



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2017 00637**

(22) Data de depozit: **29/09/2017**

(41) Data publicării cererii:
29/03/2019 BOPI nr. **3/2019**

(71) Solicitant:

- **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU ȘTIINȚE BIOLOGICE BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 296, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **UNIVERSITATEA POLITEHNICA BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI, BD. MIHAIL KOGĂLNICEANU NR. 36-46, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:

- **RUSEN EDINA ANA-MARIA, STR. PECINEAGA NR. 10, BL. 17C, SC. 2, ET. 3, AP. 24, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **DIACON AUREL, STR. SOLD. ENE MODORAN NR. 6, BL. M94, SC. 1, ET. 2, AP. 12, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**

- **MOCANU ALEXANDRA, STR. AL. UCEA NR. 1A, BL. IV/2, SC. 1, ET. 3, AP. 24, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **BACALUM ELENA, STR.SERGEANT SCARLAT NR.2, BL.12, SC.2, AP.35, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **CHEREGI MIHAELA, STR.SIBIU NR.10, BL.OS1, SC.4, AP.146, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **DAVID VICTOR, BD.TIMIȘOARA NR.65, BL.D44, SC.H, AP.107, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **BUCUR BOGDAN, STR.CONSTANTIN RĂDULESCU MOTRU NR.6, BL.35, SC.C, ET.6, AP.125, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **BUCUR PETRUȚA MĂDĂLINA, STR.CONSTANTIN RĂDULESCU MOTRU NR.6, BL.35, SC.C, ET.6, AP.125, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **RADU GABRIEL LUCIAN, ALEEA ROTUNDĂ NR 4, BL. H6, SC. D, AP. 61, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **POLIMER IMPRENTAT MOLECULAR, OBTINUT PRIN POLIMERIZARE ÎN MASĂ PENTRU NITROFURANTOINĂ PENTRU REALIZAREA DE COLOANE DE EXTRACTIVE ÎN FAZA SOLIDĂ ȘI SENZORI ELECTROCHIMICI**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui polimer impreatat molecular (MIP), specific pentru nitrofurantoină. Procedeu conform invenției constă polimerizarea în masă pe baza monomerilor: acid acrilic, hidroxietil metacrilat, N-vinil pirolidonă și tetraetilenglicol dimetacrilat în prezență de peroxid de laurionil, rezultând un produs adsorbant stabil în timp, la

stocare la temperatura camerei având o capacitate de reținere a antibioticului din soluție de 4...5 μmol/g adsorbant.

Revendicări: 3

Figuri: 4

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



Polimer impreatat molecular obtinut prin polimerizare in masa pentru nitrofurantoina pentru realizarea de coloane de extractive in faza solida si senzori electrochimici

Inventia se refera la un polimer impreatat molecular (MIP) specific pentru nitrofurantoina obtinut prin polimerizare in masa destinat pentru a fi folosit drept sorbent in coloane de extractive in faza solida utilizate pentru pretratamentul probelor inaintea analizelor cromatografice si ca element de recunoastere in constructia de senzori impedimetrici.

Nitrofurantoina este un antibiotic din clasa nitrofuranului utilizat ilegal in zootehnie ca promotor de crestere. Reglementarile UE impun controlul alimentelor si raportarea tuturor loturilor contaminate pentru retragerea lor de pe piata in baza de date on-line RASFF (<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/index.cfm?event=searchResultList>, subiect: nitrofurantoina). In consecineta exista o nevoie de metode de analize fiabile, rapide si ieftine pentru detectarea nitrofurantoina.

Tehnicile de analiza actuale ale nitrofurantoina sunt lungi si costisitoare din cauza complexitatii matricei probei si a concentratiei scazute a analitilor si se impart in doua tipuri: analize cromatografice si (bio)senzori. Sunt cunoscute metode de analiza din ambele tipuri. Astfel o metoda cromatografica de analiza bazata pe concentrarea probelor prin concentrarea acestora prin extractie in faza solida (SPE) fiind capabila sa obtina limite joase de determinare, dar prezinta dezavantajul ca are o durata mai mare analiza [S.C. Moldoveanu, V. David, Modern Sample Preparation in Chromatography, Elsevier, Amsterdam, 2015, pag. 191]. O metoda de analiza rapida a nitrofurantoina se bazeaza pe masuratori de voltametrie in puls diferentiat utilizand electrozi modificati cu poli-(5-amino-2-mercapto-1,3,4-tiadiazole) si dsDNA adsorbit si a obtinut o curba de calibrare intre 2 si 25 mg/L nitrofurantoina dar are dezavantajul de a utiliza elemente biologice (dsDNA) extrase din organisme vii (pesti) ceea ce implica numeroase dezavantaje cum ar fi: un cost mare, o stabilitate redusa, probleme etice si variabilitate intre loturi [Aydoğdu, G., Günendi, G., Zeybek, D.K., Zeybek, B., Pekyardimci, S.: A novel electrochemical DNA biosensor based on poly-(5-amino-2-mercapto-1, 3,4-thiadiazole) modified glassy carbon electrode for the determination of nitrofurantoin. Sensors and Actuators, B: Chemical, 197, pp. 211-219, 2014]. Sunt raportati si MIP pentru nitrofurantoina obtinuti din monomeri cu diverse functionalitati [U. Athikomrattanakul, M. Katterle, N. Gajovic-Eichelmann and F. W. Scheller: Preparation and characterization of novel

molecularly imprinted polymers based on thiourea receptors for nitrocompounds recognition [Talanta, 2011, 84 274-279], dar au dezavantajul ca au o mica selectivitate.

Problema pe care o rezolva inventia este realizarea unui polimer imprimat molecular (MIP) pentru nitrofurantoina prin polimerizare in masa bazat pe monomerii acid acrilic, hidroxietil metacrilat, N-vinil pirolidona si tetraetilenglicol dimetacrilat. Metoda de sinteza a MIP conform inventiei are avantajele: stabil in timp, stocare la temperatura camerei, ieftin, simplu de realizat, reproductibil, nepoluant.

Metoda de producere a MIP conform inventiei consta in : amestecarea monomerilor cu initiatorul dupa cum urmeaza: 1.08 g acid acrilic, 0.39 g hidroxietil metacrilat, 3.33 g N-vinil pirolidona, 0.86 g tetraetilen glicol dimetacrilat si 0.1 g peroxid de lauroil.

MIP conform inventiei are doua utilizari practice:

- 1) pentru realizarea de extractii in faza solida (SPE) folosind coloane pentru pretraterea probelor inainte de analize cromatografice
- 2) realizarea de senzori electrochimici.

Se prezinta in continuare cate un exemplu de utilizare practica pentru ambele aplicatii.

Exemplu de realizarea de coloane SPE

Extracția în fază solidă (SPE) este o tehnică larg utilizată la concentrarea probelor lichide, utilizand ca mediu de reținere pentru specii din probe lichide un solid cu proprietăți adsorbante. In acest scop, MIP conform inventiei a fost introdus într-un cartuș format SPE, în cantitate exactă de 200 mg. Apoi cartușul conținand adsorbantul introdus a fost supus urmatoarelor operații specifice procedurii SPE, redate schematic in figura 1.

Absorbanța eluatului (A) este masurată la 365 nm care este lungimea de undă specifică nitrofurantoiniei. Valorile absorbanțelor au fost măsurate cu ajutorul unui spectrometru utilizând cuve de cuarț cu grosime de strat de 1 cm. Dependența absorbanței în funcție de de concentrația nitrofurantonei din soluție (C) a fost dată de ecuația: $A = 0.0043 + 0.038 C$ ppm). Aceasta a fost utilizată în exprimarea valorilor absorbanțelor măsurate pentru diferite fracții culese de eluat în valori de concentrație, pentru a se trasa curbele de eluție ce descriu proprietățile adsorbante ale materialelor sintetizate. Spectrele masurate si trasarea dreptei de calibrare pentru nitrofurantoina in solutii apoase sunt redate in figura 2.

Proprietățile adsorbante ale MIP conform inventiei au fost studiate pe solutii apoase de concentratie standard (10 ppm), care au fost supuse procedurii SPE descrisa mai sus. Curbele de

elutie obtinute din reprezentarea concentratiei in functie de volumul de proba aplicat pe cartuş containand MIP sau NIP ca material adsorbant sunt redate comparativ în figura 3.

Curbele din figura 3 demonstreaza că adsorbantul de tip MIP poate reţine din soluţia apoasă compusul nitrofurantoina, în timp ce adsorbantul de tip NIP este străpuns practic din primele volume de probe apoasă aplicate pe cartuş. Din curba de elutie corespunzătoare adsorbantului MIP se observa ca practic la un volum de 25 mL probe cumulate aplicate pe cartuş, acesta este strapuns. Acest volum se numeste chiar volum de strapungere, notat cu V_B , iar valoarea sa poate fi utilizata la calcularea capacitatii de retinere a adsorbantului Q_{ads} . Cunoscand concentratia initiala a solutiei de nitrofurantoina de 10 ppm, masa moleculara a nitrofurantoniei de 238,16 g/mol, masa adsorbantului din cartuş de 200 mg, s-a calculat valoarea capacitatii de retinere a adsorbantului, $Q_{ads} = 4,198 \mu\text{moli/g}$ adsorbant.

Nota: aceasta metoda SPE de tratare a probelor este doar un exemplu. Domeniul de aplicare a MIP dezvoltate conform inventiei in SPE este extins la toate tipurile de pretratare a probei prin SPE, in coloane putandu-se utiliza o cantitate diferita de MIP, trece un volum diferit de proba eventual prelucrata si elua cu diferiti solventi organici.

Exemplu de realizare a unui senzor electrochimic

Pentru detectia rapida a nitrofurantoiniei folosind MIP conform inventiei se realizeaza masuratori in impedanta folosind un sistem din trei electrozi: electrod indicator (WE) din aur modificat cu MIP care este utilizat pentru detectarea analitului, electrod auxiliar (CE) din platina pentru masurarea curentului si un electrod de referinta (RE) din Ag/AgCl//KCl 3M pentru masurarea unui potentia de referinta. Imobilizarea MIP pe suprafata WE este realizata prin inglobare in matrice fotopolimerizabila de PVA-Sbq. Deoarece PVA-Sbq nu are o aderenta mecanica buna pe suprafata de aur, a fost necesara realizarea unui strat autoasmbat tiolic care sa realizeze o punte intre WE de aur si PVA-Sbq. Astfel WE de aur proaspat curatat prin polisare a fost imersat timp de 15 min intr-o solutie de (3-mercaptopropil)trimethoxisilan diluata 1/10 in apa purificata. Gruparile tiol au afinitate pentru suprafata de aur curata si gruparile methoxi au afinitate pentru PVA-Sbq. WE cu stratul autoasmbat de (3-mercaptopropil)trimethoxisilan a fost spalata cu apa distilata, uscat un jet de argon si apoi a fost depus 0.3 mg MIP care au fost acoperite cu 3 μL de PVA-Sbq diluat 1/1 cu apa purificata. Electrozii au fost apoi expusi la o lampa de UV 366 nm pentru 15 minute si apoi uscati la temperatura camerei timp de 2 ore.

Masuratorile de impedanta s-au facut intr-o solutie de tampon fosfat pH=8,20 concentratie 0,05 M care contine cumplul redox $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ de concentratie equimolara 0,01 M prin aplicarea un potential DC de +120 mV peste care se suprapun potentiale AC de 10 mV RMS pentru 50

de frecvente între 10.000 și 0,1 Hz. Celula electrochimică a fost ținută într-o cutie Faraday în timpul măsurătorilor. În soluția de măsură au fost adăugate alicoturi dintr-o soluție standard de nitrofurantoină preparată în DMSO și electrozii modificați cu MIP conform invenției au fost lăsați timp de 15 min pentru a se adsorbi nitrofurantoină pe MIP. Semnalele analitice măsurate sunt reprezentate sub forma diagramei Niquist ($-Z''=f(Z')$) și interpolate folosind circuitul echivalent Randels din care se utilizează valoarea rezistenței transferului de sarcină (R_{ct}) drept element indicator pentru interacția MIP-nitrofurantoină. Reprezentarea grafică a R_{ct} în funcție de concentrația de furantoină a demonstrat o curbă de calibrare liniară între 5 și 150 mg/L Nitrofurantoină cu ecuația $\text{Conc}(\text{ppm}) = 0.0354 \times R_{ct} (\text{k}\Omega) + 5.2558$; $R^2 = 0.9243$ ($n=5$). Semnalele analitice obținute pentru măsurători sunt prezentate în figura 4.

Nota: Acest senzor impedimetric este doar un exemplu. Domeniul de aplicare al MIP dezvoltate conform invenției pentru realizarea de senzori electrochimici este extins la toate timpurile și materialele de electrozi și metodele de imobilizare a MIP pe suprafața WE.

Revendicari:

1. Polimer impreatat molecular obtinut prin polimerizare in masa a acidului acrilic, hidroxietyl metacrilat, N-vinil pirolidona si tetraetilen glicol dimetacrilat pentru nitrofurantoina caracterizat prin aceea ca:

- este realizat intr-o singura etapa simpla de polimerizare in masa
- se obtin produse netoxici
- polimerii sunt stabili in timp, stocare la temperatura camerei, ieftini, simplu de realizat, reproductibil, nepoluanti.

2. Metoda de extractie solida bazata pe MIP caracterizata prin aceea ca:

- retine selectiv nitrofurantoina in raport cu alti compusi din probe,
- capacitate pentru retinerea nitrofurantoina din solutie (4-5 micromoli/g adsorbant)

3. Senzor electrochimic bazat pe MIP caracterizat prin aceea ca:

- MIP este imobilizat pe suprafata electrodului indicator (WE)
- electrodul indicator cu MIP este lasat in contact cu solutia care contine nitrofurantoina
- masuratorile electrochimice sunt corelate cu interactia dintre MIP si nitrofurantoina.
- se face o curba de calibrare liniara intre semnalul analitic masurat si concentratia de nitrofurantoina.

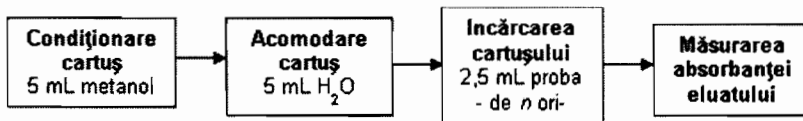


Figura 1. Etapele procedurii SPE utilizand MIP.

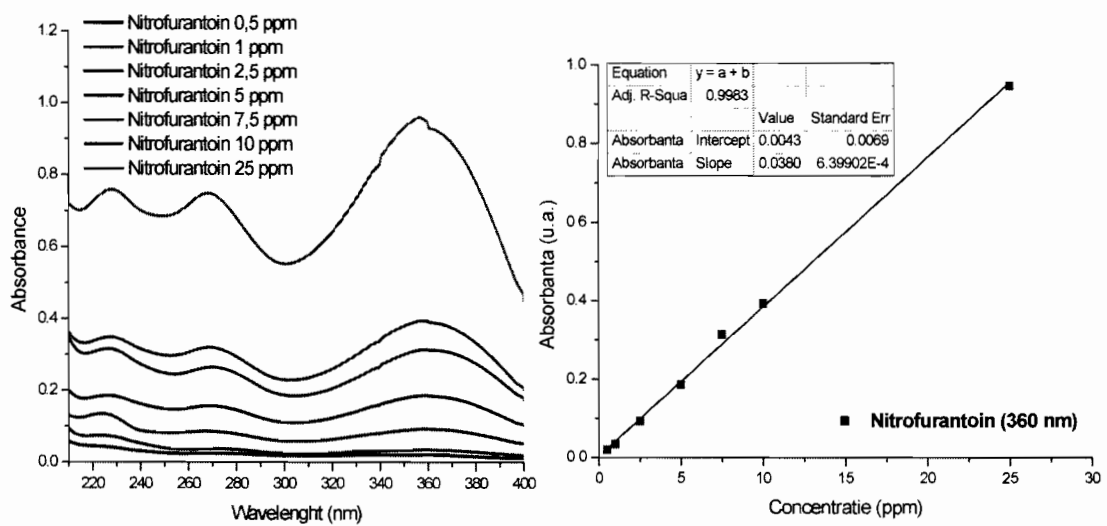


Figura 2. Sectrele de absorbtie UV-Viz ale nitrofurantoinii si curbe de calibrare obtinute pentru determinarea acestuia din solutiile rezultate din procedura SPE.

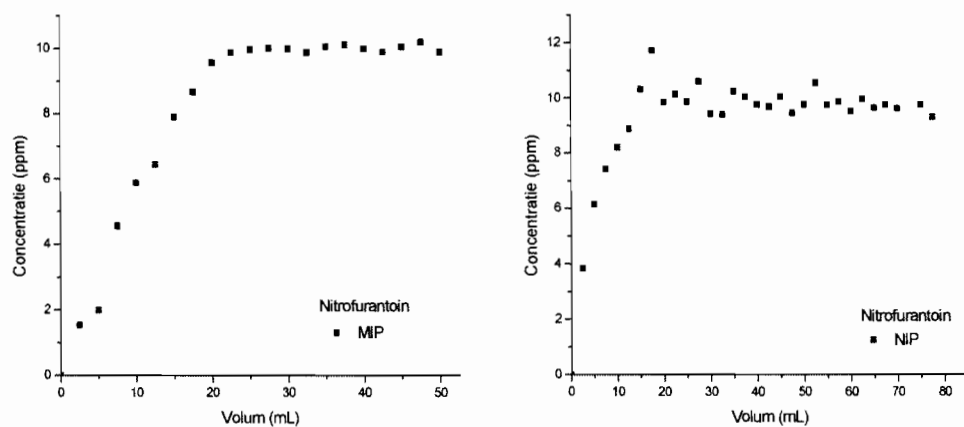


Figura 3. Curba de elutie obtinuta pe un cartus containd MIP (stanga); curba de de elutie obtinuta pe un cartus containd un adsorbant neimprentat cu nitrofurantoina (NIP).

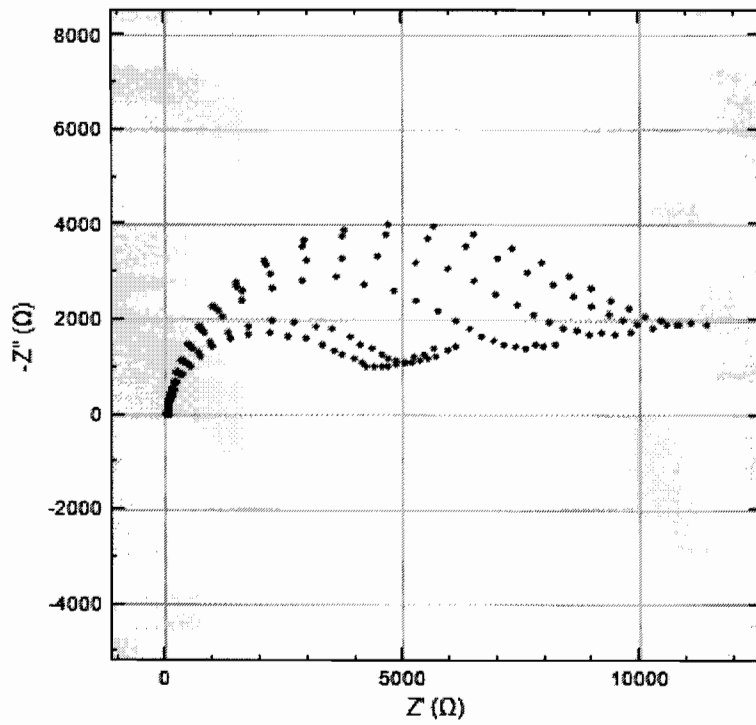


Figura 4. Reprezentarea Niquist a semnalelor analitice analitice obtinute pentru solutii cu concentratii 0-150 ppm nitrofurantoina. Semicercul creste cu valoarea concentratiei.