



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00906**

(22) Data de depozit: **25/11/2016**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/10/2021** BOPI nr. **10/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/05/2018 BOPI nr. **5/2018**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
ȘI DEZVOLTARE PENTRU FIZICĂ ȘI
INGINERIE NUCLEARĂ "HORIA
HULUBEI", STR.REACTORULUI NR.30,
C.P. MG-6, 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, ALEEA POIANA VADULUII**
NR.1, BL.OD8, SC.1, AP.10, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
RO 132003 A4; RO 13121 B1

(54) **TEHNICA ELISA ÎN FAZĂ OMOGENĂ PE BAZĂ DE
NANOIMUNOSORBENȚI DE SiO₂ PENTRU DETECȚIA
DE PESTICIDE ORGANOCOLORURATE DIN PRODUSE
ALIMENTARE ȘI DE MEDIU**



RO 132614 B1

1 Invenția se referă la tehnica ELISA în fază omogenă pe bază de nanoimunosorbenți
de SiO₂ pentru detecția de pesticide organoclorurate din produse alimentare și de mediu.

3 În prezent sunt cunoscute tehnici ELISA (engleza: Enzyme Linked Immunosorbent
Assay) de dozare pesticidică care folosesc ca imunosorbent suprafețe de polistiren (placi
5 ELISA) acoperite cu antigen (pesticid) sau anticorpi (anticorpi antipesticid) componente
cuplate la suprafața fazei solide prin adsorbție fizică sau utilizarea de microparticule
7 magnetice de Fe₂O₃ [N. T. K. Thanh, L.A.W Green, **Functionalization of nanoparticles
for biomedical applications, Nano Today, vol. 5, pp. 213-230, 2010; C. XU. S. Sun,
9 Nanodisperse magentic nanoparticles for biomedical applications, Polymer
International, vol. 56, pp. 821-826, 2007]** și pe baza de SiO₂ [Dorobanțu Ion, Haranguș
11 Livia, **Tehnică imunochimică de dozare a pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxi-
benzoic din probe de mediu, brevet RO 125452/30.06.2011, B. A. Kairdof, M. C. Mancini,
13 A. M. Smith, S. Nie, Minimizing nonspecific cellular binding of quanrum dots with
hydroxyl-derivatized surface coating, Analytical Chemistry, vol. 80, issue 8, pp. 3029-
15 3034, 2008, A. M. Smith, S. Nie, Minimizing the hydrodynamic size of quantum dots
with multifunctional multidentate polymer ligands, Journal of the American Chemical
17 Society, vol. 130, issue 34, pp. 11278-11279, 2008, C. Graf, S. Dembski, A. Hofman, E.
Ruhl, **A general method for the contolled emnedding of nanoparticles in silica colloids,
19 Langmuir, vol. 22, insue 13, pp. 5604-5610, 2006]** sau nanoimunosorbenți pe bază de SiO₂
utilizați în cromatografia de afinitate [Dorobanțu Ion, Neagu Livia, **Procedeu de obținere
21 a anticorpilor anti acid 2,4-diclorofenoxiacetic (2,4D) din amestecuri complexede
proteine pe bază de nanoimunosorbenți, Cererea de brevet de invenție OSIM
23 A00911/26.11.2014].****

25 Problema pe care o rezolvă invenția constă în prezentarea unei metode de detecție
a pesticidelor organoclorurate din produse alimentare și de mediu printr-o tehnică ELISA în
fază omogenă pe bază de nanosorbenți de SiO₂.

27 Metoda de detecție a pesticidelor organoclorurate din produse alimentare și de mediu
printr-o tehnică ELISA în fază omogenă pe bază de nanosorbenți de SiO₂, conform invenției,
29 constă în punerea în competiție pesticidul respectiv pesticidul marcat enzimatic cu anticorpul
antipesticid existent pe suprafața nanoimunosorbentului, prin introducerea în tuburi de tip
31 Ellerman, în ordine, a 1 ml tampon fosfat de sodiu 10mM pH 7,2, 100 μl suspensie de
nanoimunsorbant rezultat în 20 μg E1, 100 μl suspensie de nanoparticule de SiO₂ funcțio-
33 nalizate numai cu 1 μg proteină nespecifică utilizate ca antrenor, 100 μl de soluție standard
de pesticid 2,4-diclorofenoxiacetic în concentrații de 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50 și 100 ng/ml sau
35 probă de analizat sub formă de extract lichid, 100 μl soluție de albumină serică de capră de
concentrație 1 mg/ml și 100 μl de soluție de marker enzimatic de 2,4-d-fosfatază alcalină de
37 concentrație 10 ng/ml, iar tuburile sunt închise cu dopuri de plastic și agitare în poziție
orizentală la agitatorul electric timp de o oră în vederea atingerii echilibrului chimic al reacției
39 componentelor anticorp antipesticid și antigenul pesticid și pesticidul marcat enzimatic,
tuburile sunt centrifugate timp de 15 min, supernatantul este îndepărtat iar în tuburi se intro-
41 duce apoi 1 ml soluție de p-nitrofenilfosfat de concentrație 1 ng/ml susbtrat enzimatic pentru
fosfataza alcalină din complexul imunformat de pe suprafața nanoimunosorbentului din
43 precipitat, tuburile sunt agitate timp de 10 min, iar reacția enzimatică este stopată cu 100 μl
soluție NaOH de 0,1 M, reacția de culoare dezvoltată este măsurată streptochimic la
45 lungimea de undă de 405 nm.

RO 132614 B1

Tehnica conform invenției utilizează ca nanoimunisorbenți nanoparticule de SiO₂ funcționalizate cu anticorpi antipesticizi cuplați covalent la suprafața nanoparticulei de SiO₂ și proteina nespecifică cuplată imunologic la aceeași suprafață în raport molar cunoscut și ales conform cu criteriile optime de sensibilitate și specificitate cerute de tehnică.

Avantajele tehnicii ELISA în fază omogenă pe bază de nanoimunisorbenți constau în:

- suprafața externă funcțională a nanoimunisorbentului de (100-200) m²/g echivalent (10⁶-2*10⁶) suprafața de 1 cm²/probă în tehnica ELISA clasică (1 cm²/proba suprafața godeu) avantaj care duce la scăderea prețului de cost per analiză;

- folosirea nanoparticulelor de SiO₂ funcționalizate cu anticorpi prezintă avantajul suprafeței specifice mari 200 m²/g ceea ce permite efectuarea unui număr mare de analize și anume 2*10⁶ analize/g de nanoimunisorbent comparativ cu tehnica descrisă în [3];

- rapiditatea tehnicii: reacția antigen-anticorp în faza omogenă se realizează prin aceea că cele două componente antigenul (pesticidul) și antigenul marcat enzimatic sunt în contact direct cu anticorpul omolog (anticorp antipesticid) cuplat covalent la suprafața nanoimunisorbentului existent în suspensie în sistemul de reacție în comparație cu reacția lentă prin difuzie cu anticorpul existent la suprafața fazei solide (godeu) din tehnica ELISA clasică (difuzia pesticidului și a pesticidului marcat enzimatic la suprafața godeului la care este cuplat anticorpul antipesticid prin adsorbție fizică;

- stabilitatea nanoimunisorbentului: cuplajul covalent al anticorpului la suprafața nanoparticulei este stabil în comparație cu fenomenul de instabilitate legat de desorbția anticorpului de pe suprafața godeului fapt ce poate afecta analiza;

- nanoimunisorbentul astfel realizat cuprinde două specii moleculare cuplate covalent la suprafața nanoparticulelor: anticorpul antipesticidic și proteina nespecifică imunologic în raport molar prestabilit care în reacție cu markerul enzimatic 2,4-D-fosfataza alcalină și cu 2,4-D permite obținerea unei sensibilități crescute în comparație cu [**Dorobanțu Ion, Haranguș Livia, "Tehnică imunochimică de dozare a pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxi-benzoic din probe de mediu", brevet RO125452/30.06.2011**] prin scăderea efectului nespecificității la suprafața nanoparticulelor ceea ce duce la îmbunătățirea sensibilității și a acurateții sistemului de analiză;

- datorită suprafeței specifice mari cantitatea de nanoimunisorbent utilizată la o analiză este foarte mică, de ordinul (1-2) μg fapt care necesită folosirea ca antrenor a (1-2) mg nanoimunisorbent nanoparticule de SiO₂ funcționalizate cu proteina nespecifică de separare prin centrifugare, precipitatul format din nanoparticule de antrenor care include nanoimunisorbentul marcat enzimatic, supernatantul este înlăturat iar activitatea enzimatică a nanoimunisorbentului din precipitat este măsurată prin folosirea substratului enzimatic *p*-nitrofenilfosfat.

Metoda conform invenției consta în trei etape principale: E1, E2 și E3 și sunt redate schematic după descrierea acestora.

E1) Sinteza nanoimunisorbentului format din nanoparticule de SiO₂ la suprafața cărora se cuplează anticorpul antipesticid (anticorpul anti acid 2,4-diclorofenoxiacetic) și proteina nespecifică imunologic (albumina serică de capră) în raport molar dat, anticorp antipesticid: proteina specifică 1:10.

E2) Sinteza markerului enzimatic pesticid-enzima acid 2,4-diclorofenoxiacetic-fosfataza alcalină.

E3) Tehnica ELISA în fază omogenă, procedura de lucru.

RO 132614 B1

1 Descrierea etapelor tehnicii:

2 E1) Sinteza nanoimunisorbentului format din nanoparticule de SiO₂ la suprafața
3 cărora se cuplează anticorpii antipesticid (anticorpii anti acid 2,4-diclorofenoxiacetic) și
4 proteina nespecifică imunologic (albumina serică de capră) în raport molar dat de criteriul de
5 sensibilitate optimal al tehnicii cuprinde patru reacții, R1, R2, R3 și R4, unde reacțiile R1 și
6 R2 sunt conforme cu descrierea din [**Dorobanțu Ion, Neagu Livia, “Procedeu de obținere
7 a anticorpilor anti acid 2,4-diclorofenoxiacetic (2,4D) din amestecuri complexede
8 proteine pe bază de nanoimunisorbenți” Cererea de brevet de invenție OSIM
9 A00911/26.11.2014**]:

10 R1) Reacția de cuplare a α -aminopropiltriethoxisilan la nanoparticulele de SiO₂

11 R2) Reacția de activare cu glutaraldehida

12 R3) Reacția de cuplare a anticorpului antipesticid la componentul rezultat în reacția

13 R2

14 R4) Reacția de cuplare a proteinei nespecifice imunologic (albumina serică de capra)

15 R1) Reacția de cuplare a α -aminopropiltriethoxisilan la nanoparticulele de SiO₂ 100 mg
16 nanoparticule de SiO₂ ($\varnothing = 14$ nm și arie specifică 200 m²/g) și 10 ml HNO₃ sunt agitate la
17 temperatura de 80°C timp de 30 min. După îndepărtarea soluției acide prin centrifugare la
18 1500 x g timp de 5 min a suspensiei apoi nanoparticulele sunt spălate cu apa deionizată.
19 Nanoparticulele sunt colectate și tratate cu 5 ml soluție 10% de α -aminopropiltriethoxisilan în
20 apă deionizată sub continuă agitare la temperatura de 80°C timp de 3 h. Suspensia este
21 centrifugată la 1500 x g timp de 5 min, supernatantul este îndepărtat iar nanoparticulele
22 grefate de SiO₂-(C₂H₅O)₂-Si-C₃H₆-NH₂ sunt colectate și spălate de 3 ori cu apă deionizată,
23 urmată de spălare cu 10 ml alcool etilic și resuspendate în 10 ml apă deionizată.

24 R2) Reacția de activare cu glutaraldehida

25 2 ml nanoparticule grefate cu α -aminopropiltriethoxisilan rezultate în reacția R1)
26 (10 mg/ml) în apă deionizată sunt tratate cu 200 μ l soluție de glutaraldehidă 50% sub
27 continuă agitare timp de o oră urmat de centrifugare la 1500 x g timp de 5 min. Supernatantul
28 este îndepărtat iar nanoparticulele activate cu glutaraldehida sunt spălate cu apă deionizată
29 și suspendate în soluție de NaCl 9‰ în vederea cuplării cu anticorpii anti 2,4-D.

30 R3) Reacția de cuplare a anticorpului antipesticid la componentul rezultat în reacția
31 R2 200 μ l soluție de anticorp anti 2,4-D (2 mg/ml) au fost introduși peste suspensia de
32 nanoparticule (5 mg/ml) activate cu glutaraldehida în reacția R2) sub continuă agitare timp
33 de 4 h pentru legarea covalentă a anticorpilor la suprafața nanoparticulei la temperatura
34 camerei.

35 R4) Reacția de cuplare a proteinei nespecifice imunologic, albumina serică de capră,
36 în raport masic 10:1 față de anticorp anti 2,4-D.

37 Reacția de cuplare a proteinei se desfășoară 24 h la temperatura de 4°C urmată de
38 centrifugare la 1500 x g timp de 15 min, supernatantul este îndepărtat iar nanoimunisor-
39 bentul format este suspendat în tampon fosfat de sodiu 10 mM pH 7,2 și depozitat la 4°C în
40 vederea utilizării în tehnica ELISA.

41 E2) **Sinteza markerului enzimatic pesticid-enzima acid 2,4-diclorofenoxiacetic-
42 fosfatasa alcalină** constă în cinci etape: e1, e2, e3, e4 și e5.

43 e1) Reacția de activare a pesticidului acid 2,4-diclorofenoxiacetic (2,4-D) cu 1-etil-
44 3(3'-diaminopropil)-carbodiimida (CDI) și N-hidroxisuccinimida (NHS): 10 mg 2,4-D, 20 mg
45 CDI și 10 mg NHS în 1,0 ml dimetilformamida (DMF) au fost agitate timp de 30 min în
46 vederea activării grupării carboxil a pesticidului 2,4-D;

47 e2) Cuplarea pesticidului 2,4-D activat cu 1,8 diaminoctan: 0,5 ml amestec activ
48 rezultat în e1) se introduce peste 1 ml soluție de 1,8 diaminoctan 50 mg/ml în tampon
49 carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6 și lăsat să reacționeze timp de 4 h în vederea cuplării;

RO 132614 B1

e3) Purificarea compusului 2,4-D-amido-octil-amina: Purificarea compusului este efectuată prin cromatografie în strat subțire pe Silicagel G având ca eluent amestecul alcool etilicapa în proporții 60:40 (V/V);	1 3
e4) Cuplarea derivatului pesticidic la fosfataza alcalină: derivatul pesticidic purificat în etapa e3) (4 mg) în 1 ml tampon fosfat 10 mM pH 8,2 și 500 μl soluție de fosfatază alcalină (1 mg/ml) sunt amestecate și apoi sub continuă agitare se adaugă 100 μl soluție de glutaraldehidă 1% picătură cu picătură și lăsate să reacționeze timp de 4 h pentru cuplare;	5 7
e5) Purificarea compusului 2,4-D-amido-octil-glutaraldehid-fosfataza alcalină: purificarea markerului enzimatic pesticid-enzima 2,4-D-amido-octil-glutaraldehid-fosfataza alcalină se efectuează prin cromatografie pe coloană de Sephadex G25 (30*1) cm având ca eluent tamponul fosfat de sodiu 5 mM pH 7,2, produsul purificat este depozitat la -10°C în vederea utilizării în tehnica ELISA în fază omogenă de dozare pesticidică din probe alimentare și de mediu.	9 11 13
E3) Tehnica ELISA în fază omogenă, procedura de lucru	
În tuburi din polistiren tip Ellerman (volum 3 ml) se introduc în ordine următoarele componente:	15
- 1 ml tampon fosfat de sodiu 10 mM pH 7,2;	17
- 100 μl suspensie de nanoimunosorbent rezultat în EI (20 μg);	
- 100 μl suspensie de nanoparticule de SiO ₂ funcționalizate numai cu proteina nespecifică (1 mg) utilizate ca antrenor (procedura de obținere a antrenorului este identică cu R4) de la obținerea nanoimunosorbentului);	19 21
- 100 μl soluție standard de pesticid 2,4-D în concentrațiile de 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50 și 100 ng/ml sau proba de analizat (extract lichid);	23
- 100 μl soluție de albumină serică de capră (1 mg/ml);	
- 100 μl soluție de marker enzimatic 2,4-D-fosfataza alcalină (10 ng/ml).	25
Tuburile sunt închise cu dopuri de plastic și agitate în poziție orizontală la agitatorul electric timp de 1 h, apoi sunt centrifugate la 1500 x g, timp de 15 min, supernatantul este îndepărtat și se introduce în tuburi 1 ml soluție de substrat enzimatic <i>p</i> -nitrofenilfosfat (1 mg/ml), din nou agitate timp de 10 min urmată de stoparea reacției enzimatice prin adăos de 100 μl soluție de NaOH 0,1 M, reacția de culoare dezvoltată și măsurată la lungimea de undă de 405 nm.	27 29 31

RO 132614 B1

Revendicări

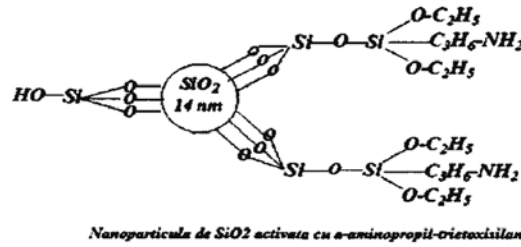
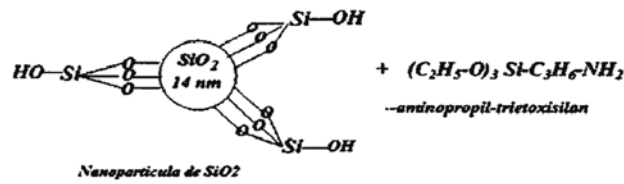
1
3 1. Metodă de detecție a pesticidelor organoclorurate din produse alimentare și de
5 mediu printr-o tehnică ELISA în fază omogenă pe bază de nanosorbenti de SiO₂
7 **caracterizată prin aceea că** consta în punerea în competiție a pesticidul respectiv, pesticidul
9 marcat enzimatic cu anticorpii antipesticid existent pe suprafața nanoimunisorbentului, prin
11 introducerea în tuburi de tip Ellerman, în următoarea ordine, 1 ml tampon fosfat de sodiu
13 10 mM pH 7,2, 100 μl suspensie de nanoimunsorbant rezultat în 20 μg E1, 100 μl suspensie
15 de nanoparticule de SiO₂ funcționalizate numai cu 1 μg proteină nespecifică utilizate ca
17 antrenor, 100 μl de soluție standard de pesticid 2,4-diclorofenoxiacetic în concentrații de 0, 1,
19 2, 5, 10, 20, 50 și 100 ng/ml sau probă de analizat sub formă de extract lichid, 100 μl soluție
21 de albumină serică de capră de concentrație 1 mg/ml și 100 μl de soluție de marker
enzimatic de 2,4-d-fosfatază alcalină de concentrație 10 ng/ml, iar tuburile sunt închise cu
dopuri de plastic și agitate în poziție orizontală la agitatorul electric timp de o oră în vederea
atingerii echilibrului chimic al reacției componentelor anticorp antipesticid și antigenul pesticid
și pesticidul marcat enzimatic, tuburile sunt centrifugate timp de 15 min, supernatantul este
îndepărtat iar în tuburi se introduce apoi 1 ml soluție de p-nitrofenilfosfat de concentrație 1
ng/ml substrat enzimatic pentru fosfataza alcalină din complexul imunformat de pe suprafața
nanoimunisorbentului din precipitat, tuburile sunt agitate timp de 10 min, iar reacția
enzimatică este stopată cu 100 μl soluție NaOH de 0,1 M, reacția de culoare dezvoltată este
măsurată streptochimic la lungimea de undă de 405 nm.

23 2. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** nanoimunisorbentul
25 pe bază de SiO₂ se obține din 100 mg de nanoparticule Φ=14 nm se tratează cu HNO₃ la
27 temperatura de 80°C timp de 30 min urmată de centrifugare la 1500 x g, nanoparticule
29 spălate cu apă deionizată apoi tratate cu 5 ml soluție 10% de α-aminopropiltriethoxisilan timp
31 de 3 ore la temperatura de 80°C centrifugate la 1500 x g apoi spălate cu apă deionizată și
33 în final cu alcool etilic, urmat de resuspendare în 2 ml apă deionizată și puse în reacție cu
35 200 μl soluție de glutaraldehidă 50% timp de o oră apoi separate prin centrifugare la
37 1500 x g timp de 5 min și suspendate în soluție de NaCl 9‰ timp de 5 min și 1 ml de
nanoparticule activate de glutaraldehidă, de concentrație 5mg/ml, este pusă în reacție cu
200 μl soluție de anticorp anti 2,4-diclorofenoxiacetic de concentrație 2 mg/ml, sub agitare
continuă timp de 4 h pentru cuplarea covalentă a anticorpului la suprafața nanoparticulei
urmată de reacția de cuplare cu albumină serică de capră, în raport masic m_{ASC}/m_{AC} față de
anticorpul anti 2,4-diclorofenoxiacetic de 10:1, reacție desfășurată timp de 24 h la
temperatura de 4°C, urmată de centrifugare la 1500 x g, iar nanoimunisorbentul precipitat
este suspendat în soluție de tampon de fosfat de sodiu 10 mM pH 7,3.

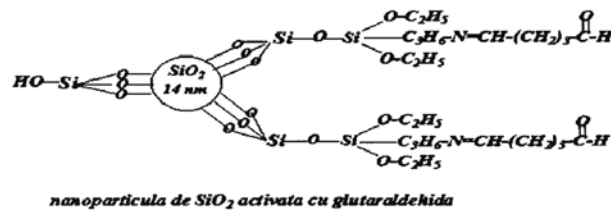
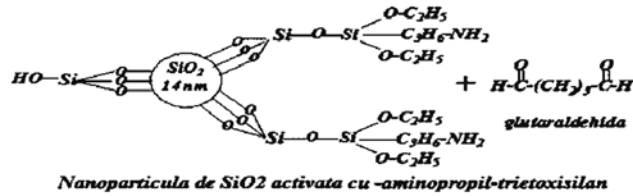
39 3. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** markerul enzimatic
41 pesticid 2,4-diclorofenoxiacetic-fosfatază alcalină este obținut prin reacția de activare a
43 10 mg 2,4-diclorofenoxiacetic cu 20 mg 1-etil-3(3'-diaminopropil)-carbodiimidă și 10 mg NHS
45 în 1,0 ml dimetilformamidă, timp de 30 min urmată de cuplarea pesticidului
47 2,4-diclorofenoxiacetic activat cu 1 ml soluție de 50 mg, 1,8 diaminoctan în tampon
49 carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6, lăsat să reacționeze timp de 4 h iar derivatul pesticid
2,4-diclorofenoxiacetic-amido-octil-amina este purificat prin cromatografie în strat subțire pe
Silicagel G având ca eluent amestecul de alcool etilic:apă în proporții 60:40 volum/volum și
4 mg de derivat pesticid în 1 ml tampon de fosfat de sodiu 10 mM pH 8,2 și 500 μl soluție de
fosfatază alcalină de concentrație 1 mg/ml, sunt amestecate și apoi sub continuă agitare,
sunt tratate cu 100 μl soluție de glutaraldehidă 1% timp de 4 h în vederea cuplării derivatului
pesticid la enzimă urmat de purificare pe coloană Sephadex G25 având ca eluent tampon
fosfat de sodiu 5 mM pH 7,2.

E1): Sinteza nanoimunisorbentului

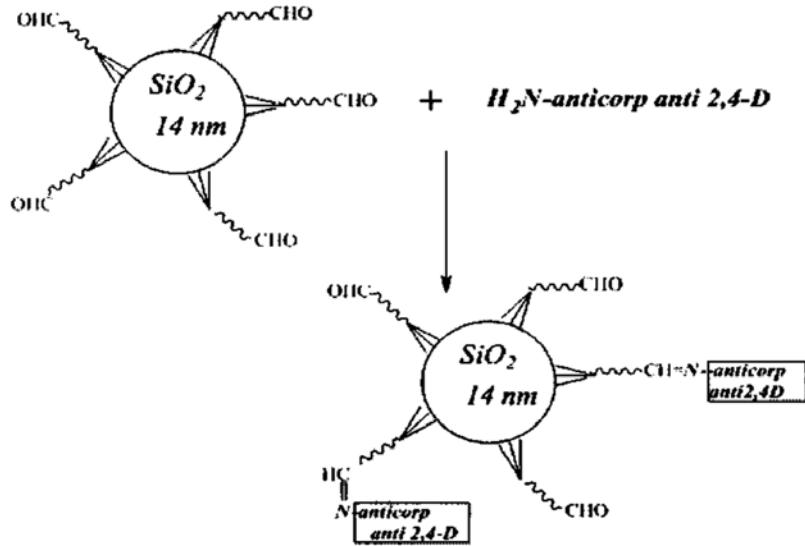
R1): Reactia de cuplare a α -aminopropil-trietoxisilan la nanoparticula de SiO₂



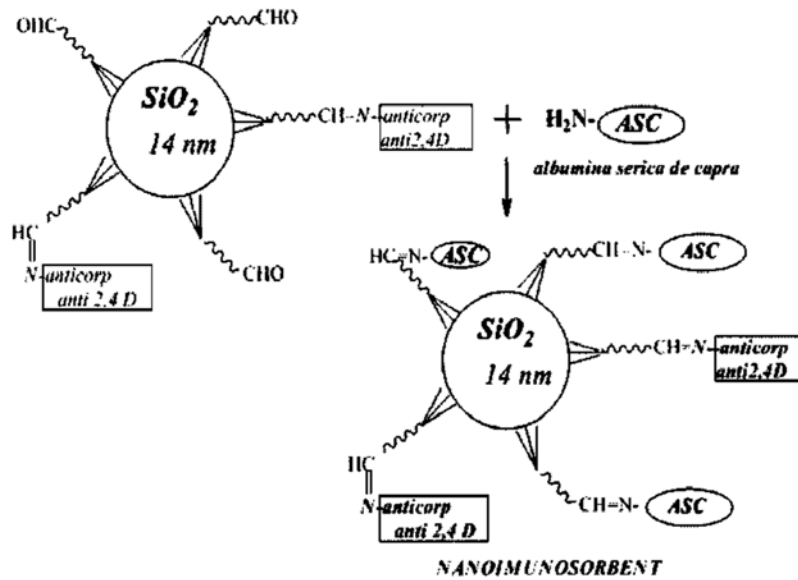
R2): Reactia de activare cu glutaraldehida



R3): Reactia de cuplare a anticorpului antipesticid la nanoimunosorbentul activat

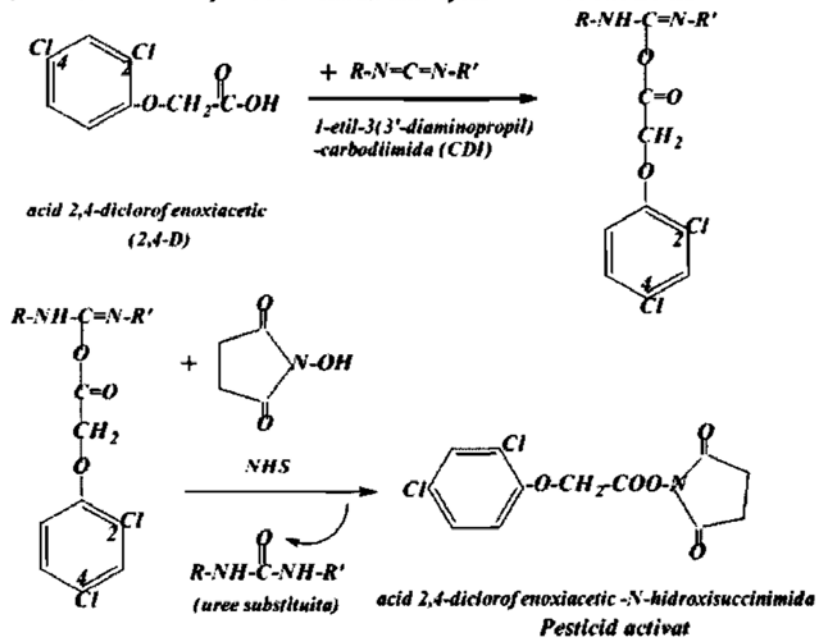


R4): Reactia de cuplare a proteinei nespecifice imunologic (albumina serica de capra)

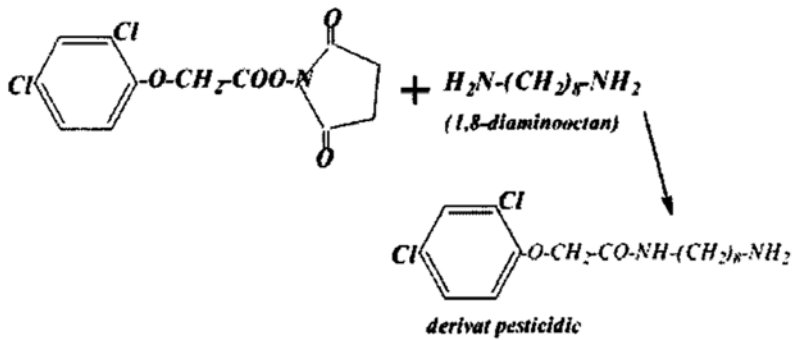


E2): Sinteza markerului enzimatic pesticid-gaetna, acid 2,4-diclorofenoxiacetic acid-fosfataza alcalina

e1): Reactia de activare a pesticidului acid 2,4-diclorofenoxiacetic cu CDI si NHS

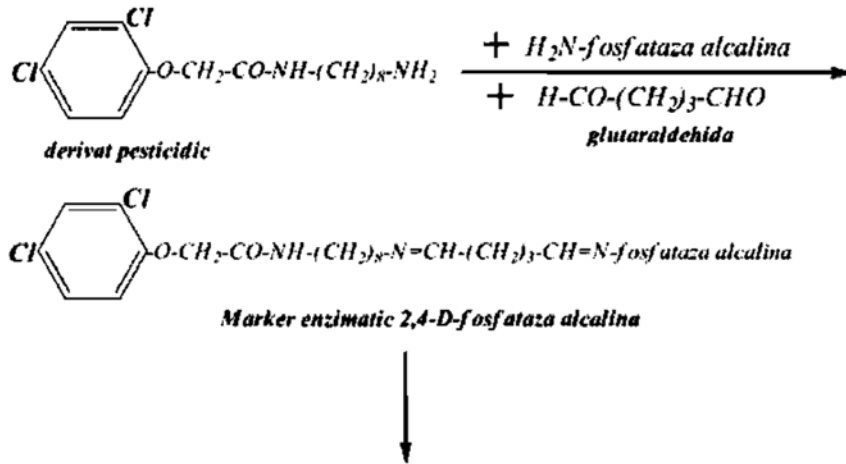


e2): Cuptarea pesticidului 2,4-D activat cu 1,8 diaminoctan



e3): Purificarea derivatului pesticidic prin cromatografie in strat subtire pe Silicagel G

e4): Cuplearea derivatului pesticidic la fosfatzeu alcalina



e5): Purificarea markerului enzimatic prin cromatografie pe coloana de Sephadex G25

E3): Tehnica ELISA in faza omogena

