.

RO 134818 B1

Dispersia apoasă este supusă unor operații succesive de centrifugare pentru selecția dimensională, supernatantul cu aspect limpede colectat conținând nanostructuri de tip „Carbon Dots” dopate cu Mn^{2+} , având o distribuție dimensională situată în intervalul 10-60 nm. Dispersia apoasă astfel rezultată este înghețată la $-25 \div -20^{\circ}C$ și apoi liofilizată, obținându-se nanostructuri de tip „Carbon Dots” dopate cu Mn^{2+} în stare uscată sub forma unei pulberi fine cu aspect galben-marونی. În vederea administrării, pulberea astfel rezultată se re-dispersează în apă la concentrația necesară pentru obținerea efectului terapeutic sau conform cerințelor specifice investigației RMN.

În continuare este prezentat un exemplu de realizare a invenției în vederea obținerii nanostructurilor de carbon tip „Carbon Dots” dopate cu Mn^{2+} , cu activitate antitumorală și utilizare ca agent de contrast în imagistica medicală RMN.

Exemplul 1

Procedura experimentală tipică implică prepararea în prealabil a complexului Mn(II)-N-Hidroxifitalimidă prin dizolvarea sub agitare energetică într-un amestec apă/etanol (30 ml/20 ml) a 0,5 g $MnCl_2$ anhidru și 1,3 g N-Hidroxifitalimidă. Reacția de complexare decurge la $40-45^{\circ}C$ sub agitare moderată într-un interval de timp de 20-24 h, obținându-se un precipitat cu aspect alb-gălbui. Precipitatul colectat este spălat cu apă bidistilată în 3 etape succesive și ulterior uscat la vid. Întreaga cantitate de complex Mn(II)-N-Hidroxifitalimidă rezultată sub formă de pulbere uscată este procesată termic într-un recipient de cuarț prevăzut cu o manta de încălzire. Procesul pirolitic se desfășoară în atmosferă protectoare de N_2 la o temperatură de $235-240^{\circ}C$ pe o durată de 6 min (+/- 30 s). După finalizarea etapei de expunere termică, produsul rezultat în recipientul de cuarț este inundat brusc cu circa 100 ml apă bidistilată la temperatura de $5-6^{\circ}C$. Dispersia apoasă brută astfel obținută este evacuată din recipientul de cuarț și procesată ultrasonic timp de 10 min. Dispersia apoasă este în continuare centrifugată la o turație de 10000 rpm timp de 10 min. Supernatantul colectat după prima centrifugare este din nou centrifugat la 15000 rpm timp de 15 min. Supernatantul cu aspect limpede obținut în urma centrifugării finale conține nanostructuri de tip „Carbon Dots” dopate cu Mn^{2+} cu o distribuție dimensională în intervalul 10-60 nm. În continuare, dispersia apoasă este înghețată la $-25 \div -20^{\circ}C$ și liofilizată. Nanostructurile de tip „Carbon Dots” dopate cu Mn^{2+} din dispersia apoasă prezintă o tendință de aglomerare, prin urmare, operația de răcire în vederea înghețării trebuie inițiată imediat după ultima operație de centrifugare. După liofilizare se obțin nanostructuri de tip „Carbon Dots” dopate cu Mn^{2+} în stare uscată sub forma unei pulberi fine cu aspect galben-marونی. Cantitatea rezultată de circa 350 mg pulbere uscată este depozitată în recipiente etanșe și re-dispersată în mediu apos la concentrația necesară în funcție de necesități.

RO 134818 B1

Revendicări

1

3

1. Procedeu de obținere a nanostructurilor de carbon dots dopate cu mangan, **caracterizat prin aceea că**, complexul Mn(II)-N-hidroxiŧalimidă este supus pirolizei parŧiale la o temperatură de 235...240°C timp de 6 min, urmată de inundarea masei rezultate cu apă distilată răcită la 5...6°C iar dispersia rezultată este centrifugată în vederea selecŧiei dimensionale a nanostructurilor în intervalul 10...60 nm, urmată de liofilizarea acestora pentru obŧinerea nanostructurilor de carbon dots dopate cu mangan în stare uscată sub forma unei pulberi fine și care pot fi supuse re-dispersiei în mediu biologic compatibil.

5

7

9

11

2. Nanostructuri de carbon dots dopate cu mangan obŧinute prin procedeul descris în revendicarea 1.

13

3. Utilizarea nanostructurilor de carbon dots dopate cu mangan în tratamente antitumorale și imagistică medicală.



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenŧii și Mărci
sub comanda nr. 202/2024