



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2019 00881**

(22) Data de depozit: **11/12/2019**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2021 BOPI nr. **6/2021**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
- DEZVOLTARE PENTRU FIZICĂ ȘI
INGINERIE NUCLEARĂ "HORIA
HULUBEI", STR.REACTORULUI, NR.30,
MĂGURELE, IF, RO**

(72) Inventatori:
• **DOROBANȚU IOAN,
ALEEA CÂMPUL CU FLORI NR.1, BL.OD 2,
SC.C, ET.5, AP.110, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **NEAGU LIVIA, ALEEA POIANA VADULUI
NR.1, BL.OD8, SC.1, ET.2, AP.10,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A NANOIMUNOSORBENTULUI
TIP ANTIGEN FLUORESCENT PE BAZĂ DE SiO₂ UTILIZAT
ÎN TEHNICA NANOELISA PENTRU DETECȚIA PESTICIDULUI
DICAMBA (ACID 3, 6-DICLORO-2-METOXIBENZOIC)
DIN PROBE ALIMENTARE ȘI DE MEDIU**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a nano-
imunisorbentului tip antigen fluorescent utilizat în
tehnica ELISA pentru detecția pesticidului acid
3,6-dicloro-2-metoxibenzoic (**DICAMBA**) din probe
alimentare și de mediu. Procedeu, conform invenției,
cuprinde etapele de: I-activare a nanoparticulelor de
SiO₂ cu 3-aminopropil trietoxisilan (**APTES**), II-activarea

pesticidului **DICAMBA**, III-cuplarea pesticidului activat
la complexul nanoparticule SiO₂- **APTES**, IV-cuplarea
izotiocianatului de fluoresceină (**FITC**) la complexul
SiO₂-**APTES** și V-separarea prin centrifugare a nano-
imunisorbentului tip antigen fluorescent.

Revendicări: 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



NR. 05/11 - 1/16/09.12.2019

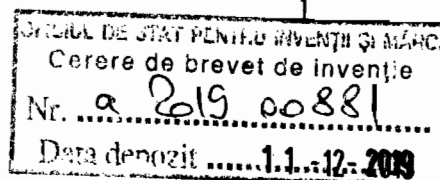
Procedeu de obtinere a nanoimunisorbentului tip antigen fluorescent pe baza de SiO₂ utilizat in tehnica nanoELISA pentru detectia pesticidului dicamba (acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic) din probe alimentare si de mediu

Detectia si analiza pesticidului DICAMBA (acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic) se efectueaza in principal prin metode cromatografice cum ar fi: cromatografia de lichide de inalta performanta cuplata cu spectrometria de masa si cromatografia in gaz cuplata cu spectrometria de masa si prin electroforeza capilara cuplata cu spectroscopie UV sau spectrometrie de masa, aceste metode necesitand o prelucrare laborioasa a probelor si echipamente costisitoare. O alta tehnica de analiza cantitativa a pesticidelor este tehnica imunochimica cu enzima legata de immunosorbent (faza solida), ELISA (engleza: Enzyme Linked Immunosorbent Assay) care se bazeaza pe capacitatea de recunoastere specifica a structurii moleculare a unui antigen (epitop) (pesticide) de catre un anticorp (anticorp antipesticid). In aceasta tehnica se folosesc ca imunisorbenti suprafete de polistiren (placi ELISA) acoperite cu antigen sau anticorpi componente cuplate la suprafata fazei solide prin adsorbție fizica. Dezavantajele acestei tehnici sunt date de desorbția speciilor deoarece nu sunt legate covalent, reproductibilitatea si neuniformitatea rezultatelor obtinute. NanoELISA este tehnica ELISA bazata pe nanoparticule astfel performantele tehnicii ELISA clasice fiind imbunatatite obtinand o metoda extrem de sensibila. Nanomaterialele sunt folosite ca una sau mai multe componente ale tehnicii si imbunatatesc limita de detectie, sensibilitatea metodei si reducerea timpului de analiza. In general, anticorpii sunt legati de diferite tipuri de nanomateriale pe baza de Au, Fe, SiO₂, siliciu acoperit cu aur sau fluorescente. Prin utilizarea nanoparticulelor fluorescente se obtine o sensibilitate mai buna fata de metodele clasice care folosesc molecule fluorescente [1]. In tehnicile de analiza imunochimice se folosesc nanoparticule fluorescente cuplate cu anticorpi avand ca nanomaterial: i) polistirenul functionalizat cu albumina si anticorpi monoclonali dengue NS1 pentru detectarea bolii tropicale, febra Dengue [1], ii) SiO₂ functionalizat cu rodamina si combinat cu nanoparticule magnetice pe baza de oxid de fier functionalizat cu polimetil metacrilat obtinandu-se nanocompozit magnetofluorescent functionalizat cu anticorpi anti alfa-fetoproteina (anti-AFP) pentru detectia markerului tumoral AFP [2]. De asemenea nanoparticulele fluorescente pe baza de SiO₂ pot fi functionalizate si cu enzima cum ar peroxidaza conjugata cu tionina utilizata in tehnica imuno-electrochimica pe baza de nanoparticule pentru detectia markerului tumoral antigen carbohidrat 125 (CA125) [3]. Moleculele fluorescente se utilizeaza in tehnicile imunochimice fluorescente ca si marker fluorescent: i) cuplat cu anticorpu, isotiocianat de fluoresceina (FITC) cuplat cu anticorpu anti-dimetil ftalat (anti-DMP) pentru detectia dimetil ftalatului, component al plastifiantilor, in probe apa [4] ; ii) pe baza de nanoparticule de SiO₂ functionalizate cu chitosan si lucigenina utilizate in tehnica imunochimica bazata pe aptamer pentru determinarea trombinei din serul uman [5].

Problema pe care o rezolva inventia consta in prezentarea unui procedeu de obtinere a nanoimunisorbentului tip antigen fluorescent pe baza de SiO₂ care poate fi utilizat in tehnica nanoELISA de detectie a pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic (dicamba) din probe alimentare si de mediu. Fluorescenta nanoimunisorbentului tip antigen rezolva problema identificarii spectrale a speciilor reactive (complexul dintre nanoimunisorbentul tip antigen fluorescent si anticorpu antipesticid) din sistemul nanoELISA in procesul de analiza a pesticidului.

Nanoimunisorbentii prezinta urmatoarele avantaje: zona specifica a nanoimunisorbentului este de 100-200 m²/g: 1 mg de nanoimunisorbent este echivalent cu suprafata de lucru a zece placi ELISA, moleculele de anticorpu sunt legate covalent pe suprafata nanoparticulelor in comparatie cu tehnica ELISA clasica in care anticorpii sunt cuplati prin adsorbție pe suprafata godeurilor placi ELISA; legarea covalenta chimica elimina desorbția anticorpuului de la suprafata din cazul tehnicii ELISA clasice ceea ce confera stabilitate nanoimunisorbentilor. Nanoimunisorbentii nonmagnetici pot fi separati prin centrifugare, iar nanoimunisorbentii superparamagnetici sunt separati folosind un separator de camp magnetic. Timpul de incubare necesar pentru a atinge echilibrul chimic intre

Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia



~~SECRET DE SERVICIU~~

anticorp si antigen (analit) este scurt (1-10 min fata de 1-2 ore in tehnica ELISA clasica), deoarece nanoparticulele sunt in suspensie (faza omogena) comparativ cu tehnica ELISA clasica unde reactia dintre anticorp si antigen este limitata prin difuzarea componentelor din solutie la suprafata godeurilor sau a tuburilor.

Procedeu conform inventiei inlatura dezavantajele de mai sus (timp de analiza, echipament costisitor, separarea complexului imun) prin aceea ca se iau: 100 mg de nanoparticule de SiO₂ de marime $\Phi=15$ nm sunt tratate cu 20 ml solutie de HNO₃ 10 % la temperatura de 80 °C, timp de 1 h si nanoparticulele se separa prin centrifugare la 1500 x g timp de 15 min, spalate cu apa deionizata 30 ml si apoi tratate cu 5 ml solutie de 3-aminopropiltriethoxisilan 10 % in apa deionizata sub continua agitare la 50 °C timp de 3 ore dupa care nanoparticulele sunt centrifugate la 1500 x g timp de 15 min apoi spalate cu 25 ml apa deionizata, din nou centrifugate la 1500 x g timp de 15 min iar complexul obtinut nanoparticula SiO₂-3-aminopropiltriethoxisilan este resuspendat in 4 ml tampon carbonat 50 mM pH 9,6 si tratat cu 2 mg pesticid acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic activ, pesticid activat obtinut prin reactia pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic cu 10 mg cu 1-etil-3(3'-diaminopropil)carbodiimida si 2 mg N-hidroxisuccinimida in mediu de 1 ml dimetilformamida timp de 3 ore la temperatura camerei, nanoimunosorbentul tip antigen obtinut (complex nanoparticule de SiO₂-dicamba) prin centrifugare la 1500 x g timp de 15 min este spalat cu apa deionizata 20 ml apoi centrifugat la 1500 x g timp de 15 min si nanoimunosorbentul tip antigen obtinut este resuspendat in 2 ml de tampon carbonat 50 mM pH 9,6 si tratat cu o solutie de 5 mg izotiocianat de fluoresceina in 400 μ l dimetilsulfoxid sub continua agitare pentru 6 ore iar nanoimunosorbentul fluorescent tip antigen este separat prin centrifugare spalat cu 5 ml alcool etilic absolut si resuspendat in 10 ml tampon fosfat 10 mM pH 7,2 depozitat la 4 °C in vederea utilizarii in tehnica nanoELISA de detectie a pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic din probe alimentare si de mediu.

Nanoimunosorbentul tip antigen fluorescent pe baza de SiO₂ la a carui suprafata este cuplat covalent pesticidul acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic si izotiocianatul de fluoresceina se obtine in cinci etape principale: Etapa I, Etapa a II-a, Etapa a III-a, Etapa a IV-a si Etapa a V-a si sunt redate schematic dupa descrierea acestora.

Etapa I: Activarea nanoparticulei de SiO₂ cu 3-aminopropil triethoxisilan (APTES).

Etapa a II-a: Activarea pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic (dicamba).

Etapa a III-a: Cuplarea pesticidului activat la complexul nanoparticule de SiO₂-APTES

Etapa a IV-a: Cuplarea izotiocianatului de fluoresceina (FITC) la complexul nanoparticula de SiO₂-APTES.

Etapa a V-a: Obtinerea nanoimunosorbentului tip antigen fluorescent

Descrierea etapelor procedurii de obtinere a nanoimunosorbentului tip antigen fluorescent

Etapa I: Activarea nanoparticulei de SiO₂ cu 3-aminopropil triethoxisilan (APTES). Aceasta etapa contine doua reactii: Reactia 1-tratamentul nanoparticulelor de SiO₂ cu HNO₃ si reactia 2: Activarea nanoparticulelor de SiO₂ cu 3-aminopropil triethoxisilan si formarea complexului nanoparticule SiO₂-APTES.

Reactia 1: Tratamentul nanoparticulelor de SiO₂ cu HNO₃

100 mg de nanoparticule de SiO₂ marime $\Phi=15$ nm sunt tratate cu 20 ml solutie de HNO₃ 10 % la temperatura de 80 °C timp de 1 h apoi sunt centrifugate la 1500 x g timp de 15 min, spalate cu 30 ml apa deionizata

Reactia 2: Activarea nanoparticulelor de SiO₂ cu 3-aminopropil triethoxisilan

Nanoparticulele in cadrul Etapei I, Reactia 1 sunt tratate cu 5 ml solutie de 3-aminopropil triethoxisilan (APTES) 10% in apa deionizata sub continua agitare la 50 °C timp de 3 ore dupa care sunt colectate prin centrifugare la 1500 x g timp de 15 min, spalate cu 25 ml apa deionizata, din nou centrifugate la 1500 x g timp de 15 min iar complexul obtinut nanoparticula SiO₂-APTES este resuspendat in 4 ml tampon carbonat 50 mM pH 9,6.

Etapa a II-a: Activarea pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic (dicamba). Aceasta etapa cuprinde doua reactii: Reactia 1-Activarea pesticidului cu 1-etil-3(3'-diaminopropil)carbodiimide

Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia

(CDI) si Reactia 2-Activarea complexului pesticide-CDI cu N-hidroxisuccinimida.

Reactia 1-Activarea pesticidului cu 1-etil-3(3'-diaminopropil)carbodiimide (CDI)

2 mg pesticid acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic sunt tratate cu 10 mg 1-etil-3(3'-diaminopropil)carbodiimide (CDI) in 1 ml dimetilformamida timp de 3 ore la temperatura camerei in vederea activarii pesticidului.

Reactia 2-Activarea complexului pesticid-CDI cu N-hidroxisuccinimida (NHS)

Complexul pesticid-CDI rezultat in cadrul Etapei a II-a, Reactia 1 este adaugat la 2 mg de N-hidroxisuccinimida in 1 ml DMF cu formarea pesticidului activat acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-N-hidroxisuccinimida.

Etapa a III-a: Cuplarea pesticidului activat la complexul nanoparticule de SiO₂-APTES

Amestecul de pesticid activat obtinut in cadrul Etapei a II-a, Reactia 2 este adaugat la 50 mg suspensie de complex nanoparticula-SiO₂-APTES in 4 ml tampon carbonat 50-mM pH 9,6 sub continua agitare timp de 3 ore la temperatura camerei. Complexul nanoparticula SiO₂-dicamba obtinut este centrifugat la 1500 x g timp de 15min, spalat cu 20 ml apa deionizata, centrifugat din nou la 1500 x g si resuspendat in 2 ml tampon carbonat 50 mM pH 9,6.

Etapa a IV-a: Cuplarea isotiocianatului de fluoresceina (FITC) la complexul nanoparticula de SiO₂-APTES

50 mg de complex nanoparticule SiO₂-APTES in 2 ml tampon carbonat 50 mM pH 9,6 sunt tratate cu o solutie de 5 mg izotiocianat de fluoresceina in 400 µl dimetilsulfoxid (DMSO) sub continua agitare, apoi nanoparticulele de SiO₂ fluorescente obtinute sunt separate prin centrifugare la 1500 x g si spalate cu 5 ml alcool etilic absolut si resuspendate in 10 ml tampon fosfat 10 mM pH 7,2. Acest complex nanoparticule SiO₂-FITC este un produs intermediar de sinteza fluorescent si este utilizat ca si control spectral al produsului final, nanoimunosorbentul tip antigen fluorescent.

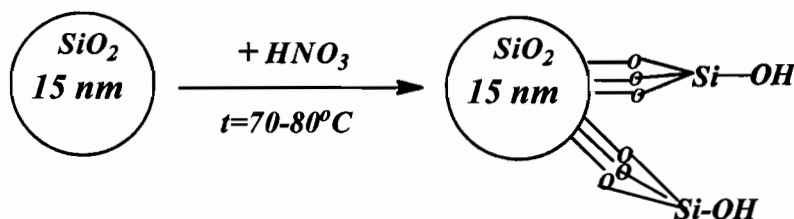
Etapa a V-a: Obtinerea nanoimunosorbentului tip antigen fluorescent

50 mg complex nanoparticule de SiO₂-dicamba obtinut in cadrul etapei a III-a resuspendat in 2 ml tampon carbonat 50 mM pH 9,6 este tratat cu o solutie de 5 mg izotiocianat de fluoresceina in 400 µl de dimetilsulfoxid sub continua agitare pentru 6 ore iar nanoimunosorbentul tip antigen fluorescent obtinut este separat prin centrifugare, spalat cu 5 ml de alcool etilic absolut si resuspendat in 10 ml tampon fosfat 10 mM pH 7,2 in vederea utilizarii in tehnica nanoELISA de detectie a pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic din probe alimentare si de mediu.

Reactiile chimice de obtinere a nanoimunosorbentului tip antigen fluorescent:

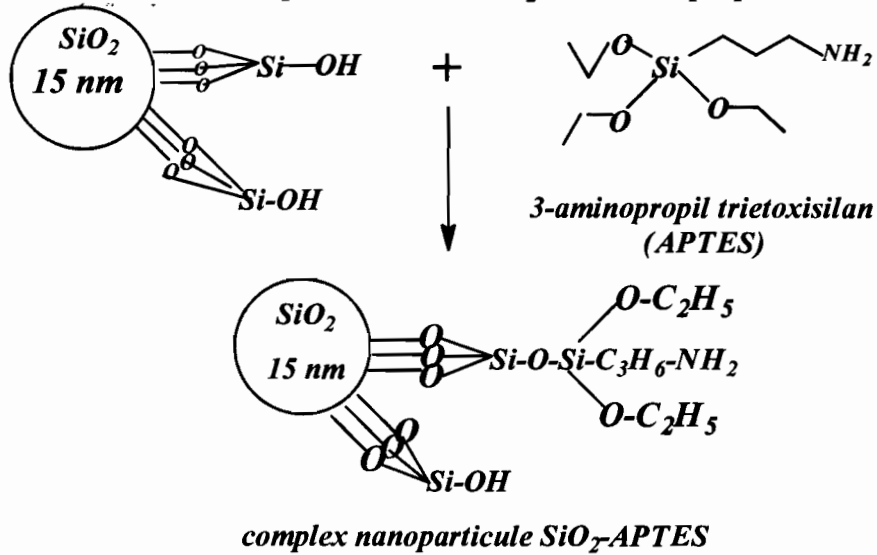
Etapa I: Activarea nanoparticulelor de SiO₂ cu 3-aminopropil trietoxisilan (APTES)

Reactia 1: Tratamentul nanoparticulelor de SiO₂ cu HNO₃



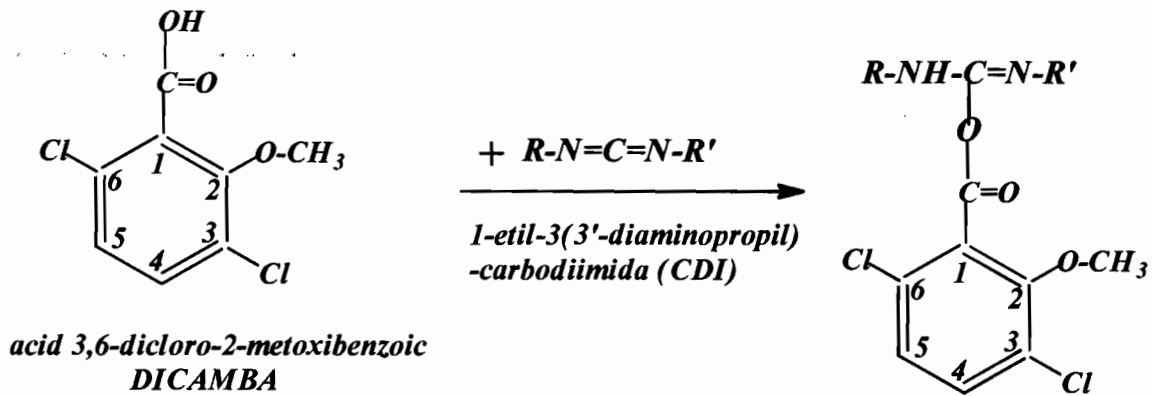
Inventatori: Dorobanţu Ioan, Neagu Livia

Reactia 2: Activarea nanoparticulelor de SiO₂ cu 3-aminopropil trietoxisilan

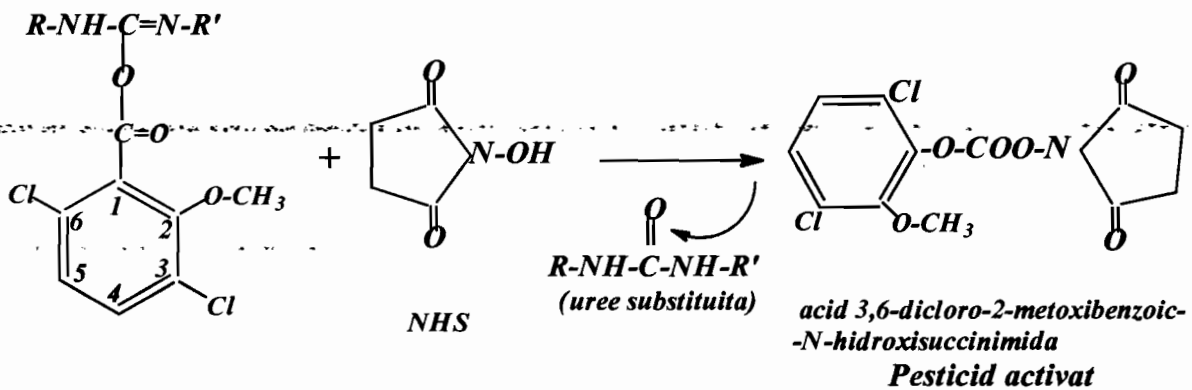


Etapa a II-a: Activarea pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic (dicamba)

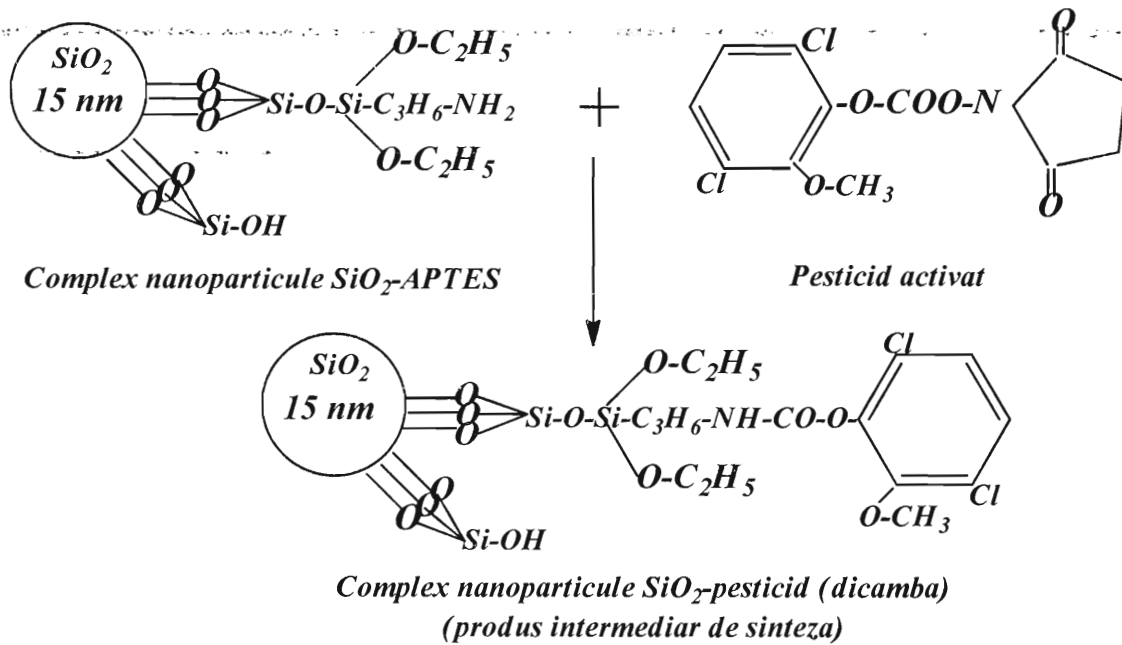
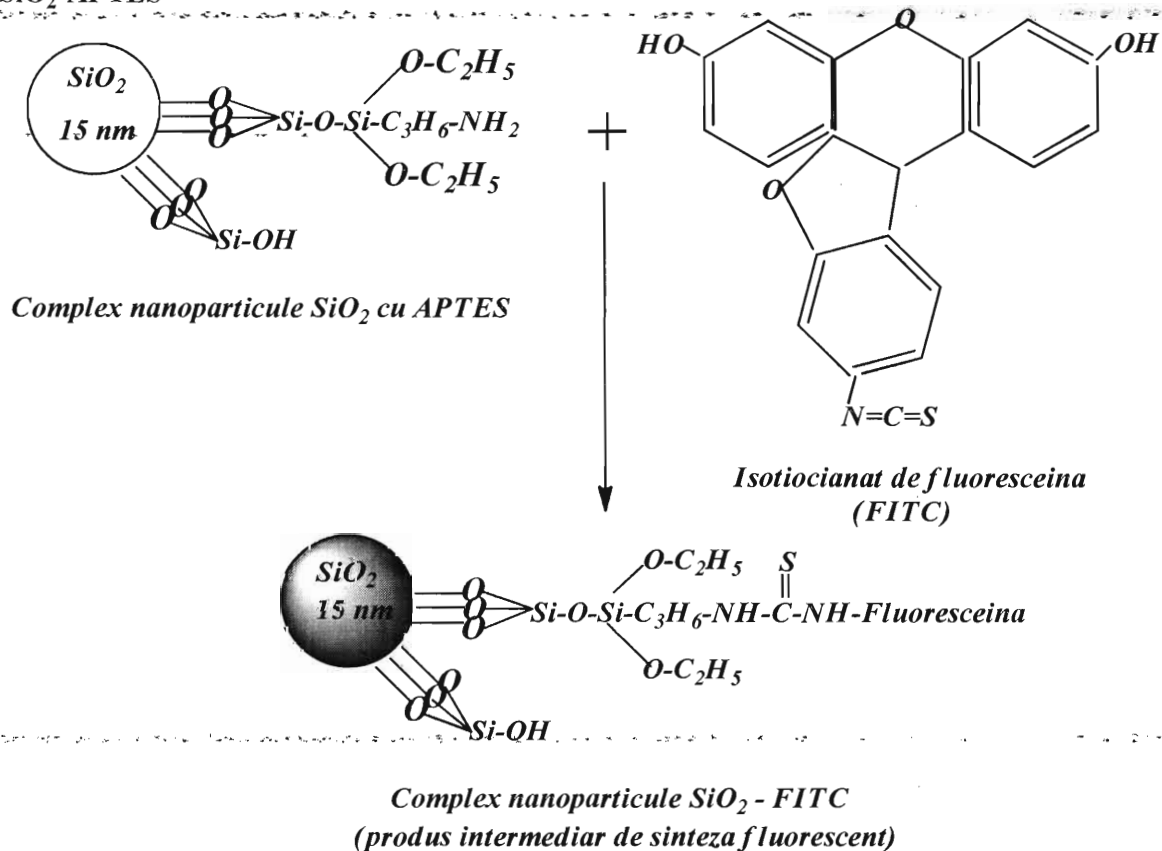
Reactia 1: Activarea pesticidului cu 1-etil-3(3'-diaminopropil)-carbodiimida (CDI)



Reactia 2: Activarea complexului pesticid-CDI cu N-hidroxisuccinimida (NHS)

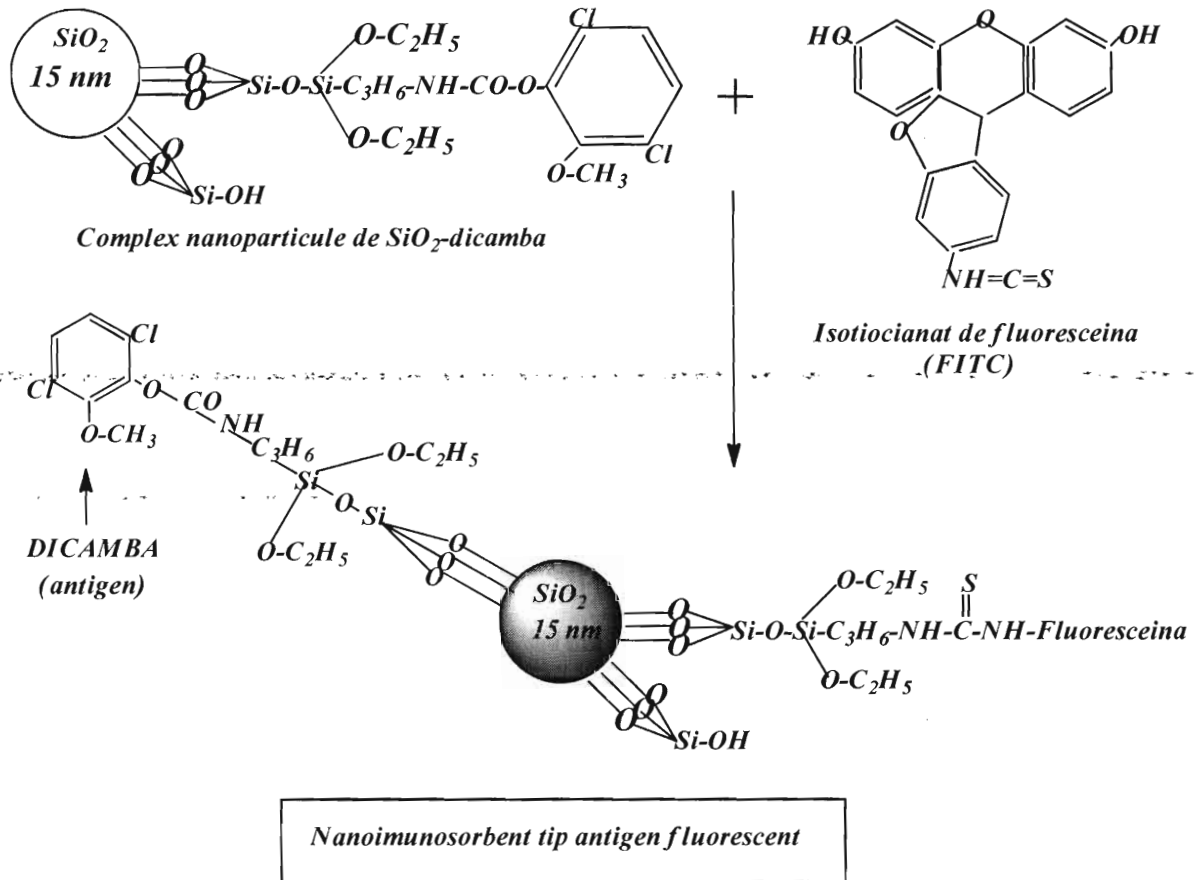


Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia

Etapa a III-a: Cuplarea pesticidului activat la complexul nanoparticule SiO_2 -APTESEtapa a IV-a: Cuplarea isotiocianatului de fluoresceina (FITC) la complexul nanoparticula de SiO_2 -APTES

Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia

Etapa a V-a: Obținerea nanoimunisorbentului tip antigen fluorescent



Bibliografie

- [1] E. M. Linares, C. S. Pannuti, L. T. Kubota, S. Thalhammer, Immunospot assay based on fluorescent nanoparticles for Dengue fever detection, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 41, pp: 180-185, 2013;
- [2] H.Y. Tsai, S. Y. Li, C. Bor Fuh, Magnetofluorescent nanocomposites and quantum dots used for optimal application in magnetic fluorescence-linked immunoassay, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 410, pp. 1923-1929, 2018;
- [3] D. Tang, B. Su, J. Tang, J. Ren, G. Chen, Nanoparticle-based sandwich electrochemical immunoassay for carbohydrate antigen 125 with signal enhancement using enzyme-coated nanometer-sized enzyme-doped silica beads, *Analytical Chemistry*, vol. 82, no. 4, pp. 1527-1534, 2010
- [4] M. Zhang, B. Liu, Y. Cong, S. Liu, Y. Hu, Development of highly specific fluorescence immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of dimethyl phthalate in water samples, *Food and Agricultural Immunology*, vol. 22, no. 4, pp. 297-309, 2011;
- [5] M. Ma, X. Zheng, Preparation of brightly fluorescent silica nanoparticles modified with lucigenin and chitosan, and their application to an aptamer-based sandwich assay for thrombin, *Microchimica Acta*, vol. 182, pp. 2193-2199, 2015.

Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia

SECRET DE SERVICIU

REVENDICARE

NR. 08177 - S/16/19.12.2019

Procedeul conform inventiei este caracterizat prin aceea ca se iau: 100 mg de nanoparticule de SiO_2 de marime $\Phi=15$ nm sunt tratate cu 20 ml solutie de HNO_3 10 % la temperatura de 80 °C, timp de 1 h si nanoparticulele se separa prin centrifugare la 1500 x g timp de 15 min, spalate cu apa deionizata 30 ml si apoi tratate cu 5 ml solutie de 3-aminopropiltriethoxisilan 10 % in apa deionizata sub continua agitare la 50 °C timp de 3 ore dupa care nanoparticulele sunt centrifugate la 1500 x g timp de 15 min apoi spalate cu 25 ml apa deionizata, din nou centrifugate la 1500 x g timp de 15 min iar complexul obtinut nanoparticula SiO_2 -3-aminopropiltriethoxisilan este resuspendat in 4 ml tampon carbonat 50 mM pH 9,6 si tratat cu 2 mg pesticid acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic activ, pesticid activat obtinut prin reactia pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic cu 10 mg cu 1-etil-3(3'-diaminopropil)carbodiimida si 2 mg N-hidroxisuccinimida in mediu de 1 ml dimetilformamida timp de 3 ore la temperatura camerei, nanoimunosorbentul tip antigen obtinut prin centrifugare la 1500 x g timp de 15 min este spalat cu apa deionizata 20 ml apoi centrifugat la 1500 x g timp de 15 min si nanoimunosorbentul obtinut este resuspendat in 2 ml de tampon carbonat 50 mM pH 9,6 si tratat cu o solutie de 5 mg izotiocianat de fluoresceina in 400 μl dimetilsulfoxid sub continua agitare pentru 6 ore iar nanoimunosorbentul fluorescent tip antigen este separate prin centrifugare spalate cu 5 ml alcool etilic absolut si resuspendat in 10 ml tampon fosfat 10 mM pH 7,2 depozitat la 4 °C in vederea utilizarii in tehnica nanoELISA de detectie a pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic din probe alimentare si de mediu.

Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia

