



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 01271**

(22) Data de depozit: **02.12.2010**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.07.2013** BOPI nr. **7/2013**

(41) Data publicării cererii:
29.06.2012 BOPI nr. **6/2012**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
ȘI DEZVOLTARE PENTRU FIZICĂ ȘI
INGINERIE NUCLEARĂ "HORIA
HULUBEI", 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 127441 A2; RO 125452 B1

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A NANOIMUNOSORBENTULUI
BIOXID DE SILICIU-AMINOPROPILTRIETOXISILAN-
GLUTARALDEHID-ALBUMINĂ SERICĂ DE BOVINĂ-
ACID 3,6- DICLORO-2-METOXIBENZOIC**



RO 127570 B1

Invenția se referă la un procedeu de obținere a nanoimunosorbentului, nanoparticulă de $(\text{SiO}_2)_{-}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{Si}-\text{C}_3\text{H}_6-\text{N}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}=\text{N}$ -albumină serică de bovină-acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic, utilizat în tehnica ELISA, pentru dozarea 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.

RO 127441 A2 se referă la un procedeu de obținere a unui nanoimunosorbent, sub formă de nanoparticulă de bioxid de siliciu-aminopropil-trietoxisilan-glutaraldehyd-anticorp antiacid 3,6-diclor-2-metoxibenzoic, utilizat în tehnica ELISA, care constă în tratarea, timp de o oră, a 2 g de nanoparticule de SiO_2 , cu diametrul de 14 nm și suprafață de 200 mp/g, cu acid azotic 10%, urmată de incubarea cu α -aminopropiltriethoxisilan 10% în apă distilată, timp de trei ore, la 70°C, după care se spală cu 3x30 ml apă distilată și cu 20 ml de alcool etilic, supernatantul se îndepărtează prin centrifugare și nanoparticulele se activează la 35°C, sub agitare, cu 50 ml de glutaraldehydă 0,1% în apă distilată, se centrifughează, pentru îndepărtarea supernatantului, și nanoparticulele se suspendă în tampon fosfat 50 mM, pH=8,6, urmat de adăugarea a 1 ml antiser antiacid 3,6-diclor-2-metoxibenzoic, la 35°C, cu agitare timp de 2 h, după care urmează 3 spălări cu același tampon fosfat și îndepărtarea supernatantului prin centrifugare, pentru izolarea nanoparticulelor de imunosorbent, care se păstrează la 4°C, în vederea utilizării în tehnica ELISA.

RO 125452 B1, care se referă la o metodă de dozare a pesticidului acid 3,6-diclor-2-metoxi benzoic din probe de mediu, care constă din aceea că un amestec format dintr-o suspensie de microsfele 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 mg/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.

Problema pe care o rezolvă invenția constă într-un procedeu de obținere a nanoimunosorbentului, nanoparticulă de bioxid de siliciu-aminopropil-trietoxisilan-glutaraldehyd-albumină serică de bovină-acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic, pentru dozarea pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic (dicamba) din probe de mediu.

Procedeul de obținere a nanoimunosorbentului, nanoparticulă de bioxid de siliciu-aminopropil-trietoxisilan-glutaraldehyd-albumină serică de bovină-acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic, conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus, prin aceea că are următoarele etape:

a. 2 părți, în greutate, nanoparticule de SiO_2 de mărime $\phi = 14$ nm și arie 200 m²/g, se tratează cu o soluție de HNO_3 10%, timp de o oră, se incubează cu aminopropiltriethoxisilan 10% în apă distilată, timp de trei ore, la 70°C, se spală de 3 ori cu 30 ml apă distilată și o dată cu 20 ml alcool etilic, iar supernatantul se îndepărtează prin centrifugare la 1500xg, timp de 10 min, obținându-se nanoparticule de bioxid de siliciu funcționalizate;

b. nanoparticulele obținute în etapa a se tratează cu 50 părți, în volum, soluție de glutaraldehidă 0,1% în apă distilată, sub agitare continuă, la temperatura de 35°C, iar supernatantul se îndepărtează prin centrifugare la 1500xg, timp de 15 min, obținându-se nanoparticule activate, care se suspendă în tampon fosfat 50 mM, pH 8,6;	1
c. se amestecă 100 părți, în greutate, acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic, 50 părți, în greutate, N-hidroxisuccinimidă și 200 părți, în greutate, carbodiimidă, în 3,5 părți, în volum, dimetilformamidă, timp de patru ore, sub agitare, se cuplează albumina serică bovină cu pesticidul activat, iar 2 părți, în volum, din amestecul de pesticid activat, se adaugă la 8 părți, în volum, soluție de albumină serică bovină 20 mg/ml în tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6, timp de 24 h, și se obține albumină serică de bovină-acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic, care se purifică prin cromatografie pe coloană de Sephadex G25, având, ca solvent de eluție, tampon fosfat 50 mM, pH 7,24,	5
d. conjugatul imunogen, purificat, din etapa c, de concentrație 2 mg/ml în apă distilată, se adaugă la nanoparticulele activate cu glutaraldehidă, obținute în etapa b, amestecul de reacție rezultat se agită timp de două ore, apoi se centrifughează la 1500xg, timp de 15 min, supernatantul se îndepărtează, iar precipitatul de nanoparticule de imunosorbent rezultat se spală de 3 ori cu tampon fosfat 50 mM, pH 8,6, se centrifughează la 1500xg, se îndepărtează supernatantul și imunosorbentul nanoparticule de bioxid de siliciu-aminopropiltrietoxisilan-glutaraldehid-albumină serică de bovină-acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic se depozitează la 4°C.	13
Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje:	21
- reducerea timpului de analiză;	
- cantitatea de nanoimunosorbent utilizat la o imunoanaliză este extrem de mică.	23
Procedeul conform invenției constă în cuplajul covalent al antigenului conjugatului imunogen-albumină serică de bovină-acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic la nanoparticulele de bioxid de siliciu, având avantajul unei suprafețe specifice mari (>200 m ² /g) comparativ cu metoda clasică (cm ² /g), cuplarea covalentă elimină desorbția antigenului din metoda clasică, cât și scăderea timpului de analiză în tehnica ELISA, în faza omogenă, față de tehnica clasică, în care reacția antigen anticorp este heterogenă (are loc la suprafața tubului de reacție).	25
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 m ² /g sunt tratate cu HNO ₃ 10% timp de o oră, la temperatura de 60°C, urmat de incubare cu soluție de α -aminopropiltrietoxisilan 10% în apă distilată, pentru trei ore 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 antigenul proteină-pesticid. Procedeul conform invenției constă în aceea că legarea covalentă a antigenului proteină-pesticid de nanoparticulă folosește glutaraldehida ca agent de cuplaj.	31
Procedeul constă în 5 etape, E1, E2, E3, E4 și E5.	33
<i>E1. Obținerea nanoparticulelor SiO₂, grefate cu α-aminopropiletetoxisilan</i>	35
2 g de nanoparticule de SiO ₂ ($\phi = 14 \text{ nm}$ și arie specifică 200 m ² /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 -aminopropiltrietoxisilan 10% în apă distilată, sub continuă agitare, la temperatura de 70°C, timp de trei ore. Amestecul este centrifugat la 1500xg, timp de 10 min, supernatantul fiind înlăturat, iar nanoparticulele de (SiO ₂)-(C ₂ H ₅ O) ₃ Si-C ₃ H ₆ -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.	37
	39
	41
	43
	45
	47

E2. Activarea nanoparticulei funcționalizate cu glutaraldehidă

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 antigenul albumină serică de bovină-acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic.

E3. Reacția de activare a acidului 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic

100 mg acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic, 50 mg N-hidroxisuccinimidă și 200 mg de carbodiimidă în 3,5 ml dimetilformamidă sunt puse în reacție timp de patru ore, sub agitare magnetică, la temperatura camerei, în vederea activării grupării carboxi al pesticidului.

E4. Cuplarea albuminei serice de bovină de pesticidul activat

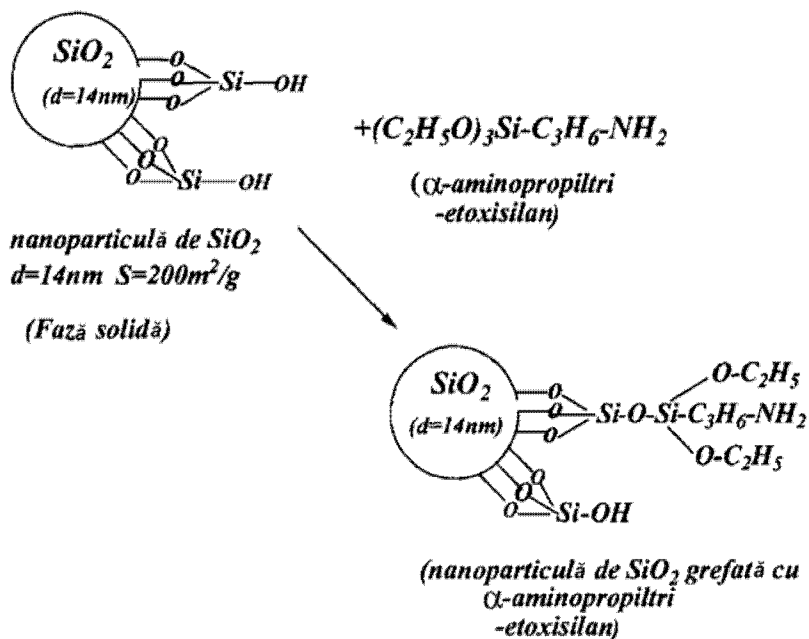
2 ml din amestecul activat de pesticid se adaugă, picătură cu picătură, la 8 ml soluție de albumină serică de bovină 20 mg/ml în tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6. Reacția de cuplare la proteină se efectuează timp de 24 h, sub continuă agitare, la temperatura camerei. Produsul obținut, acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-albumină serică de bovină, se purifică prin cromatografie pe coloană de Sephadex G25, având, ca solvent de eluție, tamponul fosfat 50 mM pH 7,24.

E5. Cuplarea conjugatului imunogen la nanoparticula funcționalizată

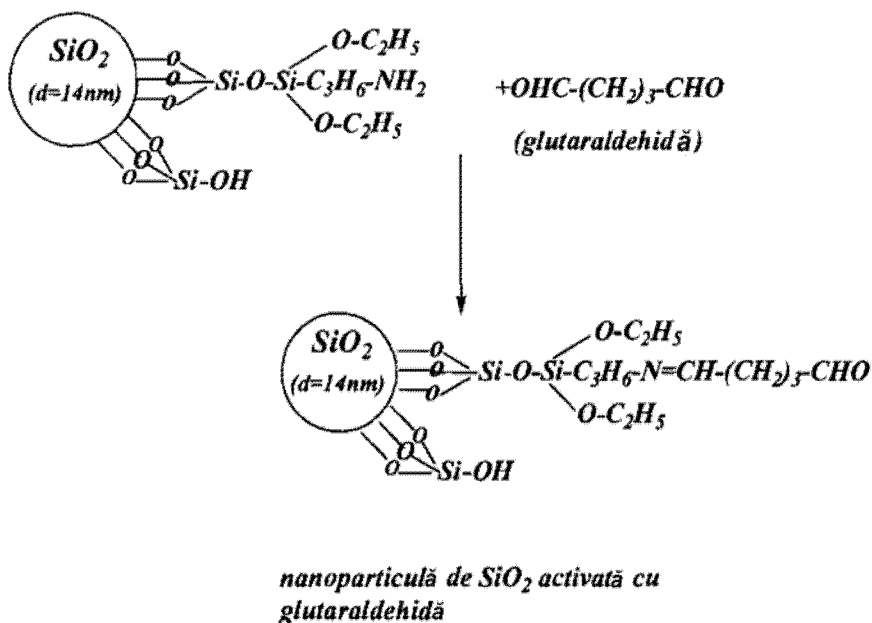
Nanoparticulele activate, rezultate din etapa E2, se suspendă în 50 ml tampon fosfat 50 mM pH 8,6, apoi se adaugă 1 ml soluție conjugat imunogen albumină serică de bovină-acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic 2 mg/ml, la temperatura de 35°C, sub agitare continuă, timp de două ore, urmată de centrifugare la 1500xg, timp de 15 min, și îndepărtarea supernatantului, apoi spălate de 3 ori cu tampon fosfat 50 mM pH 8,6, nanoparticulele de imunosorbent $(\text{SiO}_2)-(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{Si}-\text{C}_3\text{H}_6-\text{N}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}=\text{N}$ -albumină serică de bovină-acid 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.

Reacțiile chimice de obținere a nanoimunosorbentului nanoparticulă de $(\text{SiO}_2)-(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{Si}-\text{C}_3\text{H}_6-\text{N}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}=\text{N}$ -albumină serică de bovină-acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic sunt prezentate în continuare:

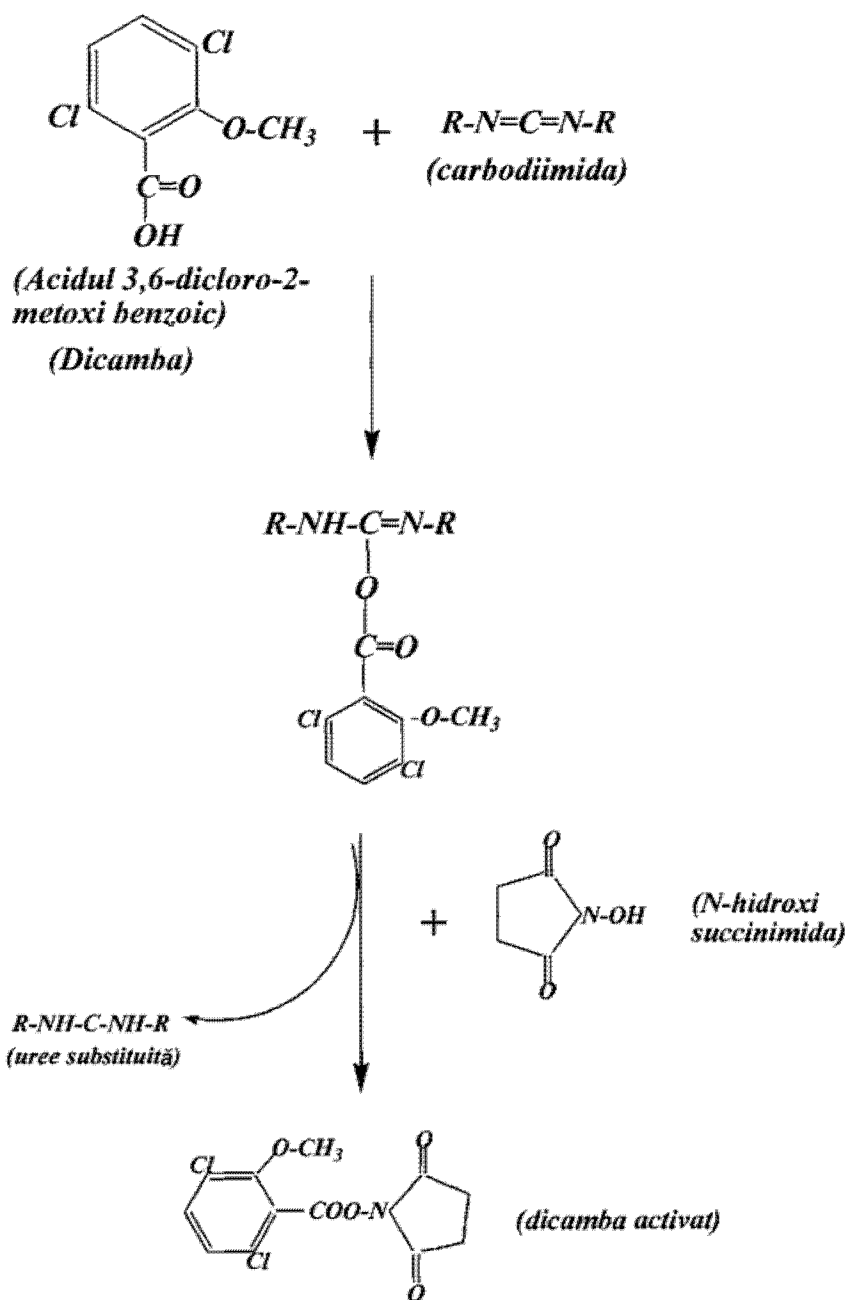
Reacția 1: Obținerea nanoparticulelor de bioxid de siliciu funcționalizate



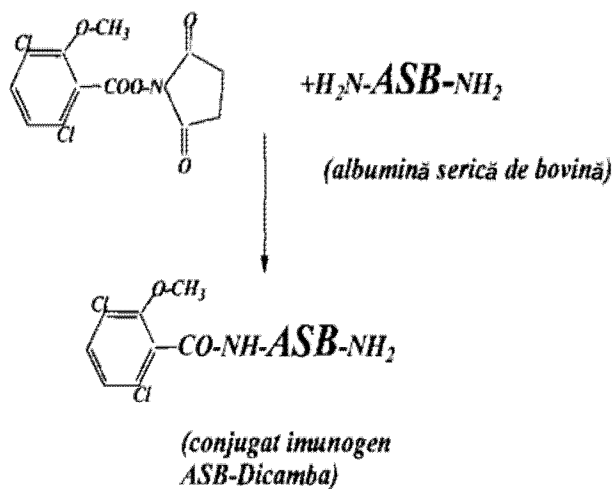
Reacția 2: Activarea nanoparticulei funcționalizate cu glutaraldehidă



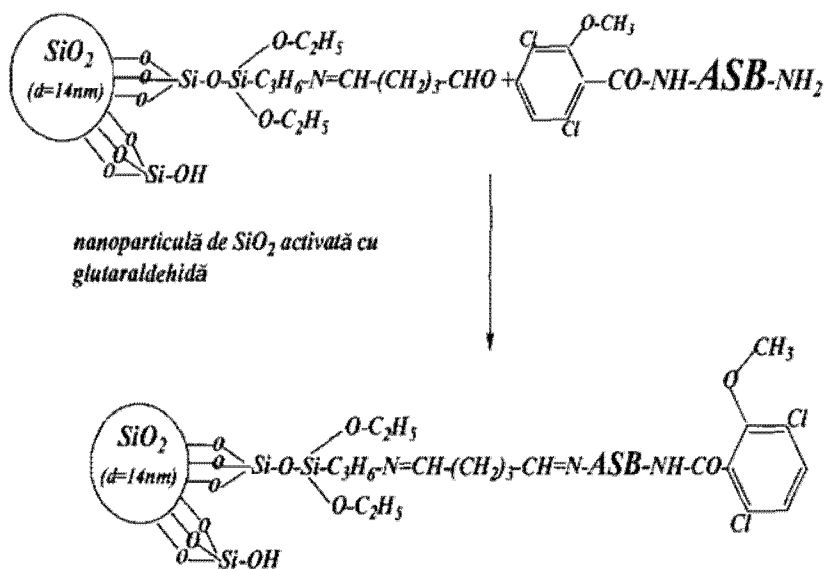
Reactia 3: Reacția de activare a acidului 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic



Reacția 4: Cuplarea albuminei serice de bovină de pesticidul activat



Reacția 5: Cuplarea conjugatului imunogen la nanoparticula activată cu glutaraldehidă



1 Procedeul conform invenției prezintă avantajul că, prin utilizarea nanoparticulelor de
oxid de siliciu de mărime 14 nm și suprafață specifică de 200 m²/g, rezultă nanoimuno-
3 sorbenți ce pot fi utilizați în tehnica ELISA în fază omogenă, reacția antigen anticorp fiind mai
rapidă decât în tehnica ELISA clasică (fază heterogenă), ceea ce conduce la reducerea
5 timpului de analiză, iar separarea complexului imun se face simplu, prin centrifugarea
nanoimunosorbentului cuplat cu antigenul, iar cantitatea de nanoimunosorbent utilizat la o
7 imunoanaliză este extrem de mică, datorită suprafeței specifice mari.

Se prezintă, în continuare, un exemplu de realizare a invenției.

9 2 g de nanoparticule de SiO₂, de mărime ϕ = 14 nm și arie 200 m²/g, se tratează cu
o soluție de HNO₃ 10%, timp de o oră, urmată de incubare cu a aminopropiltietoxisilan 10%
11 în apă distilată, pentru trei ore 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 pfrin centrifugare la 1500xg, timp
13 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,
15 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
17 ml conjugat imunogen-albumină serică de bovină-acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic, obținut
prin reacția E3 de activare a acidului 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic, amestec de reacție dintre
19 100 mg acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic, 50 mg N-hidroxisuccinimidă și 200 mg
carbodiimidă în 3,5 ml dimetilformamidă, reacție desfășurată timp de patru ore, sub agitare,
21 urmat de cuplarea albuminei serice de bovină de pesticidul activat, reacția E4 realizată prin
adaosul de 2 ml din amestecul activat de pesticid la 8 ml soluție de albumină serică de
23 bovină 20 mg/ml în tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6, reacție ce se desfășoară timp
de 24 h, iar conjugatul imunogen, rezultat, albumină serică de bovină-acid 3,6-dicloro-2-
25 metoxibenzoic, este purificat prin cromatografie pe coloană de Sephadex G25, având, ca
solvent de eluție, tampon fosfat 50 mM pH 7,24, iar conjugatul imunogen, purificat, de
27 concentrație 2 mg/ml în apă distilată, se adaugă la nanoparticulele activate cu glutaraldehydă,
amestecul de reacție, rezultat, se agită timp de două ore, apoi se centrifughează la 1500xg,
29 timp de 15 min, supernatantul se îndepărtează, iar precipitatul nanoparticule de imuno-
sorbent rezultat se spală de 3 ori cu tampon fosfat 50 mM pH 8,6, centrifugate la 1500xg, cu
31 îndepărtarea supernatantului, imunosorbentul, nanoparticule de bioxid de siliciu-amino-
propiltietoxisilan-glutaraldehyd-albumină serică de bovină-acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic,
33 se depozitează la 4°C, în vederea utilizării în tehnica ELISA de dozare a acidului 3,6-dicloro-
2-metoxibenzoic.

Procedeu de obținere a nanoimunisorbentului, nanoparticulă de bioxid de siliciu-aminopropil-trietoxisilan-glutaraldehyd-albumină serică de bovină-acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic, **caracterizat prin aceea că** acesta cuprinde următoarele etape: 5

a. 2 părți, în greutate, 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, se incubează cu aminopropiltriethoxisilan 10% în apă distilată timp de trei ore la 70°C , se spală de 3 ori cu 30 ml apă distilată și o dată cu 20 ml alcool etilic, iar supernatantul se îndepărtează prin centrifugare la 1500xg, timp de 10 min, obținându-se nanoparticule de bioxid de siliciu funcționalizate; 11

b. nanoparticulele obținute în etapa a se tratează cu 50 părți, în volum, soluție de glutaraldehydă 0,1% în apă distilată, sub agitare continuă, la temperatura de 35°C , iar supernatantul se îndepărtează prin centrifugare la 1500xg, timp de 15 min, obținându-se nanoparticule activate, care se suspendă în tampon fosfat 50 mM pH 8,6; 13

c. se amestecă 100 părți, în greutate, acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic, 50 părți, în greutate, N-hidroxisuccinimidă și 200 părți, în greutate, carbodiimidă în 3,5 părți, în volum dimetilformamidă, timp de patru ore, sub agitare, se cuplează albumina serică bovină cu pesticidul activat, iar 2 părți, în volum, din amestecul de pesticid activat, se adaugă la 8 părți, în volum, soluție de albumină serică bovină 20 mg/ml în tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6, timp de 24 h, și se obține albumină serică de bovină-acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic, care se purifică prin cromatografie pe coloană de Sephadex G25, având, ca solvent de eluție, tampon fosfat 50 mM pH 7,24, 23

d. conjugatul imunogen purificat din etapa c, de concentrație 2 mg/ml în apă distilată, se adaugă la nanoparticulele activate cu glutaraldehydă, obținute în etapa b, amestecul de reacție, rezultat, se agită timp de două ore, apoi se centrifughează la 1500xg, timp de 15 min, supernatantul se îndepărtează, iar precipitatul de nanoparticule de imunisorbent rezultat se spală de 3 ori cu tampon fosfat 50 mM pH 8,6, se centrifughează la 1500xg, se îndepărtează supernatantul și imunisorbentul nanoparticule de bioxid de siliciu-aminopropiltriethoxisilan-glutaraldehyd-albumină serică de bovină-acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic se depozitează la 4°C . 31

