



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00838

(22) Data de depozit: 28/12/2022

(41) Data publicării cererii:
28/06/2024 BOPI nr. 6/2024

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU"
CLUJ-NAPOCA, STR. VICTOR BABEȘ
NR. 8, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• IACOB BOGDAN-CEZAR,
STR.M.SORESCU NR.4, AP.31,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• BODOKI ANDREEA- ELENA,
STR.OBSERVATORULUI, NR.140, SC.1,
AP.2, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• BODOKI EDE, STR.CÂMPULUI, NR.193,
BL.CORP C2, AP.2, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A POLIMERILOR IMPRIMAȚI
MOLECULAR PRIN SINTEZĂ VERDE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor polimeri imprințați molecular (PIM) prin sinteză mecano-chimică pe cale uscată, cu utilizare în în domeniul analitic, biomedical, farmaceutic, agricol, de mediu și alimentară. Procedeu, conform invenției, constă în aplicarea unor forțe de forfecare, întindere, măcinare și triturare cu efect de activatori mecano-chimici, și eventual cu adaos de cantități catalitice de solvent, care pe lângă promovarea și susținerea procesului de polimerizare radicalică a diversilor monomeri funcționali,

facilitează interacțiunea specifică dintre cei din urmă și molecula șablon prin sinteza chimică rezultă PIM cu selectivitate ridicată față de molecula-șablon și proprietăți comparabile sau chiar superioare cu cele ale PIM echivalenți, preparați pe cale convențională, în soluție.

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).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2022 00838
Data depozit 28-12-2022

1

45

Procedeu de obținere a polimerilor imprimați molecular prin sinteză verde

Descrierea invenției

Prezenta invenție se referă la un procedeu de fabricare pe cale uscată a polimerilor imprimați molecular prin mecanochimie cu aplicații în domeniile analitic, biomedical, și farmaceutic, agricol, de mediu sau alimentar..

Stadiul cunoașterii:

În ultimele decenii, structurile polimerice au jucat un rol important în domeniile agricol, alimentar, de mediu, biomedical și farmaceutic, fiind utilizați ca: sisteme de transport și cedare controlată a unor compuși biologic activi, schele de inginerie tisulară, elemente de recunoaștere moleculară, etc. Un tip special de polimer funcțional îl reprezintă polimerii imprimați molecular (PIM), caracterizați prin prezența în matricea polimerică a unor situsuri specifice de recunoaștere moleculară pentru o anumită moleculă-țintă, numită moleculă-șablon. Aceștia reprezintă astfel receptori polimerici artificiali cu o selectivitate similară omologilor lor naturali, dar prezintă o stabilitate chimică și termică foarte bune, iar sinteza acestora este facilă și cu costuri mult reduse. Principalele aplicații ale PIM sunt în tehnicile analitice, în special în tehnicile de separare utilizați ca faze staționare în (electro)cromatografie și separări chirale precum și ca sorbenți selectivi în extracția în fază solidă (1). PIM au fost, de asemenea, aplicați ca elemente de recunoaștere în dezvoltarea biosenzorilor, în special a celor electrochimici (2) și optici (3). În ultimii ani, PIM s-au dovedit a fi materiale foarte versatile în construcția de catalizatori (4) și de sisteme de transport la țintă (5), fiind capabile să funcționeze ca rezervoare pentru eliberarea controlată și prelungită a agentului terapeutic datorită difuziei particulare a acestuia prin rețeaua polimerică, difuzie ce poate fi optimizată în funcție de compoziția amestecului de polimerizare utilizat la sinteza PIM (6).

Procedura clasică de sinteză a PIM presupune amestecarea șablonului cu un monomer funcțional adecvat, în prezența unui agent de reticulare și a unui inițiator, toate aceste componente fiind dizolvate într-un solvent organic cu rol de porogen. După polimerizare și îndepărtarea acesteia din rețeaua polimerică, vor rămâne în polimer cavități complementare șablonului. Indiferent de metoda de sinteză a PIM (în soluție sau pe cale uscată), pentru

obținerea cu succes a unor cavități imprimate, bine definite (complementare steric și funcțional cu molecula șablon), este crucială alegerea monomerilor potriviți, capabili să formeze un complex monomer funcțional – șablon, cât mai stabil, care va „fixa” molecula șablon pe parcursul întregului proces de polimerizare (7). Gradul crescut de specificitate al situsurilor din structura PIM este obținut dacă solventul utilizat nu influențează în mod negativ, printr-o manieră competitivă, interacțiunile necovalente dintre șablon și monomerul funcțional pe durata polimerizării (de exemplu, prin formarea de legături de hidrogen solvent-șablon, dacă se utilizează ca solvent apa sau alt solvent protic). De obicei, solventii nepolari, aprotici, cum ar fi cloroformul și toluenul, promovează asocierea monomerilor funcționali cu șablonul, în timp ce solventii polari precum metanolul și apa tind să perturbe interacțiunile necovalente din complexul de prepolimerizare. Prin urmare, substanțele insolubile în astfel de solventi, cum sunt cele hidrosolubile (ex. polizaharide), sau cele denaturabile (ex. peptide, proteine), prezintă dificultăți de imprimare. De asemenea, în procedura de imprimare moleculară convențională, pe cale umedă, se utilizează volume mari de solventi organici toxici, generând astfel o cantitate mare de deșeuri chimice toxice.

Unul dintre obiectivele industriilor farmaceutice și chimice este dezvoltarea unor procese tehnologice sustenabile, ecologice care elimină sau reduc la minim utilizarea solventilor. Cu toate acestea, evitarea solventilor necesită adesea folosirea catalizatorilor metalici sau de altă natură, care accelerează reacțiile chimice, dar îngreunează purificările, mai ales în cazul produselor chimice fine, cum ar fi ingredientele farmaceutice active. Mecanochimia a apărut ca o modalitate durabilă care permite sinteza chimică, inclusiv transformările moleculare organice, folosind energia mecanică.

Conform IUPAC (8), o reacție mecanochemică este o reacție chimică care este indusă prin absorbția directă a energiei mecanice. Notă: forfecarea, întinderea și triturarea sunt metode tipice pentru generarea de situsuri reactive pe cale mecanochemică, de obicei macroradicali, în lanțurile polimerice care suferă reacții mecanochemice.

Energia mecanochemică, cum ar fi cea cauzată de forfecare, întindere, triturare și măcinare, este activatorul crucial al reacției mecanochemice. Mecanochimia este a patra cale de activare chimică după termochimie (reacții termice tradiționale), electrochimie și fotochimie.

Mecanochimia este chimia care studiază comportamentul chimic al materialelor prin efecte mecanice fără utilizarea solventilor sau cu cantități neglijabile de solvent, cu rol catalitic, spre deosebire de metodele tradiționale efectuate în soluție, în care componentele sunt dizolvate într-un solvent comun. Astfel, reactivii fiind în concentrație mare și în strâns

contact între ei, activarea mecanochemică prin măcinare sau triturare este foarte avantajoasă. Efectul de activator mecanochemic poate fi realizat manual folosind mojar și pistil, printr-un reactor mecanochemic, cu ajutorul unei moare cu bile, vibrație, planetare sau prin extrudare.

Prin mecanochemie se pot obține alte căi de reacții în urma aplicării stresului mecanic iar randamentele realizate pot fi foarte ridicate.

În prezenta invenție, alegerea compușilor se realizează astfel încât, prin interacțiunea mecanochemică, să fie promovată o interacțiune între monomerul(ii) funcțional(i) și șablon și/sau o polimerizare a monomerilor din amestecul solid, fără sau cu adaosul unei mici cantități de solvent. Astfel, în funcție de structura moleculei-șablon, se va opta (dar fără a se limita la) pentru:

- monomeri funcționali cu grupări acide (de exemplu: grupări carboxilice) capabili să formeze interacțiuni electrostatice cu grupările funcționale bazice din structura moleculei-șablon (de exemplu cu grupări amino) (sau vice-versa),
- monomeri funcționali capabili să interacționeze prin alte legături necovalente (de hidrogen, van der Waals, π - π , dipol-dipol, ion-dipol, etc.) cu molecula-șablon,
- monomeri ce pot forma legături covalente (precum esteri boronici, baze Schiff, etc.) cu șablonul.

În amestecul solid sunt prezente doar componentele necesare sintezei polimerice iar opțional, pot fi utilizați aditivi suplimentari pentru o triturare mai eficientă (de exemplu: alumină, silicagel, etc.) sau cu alte scopuri, în funcție de utilizarea ulterioară.

Eliminarea totală sau utilizarea unui volum minim de solvent, transformă sinteza PIM pe cale mecanochemică într-o alternativă verde, care este durabilă, ecologică și ieftină.

Procedeul conform invenției înlătură dezavantajele procedeelelor clasice de sinteză a PIM, prin aceea că sinteza nu folosește apă sau solvenți organici sau doar adaos de cantități extrem de mici. Imprimarea moleculară în soluție prezintă dezavantajul mișcării browniene a moleculelor care duc la desfacerea legăturilor dintre monomerul funcțional și șablon. Totodată, nevoia utilizării unui solvent potrivit (apoi sau organic polar), capabil să mențină în soluție complexul de prepolimerizare însă fără riscul afectării structurilor secundare, terțiare sau cuaternare ale biomacromoleculelor (ex. peptide, proteine, lanțuri nucleotidice, oligo- și polizaharide, etc.), limitează aria de aplicabilitate a procesului de imprimare, poate avea consecințe nefavorabile asupra eficienței acesteia, asupra caracteristicilor de performanță ale polimerului imprimat rezultat, respectiv asupra calității și funcționalității situsurilor de recunoaștere moleculară formate.

În cadrul procedurii propus spre brevetare, sinteza polimerilor imprimați molecular se realizează pe cale uscată fără utilizarea vreunui solvent în care să se dizolve toate componentele amestecului de polimerizare (monomer funcțional, agent de reticulare, șablon) cu sau fără expunerea acestuia la radiații UV, printr-un procedeu mecanochimic manual sau automat, realizat prin măcinare sau triturare folosind mojar și pistil sau cu ajutorul unei moare cu bile, vibrație, planetare sau prin extrudare, iar polimerii rezultați prezintă selectivități ridicate față de molecula șablon comparativ cu polimerii echivalenți obținuți în soluție.

Etapele realizării unei sinteze mecanochimice a PIM (etapele procedurii care formează obiectul invenției):

1. În prima etapă, într-un flacon se cântăresc componentele necesare pentru amestecul de polimerizare: unul sau mai mulți monomeri funcționali, unul sau mai mulți agenți de reticulare, molecula-șablon și opțional se poate adăuga inițiator, un volum mic de solvent sau alți aditivi.

Molecula-șablon din cadrul amestecului de polimerizare poate fi orice substanță cu masă moleculară mică (de exemplu atenololul) sau mare (de exemplu proteine, precum albumina serică bovină), iar monomerii utilizați pot fi orice substanță care poate fi supusă procesului de polimerizare, ca de exemplu substanțele cu grupări vinil, dar fără a fi limitat doar la acestea.

Astfel, pentru realizarea procedurii pot fi utilizați orice tipuri de monomeri funcționali cum ar fi cu titlu de exemplificare, însă nu limitat la aceștia, monomerii din clasele monomerilor naturali sau sintetici, din clasele monomerilor polari sau nepolari, din clasele monomerilor cu grupări vinil sau alte grupări polimerizabile.

Modul de alegere a tipurilor de monomeri se realizează în funcție de structura chimică a moleculei-șablon pentru care se dorește să se sintetizeze PIM. Monomerul funcțional trebuie ca prin intermediul grupărilor funcționale din structura acestuia să formeze legături covalente sau necovalente cu grupările funcționale din structura șablonului. Astfel, selectarea monomerului adecvat se poate realiza folosind mai multe strategii, cum ar fi tehnicile spectroscopice (de exemplu, rezonanța magnetică nucleară, UV-vis, infraroșu, etc.), simulări computaționale sau calorimetria cu titrare izotermă.

Agenții de reticulare sunt substanțe cu două sau mai multe grupări polimerizabile cu rol de a conecta monomerii funcționali într-o rețea tridimensională în care se vor imprima cavitățile complementare șablonului. În funcție de natura agentului de reticulare se poate controla morfologia rețelei polimerice, asigurând totodată stabilitatea situsurilor imprimate și a rețelei polimerice, precum și o porozitate corespunzătoare pentru difuzia moleculei-șablon din și în polimer. Agenții de reticulare pot fi aleși din orice clasă, ca de exemplu (dar fără a se limita la) monomeri vinilici (cum ar fi cu titlu de exemplificare, însă nu limitat la etilenglicoldimetacrilatul, divinilbenzenul, trimetilolpropan trimetacrilatul), din clasa silanilor (cum ar fi acetoxisilanii, oximosilanii și alcoxisilani s, însă nu limitat la aceștia), etc. De asemenea, specia chimică-șablon poate fi orice substanță polară, nepolară, neutră sau ionică (ca de exemplu atenololul, albumina serică bovină, dar fără a fi limitată la acestea), iar alături de celelalte componente ale amestecului de prepolimerizare (amestec pentru imprimare moleculară) aceștia pot fi supuși unor reacții de complexare și polimerizare, în mod simultan sau secvențial.

Gramajul substanțelor nu are importanță pentru procedeul supus brevetării, din punct de vedere științific fiind important raportul molar dintre monomerul funcțional și molecula-șablon (de exemplu 1:1, 2:1, în general monomerul fiind în exces față de șablon).

Procedeul de sinteză este identic indiferent de natura monomerilor sau șablonului utilizat.

2. În a doua etapă, se introduc apoi în flacon una sau mai multe bile sau inele (confectionate din oțel inoxidabil, ceramică, zirconiu, teflon sau alt material) și se agită amestecul de pulberi un anumit timp pe un vortex sau într-o moară cu bile, vibrație, planetare sau prin extrudare cu sau fără expunere la radiații UV. Menționăm că amestecul de pulberi se poate agita/tritura, cu sau fără expunere la UV, folosind mojar și pistil, sau cu ajutorul unei moare cu bile, vibrație, planetare sau prin extrudare.

3. În a treia etapă, polimerii astfel obținuți se spală (de exemplu de minim 3 ori) cu un solvent potrivit pentru îndepărtarea șablonului (se alege un solvent în care molecula-șablon este solubilă), cum ar fi cu un amestec de metanol-acid acetic glacial 9:1. După spălare, aceștia sunt uscați la 40°C în etuvă, timp de 24 de ore.

Avantajele prezentei invenții:

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în prezentarea unui procedeu verde de obținere a polimerilor imprimați molecular cu aplicare în domeniile analitic, biomedical, farmaceutic, agricol, de mediu sau alimentar.

Procedeeul conform invenției prezintă următoarele avantaje :

- este un procedeu ecologic, fără utilizarea de solvenți organici toxici
- este simplu de aplicat și sigur în exploatare – nu se utilizează temperaturi crescute, radiații UV sau solvenți inflamabili sau toxici
- necesită un număr redus de faze tehnologice
- este eliminată multe dintre incompatibilitățile de solubilitate dintre molecula-șablon și monomerii funcționali, lărgind semnificativ aria de aplicabilitate ale procesului de imprimare moleculară
- se obțin grade de imprimare superioare sintezei clasice în solvenți
- pot oferi randamente superioare și timpi reduși de sinteză

Prezentarea invenției:

Se dau în continuare exemple de realizare a invenției.

EXEMPLU

Exemplul 1. Într-un flacon de sticlă de 5 mL s-au cântărit următoarele componente: metilen-bis-acrilamidă 374 mg, persulfat de amoniu 46 mg și atenolol 26,6 mg (doar în cazul polimerului imprimat – PIM_1) peste care s-au adăugat 51 μ L acid metacrilic, 30 mg alumina și 50 μ L acetonitril. Se introduc apoi câte 2 bile din oțel inoxidabil ($d=4$ mm) în flacon și se agită amestecul de pulberi timp de 2 ore pe un vortex la 3000 rpm și la expunere UV folosind 2 lămpi UV de 18 W și $L=59$ cm. Polimerii astfel obținuți au fost spălați de 3 ori cu amestec metanol-acid acetic glacial 9:1 și apoi de 3 ori cu câte 5 mL metanol absolut. După spălare, polimerii au fost uscați la 40 °C în etuvă timp de 24 ore. Au fost obținute 111 mg de polimer imprimat (PMI_1) și 71 mg de polimer neimprimat (PNI_1). Polimerii au fost testați prin studii de legare în prezența șablonului dar și a altor substanțe cu structură chimică similară aparținând aceleași clase farmacologice, β -blocantele. Pentru aceasta, câte 5 mg din polimerul imprimat și 5 mg din polimerul neimprimat (preparat în absența atenololului) au fost expuși la

100 μg β -blocant (atenolol, carvedilol, propranolol sau alprenolol) într-un mililitru de apă ultrapură. După 24 de ore sub agitare, amestecul a fost centrifugat la 10000 rpm timp de 15 minute iar supernatantul a fost apoi analizat prin cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) folosind o coloană Agilent Zorbax Exclipse XDB-C18 150 x 4.8 mm cu particule de diametru de 5 μm . În cazul atenololului s-a utilizat o fază mobilă alcătuită din 20% tampon boric 20 mM, pH=8.3 și 80 % acetonitril, iar pentru analiza propranololului, alprenololului și a carvedilolului, compoziția acesteia a fost de 60% tampon boric 20 mM, pH=8.3 și 40% acetonitril. Procentele de relegare au fost în cazul PIM_1: 93% pentru atenolol, 6,8% pentru propranolol, 8,4% pentru alprenolol și 10,4% pentru carvedilol iar în cazul PNI_1 acestea au fost: 9,6% pentru atenolol, 0,5% pentru propranolol, 3,9% pentru alprenolol și 6,5% pentru carvedilol (Figura 1). Performanțele polimerilor obținuți pe cale mecanochimică au fost comparate cu polimeri similari preparați prin metoda tradițională în soluție, în mediu neapos. S-au cântărit 9 mg de atenolol (în cazul PMI_UV_1) și 9 mg de acid 4,4-azobis(4-cianovaleric) peste care s-au adăugat 17 μL acid metacrilic, 150 μL etilen-glicol-dimetacrilat și 5 mL acetonitril. Polimerizarea a avut loc la temperatura camerei, prin expunere la 2 lămpi UV de 18 W și L=59 cm. Polimerii au fost spălați, uscați și testați în mod similar ca cei obținuți pe cale uscată. După studiul de relegare, rezultatele în cazul PMI_UV_1 au fost: 95,2% pentru atenolol, 24,2% pentru propranolol, 20,8% pentru alprenolol și 84,7% pentru carvedilol iar pentru PNI corespunzător acestea au fost: 79,6% pentru atenolol, 11,5% pentru propranolol, 2,13% pentru alprenolol și 61,4% pentru carvedilol (Figura 2).

Exemplul 2. Într-un flacon de sticlă de 5 mL s-au cântărit următoarele componente: metilen-bis-acrilamidă 374 mg, persulfat de amoniu 46 mg, acid 2-trifluorometacrilic 85 mg și atenolol 26.6 mg (doar în cazul polimerului imprimat – PMI_2) peste care s-au adăugat 30 mg alumina și 50 μL acetonitril. Se introduc apoi câte 2 bile din oțel inoxidabil (d=4mm) în flacon și se agită amestecul de pulberi timp de 2 ore pe un vortex la 3000 rpm și la expunere UV folosind 2 lămpi UV de 18 W și L=59 cm. Polimerii astfel obținuți au fost spălați de 3 ori cu amestec metanol-acid acetic glacial 9:1 și apoi de 3 ori cu câte 5 mL metanol absolut. După spălare, polimerii au fost uscați la 40 °C în etuvă timp de 24 ore. Au fost obținute 162,70 mg de polimer imprimat (PMI_2) și 34,50 mg de polimer neimprimat (PNI_2). Polimerii au fost testați prin studii de legare în prezența șablonului dar și a altor substanțe cu structură chimică similară aparținând aceleași clase farmacologice, β -blocantele. Pentru aceasta, câte 5 mg din polimerul imprimat și 5 mg din polimerul neimprimat (preparat în

absența atenololului) au fost expuși la 100 μg β -blocant (atenolol, carvedilol, propranolol sau alprenolol) într-un mililitru de apă ultrapură. După 24 de ore sub agitare, amestecul a fost centrifugat la 10000 rpm timp de 15 minute iar supernatantul a fost apoi analizat prin cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) folosind o coloană Agilent Zorbax Exclipse XDB-C18 150 x 4.8 mm cu particule de diametru de 5 μm . În cazul atenololului s-a utilizat o fază mobilă alcătuită din 20% tampon boric 20 mM, pH=8.3 și 80 % acetonitril, iar pentru analiza propranololului, alprenololului și a carvedilolului, compoziția acesteia a fost de 60% tampon boric 20 mM, pH=8.3 și 40% acetonitril. Procentele de relegare au fost în cazul PIM_2: 95,6% pentru atenolol, 51,1% pentru propranolol, 48,7% pentru alprenolol și 72,6% pentru carvedilol iar în cazul PNI corespunzător (PNI_2) acestea au fost: 31,9% pentru atenolol, 24,29% pentru propranolol, 21,43% pentru alprenolol și 20,74% pentru carvedilol (Figura 1). Performanțele polimerilor obținuți pe cale mecanochimică au fost comparate cu polimeri similari preparați prin metoda tradițională în soluție, în mediu neapos. S-au cântărit 9 mg de atenolol (în cazul PMI (PMI_UV_2)), 28 mg acid 2-trifluorometacrilic și 9 mg de acid 4,4-azobis(4-cianovaleric) peste care s-au adăugat 150 μL etilen-glicol-dimetacrilat și 5 mL acetonitril. Polimerizarea a avut loc la temperatura camerei, prin expunere la 2 lămpi UV de 18 W și L=59 cm. Polimerii au fost spălați, uscați și testați în mod similar ca cei obținuți pe cale uscată. După studiul de relegare, rezultatele în cazul PMI_UV_2 au fost: 73,8% pentru atenolol, 6,2% pentru propranolol, 8,0% pentru alprenolol și 76,7% pentru carvedilol iar în cazul PNI corespunzător (PNI_UV_2) acestea au fost: 78,4% pentru atenolol, 10,8% pentru propranolol, 17,0% pentru alprenolol și 78,4% pentru carvedilol (Figura 2).

Exemplul 3. Într-un flacon de sticlă de 5 mL s-au cântărit următoarele componente: metilen-bis-acrilamidă 374 mg, persulfat de amoniu 50 mg, acid metacrilic 51 μL și albumină serică bovină 222 mg (doar în cazul polimerului imprimat – PMI_BSA_1) peste care s-au adăugat 30 mg alumină. Se introduc apoi câte 2 bile din oțel inoxidabil ($d=4\text{mm}$) în flacon și se agită amestecul de pulberi timp de 2 ore pe un vortex la 3000 rpm și la expunere UV folosind 2 lămpi UV de 18 W și L=59 cm. Polimerii astfel obținuți au fost spălați cu amestec apă-acid acetic glacial 9:1 până la îndepăratea completă a proteinei și apoi de 3 ori cu câte 5 mL apă. După spălare, polimerii au fost uscați la 40 $^{\circ}\text{C}$ în etuvă timp de 24 ore. Polimerii au fost testați prin studii de relegare a șablonului comparativ cu polimerul neimprimat (N1) și a polimerului imprimat (M1_soluție) și neimprimat (N1_soluție) obținuți prin metoda clasică (aceeași rețetă, dar toate componentele au fost dizolvate în apă și apoi expuse la UV).. Pentru aceasta, câte 5 mg din polimerul imprimat și 5 mg din polimerul neimprimat (preparat în

absența proteinei) au fost expuși la 100 μg BSA într-un mililitru de apă ultrapură. După 24 de ore sub agitare, amestecul a fost centrifugat la 10000 rpm timp de 15 minute iar supernatantul a fost apoi analizat spectrofotometric. Analiza spectrofotometrică s-a bazat pe o metodă colorimetrică prin legarea unui colorant (bromcrezol-green) de proteina BSA. Astfel, soluția de analizat a fost preparată prin combinarea în raport volumic 1:1 a supernatantului în care este BSA rămas nelegat și o soluție 0.15mM bromcrezol-green în 10mM tampon citrat la pH=4.2. Procentele de relegare a BSA obținute au fost: în cazul PIM_1: 97%, în cazul polimerului neimprimat PNI_1:10%, iar pentru polimerii obținuți în soluție: pentru PIM_în soluție: 71% și 65% în cazul PNI corespunzător (PNI_în soluție) (Figura 3).

Exemplul 4. Într-un flacon de sticlă de 5 mL s-au cântărit următoarele componente: metilen-bis-acrilamidă 374 mg, persulfat de amoniu 50 mg, acid 2-trifluorometacrilic 94 mg și albumină serică bovină 222 mg (doar în cazul polimerului imprimat – PMI_BSA_2) peste care s-au adăugat 30 mg alumina. Se introduc apoi câte 2 bile din oțel inoxidabil ($d=4\text{mm}$) în flacon și se agită amestecul de pulberi timp de 2 ore pe un vortex la 3000 rpm și la expunere UV folosind 2 lămpi UV de 18 W și $L=59\text{ cm}$. Polimerii astfel obținuți au fost spălați de 3 ori cu amestec apă-acid acetic glacial 9:1 până la îndepăratea completă a proteinei și apoi de 3 ori cu câte 5 mL apă. După spălare, polimerii au fost uscați la 40 °C în etuvă timp de 24 ore. Polimerii au fost testați prin studii de relegare în prezența șablonului comparativ cu polimerul neimprimat (N2) și a polimerului imprimat (M2_soluție) și neimprimat (N2_soluție) obținuți prin metoda clasică (aceeași rețetă, dar toate componentele au fost dizolvate în apă și apoi expuse la UV). Pentru aceasta, câte 5 mg din polimerul imprimat și 5 mg din polimerul neimprimat (preparat în absența proteinei) au fost expuși la 100 μg BSA într-un mililitru de apă ultrapură. După 24 de ore sub agitare, amestecul a fost centrifugat la 10000 rpm timp de 15 minute iar supernatantul a fost apoi analizat spectrofotometric. Analiza spectrofotometrică s-a bazat pe o metodă colorimetrică prin legarea unui colorant (bromcrezol-green) de proteina BSA. Astfel, soluția de analizat a fost preparată prin combinarea în raport volumic 1:1 a supernatantului în care este BSA rămas nelegat și o soluție 0.15mM bromcrezol-green în 10mM tampon citrat la pH=4.2. Procentele de relegare a BSA obținute, au fost: în cazul PIM_BSA_2: 65%, în cazul polimerului neimprimat PNI_2: 14%, iar pentru polimerii obținuți în soluție: pentru PIM_2_în soluție: 95% și 91% în cazul PNI corespunzător (PNI_2_în soluție) (Figura 4).

Procedeu de obținere a polimerilor imprimați molecular prin sinteză verde

Bibliografie

1. Iacob B-C, Bodoki E, Oprean R. Chiral Electrochemical Sensors Based on Molecularly Imprinted Polymers with Pharmaceutical Applications. Handbook of Sustainable Polymers: Pan Stanford; 2015. p. 587-614.
2. Iacob B-C, Bodoki Ede, Barbu-Tudoran Lucian, Bodoki Andreea Elena, Oprean Radu. Enantiospecific MIP-based electrochemical sensor for the simultaneous analysis of atenolol's enantiomers. Biosens Bioelectron. 2014.
3. Feng F, He F, An L, Wang S, Li Y, Zhu D. Fluorescent Conjugated Polyelectrolytes for Biomacromolecule Detection. Advanced Materials. 2008;20(15):2959-64.
4. Zhu M, Wang S, Li S. Titanium catalyst with the molecular imprinting of substrate for selective photocatalysis. Journal of the Chinese Advanced Materials Society. 2014;2(2):71-81.
5. Gagliardi M, Bertero A, Bifone A. Molecularly Imprinted Biodegradable Nanoparticles. 2017;7:40046.
6. Iacob B-C, Bodoki AE, Feier B, Bodoki E, Oprean R. POLIMERI IMPRIMAȚI MOLECULAR - SISTEME AVANSATE DE TRANSPORT ALE SUBSTANȚELOR ACTIVE. In: Oniga O, editor. MEDICAMENTELE SECOLULUI XXI ȘI TERAPII MODERNE. Cluj-Napoca: EDITURA MEDICALĂ UNIVERSITARĂ "IULIU HAȚIEGANU" CLUJ-NAPOCA; 2019.
7. Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A. Handbook of molecularly imprinted polymers. United Kingdom: Smithers Rapra; 2013 2013.
8. IUPAC. Compendium of Chemical Technology, 2nd ed. (the "Gold book"). Online version 2019 created by S. J. Chalk ed. McNaught AD, Wilkinson A, editors. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1997.

Procedeu de obținere a polimerilor imprimați molecular prin sinteză verde

Revendicări

1. Procedeu de obținere a polimerilor imprimați molecular, **caracterizat prin aceea că** sinteza acestora are loc pe cale uscată fără utilizarea vreunui solvent în care să se dizolve toate componentele amestecului de polimerizare, cu sau fără expunerea acestuia la radiații UV, printr-un procedeu mecanochimic manual sau automat, realizat prin măcinare sau triturare folosind mojar și pistil sau cu ajutorul unei moare cu bile, vibrație, planetare sau prin extrudare iar polimerii rezultați prezintă selectivități ridicate față de molecula șablon comparativ cu polimerii echivalenți obținuți în soluție.

2. Procedeu, conform revendicării 1, în care molecula-șablon este orice substanță polară, nepolară, cu masă moleculară mică sau mare iar monomerii utilizați pot fi orice substanță care poate fi supusă procesului de polimerizare, ca de exemplu substanțele cu grupări vinil, dar fără a fi limitat doar la acestea.

3. Procedeu, conform revendicării 1, în care specia chimica-șablon este orice substanță polară, nepolară, neutră sau ionică, iar alături de celelalte componente ale amestecului de prepolimerizare (amestec pentru imprimare moleculară) aceștia pot fi supuși unor reacții de complexare și polimerizare, în mod simultan sau secvențial.

Procedeu de obținere a polimerilor imprimați molecular prin sinteză verde

Figuri

Studiu de legare ale diverselor β -blocante

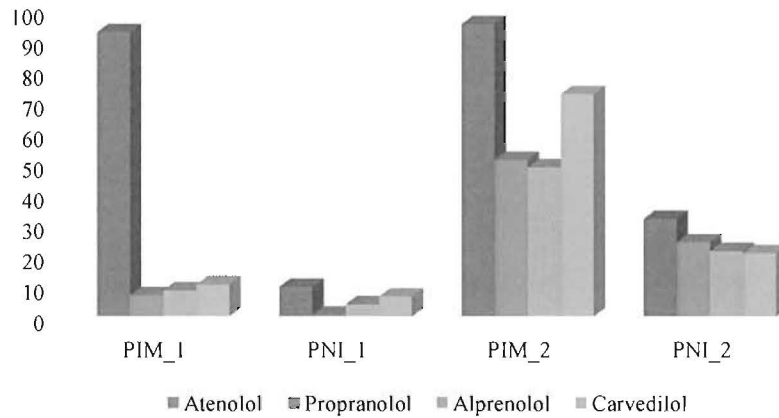


Figura 1. Procentele de relegare ale diverselor β -blocante de către cei doi PIM (preparați cu acid metacrilic – PIM_1 și cu acid 2-trifluorometacrilic – PIM_2 ca monomeri funcționali) comparativ cu PNI corespunzători.

Studiu de legare ale diverselor β -blocante

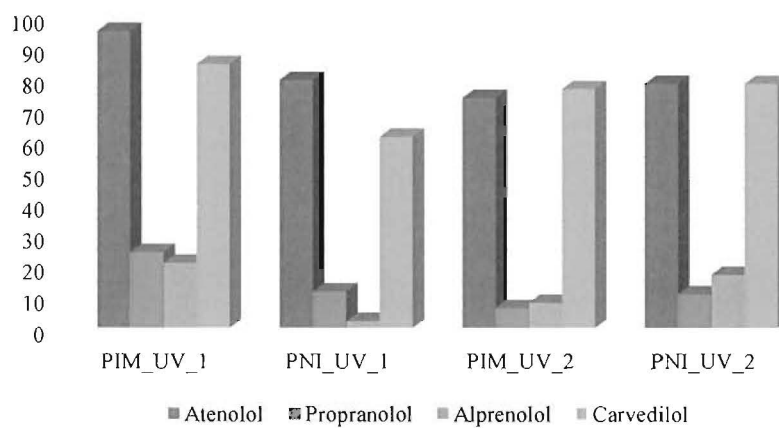


Figura 2. Procentele de relegare ale diverselor β -blocante de către cei doi PIM sintetizați în soluție (preparați cu acid metacrilic – PIM_UV_1 și cu acid 2-trifluorometacrilic – PIM_UV_2 ca monomeri funcționali) comparativ cu PNI corespunzători.

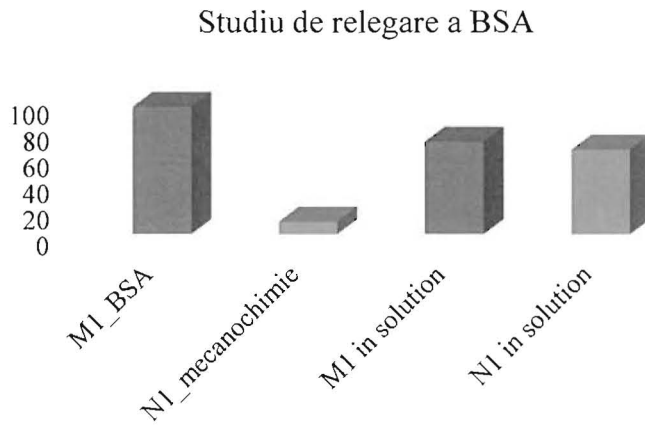


Figura 3. Procentele de relegare ale șablonului de natură proteică BSA de către PIM M1 și PNI corespunzător (N1) sintetizați prin procedeul mecanochemic, comparativ cu PIM și PNI obținuți în soluție (preparați cu acid metacrilic ca monomer funcțional).

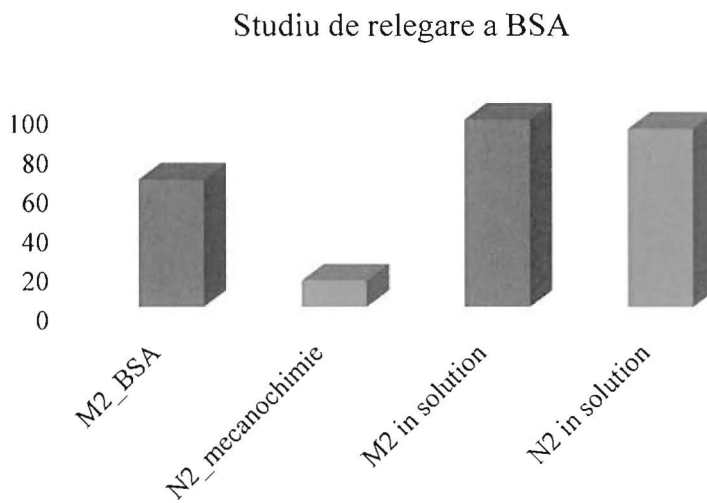


Figura 4. Procentele de relegare ale șablonului de natură proteică BSA de către PIM M2 și PNI corespunzător (N2) sintetizați prin procedeul mecanochemic, comparativ cu PIM și PNI obținuți în soluție (preparați cu acidul 2-trifluorometacrilic ca monomer funcțional).