



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 00975**

(22) Data de depozit: **14.10.2010**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.04.2013** BOPI nr. 4/2013

(41) Data publicării cererii:
30.05.2012 BOPI nr. 5/2012

(73) Titular:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
ȘI DEZVOLTARE PENTRU FIZICĂ ȘI
INGINERIE NUCLEARĂ "HORIA HULUBEI"
IFIN-HH, STR.ATOMIȘTILOR NR.407,
MĂGURELE, IF, RO

(72) Inventatori:
• DOROBANȚU IOAN,
ALEEA CÂMPUL CU FLORI NR.1, BL.OD 2,
SC.C, AP.110, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;

• NEAGU LIVIA,
STR.ALEXANDRU LĂPUȘNEANU NR.81,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
RO 125452 B1; B.S.CLEGG,
G.R.STEPHENSON, J.C.HALL,
"DEVELOPMENT OF AN ENZYME-LINKED
IMMUNOSORBENT ASSAY FOR THE
DETECTION OF DICAMBA",
J.AGRIC.FOOD CHEM., 49(5),
PP.2168-2174, MAY, 2001

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A NANOIMUNOSORBENTULUI
BIOXID DE SILICIU-AMINOPROPILTRIETOXISILAN-
GLUTARALDEHID ANTICORP ANTIACID 3,6-DICLORO-2-
METOXIBENZOIC**



RO 127441 B1

Invenția se referă la un procedeu de obținere a nanoimunosorbentului bioxid de siliciu-aminopropil-trietoxisilan-glutaraldehyd-anticorp antiacid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic, utilizat în tehnica ELISA (în engleză: Enzyme Linked Immunosorbent Assay) de dozare a pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic (dicamba) din probe de mediu.

În prezent, sunt cunoscute, pe plan mondial, tehnici ELISA de dozare a pesticidelor, ce utilizează, în principal, ca imunosorbent, faze solide, tip mase plastice, ce fixează, prin adsorbție fizică la suprafață, antigenul sau anticorpul. Dezavantajul acestor metode este suprafața limitată și desorbția componentelor imune în procesul de dozare putând conduce la scăderea sensibilității, respectiv, a acurateții analizei.

În **RO 125452 B1**, este prezentată o metodă de dozare a pesticidului acidul 3,6-diclor-2-metoxi benzoic din probe de mediu, care constă din aceea că un amestec format dintr-o suspensie de microsferă de bioxid de siliciu, acoperite cu anticorp antiacid 3,6-diclor-2-metoxi-benzoic, în diluție de 1:10 în tampon fosfat, o soluție standard de pesticid acid 3,6-diclor-2-metoxi-benzoic, având o concentrație cunoscută sau o probă necunoscută în tampon fosfat și o soluție de marker enzimatic acid 3,6-diclor-2-metoxi benzoic-fosfatază alcalină, având o concentrație de 10 µg/ml, se menține timp de 2 h la temperatura camerei, apoi se supune centrifugării și se îndepărtează supernatantul, după care se adăugă o soluție de p-nitrofenilfosfat în carbonat de sodiu, iar după stoparea reacției cu substratul enzimatic, se măsoară absorbanta optică a supernatantului rezultat în urma centrifugării, la un spectrofotometru cu o lungime de undă de 400 nm.

Clegg, B. S. G. R. Stephenson, J. C. Hall, "Developement of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Dicamba", *J. Agric. Food Chem.*, 2001, May, 49(5), 2168-2174, se referă la markeri enzimatici pentru detectarea cantitativă a erbicidelor dicamba (acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic) în probele de apă. Antiserul policlonal dicamba nu reacționează încrucișat cu un număr de alte erbicide testate, dar reacționează direct cu metabolitul dicamba, 5-hidroxidicamba, și asociate structural cu acizii clorobenzoici. Testul este utilizat pentru a estima concentrațiile cantitative de dicamba în probele de apă.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în obținerea nanoimunosorbentului bioxid de siliciu-aminopropil-trietoxisilan-glutaraldehyd-anticorp antiacid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic, utilizat în tehnici ELISA, în dozarea pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic, din probe de mediu.

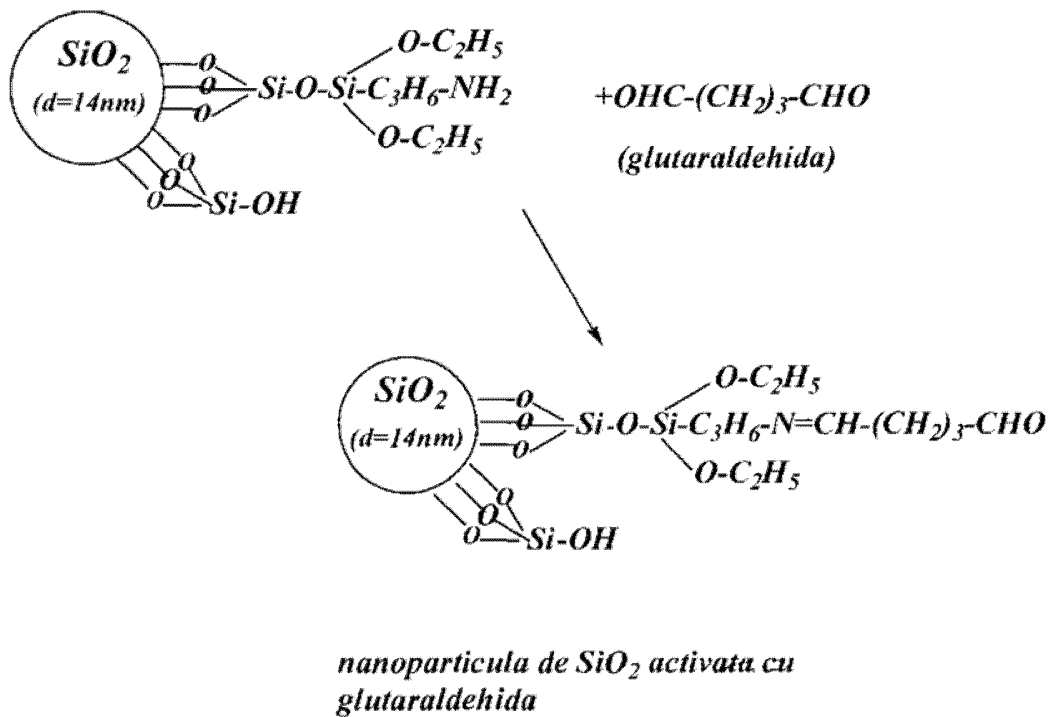
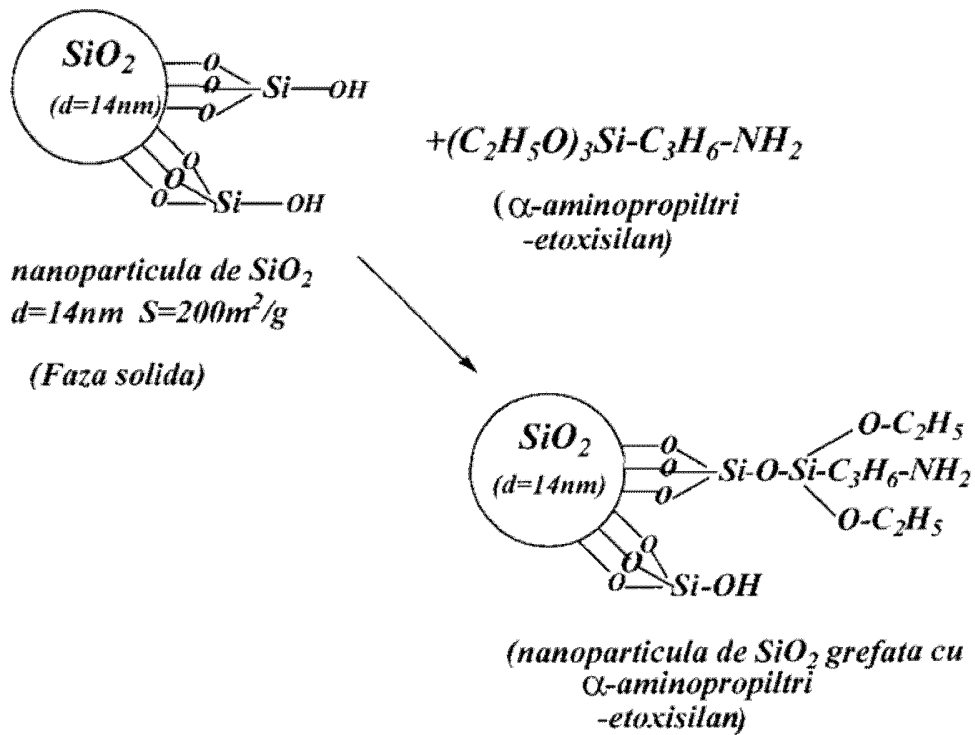
Procedeu conform invenției înlătură dezavantajele menționate mai sus, prin aceea că 2 părți, în greutate, de nanoparticule de SiO₂ de mărime $\phi = 14$ nm și arie de 200 m²/g, se tratează cu o soluție de HNO₃ 10%, timp de o oră, se incubează cu aminopropil-trietoxisilan 10% în apă distilată, timp de 3 h, la 70°C, se spală de 3 ori cu 30 părți, în volum, de apă distilată, și o dată cu 20 părți, în volum, de alcool etilic, iar supernatantul se îndepărtează prin centrifugare la 1500xg, timp de 10 min, nanoparticulele se tratează, în vederea activării, cu 50 părți, în volum, soluție de glutaraldehydă 0,1% în apă distilată, sub agitare continuă, la temperatura de 35°C, se îndepărtează supernatantul prin centrifugare la 1500xg, timp de 15 min, iar nanoparticulele activate rezultate se suspendă în tampon fosfat 50 mM, pH 8,6, se adaugă o parte în volum antiacid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic la temperatura de 35°C, timp de 2 h, sub agitare continuă, urmată de 3 spălări cu tampon fosfat 50 mM, pH 8,6 și se îndepărtează supernatantul prin centrifugare la 1500xg, timp de 15 min, iar nanoparticulele de imunosorbent bioxid de siliciu-aminopropil-trietoxisilan-glutaraldehyd-anticorp antiacid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic se depozitează la 4°C, în vederea utilizării în tehnica ELISA de dozare a acidului 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic.

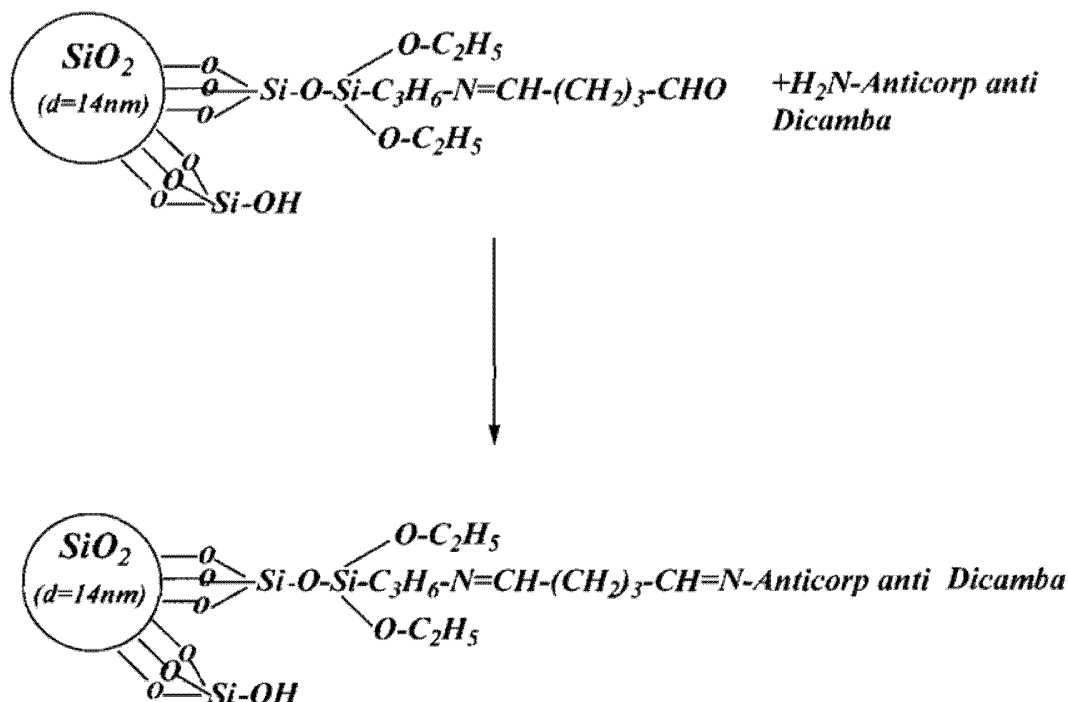
Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje:

- suprafață specifică mai mare, ceea ce determină o cantitate mai mare de anticorp antipesticid;

RO 127441 B1

- coeficient de sedimentare mai mic al nanoparticulelor comparativ cu cel al microparticulelor, ceea ce necesită operații de centrifugare la o accelerație crescută pentru nanoparticule și timpi de centrifugare mai mari;	1
- posibilitatea de depozitare a nanoimunosorbentului în fază lichidă, datorită filtrării prin filtru ce permite trecerea particulelor cu dimensiuni mici, în vederea sterilizării particulelor.	3
Procedeul conform invenției constă în cuplajul covalent al anticorpului antipesticid la nanoparticule de bioxid de siliciu, având avantajul unei suprafețe specifice mari ($>200 \text{ m}^2/\text{g}$) comparativ cu metoda clasică (cm^2/g), cuplarea covalentă elimină desorbția anticorpului din metoda clasică, cât și scăderea timpului de analiză în tehnica ELISA în fază omogenă, față de tehnica clasică în care reacția antigen anticorp este heterogenă (are loc la suprafața tubului de reacție).	7
Procedeul conform invenției constă în aceea că 2 g de nanoparticule de bioxid de siliciu de mărime $\phi = 14 \text{ nm}$ ($14 \cdot 10^{-9} \text{ m}$) și arie $200 \text{ m}^2/\text{g}$ sunt tratate cu HNO_3 10%, timp de o oră, la temperatura de 60°C , urmată de incubare cu soluție de α -aminopropiltriethoxisilan 10% în apă distilată, pentru 3 h, la 70°C . Se spală cu apă distilată de 3 ori, apoi cu alcool etilic și se depozitează la 4°C , în vederea cuplării cu anticorpul antipesticid. Procedeul conform invenției constă în aceea că legarea covalentă a anticorpului de nanoparticulă folosește glutaraldehida ca agent de cuplaj.	9
Procedeul constă în 3 etape, E1, E2 și E3:	11
<i>E1: Obținerea nanoparticulelor $(\text{SiO}_2)_{-}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{Si-C}_3\text{H}_6\text{-NH}_2$</i>	13
2 g de nanoparticule de SiO_2 ($\phi = 14 \text{ nm}$ și arie specifică $200 \text{ m}^2/\text{g}$) și 100 ml HNO_3 10% sunt agitate timp de o oră, la temperatura de 60°C . După îndepărtarea supernatantului prin centrifugare la 1500xg, timp de 10 min, nanoparticulele sunt colectate și tratate cu 100 ml de α -aminopropiltriethoxisilan 10% în apă distilată, sub continuă agitare, la temperatura de 70°C , timp de 3 h. Amestecul este centrifugat la 1500xg, timp de 10 min, supernatantul fiind înlăturat, iar nanoparticulele de $(\text{SiO}_2)_{-}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{Si-C}_3\text{H}_6\text{-NH}_2$ sunt colectate și spălate de 3 ori cu apă distilată (30 ml), urmată de o spălare cu un volum de 20 ml de alcool etilic.	15
<i>E2: Obținerea nanoparticulelor activate de $(\text{SiO}_2)_{-}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{Si-C}_3\text{H}_6\text{-N=HC-(CH}_2)_3\text{-CHO}$</i>	17
La 1,5 g nanoparticule rezultate din etapa E1, se adaugă un volum de 50 ml soluție de glutaraldehidă 0,1% în apă distilată, sub continuă agitare, la temperatura de 35°C , timp de 15 min, urmată de centrifugare la 1500xg, timp de 15 min și îndepărtarea supernatantului. Nanoparticulele activate cu glutaraldehidă sunt folosite imediat, pentru cuplarea cu anticorpul antiacid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic.	19
<i>E3: Obținerea nanoimunosorbentului $(\text{SiO}_2)_{-}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{Si-C}_3\text{H}_6\text{-N=HC-(CH}_2)_3\text{-CH=N-anticorp anti 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic}$</i>	21
Nanoparticulele activate, rezultate din etapa E2, se suspendă în 50 ml tampon fosfat 50 mM, pH 8,6, apoi se adaugă 1 ml antiser antiacid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic, la temperatura de 35°C , sub agitare continuă, timp de 2 h, urmată de centrifugare la 1500xg, timp de 15 min și îndepărtarea supernatantului, apoi spălate de 3 ori cu tampon fosfat 50 mM, pH 8,6, nanoparticulele de imunosorbent $(\text{SiO}_2)_{-}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{Si-C}_3\text{H}_6\text{-N=HC-(CH}_2)_3\text{-CH=N-anticorp anti- 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic}$, obținute în urma centrifugării, se depozitează la 4°C , în vederea utilizării în tehnica ELISA de dozare a acidului 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic.	23
Reacții chimice de obținere a nanoimunosorbentului nanoparticulă de $(\text{SiO}_2)_{-}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{Si-C}_3\text{H}_6\text{-N=CH-(CH}_2)_2\text{-CH=N-anticorp antiacid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic}$:	25





*Nanoimunosorbent -bioxid de siliciu-aminopropil
trietoxisilan-glutaraldehyd-
anticorp anti acid 3,6-dicloro-
2-metoxi benzoic*

Se prezintă mai jos un exemplu de realizare a procedurii conform invenției, pentru obținerea nanoimunosorbentului de bioxid de siliciu-aminopropil-trietoxisilan-glutaraldehyd-anticorp antiacid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic.

Exemplu. 2 g de nanoparticule de SiO_2 de mărime $\phi = 14 \text{ nm}$ și arie $200 \text{ m}^2/\text{g}$ se tratează cu o soluție de HNO_3 10%, timp de o oră, urmată de incubare cu α -aminopropiltriethoxisilan 10% în apă distilată, pentru 3 h, la 70°C , urmată de spălarea cu 30 ml apă distilată de 3 ori și 20 ml alcool etilic o dată, iar supernatantul este îndepărtat prin centrifugare la 1500xg, timp de 10 min, urmată de tratarea nanoparticulelor, în vederea activării, cu 50 ml soluție de glutaraldehydă 0,1% în apă distilată, sub agitare continuă, la temperatura de 35°C , supernatantul este îndepărtat prin centrifugare la 1500xg, timp de 15 min, iar nanoparticulele activate rezultate se suspendă în tampon fosfat 50 mM, pH 8,6, urmat de adăugarea de 1 ml antiser antiacid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic, la temperatura de 35°C , timp de 2 h, sub continuă agitare, urmată de 3 spălări cu tampon fosfat 50 mM, pH 8,6 și îndepărtarea supernatantului prin centrifugare la 1500xg, timp de 15 min, iar nanoparticulele de imunosorbent bioxid de siliciu-aminopropil-trietoxisilan-glutaraldehyd-anticorp antiacid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic se depozitează la 4°C , în vederea utilizării în tehnica ELISA de dozare a acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic.

3 Procedeu de obținere a nanoimunosorbentului bioxid de siliciu-aminopropil-
trietoxisilan-glutaraldehyd-anticorp antiacid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic, **caracterizat prin**
5 **aceea că** 2 părți, în greutate, de nanoparticule de SiO_2 de mărime $\phi = 14 \text{ nm}$ și arie de
200 m^2/g , se tratează cu o soluție de HNO_3 10%, timp de o oră, se incubează cu
7 aminopropiltrietoxisilan 10% în apă distilată, timp de 3 h, la 70°C , se spală de 3 ori cu 30
părți, în volum, de apă distilată, și o dată cu 20 părți, în volum, de alcool etilic, iar
9 supernatantul se îndepărtează prin centrifugare la 1500xg, timp de 10 min, nanoparticulele
se tratează, în vederea activării, cu 50 părți, în volum, soluție de glutaraldehydă 0,1% în apă
11 distilată, sub agitare continuă, la temperatura de 35°C , se îndepărtează supernatantul prin
centrifugare la 1500xg, timp de 15 min, iar nanoparticulele activate rezultate se suspendă
13 în tampon fosfat 50 mM, pH 8,6, se adaugă o parte, în volum, antiacid 3,6-dicloro-2-
metoxibenzoic la temperatura de 35°C , timp de 2 h, sub agitare continuă, urmată de 3 spălări
15 cu tampon fosfat 50 mM, pH 8,6, și se îndepărtează supernatantului prin centrifugare la
1500xg, timp de 15 min, iar nanoparticulele de imunosorbent bioxid de siliciu-aminopropil-
17 trietoxisilan-glutaraldehyd-anticorp antiacid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic se depozitează la
 4°C , în vederea utilizării în tehnica ELISA de dozare a acidului 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic.

