



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00101**

(22) Data de depozit: **09/03/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/09/2021 BOPI nr. **9/2021**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
DEZVOLTARE PENTRU FIZICA
MATERIALELOR (INCDFM),
STR.ATOMIȘTILOR, NR.405A, CP.MG-7,
MĂGURELE, IF, RO**

(72) Inventatori:
• **CRIȘAN DANIEL NICOLAE, STR.MIERLEI,
NR.16, MĂGURELE, IF, RO;**
• **ENACHE TEODOR ADRIAN, SAT NANOV,
COMUNA NANOV, TR, RO;**
• **DICULESCU VICTOR CONSTANTIN,
STR.NERVA TRAIAN, NR.16, BL.M35, SC.3,
ET.7, AP.88, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO**

(54) **PROCEDEU PENTRU FUNCȚIONALIZAREA
SUPRAFEȚELOR CU DENDRIMERI CU TERMINAȚII
HIDRAZIDĂ ȘI APLICAȚII ALE ACESTORA PENTRU
IMOBILIZAREA ȘI DETECȚIA DE (BIO)MOLECULELOR CE
CONȚIN GRUPĂRI CHIMICE CARBONIL**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui biosenzor electrochimic pentru detecția și cuantificarea (bio)moleculelor care conțin grupări carbonil. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de:

I) funcționalizare a suprafeței metalice, sticlă și/sau siliciu a electrodului, cu dendrimeri care conțin grupări funcționale hidrazidă, sintetizați direct pe suprafață din precursor de tip tiol-acid carboxilic sau tiol-amină,

II) imobilizarea compușilor de interes conținând grupări carbonil pe suprafața funcționalizată cu

formarea de legături covalente între (bio)molecule și dendrimer și

III) detecția grupărilor carbonil prin monitorizarea semnalelor electrochimice înainte și după interacția grupării hidrazidă de la suprafața funcționalizată cu grupările carbonil din (bio)molecule, cu regenerarea suprafeței pentru imobilizări ulterioare.

Revendicări: 3
Figuri: 4



Titlu:

PROCEDEU PENTRU FUNCȚIONALIZAREA SUPRAFEȚELOR CU DENDRIMERI CU TERMINAȚII HIDRAZIDĂ ȘI APLICAȚII ALE ACESTORA PENTRU IMOBILIZAREA ȘI DETECȚIA DE (BIO)MOLECULELOR CE CONȚIN GRUPĂRI CHIMICE CARBONIL

Elaborat de:

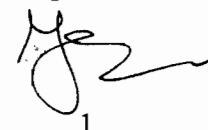
DANIEL NICOLAE CRISAN, TEODOR ADRIAN ENACHE, VICTOR CONSTANTIN DICULESCU

DESCRIERE

Prezenta invenție descrie un procedeu pentru imobilizarea și detecția pe suprafețe metalice sau cu conținut de siliciu a (bio)moleculelor ce conțin grupări chimice carbonil în vederea dezvoltării de senzori și biosenzori. Invenția presupune: i) funcționalizarea suprafețelor prin grefarea de la suprafață de dendrimeri cu grupări terminale hidrazidă; ii) imobilizarea (bio)moleculelor de interes prin reacția chimică dintre grupările hidrazidă și carbonil urmată de formarea de legături covalente între (bio)molecula de interes și dendrimer; iii) detecția grupărilor carbonil prin monitorizarea semnalelor electrochimice înainte și după interacția grupărilor hidrazidă de la suprafața funcționalizată cu grupările carbonil din (bio)molecule.

Dendrimerii sunt molecule polimerice monodisperse, precis definite structural și morfologic, sferice și simetrice în jurul nucleului. Aceste proprietăți prezintă un avantaj în folosirea dendrimerilor în aplicații precum sisteme de administrare a medicamentelor, transfecție genetică [1], senzori și biosenzori, sisteme de administrare a pesticidelor și insectidelor, imitatori de hemoglobina [2]. În domeniul senzorilor, dendrimerii sunt folosiți pentru detectarea protonilor/pH-ului, detecție de cationi, stingerea semnalului de fluorescență, printre altele. Dendrimerii pot fi sintetizați în vederea obținerii de cavități cu dimensiuni și specificități bine definite pentru a obține sisteme cu selectivitate mare. În general, dendrimerii sunt sintetizați prin reacții chimice de tip "click" [3], în urma unor metode divergente sau convergente.

În metoda divergentă, nucleul multifuncțional este extins spre exterior printr-o serie de reacții condiționate de o rata de conversie completă, necesară pentru a preveni neconformități în structura dendrimerului. Fiecare reacție incompletă se propagă de la o generație la alta, rezultând în ramificații ale dendrimerului mai scurte decât cele prevăzute teoretic, fapt ce poate afecta atât structura cât și funcționalitatea produsului final. Datorită proprietăților fizico-chimice similare între dendrimerul pur și impurități, purificarea celor dintâi devine dificilă.



Metoda convergentă presupune combinarea moleculelor mici, dinspre exterior spre nucleul dendrimerului, ceea ce permite eliminarea facilă a impurităților și a brațelor dendrimerice de dimensiuni reduse. Datorită propagării dinspre exterior spre nucleu, dimensiunile acestor tipuri de dendrimeri sunt semnificativ mai reduse comparativ cu cei obținuți prin metoda divergentă care impune limitări datorate efectelor sterice.

Funcționalizarea suprafețelor presupune conferirea de proprietăți și activități chimice unor substraturi de altfel inerte sau slab active. Funcționalizarea cu materiale polimerice se face prin grefarea pe și de la suprafață, doua metode cu avantaje și dezavantaje proprii.

Grefarea pe suprafața presupune sinteza în prealabil a dendrimerului de interes prin reacții în soluție, și depunerea prin metode fizice sau prin legătură chimică la suprafața substratului. Aceasta metoda este în prezent preferată, întrucât caracterizarea materialului polimeric are loc înainte de grefare folosind tehnici de caracterizare în soluție sau pe pulberi. Dezavantajele acestei metode sunt legate de etapele de sinteză chimică ale moleculelor polimerice, etape care necesită de multe ori mai mulți pași precum și purificări complexe dar și expunere la substanțe periculoase. În plus, reacțiile în soluție necesită și costuri mari aferente etapelor de sinteză și purificare deoarece în acest caz sunt folosite concentrații și cantități mari de precursori (de ordinul gramelor), contrar grefării de la suprafață, proces care necesită cantități de substanță semnificativ mai mici (micrograme, nanograme sau chiar mai puțin).

Grefarea polimerilor de la suprafață presupune ancorarea prin legătură chimică a unor precursori ce pot alipi prin legături chimice monomerii, inițiatorii sau agenții de transfer de lanț, în vederea polimerizării printr-o reacție heterogenă soluție/substrat. Această metodă permite funcționalizarea suprafețelor în regim mono-strat și oferă posibilitatea ajustării densității de grefare prin controlarea concentrației superficiale a precursorilor. Această proprietate permite prepararea unor suprafețe mono-strat versatile, cu grosimea și arhitectură polimerică ajustabilă. Grefarea de la suprafață prezintă și avantaje de ordin sintetic derivate din sinteza de heterogenă soluție/substrat. Purificarea se face facil prin extragerea substratului din soluția de reacție, și spălarea suprafeței pentru îndepărtarea impurităților neatașate chimic pe suprafață. Tehnica permite folosirea unor concentrații mai scăzute de precursori și evitarea folosirii substanțelor nocive des întâlnite în etapele de purificare. Dezavantajele acestei metode sunt legate în primul rând de complexitatea caracterizării moleculelor aflate la suprafață, dar tehnicile moderne de caracterizare a suprafețelor au început să complementeze cu succes tehnicile tradiționale de analiza în soluție sau pe pulberi.

Hidrazidele și grupările carbonil reacționează chimic rezultând în formarea de legături covalente de tip hidrazonă și apă ca produs secundar de reacție. Aceste legături reversibile aparțin aceleiași familii ca iminele și oximele cu precizarea că, hidrazononele sunt stabile în mediu apos între pH 5 și 7, oximele între pH 2 și 7 pe când iminele nu sunt stabile în mediu apos. Din aspectul reversibilității și

a reacției fără produși secundari, alții decât apa, hidrazidele prezintă o soluție elegantă pentru imobilizarea la suprafață a compușilor de interes ce conțin grupări carbonil, permițând totodată regenerarea suprafeței pentru imobilizări ulterioare.

În general, metodele utilizate pentru detectarea și cuantificarea grupărilor carbonil se bazează pe derivatizarea acestora cu dinitrofenilhidrazină, prin reacții similare cu cele mai sus descrise. Dinitrofenilhidrazina este în general detectată prin metode spectrofotometrice [4,5] sau prin teste imunochimice [6]. Alte metode precum electrochimia [7], electroforeza [8], fluorescența [9] și spectrometria de masă [10,11] au fost de asemenea aplicate, în general pentru identificare și cuantificarea grupărilor carbonil din peptidele și proteinele oxidate. Senzorii electrochimici au avantajul dezvoltării rapide și al detecției în timp real oferind o sensibilitate ridicată și posibilitatea cuantificării analiților la costuri reduse, ceea ce reprezintă factori importanți pentru scalabilitate comercială. Ca atare, detectarea electrochimică a grupărilor carbonil rezultate ca urmare a leziunilor oxidative induse de radicali hidroxil în proteine s-a efectuat cu proteina adsorbită la suprafața unui film nanobiocompozit modificat depus pe suprafața electrodului de carbon sticlos, care a fost incubat cu reactivi Fenton. Cu toate acestea, în scop analitic, elementul de detecție trebuie să fie o moleculă capabilă să recunoască grupări carbonil și să detecteze o gamă largă de concentrații.

Scopul invenției din prezenta cerere este de modificare a suprafețelor metalice sau de siliciu cu (bio)molecule ce conțin grupări chimice carbonil folosind dendrimeri cu terminații de tip hidrazidă pentru dezvoltarea de (bio)senzori. Deși în cazul general al polimerilor există numeroase exemple de grefare de la suprafață utilizând polimerizarea prin metodele RAFT sau ATRP, în cazul specific al dendrimerilor se apelează la metoda grefării pe suprafață, dendrimerii fiind sintetizați anterior în soluție, metodă ce prezintă dezavantaje precum cele expuse anterior.

Invenția se adresează dezvoltării tehnicii/metodelor chimice de funcționalizare a suprafețelor cu dendrimeri ce conțin grupări funcționale de tip hidrazidă cu proprietăți de formare a legăturilor covalente cu (bio)molecule ce prezintă la rândul lor grupări funcționale de tip carbonil. (Bio)moleculele ce prezintă grupări carbonil sunt molecule din următoarele familii de compuși chimici: aldehide, cetone, amino acizi, lipide, acizi carboxilici, glucide, acizi nucleici și proteine.

Avantajele cheie aduse de prezenta metodă rezolvă problemele critice ale metodelor deja existente de imobilizare și detecție a (bio)moleculelor ce prezintă grupări carbonil și sunt:

- i) posibilitatea sintezei dendrimerilor direct pe suprafață;
- ii) reducerea timpului de sinteză;
- iii) evitarea etapelor de purificare și a utilizării de solvenți organici scumpi și/sau toxici;
- iv) obținerea unei suprafețe de electrod cu conținut ridicat de grupări funcționale;
- v) obținerea unei suprafețe funcționalizate capabilă de a interacționa și reține/imobiliza (bio)molecule prin intermediul grupărilor carbonil;

vi) obținerea de senzori electrochimici pentru detectarea și cuantificarea de grupări carbonil.

Se dă în continuare un exemplu de realizarea a invenției, în legătură cu Figurile 1, 2, 3 și 4 ce reprezintă:

Figura 1. Reprezentare schematică a pașilor necesari funcționalizării suprafeței de aur cu dendrimer cu precursor de tip tiol-acid carboxilic.

Figura 2. Reprezentare schematică a pașilor necesari funcționalizării suprafeței de aur cu dendrimer cu precursor de tip tiol-amină.

Figura 3. Evaluarea procesului de sinteză a dendrimerului prin spectroscopia în infraroșu cu transformata Fourier.

Figura 4. Evaluarea electrochimică a procesului de interacție dintre grupările hidrazida ale dendrimerului grefat la suprafața electrodului și grupările carbonil din (bio)molecule.

În Figurile 1 și 2 se ilustrează schematic posibilitatea sintezei dendrimerilor direct pe suprafață, fără a fi nevoie de sinteze chimice în soluție prin etape lungi și purificări complicate, precum și fără a fi nevoie de solvenți organici scumpi și toxici. Metoda permite sinteza predominant în apă și reduce timpul total de la ordinul săptămânilor la o durată de 1-2 zile, realizându-se în 12 pași. Există două procedee.

Procedeu 1. Precursor de tip tiol-acid carboxilic:

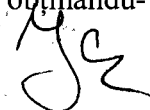
- 1) substratul se imersează într-o soluție etanolică de acid 11-mercaptoundecanoic timp de până la 48 de ore, dar nu mai puțin de 2 ore, preferabil 24 ore (Figura 1, pasul a);
- 2) substratul se extrage din baia de imersie, se clătește cu etanol și se introduce timp de 15 minute în baie de ultrasonicare cu etanol;
- 3) se extrage din baia de etanol, se spală cu apă distilată și se introduce într-o baie de ultrasunete cu apă distilată timp de 15 minute;
- 4) se extrage substratul din baia de apă și se usucă sub un flux de azot sau argon, obținându-se substratul funcționalizat cu precursor cu terminație carboxilică;
- 5) substratul funcționalizat cu precursor se imersează timp de o ora, într-o soluție apoasă de tris(2-aminoetil)amină de concentrație de până la 10 mM, în care se adaugă un exces de până la 30 mM hidrociorura de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC-HCl) dar nu mai mult de 3 ori cantitatea de tris(2-aminoetil)amină (Figura 1, pasul b), obținându-se substratul funcționalizat cu amină;
- 6) substratul se extrage din baia de reacție, se clătește cu apă și se introduce în baie de ultrasonicare cu apă timp de 15 minute;
- 7) substratul funcționalizat cu amină se imersează timp de o ora, într-o soluție apoasă de acid trimelic de concentrație de până la 10 mM, în care se adaugă un exces de până la 30 mM

hidroclorura de *N*-(3-dimetilaminopropil-*N*'-etilcarbodiimida (EDC-HCl) dar nu mai mult de 3 ori cantitatea de acid trimesic (Figura 1, pasul c);

- 8) pașii 5 - 7 se repetă alternativ până ce sfera exterioară conține acid carboxilic. Fiecare repetiție a pasului 5 constituie o generație a dendrimerului (*n* repetiții echivalând cu *n* generații, unde $n \leq 5$);
- 9) substratul funcționalizat cu acid carboxilic se imersează timp de o oră într-o soluție apoasă de Boc-hidrazidă de concentrație de până la 10 mM în care se adaugă un exces de până la 30 mM hidroclorura de *N*-(3-dimetilaminopropil-*N*'-etilcarbodiimida (EDC-HCl) dar nu mai mult de 3 ori cantitatea de hidrazidă (Figura 1, pasul d);
- 10) substratul se extrage din baia de reacție, se clătește cu apă și se introduce într-o baie de ultrasonica cu apă timp de 15 minute, proces urmat de uscarea sub flux de azot sau argon;
- 11) substratul se imersează în soluție de acid trifluoroacetic timp de cel puțin 5 minute dar nu mai mult de 15 minute;
- 12) substratul se extrage din baia de reacție, se clătește cu apă și se usucă sub flux de azot sau argon.

Procedeu 2: Precursor de tip tiol-amină:

- 1) substratul se imersează într-o soluție etanolică de 4-aminotiofenol timp de până la 48 de ore, dar nu mai puțin de 2 ore, preferabil 24 ore (Figura 2, pasul a);
- 2) substratul se extrage din baia de imersie, se clătește cu etanol și se introduce timp de 15 minute în baie de ultrasonicare cu etanol;
- 3) se extrage din baia de etanol, se spală cu apă distilată și se introduce într-o baie de ultrasunete cu apă distilată timp de 15 minute;
- 4) se extrage substratul din baia de apă și se usucă sub un flux de azot sau argon, obținându-se substratul funcționalizat cu precursor cu terminație amină;
- 5) substratul funcționalizat cu amină se imersează timp de o oră într-o soluție apoasă de acid trimesic de concentrație de până la 10 mM, în care se adaugă un exces de până la 30 mM hidroclorură de *N*-(3-dimetilaminopropil-*N*'-etilcarbodiimidă (EDC-HCl) dar nu mai mult de 3 ori cantitatea de acid trimesic (Figura 2, pașii b și d);
- 6) substratul se extrage din baia de reacție, se clătește cu apă, și se introduce în baie de ultrasonicare cu apă timp de 15 minute;
- 7) substratul funcționalizat cu acid carboxilic se imersează timp de o oră într-o soluție apoasă de tris(2-aminoetil)amină cu concentrație de până la 10 mM, în care se adaugă un exces de până la 30 mM hidroclorură de *N*-(3-dimetilaminopropil-*N*'-etilcarbodiimidă (EDC-HCl) dar nu mai mult de 3 ori cantitatea de tris(2-aminoetil)amină (Figura 2, pasul c), obținându-se substratul funcționalizat cu amină.



- 8) pașii 5 - 7 se repetă alternativ până ce sfera exterioară conține acid carboxilic. Fiecare repetiție a pasului 7 constituie o generație a dendrimerului (n repetiții echivalând cu n generații, unde $n \leq 5$);
- 9) substratul funcționalizat cu acid carboxilic se imersează timp de o oră într-o soluție apoasă de Boc-hidrazidă de concentrație de până la 10 mM în care se adaugă un exces de până la 30 mM hidrociorura de *N*-(3-dimetilaminopropil-*N*'-etilcarbodiimida (EDC-HCl) dar nu mai mult de 3 ori cantitatea de hidrazidă;
- 10) substratul se extrage din baia de reacție, se clătește cu apă și se introduce într-o baie de ultrasonica cu apă timp de 15 minute, proces urmat de uscarea sub flux de azot sau argon;
- 11) substratul se imersează în soluție de acid trifluoroacetic timp de cel puțin 5 minute dar nu mai mult de 15 minute (Figura 2, pasul e);
- 12) substratul se extrage din baia de reacție, se clătește cu apă și se usucă sub flux de azot sau argon.

În vederea obținerii de dendrimeri cu hidrazide de la suprafețe de sticlă și/sau siliciu se pot folosi precursori din clasa aminosilanilor precum (3-aminopropil)triethoxisilanul, (3-aminopropil)trimetoxisilanul, [3-(2-aminoetilamino)propil]trimetoxisilan. În cazul suprafețelor de aur pot fi folosiți ca precursori, în afara celor două exemple mai sus menționate, cisteamina, acidul 4-mercaptobenzoic, acidul mercaptoacetic, acidul 4-mercaptobutiric și acidul 4-mercaptofenilacetic.

Figura 3 ilustrează spectrele în infraroșu cu transformata Fourier obținute după fiecare pas de sinteza, schematic reprezentat în Figura 1. Aceste spectre sunt necesare pentru evidențierea grupărilor funcționale obținute la suprafața după fiecare etapă de sinteză așa cum acestea au fost descrise în Procedul 1. Semnalele specifice fiecărui compus chimic adăugat în urma fiecărui pas al sintezei sunt identificate prin această metodă.

În Figura 4 se ilustrează posibilitatea transducerii interacției dintre grupările hidrazidă din structura dendrimerului grefat de la suprafața electrodului de aur și grupările carbonil din structura unei (bio)molecule. Interacția dintre grupările carbonil și cele hidrazidă se realizează prin incubarea electrodului funcționalizat cu dendrimer cu hidrazidă în soluție apoasă a (bio)moleculei cu grupări carbonil. Electrocul se extrage din soluția unde a fost incubat, se clătește cu apă și se imersează în celula electrochimică cu electrolit de suport tampon fosfat 0.1 M pH 7.0. Transducerea interacției se face prin înregistrarea unei voltamograme urmărind scăderea semnalului analitic de oxidare electrochimică a hidrazidei (Figura 4a), sau prin înregistrarea unui spectru de impedanță electrochimică urmărind creșterea impedanței sistemului (Figura 4b).

REVENDICĂRI

1. Procedeu pentru funcționalizarea suprafețelor de aur și/sau de siliciu, caracterizat prin aceea că se realizează prin greșarea de la suprafață de dendrimeri cu grupări terminale hidrazidă.
2. Procedeu pentru imobilizarea (bio)moleculelor ce conțin grupări chimice carbonil pe suprafețe de aur și de siliciu funcționalitate cu dendrimeri cu grupări terminale hidrazidă, caracterizat prin aceea că se obțin conform revendicării 1. Imobilizarea se obține prin formarea de legături covalente între grupările hidrazidă ale dendrimerului și grupările carbonil ale moleculelor de interes. (Bio)moleculele ce prezintă grupări carbonil pot fi orice molecule din următoarele familii de compuși chimici: aldehide, cetone, amino acizi, lipide, acizi carboxilici, glucide, acizi nucleici și proteine.
3. Procedeu pentru detecția grupărilor carbonil din (bio)molecule, caracterizat prin aceea că se monitorizează semnalele electrochimice înainte și după interacția grupărilor hidrazidă de la suprafața de aur sau de siliciu funcționalitate cu dendrimeri cu grupări terminale hidrazidă obținute conform revendicării 1.



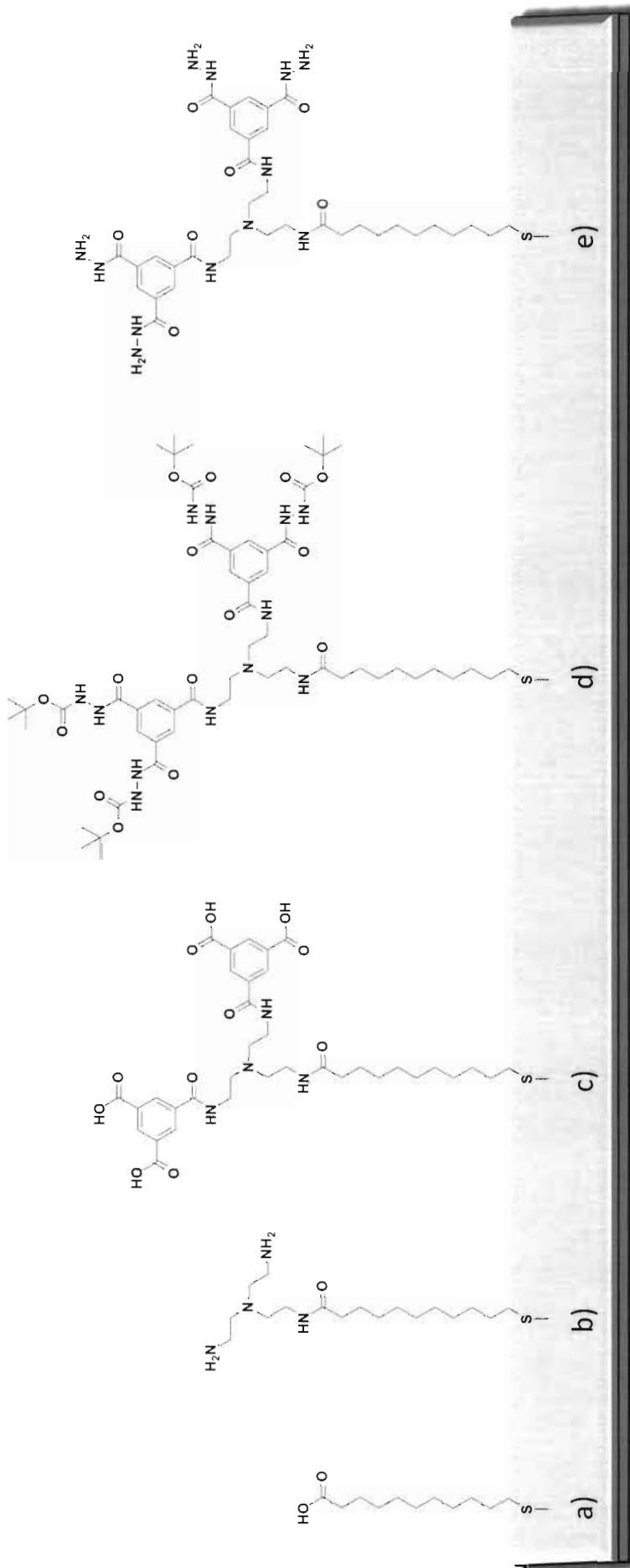


Figure 1



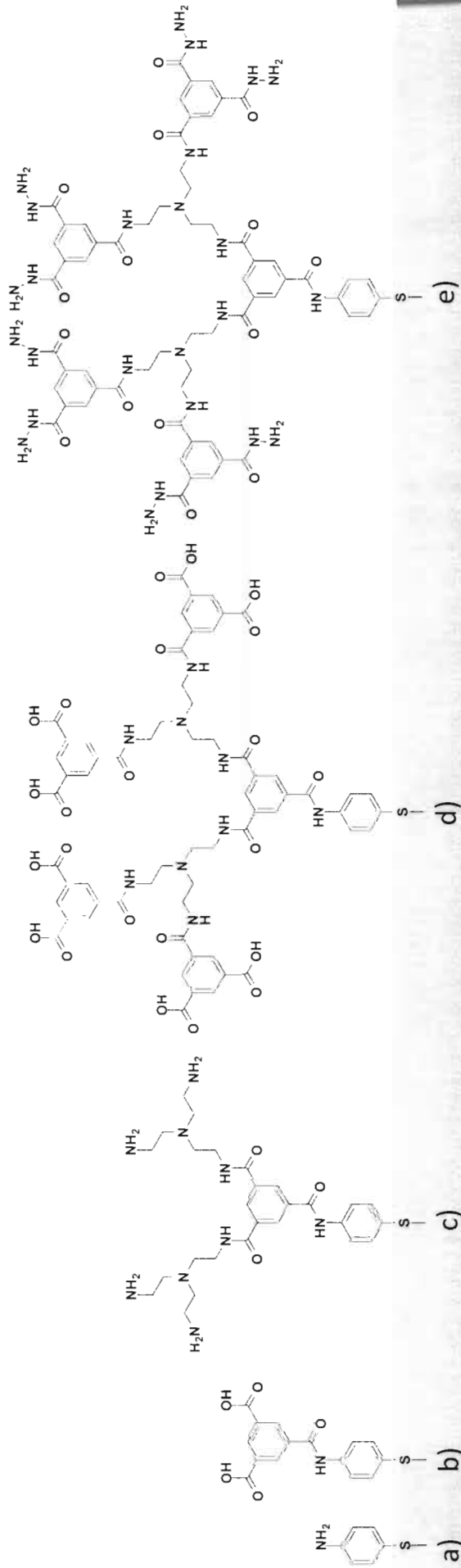


Figura 2

A handwritten signature is present in the bottom right corner, overlaid on a circular stamp. The stamp contains text that is partially illegible but appears to include 'INSTITUTO DE QUÍMICA' and 'UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO'.

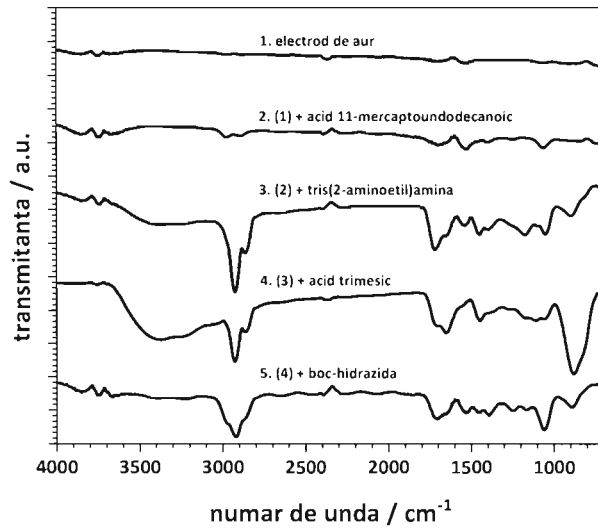


Figura 3

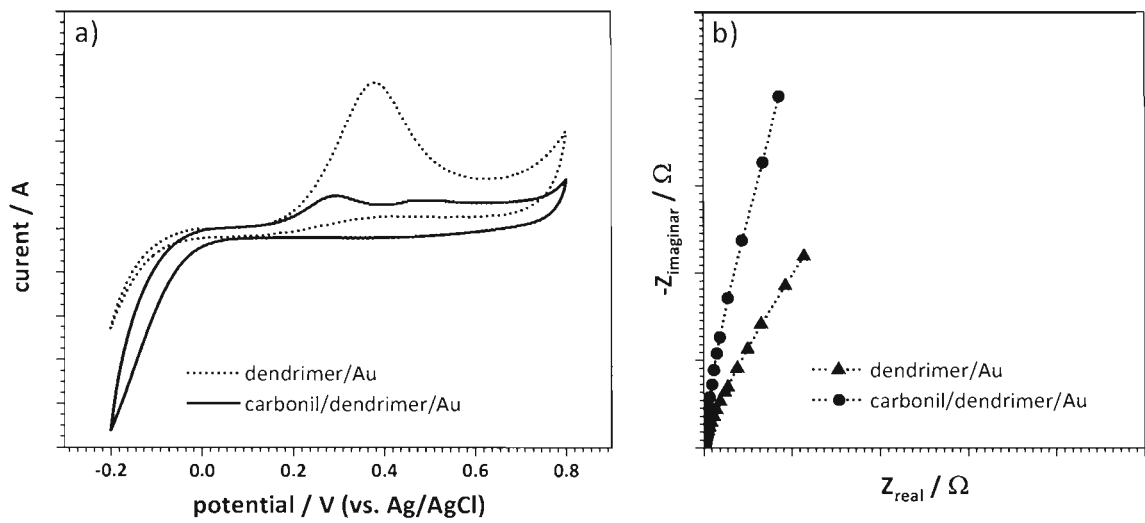


Figura 4