



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00707

(22) Data de depozit: 05/11/2019

(41) Data publicării cererii:
28/05/2021 BOPI nr. 5/2021

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• IORDACHE TANȚA VERONA,
ALEEA DOLINA, NR.6, BL.70, SC.1, ET.1,
AP.4, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• GAVRILĂ ANA MIHAELA,
BD. ALEXANDRU OBREGIA, NR.50,
BL.R11, SC.B, AP.69, ET.6, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
• SÂRBU ANDREI, STR.VALEA OLTULUI
NR. 16, BL.A28, SC.C, ET.2, AP.37,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;

• CHIRIAC ANITA LAURA,
INTRAREA CUCURUZULUI NR.20,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• CIURLICA ANA-LORENA, STR.BUZEȘTI,
NR.42, SAT BORDENII MARI,
COMUNA SCORȚENI, PH, RO;
• ZAHARIA ANAMARIA,
BD. ALEXANDRU OBREGIA NR.20 BIS,
BL.20 BIS, SC.A, ET.3, AP.14, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
• STOICA ELENA BIANCA,
SAT ȘERBĂNEASA NR.23,
COMUNA VALEA LUNGĂ, DB, RO;
• OLARU ANDREEA GABRIELA,
STR.BURNIȚEI, NR.60L, BL.60L, AP.21,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• COSAȘU DAN, STR. FELICIA RACOVIȚĂ
NR. 2-4, ET. 3, AP. 5, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;
• SANDU TEODOR, STR. PARÂNGULUI
NR. 43A, ET. 1, AP. 4, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) FILME MULTISTRATIFICATE NANOASAMBLATE
ANTIMICROBIENE ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE
A ACESTORA

(57) Rezumat:

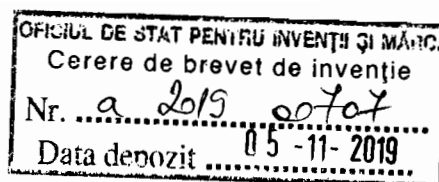
Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor filme multistratificate nanoasamblate antimicrobiene cu aplicații în tratarea apelor reziduale infestate cu bacterii gram-negative. Procedeu, conform invenției, constă în depunerea, prin metoda sol-gel, pe un suport de sticlă, a unui prim strat de compus organosilanic, peste care se adaugă un al doilea strat de polimer imprimat

molecular cu antigenul O al lipopolizaharidei, rezultând o suprafață sub formă de filme având capacitatea de reținere selectivă a antigenului O, cu o scădere a indicatorului de *E-coli* de la 2 CFU/50 ml la 0 și cel de *coliformi* de la 41 CFU/50 ml la 1.

Revendicări: 2

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).





FILME MULTISTRATIFICATE NANOASAMBLATE ANTIMICROBIENE ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTORA

Invenția se referă la filme multistratificate nanoasamblate antimicrobiene cu aplicații în tratarea apelor reziduale și la un procedeu de obținere a acestora. Lipopolizaharida (LPZ) este un constituent al membranei externe a bacteriilor gram negative. Ea se compune din polizaharide (antigenul O și oligozaharida nucleu) și din lipida A, iar structura acestor substanțe diferă în funcție de tipul de bacterie gram- negativa. Invenția de față se bazează pe cercetările proprii efectuate pentru a imobiliza prin imprimare moleculară antigenul O al lipopolizaharidei din membrana celulară a bacteriilor și în acest mod să fie distrusă bacteria respectivă. Imprimarea moleculară cu proteine este o metodă cunoscută pentru identificarea acestora sau pentru extragerea lor din matrici biologice.

Un procedeu de imprimare pe suprafața a unei proteine de bază: lipozima este prezentat în **Preparation of surface molecularly imprinted polymeric microspheres and their recognition property for basic protein lysozyme, Journal of Chromatography B, 878 (2010) 1731–1738** autori Baojiao Gao, Hongyan Fu, Yanbin Li, Ruikui Du, în care mai întâi s-a preparat un substrat prin copolimerizarea N-vinilpirolidonei cu 2- hidroxietilmetacrilat în suspensie inversă obținându-se perle de copolimer reticulate, apoi a avut loc o reacție de esterificare a grupărilor hidroxil de pe suprafața microsferelor cu clorură de metacrilat, introducând astfel pe suprafața acestora un mare număr de duble legături polimerizabile. În prezența templatului lipozimă, prin inițiere cu un sistem redox, s-a făcut polimerizarea reticulantă a acidului metacrilic. După îndepărtarea lipozimei de pe suprafața microsferelor s-au obținut particulele impregnate molecular cu lipozimă. Procedul are dezavantajul că pentru sinteza particulelor suport include multe faze și activarea suprafeței suportului este foarte laborioasă. Procedul nu s-a folosit pentru prepararea de suprafețe antibacteriene.

Un alt procedeu este prezentat în **Surface-Grafted Molecularly Imprinted Polymers for Protein Recognition, Analytical Chemistry, 73(2001) 5281-5286** autori Alessandra Bossi, Sergey A. Piletsky, Elena V. Piletska, Pier Giorgio Righetti, Anthony P. F. Turner, și constă din polimerizarea oxidativă, inițiată cu persulfat de amoniu a acidului 3-aminofenilboronic în prezența următoarelor proteine ca templat: microperoxidază, peroxidaza hreanului, lactoperoxidază și hemoglobină. Depunerea straturilor s-a făcut pe microplăci de polistiren. Procedul prezintă dezavantajul lucrului cu un monomer special, deci foarte scump. De asemenea metoda nu se folosește pentru obținerea de suprafețe antimicrobiene.

Un procedeu de imprimare a unei proteine prin metoda sol-gel este descris în **“Molecularly imprinted polymer grafted on polysaccharide microsphere surface by the sol-gel process for protein recognition”**, *Talanta* **74 (2008) 1247–1255** autori **Feng Li, Jing Li, Shu Sheng Zhang**, în care mai întâi s-au preparat particule sferice de chitosan puternic reticulate cu formaldehidă și apoi cu epiclorhidrină pentru a introduce grupe epoxidice. Particulele de polizaharidă modificată au fost tratate parțial pentru a recupera unele grupări aminice ale chitosanului și apoi au fost reacționate cu glutardialdehidă pentru a fi folosite ca suport -miez pentru imprimarea de suprafață. Apoi, molecula templat -albumina serică bovină- a fost imobilizată covalent în tampon borat pe suprafața particulelor prin formarea de legături iminice cu grupările aminice ale chitosanului. În continuare, 2 monomeri siloxanici: 3-aminopropiltrimetoxisiloxan: APTMS și tetraetoxisiloxan: TEOS s-au autoasamblat în jurul proteinei templat și ulterior au fost polimerizați la suprafața polizaharidei conținând proteina, prin reacție sol-gel, în soluție apoasă, la temperatura camerei. În final, templatul a fost îndepărtat prin tratare cu acid oxalic, rămânând cavitățile impregnate molecular cu proteina. Procedul prezintă dezavantajul că este foarte laborios, conține multe faze critice, cum ar fi prepararea particulelor suport și imobilizarea enzimei pe acestea, este o metodă de imobilizare covalentă, care presupune ruperea unor legături puternice pentru eliminarea templatului. Procedul nu s-a folosit pentru obținerea de suprafețe antibacteriene.

În lucrarea **“Development of lipid A-imprinted polymer hydrogels that selectively recognize lipopolysaccharides”**, *Biosensors and Bioelectronics* **38 (2012) 215–219** autori **Kei-Ichi Ogawa, Masumi Hyuga, Tomoko Okada, Norihiko Minoura** se descrie un procedeu de imprimare moleculară în hidrogel a lipidei A din LPZ. Procedul constă în folosirea ca monomeri funcționali a acrilolizinei și acriloilfenilalaninei, ca monomer de matrice a acrilamidei și ca reticulant a metilenbiscrilamidei (MBA) iar ca templat s-a folosit lipida A. După obținerea hidrogelului, templatul s-a extras prin spălare cu soluție de acid clorhidric sau de hidroxid de sodiu. Procedul are dezavantajul că utilizează ca monomeri funcționali doi monomeri foarte greu de preparat, neindustriali și deci foarte scumpi și ca monomer de matrice acrilamida, cunoscută ca fiind cancerigenă. În plus, imprimarea cu lipida A asigură reținerea LPZ dar nu asigură o activitate antimicrobiană, mai ales că hidrogelul este un mediu propice pentru proliferarea bacteriilor.

În brevetul **US 9329186 B2 (2016) “Imprinted polymers with affinity for phosphorylated peptides and proteins”** se descrie obținerea polimerilor impregnate molecular cu peptide și proteine fosforilate. Procedul folosește ca monomer funcțional monomeri pe bază de derivați arilici de uree sau tiouree. Dezavantajul acestui procedeu este că folosește monomeri foarte greu de preparat și scumpi, în plus,

polimerii imprențați molecular sunt destinați pentru scopuri de imagistică medicală sau pentru senzori optici și nu pentru suprafețe antimicrobiene.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în aceea că se prepară filme multistratificate antimicrobiene prin depunerea, prin sol-gel, pe suport de sticlă, a unui prim strat de compus organosilanic, peste care se adaugă un al doilea strat de polimer imprențat molecular prin metoda sol-gel, imprențarea având loc cu antigenul O al lipopolizaharidei, suprafețele astfel obținute având o capacitate de reținere selectivă a antigenului O, partea activă din membranele celulare externe ale bacteriilor gram negative și în acest mod distrugând aceste bacterii.

Filmele multistratificate nanoasamblate antimicrobiene conform invenției înlătură dezavantajele procedeelelor menționate anterior prin aceea că peste un suport de sticlă se formează un prim strat sol-gel prin reacția dintre 3- Mercaptopropil trimetoxisilan -MPTES și hidroxid de amoniu, în raport volumetric MPTES: soluție apoasă 25% de NH_4OH de 1: 3,5...4,5, peste care se formează un al doilea strat, de polimer sol-gel imprențat molecular, obținut prin reacția dintre 3-(2-trimetoxisilil)-propilmetacrilat -MAPTES cu hidroxid de amoniu, în raport volumetric MAPTES: soluție apoasă 25% de NH_4OH de 1: 5...6, format în prezența ca templat, a antigenului O din lipopolizaharida (LPZ), în raport de 50000 unitati de endotoxină, echivalent 50000 unitati antigen O, din LPZ la 0,10-0,15 mmoli MAPTES, templatul fiind extras ulterior din cel de al doilea strat, filmele astfel obținute prezentând activitate antibacteriană contra bacteriilor gram negative de tipul E-coli și coliformi, primul strat silanic depus pe sticlă fiind obținut prin dizolvarea MPTES în alcool etilic absolut, în raport volumeric MPTES: alcool etilic absolut de 1: 5...7, la temperatura de 20...30 °C, soluția precursoră alcoolică de MPTES fiind adăugată treptat, la 20...30 °C, timp de 1,5...2,5 ore, sub o agitare de 150... 350 rot/min peste o soluție catalitică formată din soluție apoasă de hidroxid de amoniu 25% și apă distilată, în raport apă: soluție 25% de NH_4OH de 1: 2...3, raportul între MPTES și soluția de hidroxid de amoniu 25% fiind de 1: 3,5...4,5, solul astfel obținut fiind pulverizat pe suportul de sticlă și lăsat timp de 15...45 minute la temperatura de 20...30 °C pentru gelifiere, iar cel de al doilea strat, imprențat molecular, fiind obținut prin dizolvarea MAPTES în alcool etilic absolut, în raport volumeric MAPTES: alcool etilic absolut de 1: 10...12, la temperatura de 20...30 °C, după care în această soluție se adăugă o soluție apoasă de 0,8-1,2 g/L de LPZ, iar raportul între soluția de LPZ și MAPTES fiind de 2,5...3:1, soluția precursoră alcoolică de MAPTES cu templat fiind adăugată treptat, timp de 1,5...2,5 ore sub o agitare de 150... 350 rot/min peste o soluție catalitică formată din soluție apoasă de hidroxid de amoniu 25%, raportul între MAPTES și soluția de hidroxid de amoniu fiind de 1: 5...6, solul astfel obținut fiind pulverizat peste primul strat silanic și lăsat la maturat 24...48 h la 20...30°C și încă 24...48 h la 45...55°C, după care filmele stratificate obținute pe

suportul de sticlă sunt spălate în 2- 3 reprize cu apă distilată în raport MAPTES: apă de 1:10...20 prin ultrasonare timp de 3...5 ore per porție, filmele având activitate antimicrobiană contra bacteriilor gram-negative de tipul E-coli și coliformi.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- Se utilizează un suport foarte ieftin și care se produce industrial și anume plăci de sticlă;
- Se folosesc monomeri comerciali, cu preț de cost relativ mic;
- Procedul propus este simplu în comparație cu alte procedee de imprimare cu proteine;
- Nu sunt probleme deosebite legate de protecția mediului sau a personalului;
- Filmele prezintă o foarte bună aderență la suport;
- Filmele nu necesită condiții speciale de păstrare putând fi folosite ca atare pentru aplicații de tratare a apelor infestate cu bacterii gram negative;
- Filmele pot fi ușor regenerate, datorită rezistenței mecanice foarte bune.
- Procesul de obținere a filmelor se desfășoară la temperaturi apropiate de temperatura camerei, ceea ce înseamnă un consum energetic redus.

Se dau în continuare exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1. Într-un pahar Berzelius de 10 mL se introduc 1,5 mL alcool etilic absolut și apoi 0,3 mL MAPTES. Se amestecă totul energic la temperatura camerei (20 °C) pentru o bună dizolvare, obținându-se soluția precursoră. În paralel, într-un pahar Erlenmayer cu dop rodat de 10 mL se introduc 1,05 mL soluție 25% de NH_4OH și 0,52 mL apă distilată și se agită pentru omogenizare, obținându-se soluția catalitică. În paharul Erlenmayer, aflat la temperatura camerei (20 °C) se introduce un corp teflonat de agitare magnetică și paharul Erlenmayer se plasează pe plita unui agitator magnetic neîncălzit și se pornește agitarea magnetică la 150 rot/min. Se începe introducerea treptată a soluției precursoră peste soluția catalitică. care durează 2,5 ore, când se obține solul 1. Solul 1 astfel realizat se pulverizează peste o lamelă de sticlă, bine curățată prin spălare cu apă și săpun și în final cu etanol pa.. Pentru policondensare se lasă lamela de sticlă cu primul strat silanic să stea la temperatura camerei (20 °C) timp de 45 minute. Între timp, într-un alt pahar Berzelius de 10 mL se introduc 2,4 mL alcool etilic absolut și 0,2 mL MAPTES și se amestecă energic la temperatura camerei (20 °C) pentru o bună dizolvare. Se mai adaugă 0,6 mL de soluție apoasă 0,8 g/L de LPZ și se agită pentru omogenizare se obține astfel soluția precursoră de imprimare la un raport de 50000 de unitati de endotoxină (echivalent 50000 de unitati antigen O) din LPZ la 0,15 mmoli MAPTES. Într-un alt pahar Erlenmayer de 10 mL, cu dop rodat, se introduc 1,2 mL soluție 25% de NH_4OH . Se plasează paharul Erlenmayer pe placa unui agitator magnetic, se introduce în el un corp teflonat de agitare magnetică și se pornește agitarea

la 350 rot/min. Se începe introducerea treptată a soluției precursorare de imprimare peste soluția de NH_4OH 25%. Introducerea durează 1,5 ore, rezultând solul 2. Solul 2 este pulverizat peste primul strat silanic de pe lamela de sticlă. Se lasă lamela cu cel de al doilea strat la maturare, la temperatura camerei ($20\text{ }^\circ\text{C}$), timp de 48 ore și apoi într-o etuvă timp de 24 ore la temperatura de $55\text{ }^\circ\text{C}$. Apoi, lamela se introduce într-un cristalizor și se adaugă peste ea 2 mL apă distilată. Se introduce cristalizorul într-o baie de ultrasonare, unde se lasă timp de 3 ore. Apoi, se scurge apa de extracție și se adaugă încă 2 mL apă distilată. Se ultrasonează din nou 3 ore. Se scurge apa de spălare și se adaugă din nou 2 mL apă distilată. Se ultrasonează încă 3 ore. În final se scoate lamela multistratificată din cristalizor și se lasă să se usuce în convecție liberă la temperatura camerei ($20\text{ }^\circ\text{C}$). Lamela cu filme stratificate astfel preparată a fost pusă în contact cu apa uzată, câte 50 mL/probă. După 24 ore indicatorul de E-coli a scăzut de la 2CFU/50 mL la zero și cel de coliformi de la 41CFU/50mL la 1.

Exemplul 2. Într-un pahar Berzelius de 10 mL se introduc 2,1 mL alcool etilic absolut și apoi 0,3 mL MPDES. Se amestecă totul energic, pe o plită magnetică, la temperatura de $30\text{ }^\circ\text{C}$, pentru o bună dizolvare, obținându-se soluția precursorare. În paralel, într-un pahar Erlenmayer cu dop rodat de 10 mL se introduc 1,35 mL soluție 25% de NH_4OH și 0,45 mL apă distilată și se agită pentru omogenizare, obținându-se soluția catalitică. În paharul Erlenmayer, se introduce un corp teflonat de agitare magnetică și paharul Erlenmayer se plasează pe plita unui agitator magnetic, aflată la temperatura de $30\text{ }^\circ\text{C}$, și se pornește agitarea magnetică la 350 rot/min. Se începe introducerea treptată a soluției precursorare peste soluția catalitică. Această introducere treptată durează 1,5 ore, când se obține solul 1. Solul 1 se pulverizează peste o lamelă de sticlă, bine curățată prin spălare cu apă și săpun și în final cu etanol pa. Se lasă lamela de sticlă cu primul strat silanic să stea la temperatura de $30\text{ }^\circ\text{C}$ pe plita agitatorului magnetic, pentru policondensare, timp de 15 minute. Între timp, într-un alt pahar Berzelius de 10 mL aflat pe plita unui agitator magnetic se introduc 2 mL alcool etilic absolut și 0,2 mL MAPDES și se amestecă energic la temperatura de 30 ° , pentru o bună dizolvare. Se mai adaugă 0,5 mL de soluție apoasă 1,2 g/L de LPZ și se agită pentru omogenizare. Se obține astfel soluția precursorare de imprimare, la un raport de 50000 de unitati de endotoxină (echivalent 50000 de unitati antigen O) din LPZ la 0,10 mmoli MAPDES. Într-un alt pahar Erlenmayer de 10 mL, cu dop rodat se introduce 1 mL soluție 25% de NH_4OH . Se plasează paharul Erlenmayer pe plita unui agitator magnetic incalzit la $30\text{ }^\circ\text{C}$, se introduce în el un corp teflonat de agitare magnetică și se pornește agitarea la 150 rot/min. Se începe introducerea treptată a soluției precursorare de imprimare peste soluția de NH_4OH 25%. Introducerea durează 2,5 ore. Solul 2 astfel obținut este pulverizat peste primul strat silanic de pe lamela de sticlă. Se lasă lamela cu cel de al doilea strat să stea la maturare, la temperatura de $30\text{ }^\circ\text{C}$, pe plita agitatorului

magnetic timp de 24 ore și apoi într-o etuvă timp de 48 ore la temperatura de 45 °C. Apoi, lamela se introduce într-un cristalizor și se adaugă peste ea 3 mL apă distilată. Se introduce cristalizorul într-o baie de ultrasonare , unde se lasă timp de 5 ore. Apoi se scurge apa de extracție și se adaugă încă 3 mL apă distilată. Se ultrasonează din nou 5 ore. În final se scoate lamela multistratificată din cristalizor și se lasă să se usuce în convecție liberă pe plita unui agitator magnetic incalzita la 30 °C. Lamela uscată. cu filme multistratificate astfel preparate a fost pusă în contact cu apa uzată, câte 100 mL/probă. Dupa 24 ore indicatorul de E-coli a scăzut de la 1 CFU/100 mL la zero și cel de coliformi de la 120 CFU/100 mL la 19.

Exemplul 3 Într-un pahar Berzelius de 10 mL se introduc 2 mL alcool etilic absolut și apoi 0,3 mL MPTES. Se amestecă totul energic, pe o plită magnetică, la temperatura de 28 °C, pentru o bună dizolvare, obținându-se soluția precursoră. În paralel, într-un pahar Erlenmayer cu dop rodat de 10 mL se introduc 1,25 mL soluție 25% de NH₄OH și 0,65 mL apă distilată și se agită pentru omogenizare, obținându-se soluția catalitică. În paharul Erlenmayer, se introduce un corp teflonat de agitare magnetică și paharul Erlenmayer se plasează pe plita unui agitator magnetic, aflată la temperatura de 28 °C, și se pornește agitarea magnetică la 200 rot/min. Se începe introducerea treptată a soluției precursoră peste soluția catalitică. Această introducere treptată durează 2 ore, când se obține solul 1. Solul 1 se pulverizează peste o lamelă de sticlă, bine curățată prin spălare cu apă și săpun și în final cu etanol pa. Se lasă lamela de sticlă cu primul strat silanic să stea la temperatura de 25 °C pe plita agitatorului magnetic, pentru policondensare, timp de 30 minute. Între timp, într-un alt pahar Berzelius de 10 mL aflat pe plita unui agitator magnetic se introduc 2,2 mL alcool etilic absolut și 0,2 mL MAPTES și se amestecă energic la temperatura de 25 °, pentru o bună dizolvare. Se mai adaugă 0,55 mL de soluție apoasă 1 g/L de LPZ și se agită pentru omogenizare. Se obține astfel soluția precursoră de imprimare, la un raport de 50000 de unitati de endotoxină (echivalent 50000 de unitati antigen O) din LPZ la 0,12 mmoli MAPTES. Într-un alt pahar Erlenmayer de 10 mL, cu dop rodat se introduce 1,1 mL soluție 25% de NH₄OH. Se plasează paharul Erlenmayer pe plita unui agitator magnetic incalzit la 25 °C, se introduce în el un corp teflonat de agitare magnetică și se pornește agitarea la 200 rot/min. Se începe introducerea treptată a soluției precursoră de imprimare peste soluția de NH₄OH 25%. Introducerea durează 2,2 ore. Solul 2 obținut este pulverizat peste primul strat silanic de pe lamela de sticlă. Se lasă lamela cu cel de al doilea strat să stea la maturare, la temperatura de 25 °C, pe plita agitatorului magnetic timp de 36 ore și apoi într-o etuvă timp de 30 ore la temperatura de 50 °C. Apoi lamela se introduce într-un cristalizor și se adaugă peste ea 4 mL apă distilată. Se introduce cristalizorul într-o baie de ultrasonare , unde se lasă timp de 4 ore. Apoi se scurge apa de extracție și se adaugă încă 3 mL apă distilată. Se ultrasonează din nou 4 ore. În final se scoate lamela multistratificată din cristalizor și se lasă să se usuce

în convecție liberă pe plita unui agitator magnetic incalzita la 23 °C. Lamela uscată, cu filme multistratificate astfel preparate a fost pusă în contact cu apa uzată, câte 100 mL/probă. După 24 ore indicatorul de E-coli a scăzut de la 3 CFU/100 mL la zero și cel de coliformi de la 100 CFU/100 mL la 12.

Exemplul 4 Într-un pahar Berzelius de 10 mL se introduc 1,8 mL alcool etilic absolut și apoi 0,3 mL MPDES. Se amestecă totul energic, pe o plită magnetică, la temperatura de 25 °C, pentru o bună dizolvare, obținându-se soluția precursoră. În paralel, într-un pahar Erlenmayer cu dop rodat de 10 mL se introduc 1,2 mL soluție 25% de NH₄OH și 0,5 mL apă distilată și se agită pentru omogenizare, obținându-se soluția catalitică. În paharul Erlenmayer, se introduce un corp teflonat de agitare magnetică și paharul Erlenmayer se plasează pe plita unui agitator magnetic, aflată la temperatura de 23 °C, și se pornește agitarea magnetică la 250 rot/min. Se începe introducerea treptată a soluției precursoră peste soluția catalitică. Această introducere treptată durează 2,2 ore, când se obține solul 1. Solul 1 se pulverizează peste o lamelă de sticlă, bine curățată prin spălare cu apă și săpun și în final cu etanol pa. Se lasă lamela de sticlă cu primul strat silanic să stea la temperatura de 27 °C pe plita agitatorului magnetic, pentru policondensare, timp de 35 minute. Între timp, într-un alt pahar Berzelius de 10 mL aflat pe plita unui agitator magnetic se introduc 2,1 mL alcool etilic absolut și 0,2 mL MAPDES și se amestecă energic la temperatura de 27 °, pentru o bună dizolvare. Se mai adaugă 0,55 mL de soluție apoasă 1,1 g/L de LPZ și se agită pentru omogenizare. Se obține astfel soluția precursoră de imprimare, la un raport de 50000 de unitati de endotoxină (echivalent 50000 de unitati antigen O) din LPZ la 0,11 mmoli MAPDES. Într-un alt pahar Erlenmayer de 10 mL, cu dop rodat se introduce 1,15 mL soluție 25% de NH₄OH. Se plasează paharul Erlenmayer pe plita unui agitator magnetic incalzit la 27 °C, se introduce în el un corp teflonat de agitare magnetică și se pornește agitarea la 180 rot/min. Se începe introducerea treptată a soluției precursoră de imprimare peste soluția de NH₄OH 25%. Introducerea durează 1,8 ore. Solul obținut este pulverizat peste primul strat silanic de pe lamela de sticlă. Se lasă lamela cu cel de al doilea strat să stea la maturare, la temperatura de 27 °C, pe plita agitatorului magnetic timp de 30 ore și apoi într-o etuvă timp de 40 ore la temperatura de 48 °C. Apoi, lamela se introduce într-un cristalizor și se adaugă peste ea 3 mL apă distilată. Se introduce cristalizorul într-o baie de ultrasonare, unde se lasă timp de 3,5 ore. Apoi, se scurge apa de extracție și se adaugă 4 mL apă distilată. Se ultrasonează din nou 4 ore. Se scurge apa de spălare și se adaugă 2 mL apă distilată. Se ultrasonează încă 3 ore. În final se scoate lamela multistratificată din cristalizor și se lasă să se usuce în convecție liberă la temperatura camerei (20 °C). Lamela cu filme stratificate astfel preparate a fost pusă în contact cu apa uzată, câte 50 mL/probă. După 24 ore indicatorul de E-coli a scăzut de la 4 CFU/50 mL la 1 și cel de coliformi de la 61CFU/50mL la 4.

FILME MULTISTRATIFICATE NANOASAMBLATE ANTIMICROBIENE**ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTORA****REVENDICARI**

1. Filme multistratificate nanoasamblate antimicrobiene caracterizate prin aceea că peste un suport de sticlă se formează un prim strat sol-gel prin reacția dintre (3-Mercaptopropil)trimetoxisilan: MPTES și hidroxid de amoniu, în raport volumetric MPTES: soluție apoasă 25% de NH_4OH de 1: 3,5...4,5, peste care se formează un al doilea strat, de polimer sol-gel imprimat molecular, obținut prin reacția dintre 3-(2-trimetoxisilil)-propilmetacrilat: MAPTES, cu hidroxid de amoniu, în raport volumetric MAPTES: soluție apoasă 25% de NH_4OH de 1: 5...6, format în prezența ca templat, a antigenului O din lipopolizaharida: LPZ, în raport de 50000 de unitati de endotoxină, echivalent 50000 de unitati antigen O, din LPZ la 0,10-0,15 mmoli MAPTES, templatul fiind extras ulterior din cel de al doilea strat, filmele astfel obținute prezentând activitate antibacteriană contra bacteriilor gram negative de tipul E-coli și coliformi.
2. Procedeu de obtinere a filmelor multistratificate nanoasamblate, conform revendicarii 1, caracterizat prin aceea că primul strat silanic depus pe sticlă este obținut prin dizolvarea MPTES în alcool etilic absolut, în raport volumeric MPTES: alcool etilic absolut de 1: 5...7, la temperatura de 20...30 °C, soluția precursoră alcoolică de MPTES fiind adăugată treptat, la 20...30 °C, timp de 1,5...2,5 ore, sub o agitare de 150... 350 rot/min peste o soluție catalitică formată din soluție apoasă de hidroxid de amoniu 25% și apă distilată, în raport apă: soluție 25% de NH_4OH de 1: 2...3, raportul între MPTES și soluția de hidroxid de amoniu 25% fiind de 1: 3,5...4,5, solul astfel obținut fiind pulverizat pe suportul de sticlă și lăsat timp de 15...45 minute la temperatura de 20...30 °C pentru gelifiere, iar cel de al doilea strat, imprimat molecular, fiind obținut prin dizolvarea MAPTES în alcool etilic absolut, în raport volumeric MAPTES: alcool etilic absolut de 1: 10...12, la temperatura de 20...30 °C, după care, în această soluție se adaugă o soluție apoasă de 0,8-1,2 g/L de LPZ, iar raportul între soluția de LPZ și MAPTES fiind de 2,5...3:1, soluția precursoră alcoolică de MAPTES cu templat fiind adăugată treptat, timp de 1,5...2,5 ore sub o agitare de 150... 350 rot/min peste o soluție catalitică formată din soluție apoasă de hidroxid de amoniu 25%, raportul între MAPTES și soluția de hidroxid de amoniu fiind de 1: 5...6, solul astfel obținut fiind pulverizat peste primul strat silanic și lăsat la maturat 24...48 h la 20...30°C și încă 24...48 h la 45...55°C, după care filmele stratificate obținute pe suportul de sticlă sunt spălate în 2- 3 reprize cu apă distilată în raport MAPTES: apă de 1:10...20, prin ultrasonare, timp de 3...5 ore per porție.