



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2010 01271

(22) Data de depozit: 02.12.2010

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

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
FIZICĂ ȘI INGINERIE NUCLEARĂ "HORIA  
HULUBEI", STR. ATOMIȘTILOR NR. 407,  
PO BOX MG-6, 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 OBTINERE A NANOIMUNOSORBENTULUI  
BIOXID DE SILICIU-AMINOPROPILTRITOXISILAN-  
GLUTARALDEHID-ALBUMINĂ SERICĂ DE BOVINĂ-ACID 3,  
6-DICLORO-2-METOXIBENZOIC UTILIZAT ÎN TEHNICA  
ELISA DE DOZARE A PESTICIDULUI ACID 3, 6-DI-  
CLORO-2-METOXIBENZOIC**

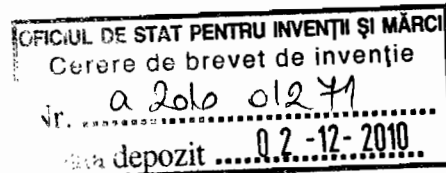
(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a unui nanoimunosorbent bioxid de siliciu- aminopropiltriectoxisilan-glutaraldehydă-albumină serică de bovină-acid 3, 6-diclor-2-metoxibenzoic, cu utilizare în tehnica ELISA de dozare a acidului 3, 6-diclor-2-metoxibenzoic, prin tratarea nanoparticulelor de SiO<sub>2</sub> cu soluție 10% de HNO<sub>3</sub>, incubarea la 70°C cu derivatul de siliciu, activarea nanoparticulelor separate și spălate cu glutaraldehydă 0,1%, suspendarea nanoparticulelor

izolate și spălate în tampon fosfat, adăugarea conjugatului imunogen albumină serică de bovină-acid 3, 5-diclor-2-metoxibenzoic, obținut separat, cu agitare timp de 2 h, după care, prin centrifugare, spălare cu tampon fosfat și din nou centrifugare, este separat imunosorbentul sub formă de nanoparticule.

Revendicări: 1





## DESCRIERE

### PROCEDEU DE OBTINERE A NANOIMUNOSORBENTULUI BIOXID DE SILICIU-AMINOPROPILTRIETOXISILAN-GLUTARALDEHID-ALBUMINA SERICA DE BOVINA-ACID 3,6-DICLORO-2-METOXIBENZOIC UTILIZAT ÎN TEHNICA ELISA DE DOZARE A PESTICIDULUI ACID 3,6-DICLORO-2-METOXIBENZOIC

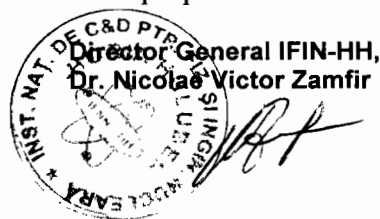
Invenția se referă la un procedeu de obținere a nanoimunosorbentului nanoparticulă de (SiO<sub>2</sub>)-(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O)<sub>3</sub>Si-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-N=CH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH=N-albumina serică de bovină-acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic utilizat în tehnica ELISA (engl.: 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 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.

Procedeu conform invenției constă în cuplajul covalent al antigenului conjugatului imunogen-albumina serica de bovină- acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic la nanoparticule de bioxid de siliciu având avantajul unei suprafețe specifice mari (> 200 m<sup>2</sup>/g) comparativ cu metoda clasică (cm<sup>2</sup>/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).

Procedeu 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<sup>2</sup>/g sunt tratate cu HNO<sub>3</sub> 10% timp de 1 oră la temperatura de 60°C urmat de incubare cu soluție de  $\alpha$ -aminopropiltriethoxisilan 10% în apă distilată pentru 3 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. Procedeu conform invenției constă în aceea că legarea covalentă a antigenului proteină-pesticid de nanoparticulă folosește glutaraldehida ca agent de cuplaj.

Procedeu constă în 5 etape, E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>, E<sub>4</sub> și E<sub>5</sub>:

**E1: Obținerea nanoparticulelor SiO<sub>2</sub> grefate cu  $\alpha$ -aminopropiltriethoxisilan:** 2 g de nanoparticule de SiO<sub>2</sub> ( $\Phi=14$  nm și arie specifică 200 m<sup>2</sup>/g) și 100 ml HNO<sub>3</sub> 10% sunt agitate timp de 1 oră la temperatura de 60°C. După îndepărtarea supernatantului prin centrifugare la 1500xg timp de 10 minute nanoparticulele sunt colectate și tratate cu 100 ml de  $\alpha$ -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: 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 minute urmată de centrifugare la 1500xg timp de 15 minute și îndepărtarea supernatantului. Nanoparticulele activate cu glutaraldehidă sunt folosite imediat pentru cuplarea cu antigenul albumină serică de bovină-acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic.

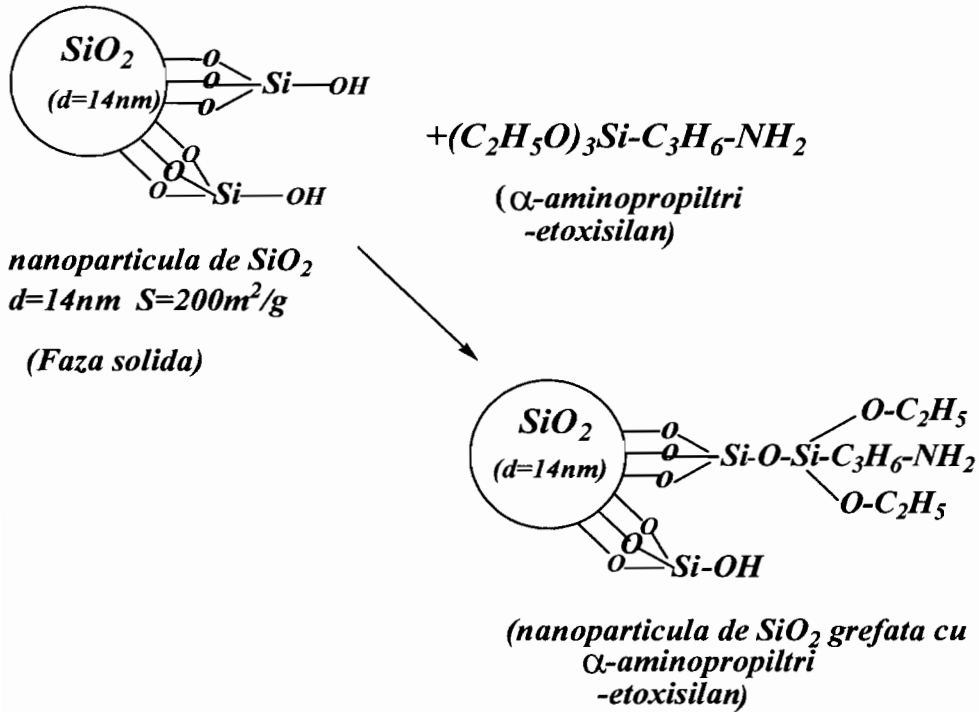
**E3: Reacția de activare a acidului 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic:** 100 mg acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic, 50 mg N-hidroxisuccinimidă și 200 mg de carbodiimidă în 3,5 ml dimetilformamidă sunt puse în reacție timp de 4 ore sub agitare magnetică la temperatura camerei în vederea activării grupării carboxi 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 50mM pH 9,6. Reacția de cuplare la proteină se efectuează timp de 24 ore sub continuă agitare la temperatura camerei. Produsul obținut acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-albumină serică de bovină se purifică pe cromatografie pe coloană de Sephadex G25 având ca solvent de eluție tamponul fosfat 50mM pH 7,24.

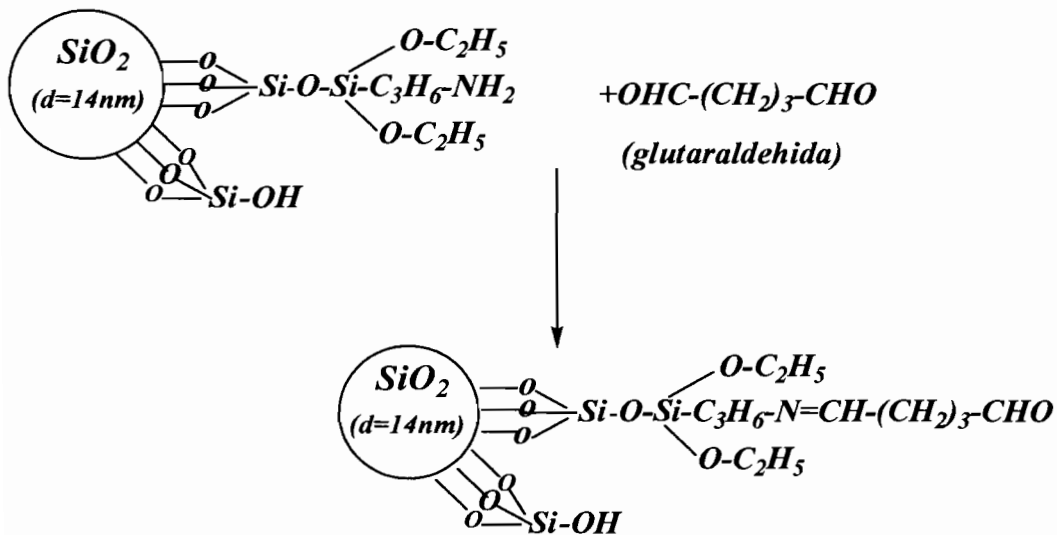
**E5: Cuplarea conjugatului imunogen la nanoparticula funcționalizată:** Nanoparticulele activate rezultate din etapa E2 se suspendă în 50 ml tampon fosfat 50 mM pH 8,6 apoi se adaugă 1 ml soluție conjugat imunogen albumină serică de bovină-acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic 2 mg/ml la temperatura de 35 °C sub agitare continuă timp de 2 ore urmată 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 imunosorbent  $\text{SiO}_2-(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{Si}-\text{C}_3\text{H}_6-\text{N}=\text{HC}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}=\text{N}$ -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:

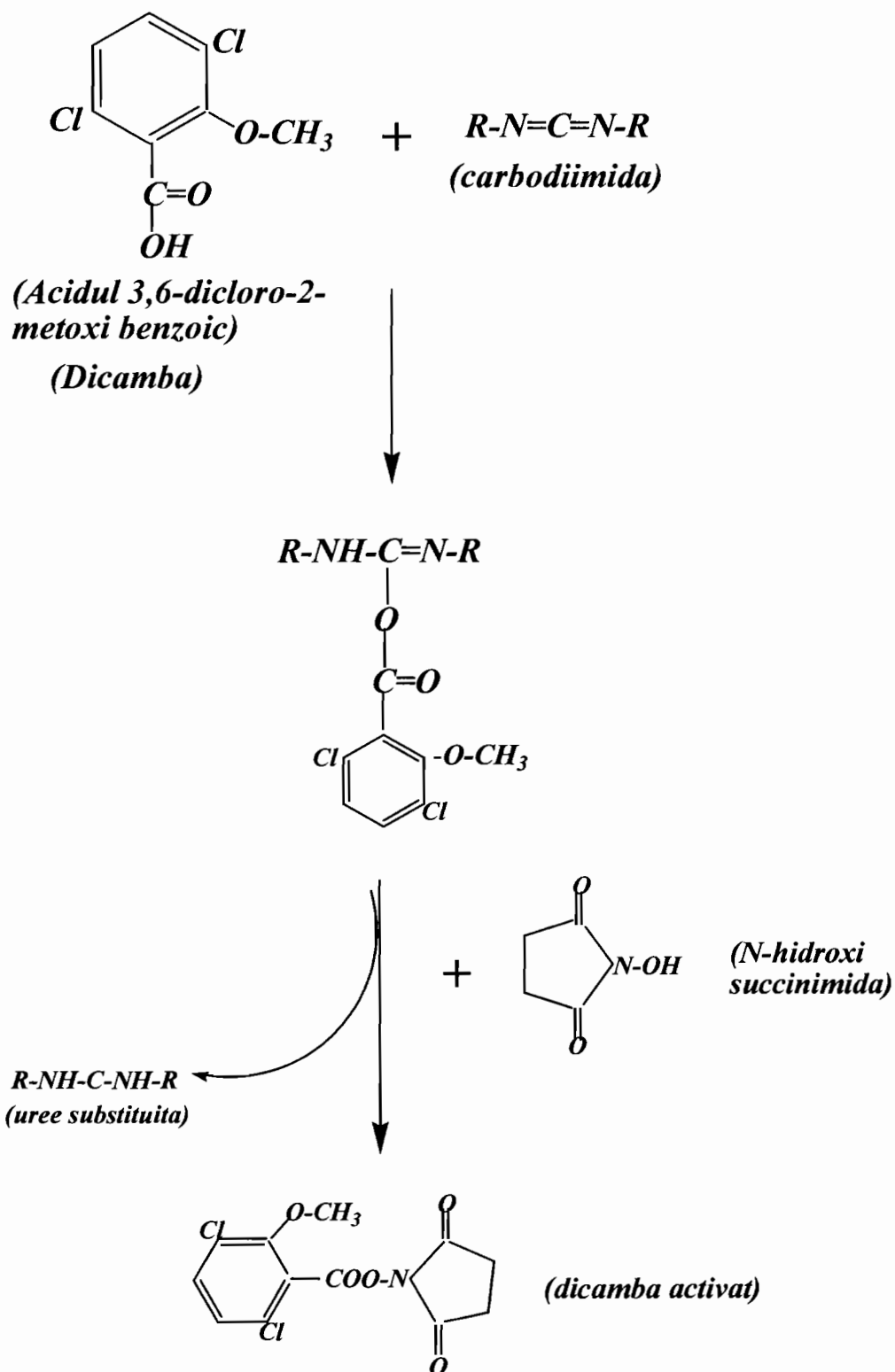
**Reactia 1: Obtinerea nanoparticulelor de bioxid de siliciu functionalizate**



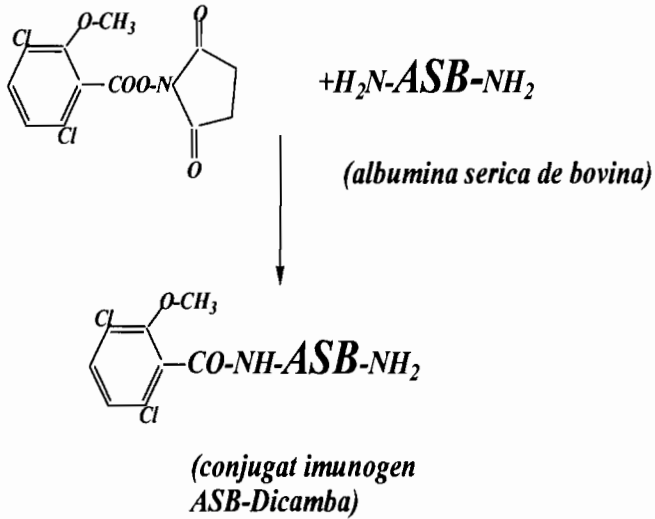
**Reactia 2: Activarea nanoparticulei functionalizate cu glutaraldehida**



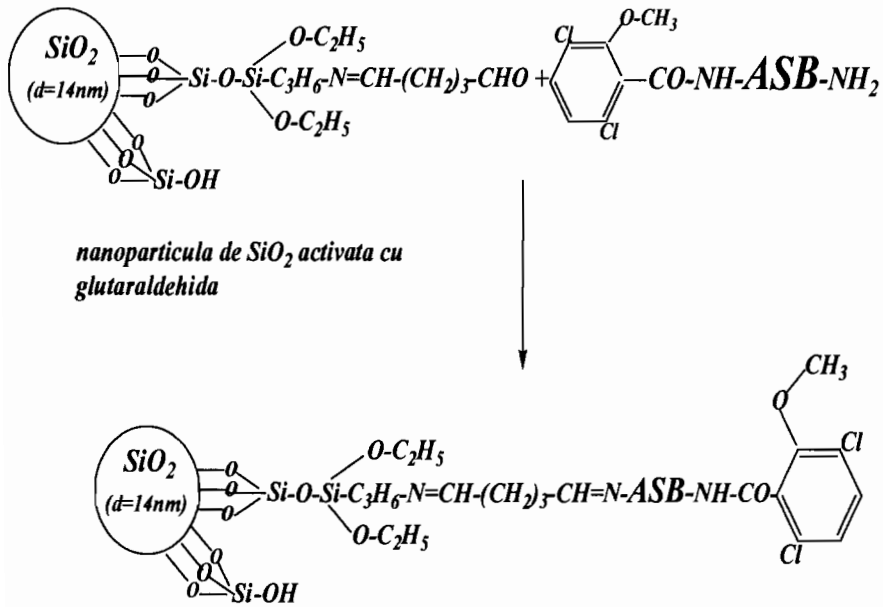
**Reactia 3: Reactia de activare a acidului 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic**



**Reactia 4: Cuplarea albuminei serice de bovina de pesticidul activat**



**Reactia 5: Cuplarea conjugatului imunogen la nanoparticula activata cu glutaraldehida**



**Imunosorbent: nanoparticula de bioxid de siliciu-aminopropiltriethoxisilan-glutaraldehyd- albumina serica de bovina-acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic**

Procedeu conform invenției prezintă avantajul că, prin utilizarea nanoparticulelor de oxid de siliciu de mărime 14 nm și suprafață specifică de 200 m<sup>2</sup>/g rezultă nanoimunosorbenți 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-albumină serică de bovină-acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic ce conține obiectul acestei invenții.

Potrivit invenției 2 g de nanoparticule de SiO<sub>2</sub> de mărime  $\Phi=14$  nm și arie 200 m<sup>2</sup>/g se tratează cu o soluție de HNO<sub>3</sub> 10% timp de o oră urmată de incubare cu  $\alpha$  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 1500xg 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 1500xg timp de 15 minute iar nanoparticulele activate rezultate se suspendă în tampon fosfat 50 mM pH 8,6 urmat de adăugarea de 1 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 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 4 ore sub agitare, 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 bovină 20 mg/ml în tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6, reacție ce se desfășoară timp de 24 ore iar conjugatul imunogen rezultat, albumină serică de bovină-acid 3,6-dicloro-2-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 concentrație 2 mg/ml în apă distilată se adaugă la nanoparticulele activate cu glutaraldehydă, amestecul de reacție rezultat se agită timp de 2 ore apoi se centrifughează la 1500xg timp de 15 minute, supernatantul se îndepărtează iar precipitatul nanoparticule de imunosorbent rezultat se spală de 3 ori cu tampon fosfat 50 mM pH 8,6, centrifugate la 1500xg cu îndepărtarea supernatantului, imunosorbentul nanoparticule de bioxid de siliciu-aminopropiltriethoxisilan-glutaraldehyd-albumină serică de bovină- acid 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.

## REVENDICĂRI

Procedul de obținere a nanoimunisorbentului nanoparticulă de bioxid de siliciu-aminopropil-trietoxisilan-glutaraldehyd-albumină serică de bovină-acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic este caracterizat prin aceea că 2 g de nanoparticule de  $\text{SiO}_2$  de mărime  $\Phi=14$  nm și arie  $200 \text{ m}^2/\text{g}$  se tratează cu o soluție de  $\text{HNO}_3$  10% timp de o oră urmată de incubare cu  $\alpha$  aminopropiltriethoxisilan 10% în apă distilată pentru 3 ore la  $70^\circ\text{C}$  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  $35^\circ\text{C}$  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 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 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 4 ore sub agitare, 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 bovină 20 mg/ml în tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6, reacție ce se desfășoară timp de 24 ore iar conjugatul imunogen rezultat, albumină serică de bovină-acid 3,6-dicloro-2-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 concentrație 2 mg/ml în apă distilată se adaugă la nanoparticulele activate cu glutaraldehydă, amestecul de reacție rezultat se agită timp de 2 ore apoi se centrifughează la  $1500\times g$  timp de 15 minute, supernatantul se îndepărtează iar precipitatul nanoparticule de imunisorbent rezultat se spală de 3 ori cu tampon fosfat 50 mM pH 8,6, centrifugate la  $1500\times g$  cu îndepărtarea supernatantului, imunisorbentul nanoparticule de bioxid de siliciu-aminopropiltriethoxisilan-glutaraldehyd-albumină serică de bovină- acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic se depozitează la  $4^\circ\text{C}$  în vederea utilizării în tehnica ELISA de dozare a acidului 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic.