



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00791

(22) Data de depozit: 27/11/2020

(41) Data publicării cererii:
30/09/2022 BOPI nr. 9/2022

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
- DEZVOLTARE PENTRU FIZICĂ ȘI
INGINERIE NUCLEARĂ "HORIA
HULUBEI"(IFIN-HH), STR.REACTORULUI,
NR.30, 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 VADULUI
NR.1, BL.OD8, SC.1, ET.2, AP.10,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• STOICA RALUCA- DIANA,
STR.EUCALIPTULUI NR.14B1, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A NANOIMUNOSORBENTULUI
TIP ANTIGEN:ACID 3,6-DICLORO-2-METOXIBENZOIC-
CISTEAMINA-NANOPARTICULA DE AUR FOLOSIT ÎN
DETECȚIA PESTICIDULUI ACID 3,6-DICLORO-
2-METOXIBENZOIC DIN PROBE ALIMENTARE ȘI DE MEDIU**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui nanoimunisorbent tip antigen: acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-cisteamina-nanoparticula de aur folosit în detecția pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic (dicamba) din probe alimentare și de mediu. Procedeu, conform invenției, constă în etapele: E1-sinteza nanoparticulelor de aur, E2-sinteza conjugatului dicamba-cisteamină prin reacția de activare a pesticidului cu 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (CDI) în dimetilformamida (DMF), respectiv, cu N-hidroxisuccinimida,

urmată de reacția de cuplare a cisteaminei cu pesticidul activat și E3-cuplarea conjugatului dicamba-cisteamină la suprafața nanoparticulelor de aur din care rezultă nanoimunisorbentul tip antigen care este resuspendat în tampon fosfat și depozitat la 4°C în vederea utilizării în metoda de dozare a pesticidului dicamba din probe alimentare și de mediu.

Revendicări: 1



OFICIUL NAȚIONAL DE BREVETE ȘI MĂRCI
Către deținătorul de drepturi
Nr. a 620 00991
Data depunerii 27.11.2020

SECRET DE SERVICIU
DESCRIERE

RO-136003/A4
Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
Informații Clasificate 8/III 23.11.2020
INVENTORIE
Nr. 8/59 / 27.11.2020

Procedeu de obtinere a nanoimunisorbentului tip antigen: acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-cisteamina-nanoparticula de aur folosit in detectia pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic din probe alimentare si de mediu

Inventia se refera la procedeu de obtinere a nanoimunisorbentului tip antigen: acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-cisteamina-nanoparticula de aur folosit in detectia pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic (dicamba) din probe alimentare si de mediu. In prezent, sunt cunoscute tehnici imunochimice tip ELISA (engleza: Enzyme Linked Immunosorbent Assay) de detectie a pesticidelor din probe alimentare si de mediu care utilizeaza anticorpi antipesticid cuplati la suprafete de faze solide de polistiren (placi tip ELISA) iar ca marker antigenic, pesticide marcate cu enzime avand activitati specific mari, cum ar fi peroxidaza sau fosfataza alcalina [1] sau care adauga un substrat chemiluminescent pentru imbunatatirea sensibilitatii metodei pentru detectia dicamba in probe de mediu, sol si in soia [2]. Tehnica de detectie consta in reactia de competitie intre pesticidul ce urmeaza a fi analizat (pesticidul din proba) si pesticidul marcat enzimatic cu anticorpii antipesticid cuplat la suprafata godeului din placa ELISA. Dupa atingerea echilibrului chimic, supernatantul este indepartat iar activitatea enzimatica cuplata la anticorp este determinata prin folosirea unui substrat enzimatic cum ar fi paranitrofenilfosfat pentru fosfataza alcalina sau tetrametilbenzidina pentru peroxidaza. Ambele metode conduc la o reactie de culoare in domeniul vizibil care poate fi masurata la spectrofotometru sau cititorul de placi ELISA. Absorbanta optica la lungimea de unda de 405 nm masurata la un moment dat este invers proportional cu concentratia pesticidului din probe. Desi tehnica ELISA este sensibila si larg utilizata in laboratoarele de detectie a pesticidelor, necesita anticorpi antipesticidici cu afinitate inalta fata de pesticide, anticorpii sunt legati la suprafata prin adsorbție fizica, iar desorbția acestuia poate compromite analiza uneori iar suprafata godeului este limitata la cca 1 cm². Folosirea nanoparticulelor inlatura acest deficient astfel nanoimunisorbentul conform inventiei este format din nanoparticule de aur, la suprafata acestora fiind cuplat chimic antigenul specific, acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic prin intermediul gruparii tiolice -SH prezente in cisteamina, aceasta avand afinitate pentru aur. Nanoimunisorbentul prezinta avantajul unei suprafete specific mari de 3,11*10⁵ cm²/g pentru nanoparticulele de aur avand diametrul de cca 10 nm, diametru echivalent a suprafata godeurilor a cca 3300 placi ELISA cu 96 de godeuri iar valoric, la pretul actual al aurului de 230 lei/g ar rezulta echivalentul a 14 placi ELISA/leu. Acest avantaj al unei suprafete specific mari a nanoimunisorbentului in comparative cu suprafata godeului existent pe placa ELISA poate conduce la imbunatatirii tehnicii ELISA de dozare. Un alt avantaj ar fi stabilitatea si simplitatea procedurii de analiza. Tehnica nanoELISA de dozare bazata pe nanoimunisorbenti este in faza omogena, fapt ce conduce la un timp de atingere a echilibrului chimic a speciilor reactante (antigen-marcate enzimatic si anticorpi) mai mic comparativ cu tehnica ELISA clasica care se bazeaza pe reactia heterogena, reactivul fiind adsorbit la suprafata.

Sunt cunoscute proceduri in care pe suprafata nanoparticulelor de aur se cupleaza: anticorpii si enzima de aur pentru detectia gliadinei, component al glutenului din grau conducand la cresterea sensibilitatii metodei ELISA si la scaderea timpului de analiza [3]; anticorpi monoclonali anti Helicobacter pilori sau policlonali specifici imunoglobulinei de soarece pe suprafata nanoparticulelor de aur in vederea stabilirii concentratiei optime de anticorpi imobilizati pe suprafata nanoparticulei de aur fara pierderea activitatii conjugatului anticorpi monoclonal-nanoparticule de aur, aceasta nefiind intodeauna egala cu concentratia stabilizatoare [4]; anticorpi policlonali si biotina pentru detectia E. Coli O157:H7 din alimente obtinand o sensibilitate imbunatatita a metodei, in acest caz de patru ori fata de tehnica ELISA conventionala si timpul total de analiza de doar 3 ore [5]. Nanoparticulele de aur se utilizeaza si in tehnica ELISA colorimetrica pentru determinarea ractopaminei, agonistul β utilizat in fermele de crestere a animalelor pentru cresterea in greutate a acestora [6] sau in cazul tehnicii imunochimice bazata pe agregare cand nanoparticulele de aur sunt acoperite cu antigenul si anume proteina A in prezenta anticorpilor corespunzatori pentru determinarea acestora [7].

Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia, Stoica Raluca-Diana

1

~~SECRET DE SERVICIU~~

Sinteza nanoimunisorbentului tip antigen acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-cisteamina cuplat la nanoparticula de aur conform inventiei cuprinde trei etape, E1, E2 si E3:

E1: Sinteza nanoparticulelor de aur;

E2: Sinteza conjugatului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-cisteamina (dicamba-cisteamina);

E3: Sinteza nanoimunisorbentului tip antigen prin cuplarea conjugatului dicamba-cisteamina la suprafata nanoparticulelor de aur.

Etapa E1: Sinteza nanoparticulelor de aur

37,3 mg acid tetracloroauric se dizolva in 120 ml apa bidistilata, se adauga la solutia data 100,7 mg citrat de sodiu. Amestecul format este agitat si adus la temperatura de 60-70 °C pana la formarea unei solutii de culoare rosie de nanoparticule de aur. Nanoparticulele de aur sunt separate prin centrifugare la 1500 x g timp de 15 min, supernantantul este indepartat iar nanoparticulele de aur sunt resuspendate in 10 ml apa bidistilata, din nou centrifugate si spalate si suspendate in final in 5 ml apa bidistilata. Randamentul de recuperare al procedurii este de 57-60 %.

Etapa E2: Sinteza conjugatului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-cisteamina (dicamba-cisteamina) cuprinde trei reactii, R1, R2 si R3:

R1: Reactia de activare a pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic cu 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida

Se activeaza 90 mg acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic cu 180 mg 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (CDI) in 2 ml de dimetilformamida (DMF) timp de 30 minute, la temperatura camerei sub continua agitare;

R2: Reactia de activare a pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic cu N-hidroxisuccinimida

Amestecul obtinut in R1 se trateaza cu 45 mg N-hidroxisuccinimida (NHS) dizolvata in 1 ml DMF, aceasta reactie se desfasoara timp de 6 ore la temperatura camerei, sub continua agitare.

R3: Reactia de cuplare a cisteaminei de pesticidul activat

Se dizolva de 60 mg cisteamina in 6 ml tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6. Peste solutia formata se adauga sub agitare continua, picatura cu picatura, la temperatura camerei 2 ml solutie amestec de pesticid activat rezultat in R2. Reactia de cuplare se desfasoara pe durata a 3 ore la temperatura camerei iar amestecul format este depozitat la temperatura de 4 °C pentru 24 ore pana la formarea unui precipitat care reprezinta compusul conjugat dicamba-cisteamina. Precipitatul format al derivatului pesticidic acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-cisteamina este separat prin centrifugare la 1500 x g timp de 15 minute, urmat de spalare cu apa bidistilata avand temperatura de 4 °C, din nou centrifugat iar conjugatul acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-cisteamina este dizolvat in solutie alcoolica 50 % (V/V) alcool etilic: apa si depozitat la 4 °C, randamentul de reactie este de 51 %.

Etapa E3: Sinteza nanoimunisorbentului tip antigen prin cuplarea conjugatului dicamba-cisteamina la suprafata nanoparticulelor de aur

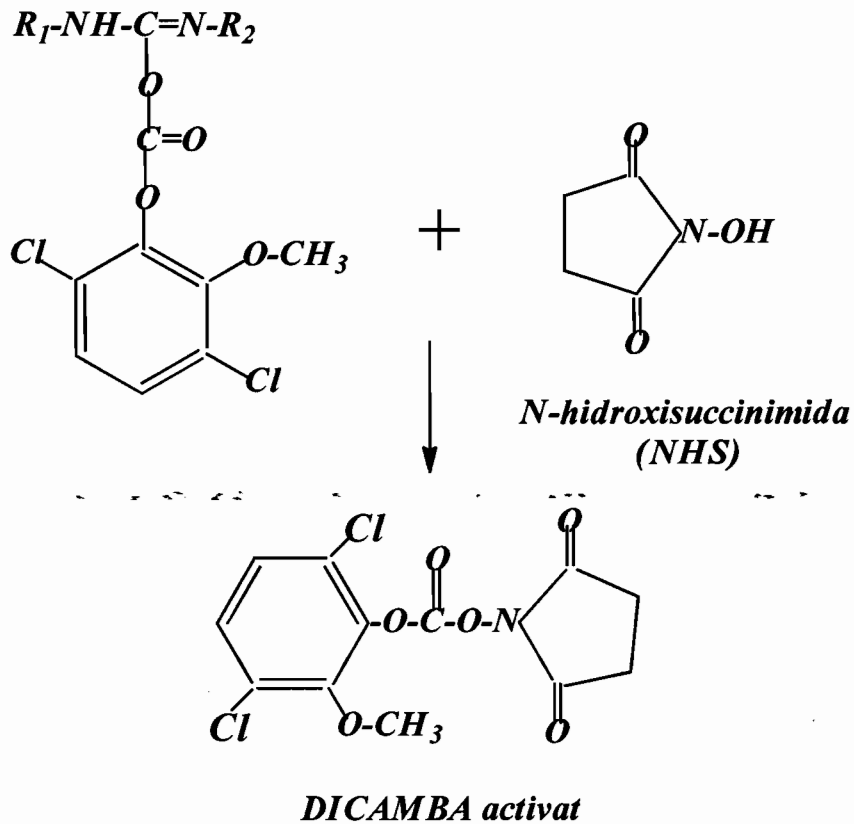
Peste 100 µl suspensie nanoparticule de aur sintetizate conform E1 in 1 ml apa bidistilata se introduce 200 µl solutie de conjugat cisteamina-dicamba 1 mg/ml. Amestecul de reactie este agitat iar nanoimunisorbentul tip antigen dicamba-cisteamina-nanoparticule de aur rezultat in urma reactiei de cuplare a dicamba-cisteaminei la suprafata nanoparticulelor de aur se centrifugheaza la 1500 x g timp de 15 min, supernatantul este indepartat iar nanoimunisorbentul rezultat este resuspendat in 2 ml tampon fosfat 10 mM pH 7,2 si depozitat la temperatura de 4 °C in vederea utilizarii.

Reactiile chimice de obtinere a nanoimunisorbentului tip antigen sunt urmatoarele:

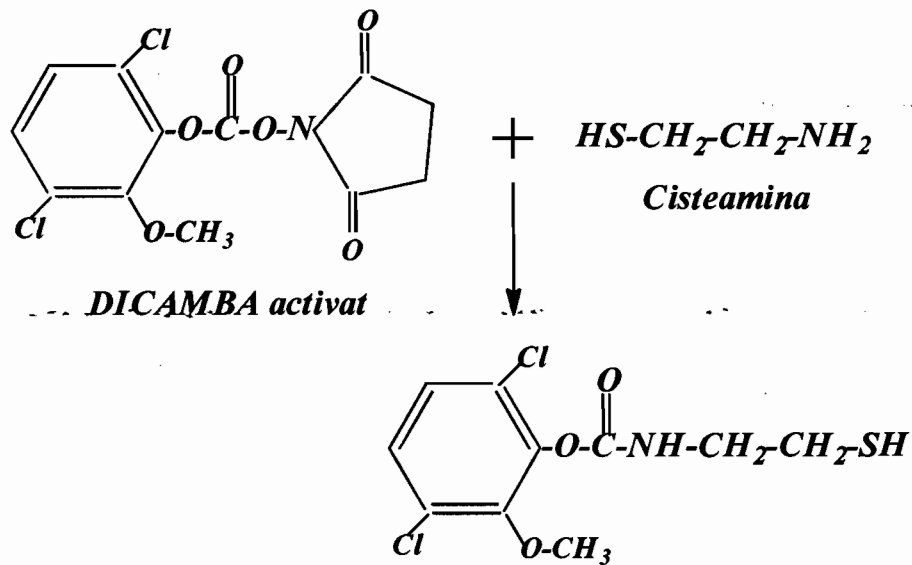
Inventatori: Dorobanţu Ioan, Neagu Livia, Stoica Raluca-Diana

SECRET DE SERVICIU

R2: Reactia de activare a pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic cu N-hidroxisuccinimida

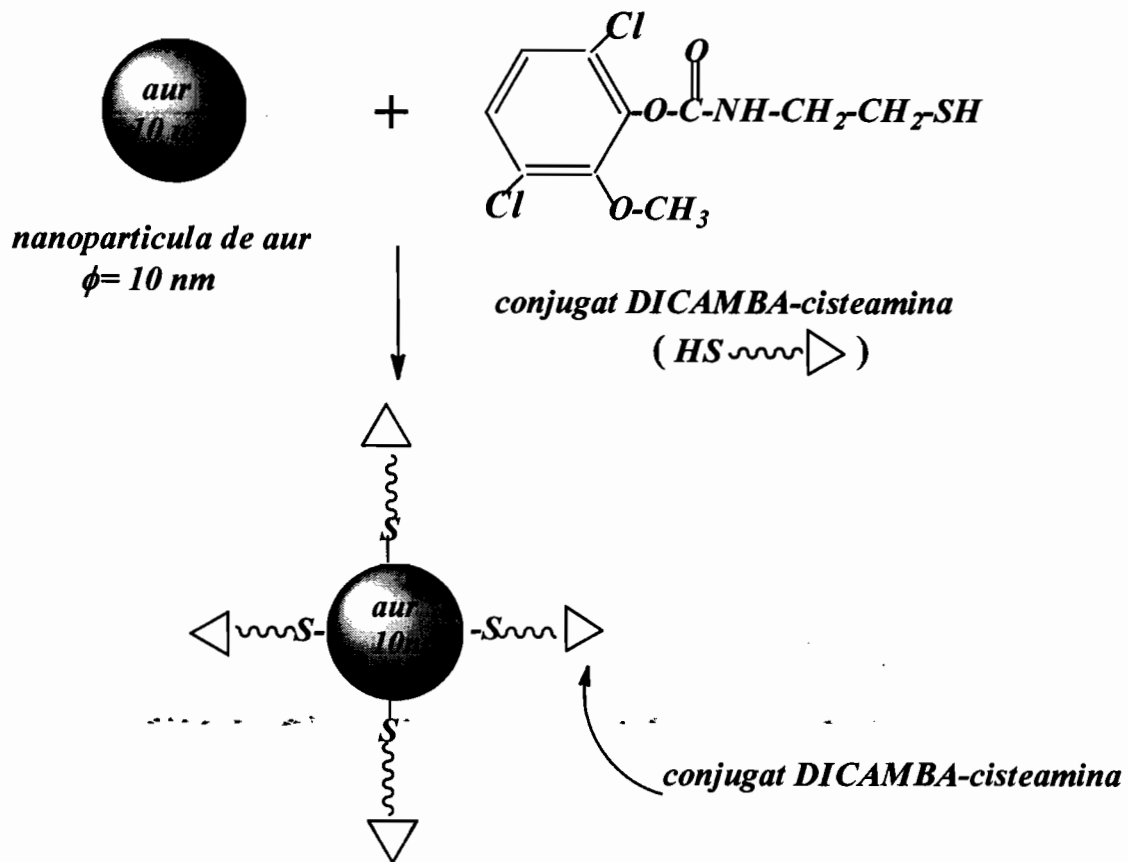


R3: Reactia de cuplare a cisteaminei de pesticidul activat



Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia, Stoica Raluca-Diana

SECRET DE SERVICIU

E3: Sinteza nanoimunisorbentului tip antigen acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic - cisteamina-nanoparticula de aur**Nanoimunisorbent tip antigen acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-cisteamina-nanoparticula de aur****Bibliografie:**

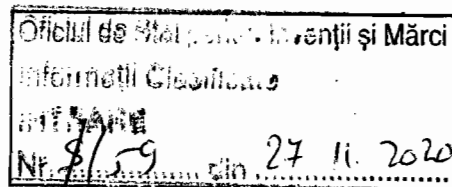
- [1] B.S. Clegg, G.R. Stephenson, J.C. Hall, Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of dicamba, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 49, no. 5, pp. 2168-2174, 2001;
- [2] J. Huo, B. Barnych, Z. Li, D. Wan, D. Li, N. Vasylieva, S.Z. Knezevic, O.A. Osipitan, J.E. Scott, J. Zhang, B. D. Hammock, Hapten synthesis, antibody development, and a highly sensitive indirect competitive chemiluminescent enzyme immunoassay for detection of dicamba, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 67, pp. 5711-5719, 2019;
- [3] P. Ciaurriz, F. Fernandez, E. Tellechea, J.F. Moran, A.C. Asensio, Comparison of four functionalization methods of gold nanoparticles for enhancing the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), *Beilstein Journal of Nanotechnology*, vol. 8, pp. 244-253, 2017;
- [4] N.A. Byzova, I.V. Safenkova, E.S. Slutskaya, A.V. Zherdev, B.D. Dzantiev, Less is more: A comparison of antibody-gold nanoparticle, *Bioconjugate Chemistry*, vol. 28, pp. 2737-2746, 2017;
- [5] Z. Shen, N. Hou, M. Jin, Z. qiu, J. Wang, B. Zhang, X. Wang, J. Wang, D. Zhou, J. Li, A novel enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7 using immunomagnetic and beacon gold nanoparticles, *Gut Pathogens*, vol. 6, article number 14, 2014;
- [6] S. Han, T. Zhou, B. Yin, P. He, Gold nanoparticle-based colorimetric ELISA for quantification of ractopamine, *Microchimica Acta*, vol. 185, article number 210, 2018;
- [7] N.T.K. Thanh, Z. Rosenzweig, Development of an aggregation-based immunoassay for anti-protein A using gold nanoparticles, *Analytical Chemistry*, vol. 74, pp. 1624-1628, 2002.

Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia, Stoica Raluca-Diana

~~SECRET DE SERVICIU~~

REVENDICARE

Procedeul de obtinere a nanoimunisorbentului tip antigen: acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-cisteamina-nanoparticula de aur folosit in detectia pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic (dicamba) din probe alimentare si de mediu este caracterizat prin aceea ca 37,3 mg acid tetracloroauric se dizolva in 120 ml apa bidistilata la care se adauga o cantitate de 100,7 mg citrate de sodiu iar amestecul de reactie rezultat este adus la temperatura de 60-70 °C sub continua agitare pana la formarea unei solutii de culoare rosie de nanoparticule de aur ce sunt separate prin centrifugare la 1500 x g timp de 15 min apoi spalate cu 10 ml apa bidistilata si suspendate in final in 5 ml apa bidistilata iar 100 µl suspensie de nanoparticule de aur se adauga la 1 ml solutie de 200 µg/ml conjugat dicamba-cisteamina obtinut prin reactia de activare a 90 mg de acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic (dicamba) in 2 ml dimetilformamida cu 180 mg de 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida timp de 30 min la temperatura camerei iar amestecul se adauga la 45 mg de N-hidroxisuccinimida in 1 ml dimetilformamida sub continua agitare timp de 6 ore iar 2 ml din solutia de pesticid activat se adauga la 6 ml solutie de cisteamina 10 mg/ml picatura cu picatura sub continua agitare timp de 3 ore iar amestecul de reactie rezultat este depozitat la 4 °C pana la formarea unui precipitat de conjugat dicamba-cisteamina care este separate prin centrifugare si spalat cu apa bidistilata avand temperatura de 4 °C si utilizat in proportie de 200 µg/ml la 100 µl suspensie de nanoparticule de aur rezultate in etapa E1 pentru realizarea nanoimunisorbentului tip antigen acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-cisteamina-nanoparticule de aur, obtinut prin reactia de cuplare a conjugatului dicamba-cisteamina la suprafata nanoparticulelor de aur, produsul final este obtinut prin centrifugare la 1500 x g timp de 15 min si resuspendat in 2 ml tampon fosfat 10 mM pH 7,2 si depozitat la 4°C in vederea utilizarii in tehnica de dozare a pesticidului dicamba din probe alimentare si de mediu.



Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia, Stoica Raluca-Diana