



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

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

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

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

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

(72) Inventatori:
• DOROBANȚU IOAN,
ALEEA CÂMPUL CU FLORI NR. 1, BL. OD2,
SC. C, AP.110, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• NEAGU LIVIA,
STR. ALEXANDRU LĂPUȘNEANU NR.81,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU DE OBȚINERE A NANOIMUNOSORBENTULUI
BIOXID DE SILICIU-AMINOPROPILTRITOXISILAN-GLUTAR-
ALDEHID ANTICORP ANTIACID 3,6-DICLORO-2-
METOXIBENZOIC, UTILIZAT ÎN TEHNICA ELISA DE DOZARE
A PESTICIDULUI ACID 3,6-DICLORO-2- METOXIBENZOIC**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui nanoimunisorbent sub formă de nanoparticulă de bioxid de siliciu-aminopropil-trietoxisilan-glutaraldehyd-anticorp antiacid 3,6-diclor-2-metoxibenzoic, utilizat în tehnica ELISA. Procedeu conform invenției constă din tratarea timp de o oră a 2 g de nanoparticule de SiO₂, cu diametrul de 14 nm și suprafață de 200 mp/g, cu acid azotic 10%, urmată de incubare cu α-amino-propiltriethoxisilan 10% în apă distilată, timp de 3 h 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 glutaraldehidă 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 imunisorbent, care se păstrează la 4°C, în vederea utilizării în tehnica ELISA.

Revendicări: 1



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
 Cerere de brevet de invenție
 Nr. *a 206 00975*
 Data depozit *14-10-2010*

DESCRIERE

PROCEDEU DE OBTINERE A NANOIMUNOSORBENTULUI BIOXID DE SILICIU-AMINOPROPILTRIEOXISILAN-GLUTARALDEHID ANTICORP ANTI ACID 3,6-DICLORO-2-METOXIBENZOIC UTILIZAT ÎN TEHNICA ELISA DE DOZARE A PESTICIDULUI ACID 3,6-DICLORO-2-METOXIBENZOIC

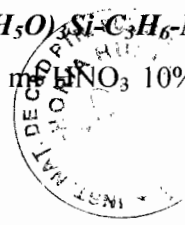
Invenția se referă la un procedeu de obținere a nanoimunisorbentului nanoparticulă de $(SiO_2)-(C_2H_5O)_3Si-C_3H_6-N=CH-(CH_2)_2-CH=N$ -anticorp anti acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic utilizat în tehnica ELISA (engl.: Enzyme Linked Immunosorbent Assay) de dozare a pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic (dicamba) din probe de mediu. În prezent sunt cunoscute pe plan mondial tehnici ELISA de dozare a pesticidelor ce utilizează în principal ca imunisorbent 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.

Procedeul conform invenției constă în cuplajul covalent al anticorpului antipesticid la nanoparticule 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 anticorpului 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).

Procedeul conform invenției constă în aceea că 2 g de nanoparticule de bioxid de siliciu de marime $\Phi=14 nm$ ($14 \cdot 10^{-9} m$) și arie $200 m^2/g$ sunt tratate cu HNO_3 10% timp de 1 oră la temperatura de $60^\circ C$ urmat de incubare cu soluție de α -aminopropiltriethoxisilan 10% în apă distilată pentru 3 ore la $70^\circ C$. Se spală cu apă distilată de 3 ori apoi cu alcool etilic și se depozitează la $4^\circ C$ 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.

Procedeul constă în 3 etape, E_1 , E_2 și E_3 :

E1: Obținerea nanoparticulelor $SiO_2-(C_2H_5O)_3Si-C_3H_6-NH_2$: 2 g de nanoparticule de SiO_2 ($\Phi=14 nm$ și arie specifica $200 m^2/g$) și 100 ml HNO_3 10% sunt agitate timp de 1 oră la



Director General IFIN-HH,
Dr. Nicolae Victor Zamfir

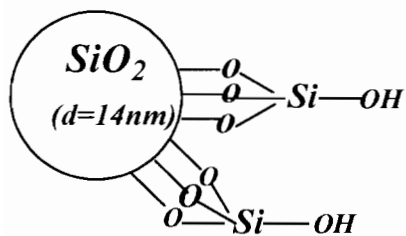
temperatura de 60°C. După îndepărtarea supernatantului prin centrifugare la 1500xg timp de 10 minute nanoparticulele sunt colectate și tratate cu 100 ml de α-aminopropiltriethoxisilan 10% în apă distilată sub continuă agitare, la temperatura de 70°C timp de 3 ore. Amestecul este centrifugat la 1500xg timp de 10 minute, supernatantul fiind înlăturat iar nanoparticulele de $\text{SiO}_2-(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{Si}-\text{C}_3\text{H}_6-\text{NH}_2$ 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.

E2: Obținerea nanoparticulelor activate de $\text{SiO}_2-(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{Si}-\text{C}_3\text{H}_6-\text{N}=\text{HC}-(\text{CH}_2)_3-\text{CHO}$:

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 minute urmată de centrifugare la 1500xg timp de 15 minute și îndepărtarea supernatantului. Nanoparticulele activate cu glutaraldehidă sunt folosite imediat pentru cuplarea cu anticorpul antiacid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic.

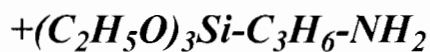
E3: Obținerea nanoimunisorbentului $\text{SiO}_2-(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{Si}-\text{C}_3\text{H}_6-\text{N}=\text{HC}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}=\text{N}$ -anticorp anti 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic: Nanoparticulele activate rezultate din etapa E2 se suspendă în 50 ml tampon fosfat 50 mM pH 8,6 apoi se adaugă 1 ml antiser anti acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic la temperatura de 35 °C sub agitare continuă timp de 2 ore urmat de centrifugare la 1500xg timp de 15 minute și îndepărtarea supernatantului apoi spălate de 3 ori cu tampon fosfat 50 mM pH 8,6, nanoparticulele de imunisorbent $\text{SiO}_2-(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{Si}-\text{C}_3\text{H}_6-\text{N}=\text{HC}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}=\text{N}$ -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.

Reactii chimice de obținere a nanoimunisorbentului nanoparticulă de $(\text{SiO}_2)-(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{Si}-\text{C}_3\text{H}_6-\text{N}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}=\text{N}$ -anticorp anti acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic:

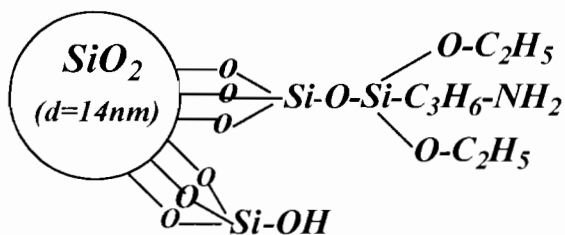


nanoparticula de SiO_2
d=14nm S=200m²/g

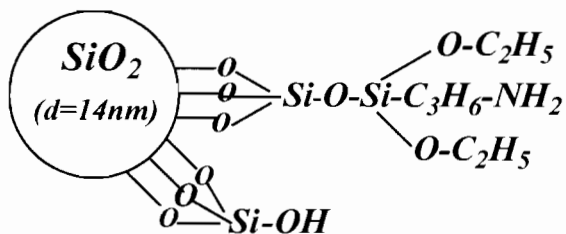
(Faza solida)



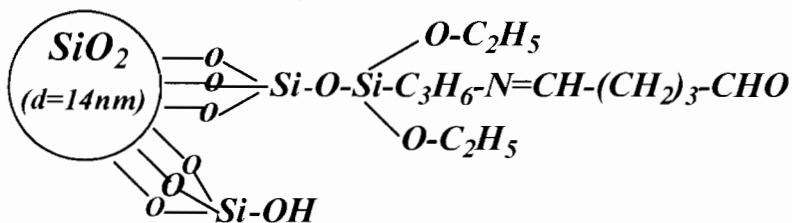
(α -aminopropiltri-
-etoxisilan)



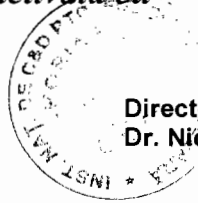
(nanoparticula de SiO_2 grefata cu
 α -aminopropiltri-
-etoxisilan)

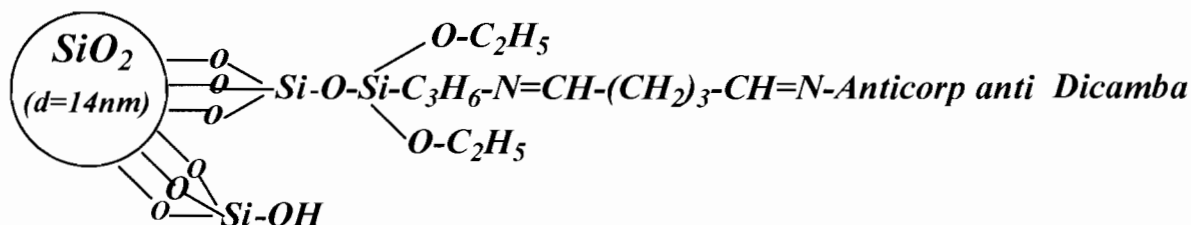
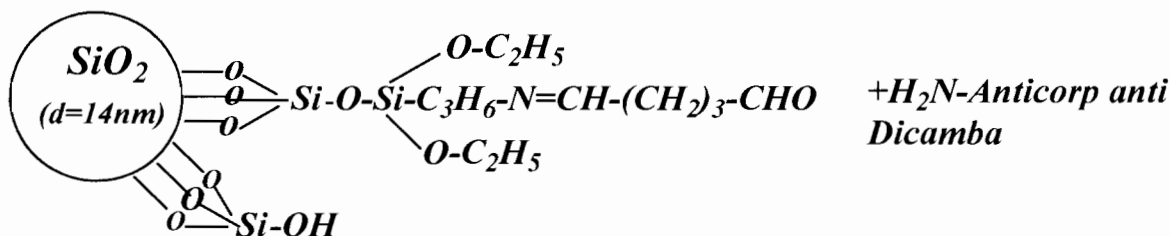


(glutaraldehida)



nanoparticula de SiO_2 activata cu
glutaraldehida





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

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 nanoimunosorbenti 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 timpului de analiză, iar separarea complexului imun se face simplu, prin centrifugarea nanoimunosorbentului cuplat cu antigenul iar cantitatea de nanoimunosorbent utilizat la o imunoanaliză este extrem de mică datorită suprafeței specifice mari.

Se prezintă mai jos un exemplu de aplicare a procedurii conform invenției pentru obținerea nanoimunosorbentului nanoparticulă de bioxid de siliciu-aminopropil-trietoxisilan-glutaraldehyd-anticorp anti acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic ce conține obiectul acestei invenții.

Potrivit invenției 2 g de nanoparticule de SiO_2 de mărime $\Phi=14$ 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 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 prin centrifugare la $1500\times g$ timp de 10 minute 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 $1500\times g$ timp de 15 minute 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 ore sub continuă agitare urmată de 3 spălări cu tampon fosfat 50 mM pH 8,6 și îndepărtarea supernatantului prin centrifugare la $1500\times g$ timp de 15 minute iar nanoparticulele de imunosorbent bioxid de siliciu-aminopropil-triethoxisilan-glutaraldehyd-anticorp anti acid 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.



REVENDICĂRI

Procedeul de obținere a nanoimunisorbentului nanoparticulă de bioxid de siliciu-aminopropil-trietoxisilan-glutaraldehyd-anticorp anti acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic este caracterizat prin aceea că 2 g de nanoparticule de SiO_2 de mărime $\Phi=14$ 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 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 prin centrifugare la $1500 \times g$ timp de 10 minute 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 $1500 \times g$ timp de 15 minute 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 ore sub continuă agitare urmată de 3 spălări cu tampon fosfat 50 mM pH 8,6 și îndepărtarea supernatantului prin centrifugare la $1500 \times g$ timp de 15 minute iar nanoparticulele de imunisorbent bioxid de siliciu-aminopropil-trietoxisilan-glutaraldehyd-anticorp anti acid 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.