



(12)

BREVET DE INVENȚIE

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

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/03/2022** BOPI nr. **3/2022**

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

(73) Titular:

- **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU ȘTIINȚE BIOLOGICE BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 296, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN 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, STR. PECINEAGA NR.10, BL.17C, SC.2, ET.3, AP.24, 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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:

- SOPHI DAMAYANTI Ș.A., "DEVELOPMENT OF MOLECULAR IMPRINTED POLYMER SOLID PHASE EXTRACTION FOR SEPARATION NITROFURANTOIN RESIDUE IN CHICKEN EGGS", ASIAN J. PHARM. CLIN. RES, ISSUE 6, VOL. 10, PP. 108-111, 2017**

(54) **POLIMER IMPRENTAT MOLECULAR
PENTRU IDENTIFICAREA NITROFURANTOINEI**



1 Invenția se referă la un polimer impreatat molecular (MIP) specific pentru nitro-
2 furantoină obținut prin polimerizare în masă destinat pentru a fi folosit drept sorbent în
3 coloane de extractive în faza solidă utilizate pentru pretratamentul probelor înainte anali-
4 zelor cromatografice și ca element de recunoaștere în construcția de senzori impedimetrice.

5 Nitrofurantoina este un antibiotic din clasa nitrofuranului utilizat ilegal în zootehnie ca
6 promotor de creștere. Reglementările UE impun controlul alimentelor și raportarea tuturor
7 loturilor contaminate pentru retragerea lor de pe piață în baza de date on-line RASFF
8 (<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/index.cfm?event=searchResultList>,
9 subiect:nitrofurantoina). În consecință există o nevoie de metode de analize fiabile, rapide
și ieftine pentru detectarea nitrofurantoina.

11 Tehnicile de analiză actuale ale nitrofurantoina sunt lungi și costisitoare din cauza
12 complexității matricei probei și a concentrației scăzute a analiților și se împart în două tipuri:
13 analize cromatografice și (bio)senzori. Sunt cunoscute metode de analiză din ambele tipuri.
Astfel o metodă cromatografică de analiză bazată pe concentrarea probelor prin
15 concentrarea acestora prin extracție în faza solidă (SPE) fiind capabilă să obțină limite joase
de determinare, dar prezintă dezavantajul că are o durată mai mare analiză [S.C.
17 **Moldoveanu, V. David, *Modern Sample Preparation in Chromatography*, Elsevier,
Amsterdam, 2015, pag. 191]. O metodă de analiză rapidă a nitrofurantoina se bazează pe
19 măsurători de voltametrie în puls diferențiat utilizând electrozi modificați cu poli-(5-amino-2-
mercapto-1,3,4-tiadiazol) și dsDNA adsorbit și a obținut o curbă de calibrare între 2 și 25
21 mg/L nitrofurantoina dar are dezavantajul de a utiliza elemente biologice (dsDNA) extrase
din organisme vii (pești) ceea ce implică numeroase dezavantaje cum ar fi: un cost mare, o
23 stabilitate redusă, probleme etice și variabilitate între loturi [Aydoğdu G., Günendi G.,
Zeybek D.K., Zeybek B., Pekyardimci S.: *A novel electrochemical DNA biosensor
25 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,
27 197, pp. 211-219, 2014]. Sunt raportați și MIP pentru nitrofurantoină obținut din monomeri
cu diverse funcționalități [U. Athikomrattanakul M. Katterle N. Gajovic-Eichelmann and
29 F. W. Scheller. *Preparation and characterization of novel molecularly imprinted
polymers based on thiourea receptors for nitrocompounds recognition, Talanta, 2011,
31 84 274-279], dar au dezavantajul că au o mică selectivitate. În articolul [S. DamayantL, U.
Gunawan S. Ibrahim: *Development of molecular imprinted polymer solid phase
33 extraction for separation nitrofurantoin residue in chicken eggs, Asian Journal of
Pharmaceutical and Clinical Research, 2017, 6, 108-111] sinteza MSP s-a realizat în
35 prezența a 6 monomeri în soluție, folosind ca solvent dimetilformamida. Cei 6 monomeri
utilizați au fost: acid acrilic, hidroxietil metacrilat, acid metacrilic, acrilamida, alcool alilic și p-
37 vinil benzoic acid. Studiul nostru are avantajul de a realiza o polimerizare în masă, în
absența solventului, utilizând doar 4 monomeri: acid acrilic, hidroxietil metacrilat, N-vinil
39 pirolidona și tetraetilenglicol dimetacrilat. Lipsa solventului înseamnă viteza de polimerizare
mai mare, implicit un timp de reacție mai scurt, ceea ce se traduce prin economie de energie.
41 Mai mult de atât și utilizarea unui număr inferior de monomeri înseamnă o reducere
semnificativă de preț.*****

43 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în detectarea rapidă a
nitrofurantoina.

45 Polimerul impreatat molecular pe bază de acid acrilic, obținut prin polimerizare în
46 masă conform invenției, constă în polimerizarea în masă a acid acrilic:2-hidroxietil meta-
47 crilat:N-vinil pirolidona:tetraetilen glicol dimetacrilat:peroxid de lauroil:nitrofurantoină într-un

RO 133210 B1

raport molar de 35:7:70:6:1, prin încălzirea la o temperatură de 75°C, timp de 2 h, urmată de îndepărtarea completă a nitrofurantoini prin folosirea unei extracții convenționale cu un amestec apă și dimetilformamidă într-un extractor de tip Soxhlet timp de 7 zile, rezultând un produs cu o capacitate pentru reținerea nitrofurantoini din soluție de 4-5 μmoli/g adsorbant.	1
Utilizarea polimerului obținut prin procedeul conform invenției, pentru identificarea nitrofurantoini, fie sub forma unui cartuș pentru extracție în fază solidă, fie sub forma unui senzor electrochimic prin depunere pe un electrod de aur.	3
Procedeul de sinteză a MIP conform invenției are avantajele:	5
- stabil în timp, stocare la temperatura camerei, ieftin, simplu de realizat, reproductibil, nepoluant;	7
- metoda conduce la obținerea de polimeri netoxici;	9
- polimerii sunt stabili în timp, stocarea se realizează la temperatura camerei. Astfel producția de polimeri imprantați prin această metodă este ieftină, simplu de realizat, iar sinteza este reproductibilă;	11
- polimerii sunt simplu de realizat.	13
În continuare se dă un exemplu de realizare a invenției, care are legătură și cu figurile care reprezintă:	15
- fig. 1, interacția între nitrofurantoină și monomerii utilizați prin crearea de punți de hidrogen;	17
- fig. 2, etapele procedurii SPE utilizând MIP;	19
- fig. 3, spectrele de adsorbție UV-Viz ale nitrofurantoini și curba de calibrare, obținute pentru determinarea acesteia din soluțiile rezultate din procedura SPE;	21
- fig. 4, curba de eluție obținută pe un cartuș conținând MIP (stânga); curba de eluție obținută pe un cartuș conținând un adsorbant neimprantat cu nitrofurantoină (NIP);	23
- fig. 5, reprezentarea Niquist a semnalelor analitice obținute pentru soluții cu concentrații 0...150 ppm nitrofurantoină. Semicercul crește cu valoarea concentrației.	25
Procedeul de obținere a MIP conform invenției constă în: amestecarea monomerilor cu inițiatorul după cum urmează: 1,08 g acid acrilic, 0,39 g 2-hidroxietil metacrilat, 3,33 g N-vinil pirolidona, 0,86 g tetraetilen glicol dimetacrilat, 0,1 g peroxid de lauroil, și 1,9 g nitrofurantoina ca template, urmată de barbotare cu azot a amestecului și imersarea fiolei de polimerizare în baie de ulei la 75°C timp de 2 h. Tetraetilen glicolul dimetacrilat are rol de agent de reticulare. După 2 h de reacție MIP-ul obținut se spală cu etanol, în vederea îndepărtării monomerilor nereacționați și sunt supuși uscării la 70°C timp de 3 zile. Pentru a îndepărta nitrofurantoina, polimerul întâi a fost mojarat pentru a mari suprafața specifică și apoi supus unei extracții Soxhlet, cu apă și dimetilformamida la 100°C timp de 7 zile. Pentru comparație s-a realizat și NIP, în aceleași condiții, fără a introduce în reacție nitrofurantoina.	27
Monomerii fiind vinilici în principiu au reactivitate comparabilă și structura polimerului sintetizat în principiu respectă raportul molar inițial dintre monomeri. Metoda de interacție a nitrofurantoini cu monomerii este prezentat în fig. 1, formându-se astfel punți de hidrogen. Deoarece polimerizarea are loc în prezența nitrofurantoini în structura polimerului vor apare microstructuri poroase în care monomerii sunt aranjați spațial astfel încât să permită realizarea de punți de hidrogen cu nitrofurantoină. În ceea ce privește proprietățile fizice ale MIP, acesta este un polimer tip 3D insolubil, infuzibil, care se gonflează în amestec de apă și dimetilformamida. Se prezintă sub formă de granule micronice.	29
MIP conform invenției are două utilizări practice:	31
1) pentru realizarea de extracții în faza solidă (SPE) folosind coloane pentru pretratarea probelor înainte de analize cromatografice;	33
2) realizarea de senzori electrochimici.	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47
	49

RO 133210 B1

1 Se prezintă în continuare câte un exemplu de utilizare practică pentru ambele
aplicații.

3 Exemplu de realizarea de coloane SPE

4 Extracția în fază solidă (SPE) este o tehnică larg utilizată la concentrarea probelor
5 lichide, utilizând ca mediu de reținere pentru specii din probe lichide un solid cu proprietăți
adsorbante. În acest scop, MIP conform invenției a fost introdus într-un cartuș format SPE,
7 în cantitate exactă de 200 mg. Apoi cartușul conținând adsorbantul introdus a fost supus
următoarelor operații specifice procedurii SPE, redate schematic în fig. 2.

9 Absorbanta eluatului (A) este măsurată la 365 nm care este lungimea de undă
specifică nitrofurantoinii. Valorile absorbantelor au fost măsurate cu ajutorul unui spectro-
11 metru utilizând cuve de cuarț cu grosime de strat de 1 cm. Dependența absorbantei în funcție
de concentrația nitrofurantoinii din soluție (C) a fost dată de ecuația: $A = 0,0043 + 0,038$
13 C_{ppm} . Aceasta a fost utilizată în exprimarea valorilor absorbantelor măsurate pentru diferite
fracții culese de eluat în valori de concentrație, pentru a se trasa curbele de eluție ce descriu
15 proprietățile adsorbante ale materialelor sintetizate. Spectrele măsurate și trasarea dreptei
de calibrare pentru nitrofurantoina în soluții apoase sunt redate în fig. 3.

17 Proprietățile adsorbante ale MIP conform invenției au fost studiate pe soluții apoase
de concentrație standard (10 ppm), care au fost supuse procedurii SPE descrisă mai sus.
19 Curbele de eluție obținute din reprezentarea concentrației în funcție de volumul de probă
aplicat pe cartuș conținând MIP sau NIP ca material adsorbant sunt redate comparativ în
21 fig. 4.

23 Curbele din fig. 4 demonstrează că adsorbantul de tip MIP poate reține din soluția
apoașă compusul nitrofurantoina, în timp ce adsorbantul de tip NIP este străpuns practic din
primele volume de probe apoase aplicate pe cartuș. Din curba de eluție corespunzătoare
25 adsorbantului MIP se observă că practic la un volum de 25 mL probe cumulate aplicate pe
cartuș, acesta este străpuns. Acest volum se numește chiar volum de străpungere, notat cu
27 V_b , iar valoarea sa poate fi utilizată la calcularea capacității de reținere a adsorbantului Q_{ads} .
Cunoscând concentrația inițială a soluției de nitrofurantoină de 10 ppm, masa moleculară a
29 nitrofurantoinii de 238,16 g/mol, masa adsorbantului din cartuș de 200 mg, s-a calculat
valoarea capacității de reținere a adsorbantului, $Q_{ads} = 4,198 \mu\text{moli/g}$ adsorbant.

31 Notă: această metodă SPE de tratare a probelor este doar un exemplu. Domeniul de
aplicare a MIP dezvoltate conform invenției în SPE este extins la toate tipurile de pretratare
33 a probei prin SPE, în coloane putându-se utiliza o cantitate diferită de MIP, trece un volum
diferit de probă eventual prelucrată și elua cu diferiți solvenți organici.

35 Exemplu de realizare a unui senzor electrochimic

37 Pentru detecția rapidă a nitrofurantoinii folosind MIP conform invenției se realizează
măsurători în impedanță folosind un sistem din trei electrozi: electrod indicator (WE) din aur
modificat cu MIP care este utilizat pentru detectarea analitului, electrod auxiliar (CE) din
39 platină pentru măsurarea curentului și un electrod de referință (RE) din Ag/AgCl//KCl 3M
pentru măsurarea unui potențial de referință. Imobilizarea MIP pe suprafața WE este
41 realizată prin înglobare în matrice fotopolimerizabilă de PVA-Sbq. Deoarece PVA-Sbq nu are
o aderență mecanică bună pe suprafața de aur, a fost necesară realizarea unui strat
43 autoasamblat tiolic care să realizeze o punte între WE de aur și PVA-Sbq. Astfel WE de aur
proaspăt curățat prin polisare a fost imersat timp de 15 min într-o soluție de (3-mercapto-
45 propil)trimethoxisilan diluată 1/10 în apă purificată. Grupările tiol au afinitate pentru suprafața
de aur curată și grupările methoxi au afinitate pentru PVA-Sbq. WE cu stratul autoasamblat
47 de (3-mercaptopropil)trimethoxisilan a fost spălat cu apă distilată, uscat un jet de argon și
apoi a fost depus 0,3 mg MIP care au fost acoperite cu 3 μL de PVA-Sbq diluat 1/1 cu apă
49 purificată. Electrozii au fost apoi expuși la o lampă de UV 366 nm pentru 15 min și apoi
uscați la temperatura camerei timp de 2 h.

RO 133210 B1

Măsurătorile de impedanță s-au făcut într-o soluție de tampon fosfat pH = 8,20 concentrație 0,05 M care conține cumpiul redox $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ de concentrație	1
equimolară 0,01 M prin aplicarea un potențial DC de +120 mV peste care se suprapun	3
potențiale AC de 10 mV RMS pentru 50 de frecvențe între 10000 și 0,1 Hz. Celula electro-	
chimică a fost ținută într-o cușcă Faraday în timpul măsurătorilor. În soluția de măsură au	5
fost adăugate alicoturi dintr-o soluție standard de nitrofurantoină preparată în DMSO și	
electrozii modificați cu MIP conform invenției au fost lăsat timp de 15 min pentru a se adsorbi	7
nitrofurantoina pe MIP. Semnalele analitice măsurate sunt reprezentate sub forma diagramei	
Niquist ($-Z'' = f(Z^*)$) și interpolate folosind circuitul echivalent Randels din care se utilizează	9
valoarea rezistenței transferului de sarcină (Ret) drept element indicator pentru interacția	
MIP-nitrofurantoina. Reprezentarea grafică a Ret în funcție de concentrația de furantoină a	11
demonstrat o curbă de calibrare liniară între 5 și 150 mg/L Nitrofurantoina cu ecuația	
Conc(ppm) = 0,0354 x Ret (kΩ) + 5,2558; $R^2 = 0,9243$ (n = 5). Semnalele analitice obținute	13
pentru măsurători sunt prezentate în fig. 5.	
Nota: Acest senzor impedimetric este doar un exemplu. Domeniul de aplicare al MIP	15
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.	17

RO 133210 B1

Revendicări

1

3

1. Polimer imprenat molecular pe bază de acid acrilic, obținut prin polimerizare în masă, **caracterizat prin aceea că**, se polimerizează în masă acid acrilic:2-hidroxietil metacrilat:N-vinil pirolidonă:tetraetilen glicol dimetacrilat:peroxid de lauroil:nitrofurantoină într-un raport molar de 35:7:70:6:1, prin încălzirea la o temperatură de 75°C, timp de 2 h, urmată de îndepărtarea completă a nitrofurantoinii prin folosirea unei extracții convenționale cu un amestec apă și dimetilformamidă într-un extractor de tip Soxhlet timp de 7 zile, rezultând un produs cu o capacitate pentru reținerea nitrofurantoinii din soluție de 4-5 μmoli/g adsorbant.

5

7

9

11

2. Utilizarea polimerului obținut prin procedeul definit în revendicarea 1, pentru identificarea nitrofurantoinii, fie sub forma unui cartuș pentru extracție în fază solidă, fie sub forma unui senzor electrochimic prin depunere pe un electrod de aur.

(51) Int.Cl.

G01N 30/06 (2006.01);

G01N 27/02 (2006.01)

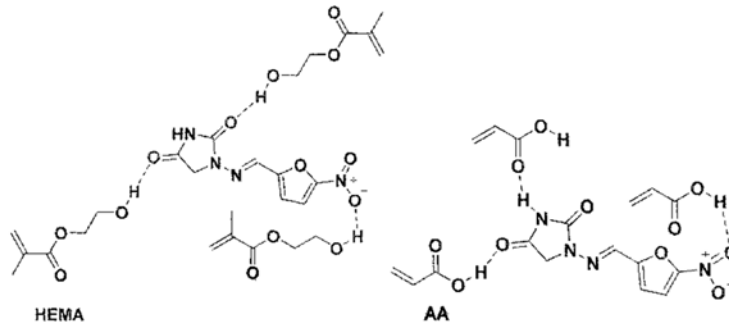


Fig. 1

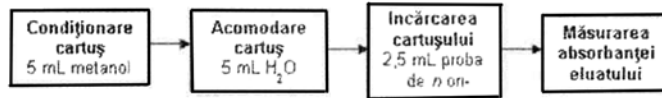


Fig. 2

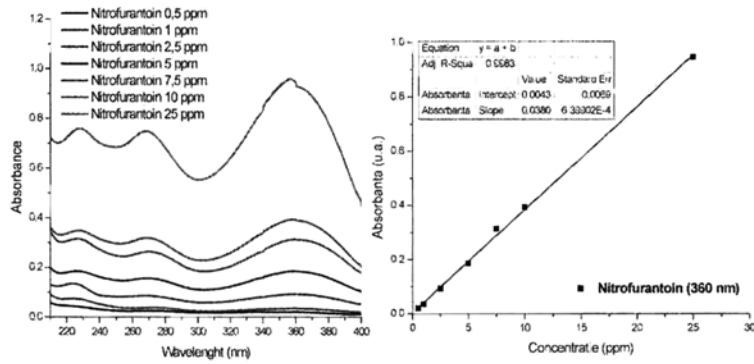


Fig. 3

(51) Int.Cl.

G01N 30/06 (2006.01),

G01N 27/02 (2006.01)

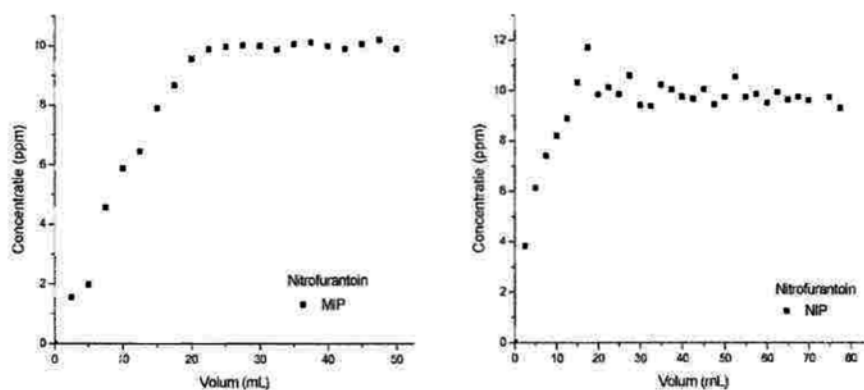


Fig. 4

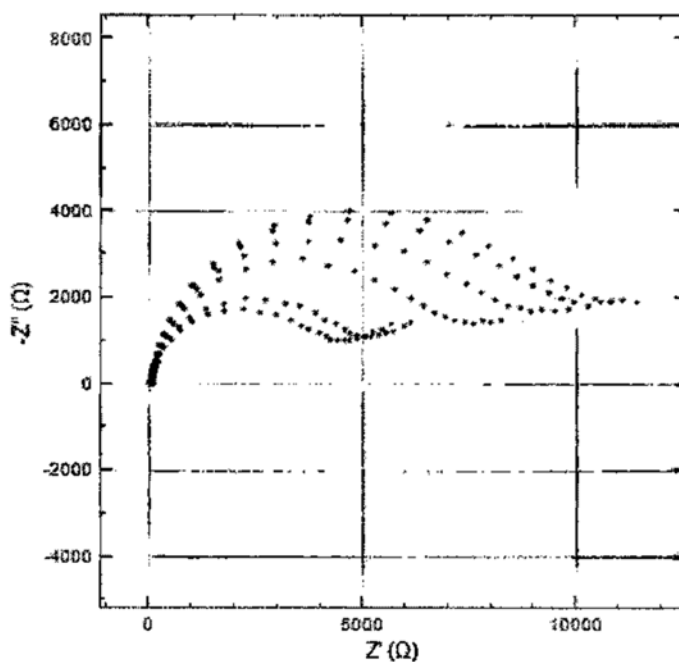


Fig. 5



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 138/2022