



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI

Brevet de invenție

Nr.135087

Acordat în temeiul Legii nr.64/1991 privind brevetele de invenție, republicată în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr.613, din 19 august 2014.

Titular: INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE - DEZVOLTARE PENTRU FIZICĂ ȘI INGINERIE NUCLEARĂ "HORIA HULUBEI"(IFIN-HH), MĂGURELE, IF, RO; INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE - DEZVOLTARE PENTRU TEHNOLOGII IZOTOPICE ȘI MOLECULARE, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

Titlul invenției: PROCEDU DE OBTINERE A NANOIMUNOSORBENTULUI SUPERPARAMAGNETIC TIP ANTICORP PE BAZĂ DE Fe₃O₄ UTILIZAT ÎN TEHNICA NANOELISA PENTRU DETECTIA PESTICIDULUI DICAMBA (ACID 3, 6-DICLORO-2-METOXIBENZOIC) DIN PROBE ALIMENTARE ȘI DE MEDIU

Inventatori: DOROBANȚU IOAN, BUCUREȘTI, B, RO; NEAGU LIVIA, BUCUREȘTI, B, RO; STOICA RALUCA-DIANA, BUCUREȘTI, B, RO; CRĂCIUNESCU IZABELL, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO; TURCU RODICA PAULA, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

Descrierea invenției, revendicările și desenele la care se face referință în acestea, fac parte integrantă din prezentul brevet de invenție.
Durata brevetului de invenție este de 20 ani, cu începere de la data de 11/12/2019, cu condiția plății taxelor anuale de menținere în vigoare a brevetului.

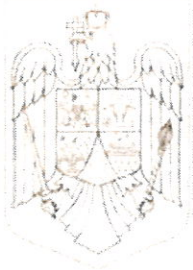
Confirm cele de mai sus prin
semnarea și aplicarea sigiliului

Director General

București, Data eliberării 30/10/2025

(19) OFICIUL DE STAT
PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
București

ROMÂNIA



(11) RO 135087 B1

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 ^(2006.01)

G01N 33/543 ^(2006.01)

(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00883

(22) Data de depozit: 11.12.2019

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: 30.10.2025 BOPI nr. 10/2025

(41) Data publicării cererii:

30/06/2021 BOPI nr. 6/2021

(73) Titular:

INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE -
DEZVOLTARE PENTRU FIZICĂ ȘI INGINERIE
NUCLEARĂ "HORIA HULUBEI"(IFIN-HH)
STR.REACTORULUI, NR.30, 077125 MĂGURELE,
ILFOV, (România)
INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE -
DEZVOLTARE PENTRU TEHNOLOGII IZOTOPICE
ȘI MOLECULARE STR.DONATH NR.67-103,
400293 CLUJ-NAPOCA, CLUJ, (România)

(72) Inventatori:

IOAN DOROBANȚU, ALEEA CÂMPUL CU FLORI
NR.1, BL.OD 2, SC.C, ET.5, AP.110, SECTOR 6,
062021 BUCUREȘTI, [RO]

LIVIA NEAGU, ALEEA POIANA VADULUI NR.1,
BL.OD8, SC.1, ET.2, AP.10, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, [RO]

RALUCA-DIANA STOICA, STR.EUCALIPTULUI
NR.14B1, SECTOR 6, BUCUREȘTI, [RO]

IZABELL CRĂCIUNESCU, STR.BUCUREȘTI NR.57-
63, BL.A, SC.2, AP.20, CLUJ-NAPOCA, CLUJ, [RO]

RODICA PAULA TURCU, STR.TITU MAIORESCU,
NR.7, AP.4, CLUJ-NAPOCA, CLUJ, [RO]

(56) Documente din stadiul tehnicii:

RO 131121 B1

RO 127441 B1

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

Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la
OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de
6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a
brevetului

RO 135087 B1

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui nanoimunosorbent superparamagnetic, tip anticorp pe bază de Fe_xO_y utilizat în tehnica nanoELISA pentru detecția pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic din probe alimentare și de mediu.

În prezent, detecția și analiza pesticidului DICAMBA (acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic) se efectuează în principal prin metode cromatografice cum ar fi: cromatografia de lichide de înaltă performanță cuplată cu spectrometria de masă și cromatografia în gaz cuplată cu spectrometria de masă și prin electroforeza capilară cuplată cu spectroscopie UV sau spectrometrie de masă, aceste metode necesitând o prelucrare laborioasă a probelor și echipamente costisitoare. O altă tehnică de analiză cantitativă a pesticidelor este tehnica imunochimică cu enzima legată de imunosorbent (faza solidă), ELISA (engleză: Enzyme Linked Immunosorbent Assay) care se bazează pe capacitatea de recunoaștere specifică a structurii moleculare a unui antigen (epitop) (pesticide) de către un anticorp (anticorp antipesticid). În această tehnică se folosesc ca imunosorbenți suprafețe de polistiren (plăci ELISA) acoperite cu antigen sau anticorpi componente cuplate la suprafața fazei solide prin adsorbție fizică. Dezavantajele acestei tehnici sunt date de desorbția speciilor deoarece nu sunt legate covalent, reproductibilitatea și neuniformitatea rezultatelor obținute. NanoELISA este tehnica ELISA bazată pe nanoparticule astfel performanțele tehnicii ELISA clasice fiind îmbunătățite obținând o metodă extrem de sensibilă, Nanomaterialele sunt folosite ca una sau mai multe componente ale tehnicii și îmbunătățesc limita de detecție, sensibilitatea metodei și reducerea timpului de analiză. Au fost acoperite cu anticorp: nanoparticule de fier pentru detecția micotoxinei zearalenonei din cereale și produse alimentare [1]; nanoparticule de aur pentru detecția gliadinei din gluten [2] sau a proteinei p53 [3]; nanoparticule de SiO_2 pentru detecția markerului tumoral antigen carbohidrat 19-9 (CAI 9-9) [4]; nanoparticule de siliciu acoperite cu aur (en. Nanoshells) pentru creșterea sensibilității metodei ELISA în cazul detecției receptorului factorului de creștere al epidermei (EGFR) [5]. Nanoimunosorbenții pe bază de SiO_2 pot fi utilizați și în cromatografia de afinitate de purificare a anticorpilor anti acid 2,4-diclorofenoxiacetic (2,4D) din amestecuri complexe de proteine [6], în cazul nanoparticulelor de aur cuplate cu anticorp [1] sensibilitatea metodei a crescut de cel puțin cinci ori, limita de detecție mai mică față de tehnica ELISA clasică de cel puțin trei ori și timpul de analiză a scăzut.

Invenția prezintă procedeul de obținere a nanoimunosorbentului superparamagnetic tip anticorp utilizat în tehnica nanoELISA în fază omogenă pe bază de nanoimunosorbenți aceștia având următoarele avantaje: zona specifică a nanoimunosorbentului este de (100-200) m^2/g : 1 mg de nanoimunosorbent este echivalent cu suprafața de lucru a zece plăci ELISA, moleculele de anticorp sunt legate covalent pe suprafața nanoparticulelor în comparație cu tehnica ELISA clasică în care anticorpii sunt cuplați prin adsorbție pe suprafața godeurilor plăcii ELISA; legarea covalentă chimică elimină desorbția anticorpului de la suprafață din cazul tehnicii ELISA clasice ceea ce conferă stabilitate nanoimunosorbenților. Nanoimunosorbenții nonmagnetici pot fi separați prin centrifugare, iar nanoimunosorbenții superparamagnetici sunt separați folosind un separator de câmp magnetic. Timpul, de incubare nepesar pentru a atinge echilibrul chimic între anticorp și antigen (analit) este scurt (1-10 min față de 1-2 h în tehnica ELISA clasică), deoarece nanoparticulele sunt în suspensie (fază omogenă) comparativ cu tehnica ELISA clasică unde reacția dintre anticorp și antigen este limitată prin difuzarea componentelor din soluție la suprafața godeurilor sau a tuburilor.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în prezentarea unui procedeu de obținere a nanoimunosorbentului superparamagnetic tip anticorp pe bază de Fe_xO_y utilizat în tehnica nanoELISA pentru detecția pesticidului DICAMBA (acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic) din probe alimentare și de mediu.

Procedeul, conform invenției, de obținere a unui nanoimunosorbent superparamagnetic, tip anticorp pe bază de Fe_xO_y utilizat în tehnica nanoElisa pentru detecția pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic din probe alimentare și de mediu cuprinde următoarele etape:

a) obținerea unui complex de nanoparticule de Fe_xO_y funcționalizate cu aminopropiltriethoxisilan și glutaraldehidă;

b) obținerea unui complex de nanoparticule de SiO_2 funcționalizate cu aminopropiltriethoxisilan și glutaraldehidă;

c) obținerea unui nanoimunosorbent tip antigen prin reacția complexului de nanoparticule de SiO_2 funcționalizate cu aminopropiltriethoxisilan și glutaraldehidă cu un conjugat imunogen de 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-ovalbumină;

d) obținerea de anticorpi anti 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic purificați pe o coloană de afinitate prin punerea în contact a unor γ -globuline separate dintr-un antiser anti 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic cu nanoimunosorbentul tip antigen obținut în etapa c), în vederea reacției imune dintre 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic care este cuplat la suprafața nanoparticulelor de SiO_2 funcționalizate și anticorpul anti 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic, urmată de introducerea complexului rezultat în coloana de cromatografie peste un strat de Sephadex G25 de 1 cm, iar apoi de disocierea anticorpilor anti 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic de pe nanoimunosorbentul pe bază de SiO_2 prin eluție cu o soluție tampon glicină - HCl 10 mM pH 2,3, aduși la pH 7 cu tampon fosfat 1 mM;

e) obținerea nanoimunosorbentului superparamagnetic tip anticorp pe bază de Fe_xO_y prin cuplarea anticorpilor anti 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic purificați în etapa d) cu nanoparticulele de Fe_xO_y funcționalizate cu aminopropiltriethoxisilan și glutaraldehidă din etapa a), nanoimunosorbentul obținut fiind în final depozitat la -18°C în vederea utilizării în tehnica nanoELISA pentru detecția pesticidului 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic din probe alimentare și de mediu.

Procedeul conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că se iau: într-un balon cu fund rotund se dispersează 6,5 mmoli (2,284 g) de acil acetat de fier în 40 ml solvent dibenzilic și se adaugă 0,4 M (5 ml) de acid oleic și 0,4 M (5,2 ml) oleilamina iar soluția astfel obținută este agitată magnetic 30 min până la dizolvarea completă a reactanților, apoi este încălzită și menținută la temperatura după cum urmează: 30 min la 150°C sub flux de argon, 1 h la 250°C , apoi 1 h la reflux, 295°C apoi la terminarea timpului de reacție proba este spălată de trei ori cu câte 50 ml amestec de metanol-etanol și redispersată la concentrație cunoscută în toluen, apoi se introduce un volum de 200 ml de hexan acidificat cu 0,04 ml de acid acetic în care se dizolvă 2 ml de 3-aminopropiltriethoxisilan și se redispersază echivalentul volumic a 1 g de probă de nanoparticule magnetice hidrofobe apoi proba este menținută timp de 72 h sub agitare magnetică puternică la temperatura camerei și după terminarea timpului de reacție proba este separată magnetic din mediul de reacție, spălată de 3 ori cu apă distilată și redispersată la concentrație cunoscută în mediu apos iar 1 g de nanoparticule de Fe_xO_y de diametrul 10 nm este tratat cu 20 ml soluție de α -aminopropiltriethoxisilan (APTES) 10% în amestec hexan: acid acetic timp de 5 h, apoi

centrifugate la 1500 x g, spălate cu apă deionizată, din nou centrifugate la 1500 x g și tratate apoi cu 10 ml soluție de glutaraldehida 10% timp de 3 h sub continuă agitare apoi spălate de excesul de glutaraldehidă și depozitate la 4°C în vederea cuplării cu anticorpii antiDICAMBA separate din antiseruri policlonale antipesticid prin utilizarea nanoimunosorbentului de tip antigen obținut prin tratamentul a 100 mg de nanoparticule de SiO₂ de diametru de 15 nm cu o soluție de HNO₃ 10% timp de 1 h la temperatura de 80°C iar soluția acidă este îndepărtată și nanoparticulele de SiO₂ sunt centrifugate la 1500 x g timp de 15 min apoi spălate cu 20 ml apă deionizată apoi tratate cu 10 ml soluție de APTES 10% în apă deionizată sub continuă agitare timp de 3 h apoi nanoparticulele obținute prin centrifugare la 1500 x G timp de 15 min sunt tratate cu 5 ml soluție de glutaraldehidă 10% timp de 2 h la temperatura camerei apoi centrifugate la 1500 x g timp de 15 min și apoi puse în reacție cu 20 mg conjugat 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-ovalbumina, conjugat realizat din reacția dintre 10 mg acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic, 10 mg N-hidroxisuccinimida (NHS) și 30 mg 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil-carbodiimida) (CDI) în 1 ml dimetilformamida (DMF) pentru 30 min în vederea activării pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic care este pus în reacție cu 4 ml soluție de ovalalbumină de concentrație 3 mg/ml în tampon carbonat 50 mM pH 9,6 timp de 24 h la temperatura de 4°C, apoi este purificat pe coloana de Sephadex G25 având ca tampon de eluție tampon fosfat 5 Mm iar conjugatul 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-ovalbumina este pus să reacționeze cu 100 mg de nanoparticule de SiO₂ activate cu glutaraldehida 2 h în vederea obținerii de nanoimunosorbent tip antigen nanoimunosorbent SiO₂ -ovalbumina-acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic care este folosit în obținerea anticorpilor specifici anti 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic rezultați din tratarea a 100 μl antiser antipesticid brut cu (NH₄)₂SO₄ 50% (v/v) în vederea precipitării γ-globulinelor ce sunt separate prin centrifugare la 1500 x g timp de 10 min, supernatantul este îndepărtat iar precipitatul dizolvat în tampon fosfat 10 mM pH 7,2 1 ml apoi este pus în amestec cu 20 mg suspensie de nanoimunosorbent tip antigen timp de 3 h în vederea reacției imune dintre anticorpii antipesticid și conjugatul pesticidic cuplat la suprafața nanoparticulelor de SiO₂ urmată de centrifugare la 1500 x g timp de 15 min, spălarea nanoimunosorbentului cu soluție de NaCl 9% iar apoi introduce pe coloana de sticlă diametrul 1 cm, L = 10 cm pentru un strat de Sephadex G25 de înălțime 1 cm iar anticorpii specifici anti acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic sunt disociați prin eluție cu soluție de glicină-HCl 10 mM pH 2,3 aduse la pH 7,0 cu tampon fosfat 1 mM pH 7 și cuplați la 100 mg nanoparticule superparamagnetice de Fe_xO_y, activate cu glutaraldehida cu formare de nanoimunosorbent tip anticorp Fe_xO_y-anticorp anti acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic care este depozitat la temperatura de -18°C în vederea utilizării în tehnica nanoELISA pe bază de nanoimunosorbent tip anticorp pentru detecția pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic din probe alimentare și de mediu.

Procedeul conform invenției constă în 11 etape: E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10 și E11.

E1: Obținerea de nanoparticule superparamagnetice de Fe_xO_y cu diametrul de 10 nm

E2: Activarea nanoparticulelor de Fe_xO_y cu APTES

E3: Activarea complexului nanoparticule Fe_xO_y-APTES cu glutaraldehida cu formare de nanoparticule de Fe_xO_y activate.

E4: Activarea nanoparticulelor de SiO₂ cu 3-aminopropil trietoxisilan (APTES) și glutaraldehida, activare realizată în trei reacții: Reacția 1 - tratamentul termic al nanoparticulelor cu HNO₃, Reacția 2 - reacția nanoparticulelor de SiO₂ cu APTES cu formare de complex nanoparticule de SiO₂-APTES și Reacția 3 - activarea complexului nanoparticule de SiO₂-APTES cu glutaraldehida și formare de nanoparticule de SiO₂ activate.

E5: Activarea pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic (dicamba) realizată prin două reacții:

Reacția 1 - activarea pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic cu 1-etil-3(3'-diaminopropil)carbodiimide (CDI) reacție desfășurată în dimetilformamida și reacția 2- activarea complexului pesticid-CDI cu N-hidroxisuccinimida (NHS) cu formare de pesticid activat.

E6: Obținerea conjugatului imunogen ovalbumina-dicamba prin reacția dintre ovalbumina și pesticidul activ.

E7: Purificarea conjugatului proteina-pesticid pe coloana de Sephadex G25.

E8: Obținerea nanoimunisorbentului tip antigen, reacție dintre nanoparticule de SiO_2 activate cu glutaraldehida și conjugatul imunogen purificat în etapa E7.

E9: Obținerea coloanei de afinitate utilizând nanoimunisorbent de tip antigen (caracteristici tehnice și funcționale ale coloanei).

E10: Obținerea anticorpilor antipesticid purificați pe coloana de afinitate

E11: Obținerea nanoimunisorbentului tip anticorp prin reacția nanoparticulelor superparamagnetice Fe_xO_y activate în etapa 3 cu anticorpii anti 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic purificați în etapa E10.

Descrierea etapelor procedurii de obținere:

E1: Obținerea de nanoparticule superparamagnetice de Fe_xO_y cu diametrul de 10 nm

Într-un balon cu fund rotund se dispersează 6,5 mmoli (2,284 g) de acetyl acetat de fier în 40 ml solvent dibenzilic și se adaugă 0,4 M (5 ml) de acid oleic și 0,4 M (5,2 ml) oleilamina. Soluția astfel obținută este agitată magnetic 30 min până la dizolvarea completă a reactanților, apoi este încălzită și menținută la temperatura după cum urmează: 30 min la 150°C sub flux de argon, 1 h la 250°C , apoi 1 h la reflux, 295°C . La terminarea timpului de reacție proba este spălată de trei ori cu câte 50 ml amestec de metanol-etanol și redispersată la concentrația cunoscută în toluene. Se introduce un volum de 200 ml de hexan acidificat cu 0,04 ml de acid acetic în care se dizolvă 2 ml de 3-aminopropiltriethoxisilan și se redispersează echivalentul volumic a 1 g de probă de nanoparticule magnetice hidrofobe apoi proba este menținută timp de 72 h sub agitare magnetică puternică la temperatura camerei și după terminarea timpului de reacție proba este separată magnetic din mediul de reacție, spălată de 3 ori cu apă distilată și redispersată la concentrație cunoscută în mediu apos.

E2: Activarea nanoparticulelor de Fe_xO_y cu APTES

1 g de nanoparticule de Fe_xO_y de diametrul 10 nm este tratat cu 20 ml soluție de α -aminopropiltriethoxisilan (APTES) 10% în amestec hexamacid acetic (10:0,1) timp de 5 h, separare prin centrifugare la 1500 x g, spălate cu apă deionizată, din nou centrifugate la 1500 x g.

E3: Activarea complexului nanoparticule Fe_xO_y -APTES cu glutaraldehida cu formare de nanoparticule activate de Fe_xO_y .

Complexul de nanoparticule Fe_xO_y -APTES este tratat cu 10 ml soluție de glutaraldehidă 10% timp de 3 h sub continuă agitare apoi spălate pentru îndepărtarea excesului de glutaraldehidă și depozitate la 4°C în vederea cuplării cu pesticidul acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic.

E4: Activarea nanoparticulelor de SiO_2 cu 3-aminopropil triethoxisilan (APTES) și glutaraldehidă, activare realizată în trei reacții: Reacția 1 - tratamentul termic al nanoparticulelor cu HNO_3 , Reacția 2 - reacția de activare a nanoparticulelor de SiO_2 cu APTES cu formare de complex nanoparticule de SiO_2 -APTES și Reacția 3-activarea complexului nanoparticule de SiO_2 -APTES cu glutaraldehidă.

Reacția 1: 100 mg de nanoparticule de SiO_2 cu diametrul $\Phi = 15$ nm se tratează cu o soluție de HNO_3 10% timp de 1 h la temperatura de 80°C nanoparticulele sunt separate prin centrifugarea la $1500 \times g$ timp de 15 min apoi spălate cu 20 ml apă deionizată.

Reacția 2: Nanoparticulele rezultate în reacția 1 sunt tratate cu 10 ml soluție de APTES 10% în apă deionizată timp de 3 h sub continuă agitare apoi sunt centrifugate la $1500 \times g$, timp de 15 min și spălate cu apă deionizată (30 ml).

Reacția 3: Activarea complexului nanoparticule de SiO_2 -APTES cu glutaraldehidă: nanoparticulele rezultate în reacția R2 sunt tratate cu 5 ml de soluție de glutaraldehidă 10% timp de 2 h la temperatura camerei sub continuă agitare, apoi centrifugate la $1500 \times g$ timp de 15 min pentru îndepărtarea glutaraldehidei în exces și depozitate la 4°C în vederea cuplării cu conjugatul acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-ovalbumina.

E5: Activarea pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic realizată prin două reacții: Reacția 1 - activarea pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic cu 1-etil-3(3'-diaminopropil)carbodiimida (CDI) reacție desfășurată în dimetilformamida și reacția 2- activarea complexului pesticid-CDI cu N-hidroxisuccinimidă (NHS) cu formare de pesticid activ.

Reacția 1: 10 mg de acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic și 30 mg 1-etil-3(3'-diaminopropil)carbodiimidă (CDI) în 1 ml dimetilformamidă (DMF) pentru realizarea complexului pesticid-CDI.

Reacția 2: Reacția dintre complexul pesticid-CDI cu 10 mg N-hidroxisuccinimidă în 1 ml DMF cu formarea complexului activ acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-N-hidroxisuccinimidă (pesticidul activat).

E6: Obținerea conjugatului imunogen ovalbumină-dicamba

Pesticidul activat realizat în etapa E5, reacția 2 este tratat cu 4 ml soluție de ovalbumină de concentrație 3 mg/ml în tampon carbonat 50 mM pH 9,6 timp de 24 h la temperatura de 4°C cu formare de conjugat 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-ovalbumină.

E7: Purificarea conjugatului proteină-pesticid pe coloana de Sephadex G25

Conjugatul 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-ovalbumină este purificat pe coloană de Sephadex G25 având ca tampon de eluție tamponul fosfat 5 mM pH 7,2.

E8: Obținerea nanoimunosorbentului tip antigen

100 mg nanoparticule de SiO_2 activate cu glutaraldehidă realizate în etapa E3 au fost tratate cu 20 mg conjugat proteina-pesticid purificat în etapa E7 timp de 2 h pentru formarea de nanoimunosorbent tip antigen.

E9: Obținerea coloanei de afinitate utilizând nanoimunosorbent de tip antigen (caracteristici tehnice și funcționale ale coloanei).

Coloana de afinitate are diametrul de 1 cm, lungimea de 10 cm, grosimea stratului de Sephadex G25 = 1 cm și eluent glicina-HCl 10 mM, pH 2,3.

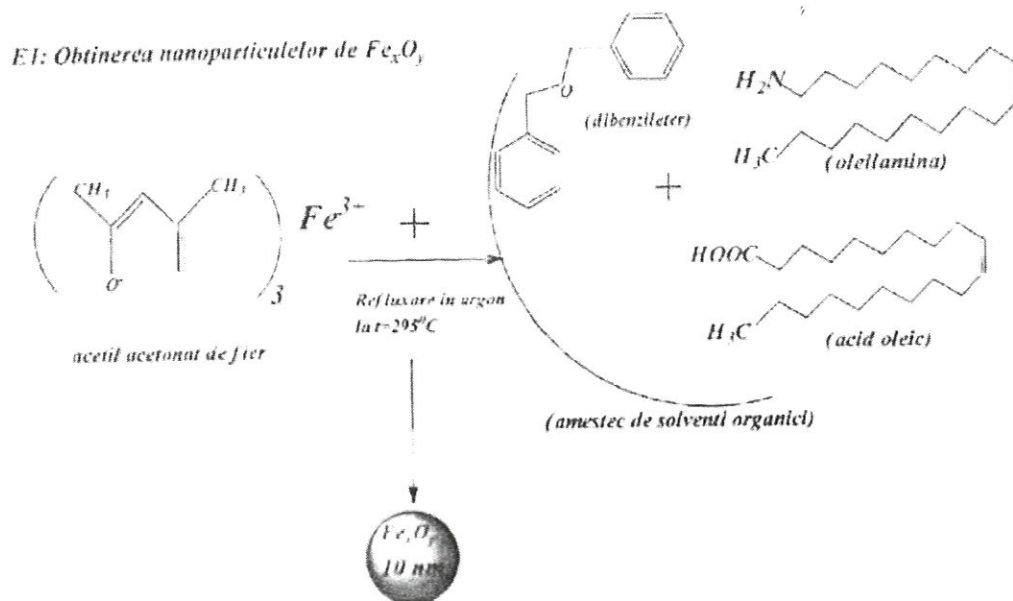
E10: Obținerea anticorpilor antipesticid purificați pe coloana de afinitate

100 μl antiser anti 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic brut în 1 ml apă deionizată este tratat cu 1 ml soluție de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (sulfat de amoniu) 50%. Precipitatul conținând γ -globulinele sunt separate prin centrifugare la $1500 \times g$, supernatantul îndepărtat iar γ -globulinele precipitate sunt dizolvate în tampon fosfat 10 mM pH 7,2 apoi sunt puse în contact cu 20 mg nanoimunosorbent tip antigen obținut în etapa E8 timp de 3 h sub continua agitare în vederea reacției imune dintre antigenul acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic cuplat la suprafața nanoparticulelor și γ -globulina specifică (anticorpul anti 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic). Suspensia de nanoparticule având complexul imun cuplat la suprafața este introdusă în coloană peste un strat de Sephadex G25 de 1 cm iar anticorpul anti 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic sunt disociați de pe nanoimunosorbent prin eluție cu soluție de tampon glicină-HCl 10 mM pH 2,3 și aduși la pH 7,2 cu tampon fosfat 1 M pH 7,2.

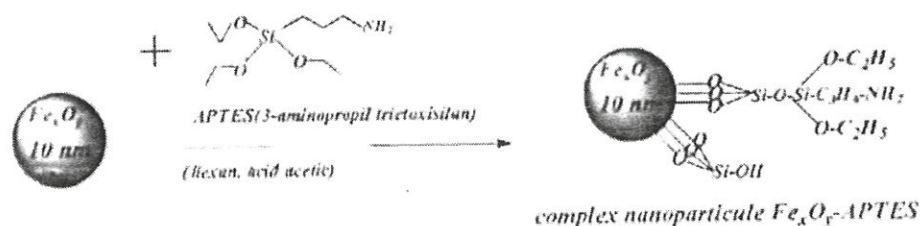
E11: Obținerea nanoimunisorbentului tip anticorp

Anticorprii anti 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic purificați în etapa E10 sunt cuplați la 100 mg nanoparticule superparamagnetice Fe_xO_y activate cu glutaraldehidă în etapa 3, obținându-se nanoimunisorbentul tip anticorp.

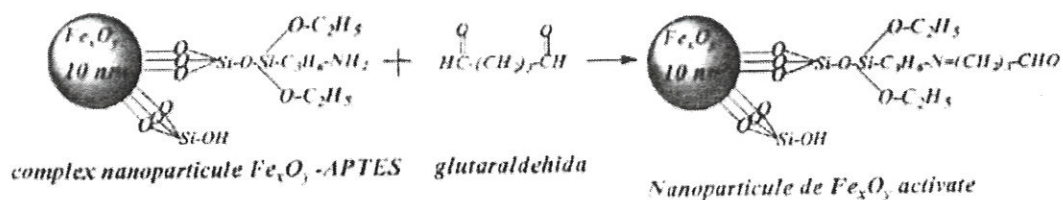
Reacții chimice de obținere a nanoimunisorbentului tip anticorp



E2: Activarea nanoparticulelor de Fe_xO_y cu APTES

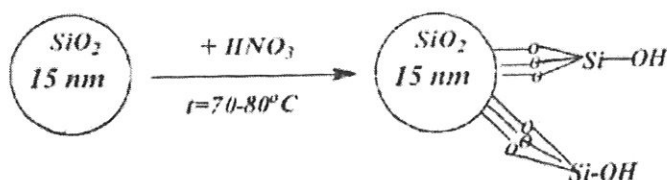


E3: Activarea complexului nanoparticule Fe_xO_y -APTES cu glutaraldehidă

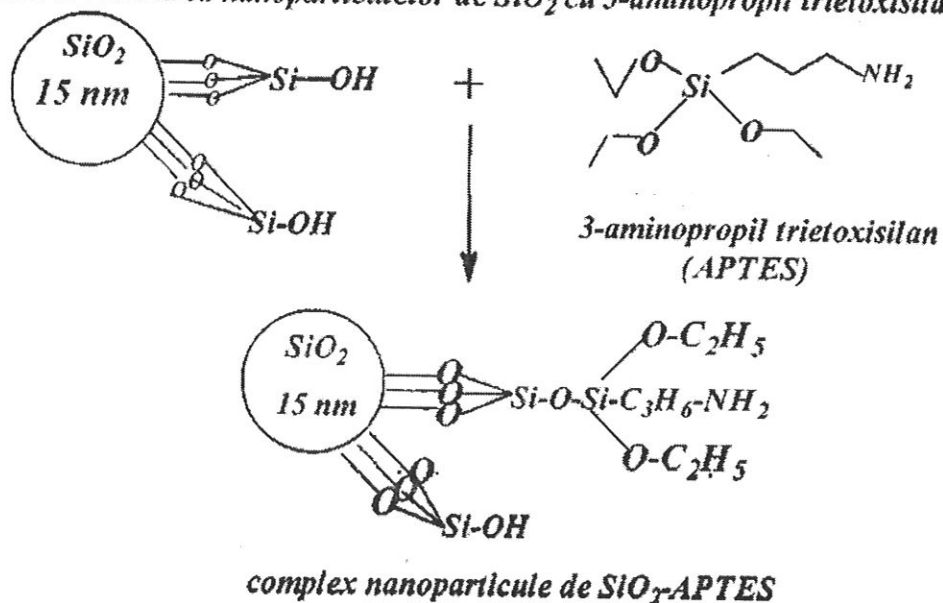


E4: Activarea nanoparticulelor de SiO_2 cu 3-aminopropil trietoxisilan (APTES) și glutaraldehidă

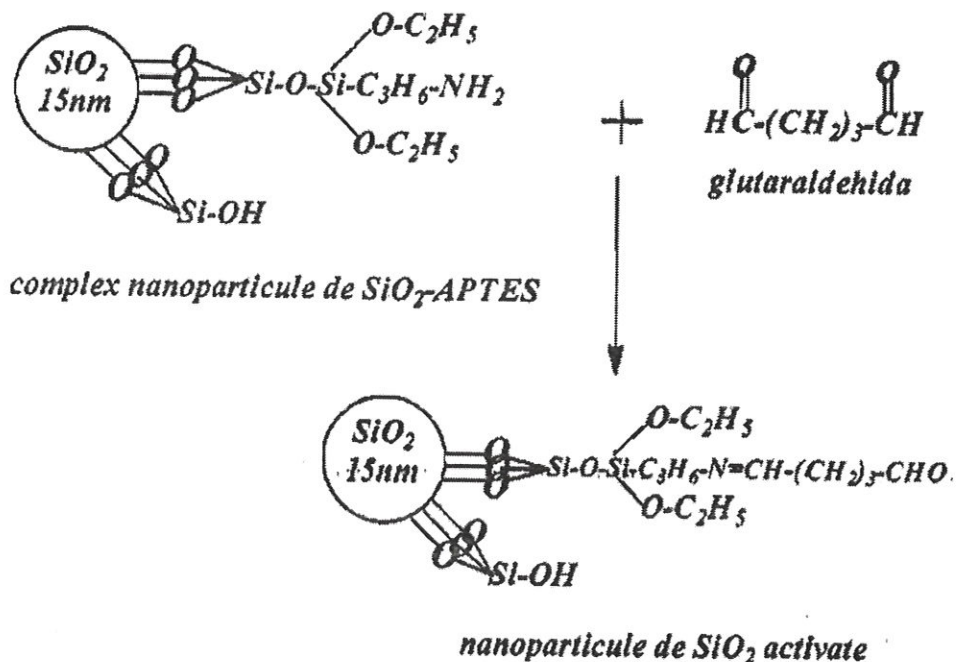
Reacția 1: Tratatamentul nanoparticulelor de SiO_2 cu HNO_3



Reactia 2: Activarea nanoparticulelor de SiO_2 cu 3-aminopropil trietoxisilan

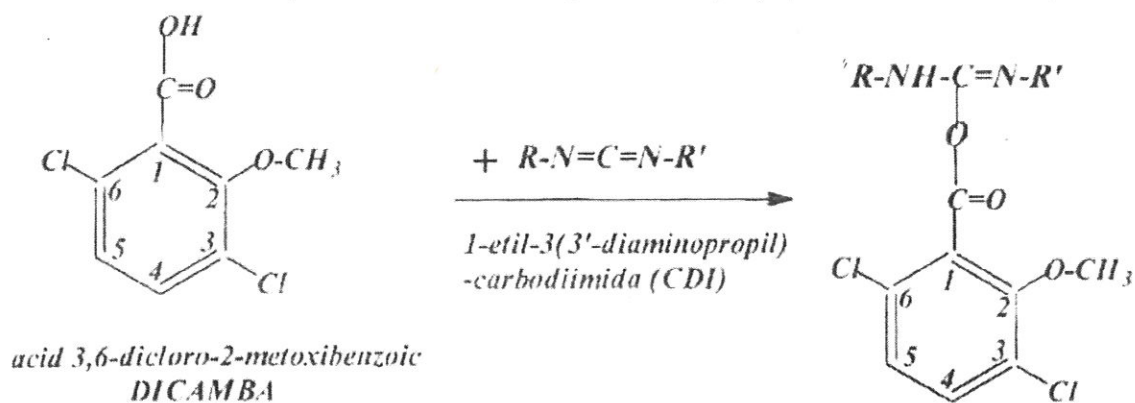


Reactia 3: Activarea complexului nanoparticule de SiO_2 -APTES cu glutaraldehida

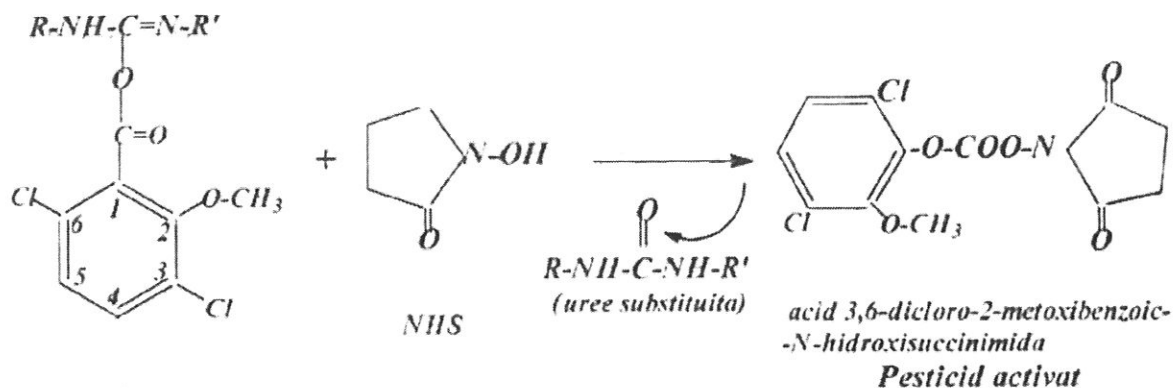


E5: Activarea pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic (dicamba)

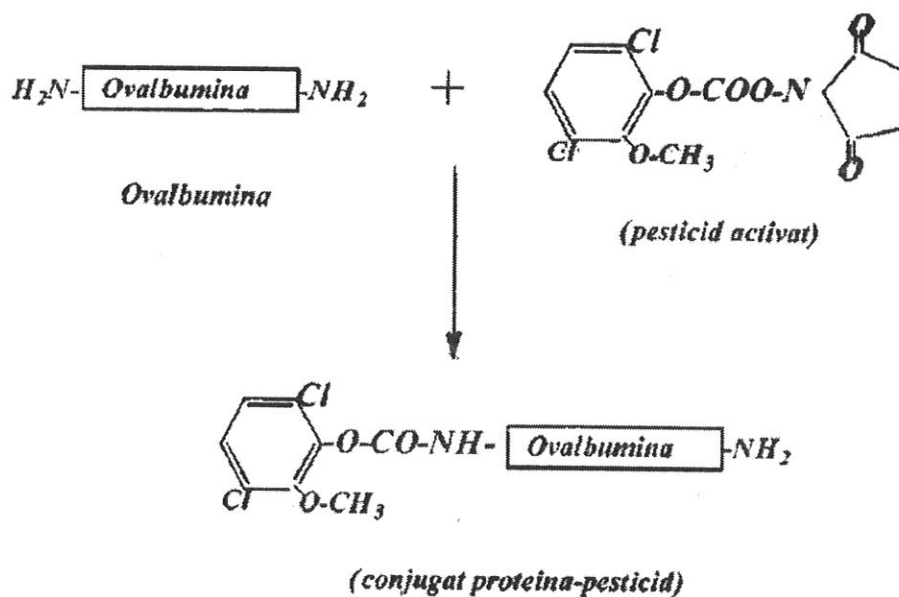
Reactia 1: Activarea pesticidului cu 1-etil-3(3'-diaminopropil)-carbodiimida (CDI)



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

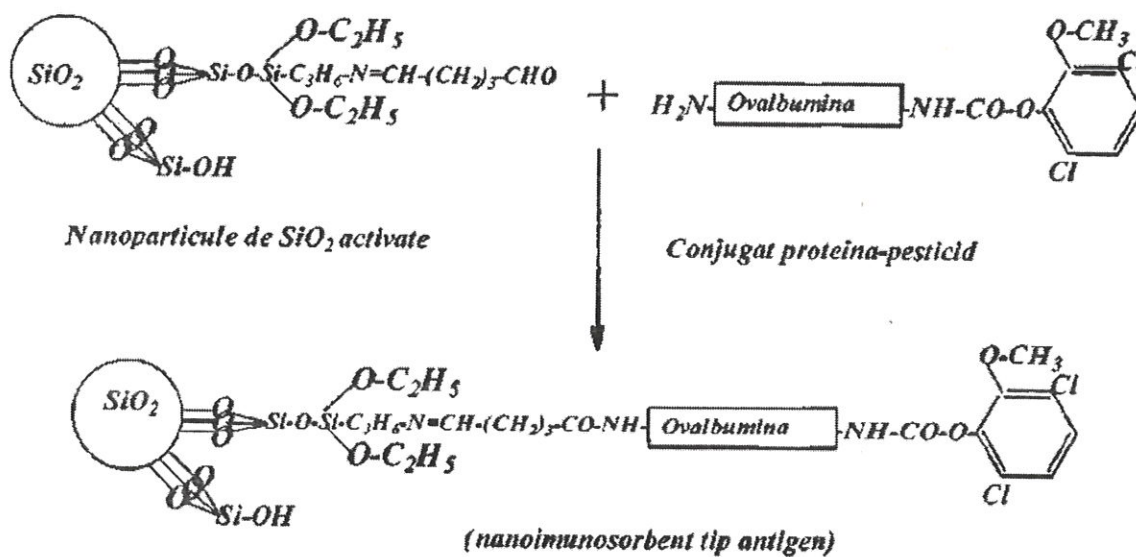


E6: Obținerea conjugatului imunogen ovalbumina-dicamba



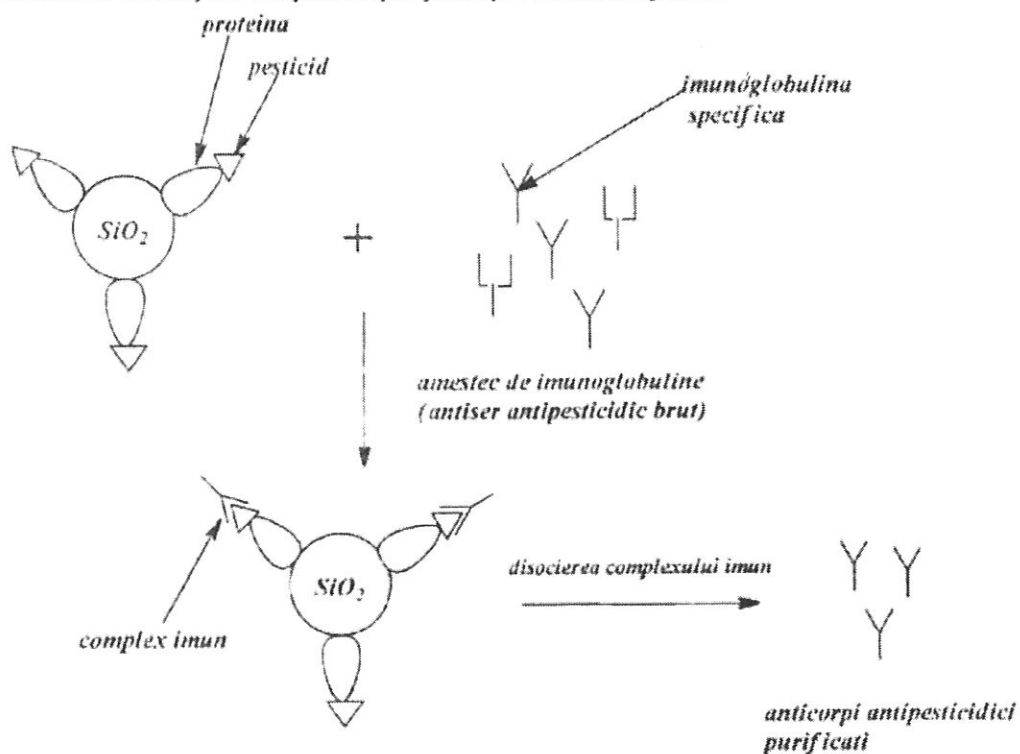
E7: Purificarea conjugatului proteina-pesticid pe coloana de Sephadex G25

E8: Obținerea nanoimunosorbentului tip antigen

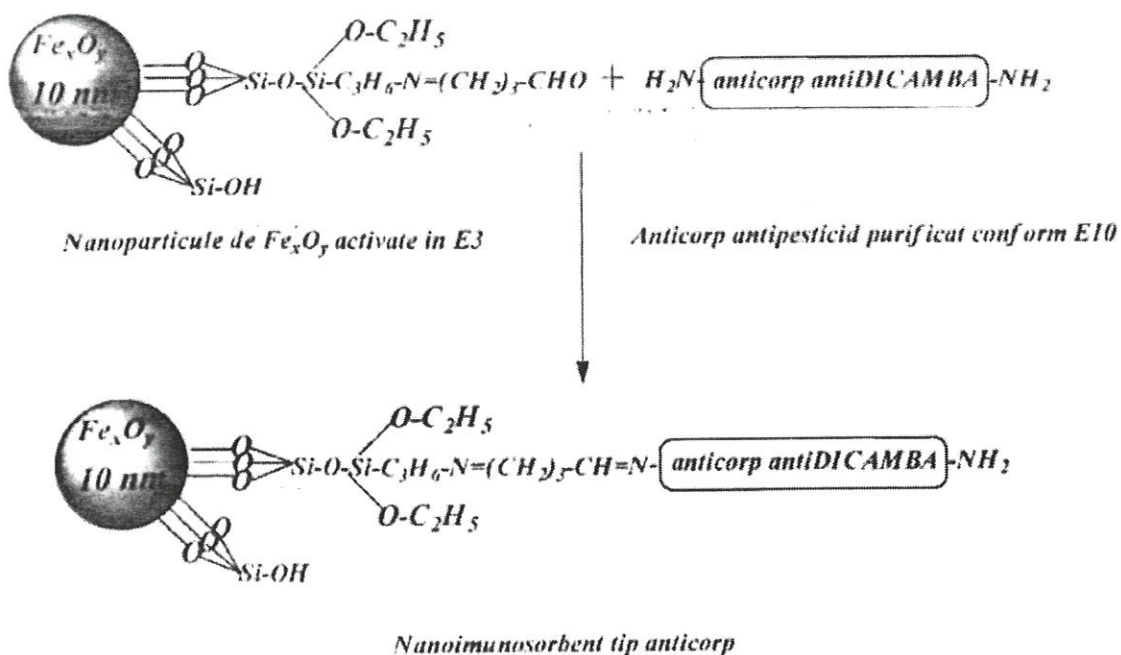


E9: Obținerea coloanei de afinitate utilizând nanoimunisorbentul de tip antigen (caracteristici)

E10: Obținerea anticorpilor antipesticid purificați pe coloana de afinitate



E11: Obținerea nanoimunisorbentului tip anticorp



Bibliografie

[1] X. Zhang, X. Wang, M. Sun, X. Zhang, H. Song, Y. Yan, J. Sun, X. Li, W. Fang, *A magnetic nanoparticle based enzyme-linked immunosorbent assay for sensitive quantification of zearalenone in cereai and feed samples*, Toxins, vol. 7, pp. 4216-4231, 2015;

[2] P. Ciaurriz, F. Fernandez, E. Teliechea, 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;

[3] C.-P. Jia, X.-Q. Zhong, B. Hua, M.-Y. Liu, F.-X. Jing, X.-H. Lou, S.-H. Yao, J.-Q. Xiang, Q.-H. Jin, J.-L. Zhao, *Nano-ELISA for highly sensitive protein detection*, Biosensors and Bioelectronics, vol. 24, pp. 2836-2841, 2009;

[4] Y. Zhuo, R. Yuan, Y.-Q. Chai, C.-L. Hong, *Functionalized SiO₂ labeled CA19-9 antibodies: A new strategy for signal amplification of antigen-antibody sensing processes*, The Analyst, vol. 135, issue8, art. No. 2036, 2010;

[5] M. M. Billingsley, R. S. Riley, E.S. Day, *Antibody-nanoparticle conjugates to enhance the sensitivity of ELISA-based detection methods*, Pios One, vol. 12, issue 5, article no. e0177592, 2017.

[6] Dorobanțu Ioan, Neagu Livia, *Procedeu de obținere a anticorpilor anti acid 2,4-diclorofenoxiacetic-(2,4D) din amestecuri complexe-de-proteine pe bază de nanoimunosorbenți*, Brevet de invenție nr. OS1M 131121/30.09.2019.

Revendicări

1. Procedeu de obținere a unui nanoimunosorbent superparamagnetic, tip anticorp pe bază de Fe_xO_y utilizat în tehnica nanoElisa pentru detecția pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic din probe alimentare și de mediu, **caracterizat prin aceea că**, cuprinde următoarele etape:

a) obținerea unui complex de nanoparticule de Fe_xO_y funcționalizate cu aminopropiltrietoxisilan și glutaraldehidă;

b) obținerea unui complex de nanoparticule de SiO_2 funcționalizate cu aminopropiltrietoxisilan și glutaraldehidă;

c) obținerea unui nanoimunosorbent tip antigen prin reacția complexului de nanoparticule de SiO_2 funcționalizate cu aminopropiltrietoxisilan și glutaraldehidă cu un conjugat imunogen de 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-ovalbumină;

d) obținerea de anticorpi anti 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic purificați pe o coloană de afinitate prin punerea în contact a unor γ -globuline separate dintr-un antiser anti 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic cu nanoimunosorbentul tip antigen obținut în etapa c), în vederea reacției imune dintre 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic care este cuplat la suprafața nanoparticulelor de SiO_2 funcționalizate și anticorpul anti 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic, urmată de introducerea complexului rezultat în coloana de cromatografie peste un strat de Sephadex G25 de 1 cm, iar apoi de disocierea anticorpilor anti 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic de pe nanoimunosorbentul pe bază de SiO_2 prin eluție cu o soluție tampon glicină - HCl 10 mM pH 2,3, aduși la pH 7 cu tampon fosfat 1mM;

e) obținerea nanoimunosorbentului superparamagnetic tip anticorp pe bază de Fe_xO_y prin cuplarea anticorpilor anti 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic purificați în etapa d) cu nanoparticulele de Fe_xO_y funcționalizate cu aminopropiltrietoxisilan și glutaraldehidă din etapa a), nanoimunosorbentul obținut fiind în final depozitat la -18°C în vederea utilizării în tehnica nanoELISA pentru detecția pesticidului 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic din probe alimentare și de mediu.

2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, complexul de nanoparticule de Fe_xO_y funcționalizate cu aminopropiltrietoxisilan și glutaraldehidă se obține prin o serie de etape care cuprind:

- obținerea nanoparticulelelor de Fe_xO_y prin dispersarea a 6,5 mmoli de acetylacetonat de fier în 40 ml solvent dibenzileter, adaugare de 5 ml de acid oleic 0,4 M și 5,2 ml oleilamina 0,4 M, soluția astfel obținută fiind apoi agitată magnetic 30 min până la dizolvarea completă a reactanților, apoi încălzită și menținută 30 min la 150°C sub flux de argon, 1 h la 250°C , apoi 1 h la reflux, 295°C apoi la terminarea timpului de reacție proba este spălată de trei ori cu câte 50 ml amestec de metanol-etanol și redispersată la concentrație cunoscută în toluen, apoi se introduce un volum de 200 ml de hexan acidifiat cu 0,04 ml de acid acetic în care se dizolvă 2 ml de 3-aminopropiltrietoxisilan și se redispersează echivalentul volumic a 1 g de probă de nanoparticule magnetice hidrofoabe, apoi proba este menținută timp de 72 h sub agitare magnetică puternică la temperatura camerei și după terminarea timpului de reacție proba este separată magnetic din mediul de reacție, spălată de 3 ori cu apă distilată și redispersată la concentrația cunoscută în mediu apos;

- activarea nanoparticulelelor de Fe_xO_y cu α -aminopropiltrietoxisilan (APTES) și glutaraldehidă prin tratarea a 1 g de nanoparticule de Fe_xO_y de diametrul 10 nm cu 20 ml soluție de APTES 10% în amestec hexan: acid acetic timp de 5 h, urmată de centrifugare la

1500 x g, spălare cu apă deionizată, din nou centrifugare la 1500 x g și tratare apoi cu 10 ml soluție de glutaraldehidă 10% timp de 3 h sub continuă agitare, apoi spălare de excesul de glutaraldehidă și depozitare la 4°C.

5 3. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, complexul de nanoparticule de SiO_2 funcționalizate cu aminopropiltrietoxisilan și glutaraldehidă se obține prin tratarea a 100 mg de nanoparticule de SiO_2 de diametru de 15 nm cu o soluție de HNO_3 10% timp de 1 h la temperatura de 80°C cu obținerea unei soluții acide care este îndepărtată, centrifugarea nanoparticulelor de SiO_2 la 1500 x g timp de 15 min, spălarea acestora cu 20 ml apă deionizată, urmată de tratarea cu 10 ml soluție de APTES 10% în apă
10 deionizată sub continuă agitare timp de 3 h, iar ulterior centrifugarea nanoparticulelor obținute la 1500 x G timp de 15 min, tratarea acestora cu 5 ml soluție de glutaraldehidă 10% timp de 2 h la temperatura camerei, urmată de centrifugare la 1500 x g timp de 15 min.

15 4. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, conjugatul imunogen din etapa c) se obține prin reacția dintre 10 mg acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic, 10 mg N-hidroxisuccinimidă (NHS) și 30 mg 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropilcarbodiimidă) (CDI) în 1 ml dimetilformamidă (DMF) în vederea activării pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic care este apoi pus în reacție cu 4 ml soluție de ovalbumină de concentrație 3 mg/ml în tampon carbonat 50 mM la pH 9,6, timp de 24 h, la 4°C, iar ulterior purificat pe coloana de Sephadex G25 având ca tampon de eluție tampon fosfat 5 mM.

20 5. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, etapa d) cuprinde tratarea a 100 μl antiser anti 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic brut în 1 ml apă deionizată cu 1 ml soluție de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50%, urmată de centrifugare la 1500 x g și dizolvarea γ -globulinele precipitate în tampon fosfat 10 mM pH 7,2 în vederea punerii în contact cu nanoimunosorbentul tip antigen obținut în etapa c).



**Extras din Legea nr. 64/1991 privind brevetele de invenție,
republicată în Monitorul Oficial al României,
Partea I, nr. 613 din 19 August 2014**

Art. 29

(1) Brevetul de invenție este eliberat de directorul general al OSIM, în temeiul hotărârii de acordare a acestuia. Pentru brevetul european, OSIM certifică validitatea brevetului în România, conform legii.

(2) Data eliberării brevetului de invenție este data la care mențiunea hotărârii de acordare este publicată în Buletinul Oficial de Proprietate Industrială.

(3) Brevetele se înscriu în Registrul național al brevetelor de invenție.

Art. 31

(1) Brevetul de invenție conferă titularului său un drept exclusiv de exploatare a invenției pe întreaga sa durată.

(2) Este interzisă efectuarea fără consimțământul titularului a următoarelor acte:

a) fabricarea, folosirea, oferirea spre vânzare, vânzarea sau importul în vederea folosirii, oferirii spre vânzare ori vânzării, în cazul în care obiectul brevetului este un produs;

b) utilizarea procedurii, precum și folosirea, oferirea spre vânzare, vânzarea sau importul în aceste scopuri al produsului obținut direct prin procedul brevetat, în cazul în care obiectul brevetului este un procedeu.

Art. 33

(1) Nu constituie încălcarea drepturilor prevăzute la art. 31 și 32

a) folosirea invențiilor în construcția și în funcționarea vehiculelor terestre, aeriene, precum și la bordul navelor sau la dispozitivele pentru funcționarea acestora, aparținând statelor membre ale tratatelor și convențiilor internaționale privind invențiile, la care România este parte, când aceste vehicule sau nave pătrund pe teritoriul României, temporar sau accidental, cu condiția ca această folosire să se facă exclusiv pentru nevoile vehiculelor sau navelor;

b) efectuarea oricăruia dintre actele prevăzute la art. 31 alin. (2) de către o persoană care a aplicat obiectul brevetului de invenție sau cel al cererii de brevet, așa cum a fost publicată, ori a luat măsuri efective și serioase în vederea producerii sau folosirii lui cu bună-credință pe teritoriul României, independent de titularul acestuia, cât și înainte de constituirea unui depozit național reglementar privind invenția sau înainte de data la care curge termenul de prioritate recunoscută; în acest caz, invenția poate fi folosită în continuare de acea persoană în volumul existent la data de depozit sau a priorității recunoscute și dreptul de folosire nu poate fi transmis decât cu patrimoniul persoanei ori cu o fracțiune din patrimoniul afectat exploatarei invenției;

c) efectuarea oricăruia dintre actele prevăzute la art. 31 alin. (2) exclusiv în cadru privat și în scop necomercial; producerea sau, după caz, folosirea invenției exclusiv în cadru privat și în scop necomercial;

d) comercializarea sau oferirea spre vânzare pe teritoriul Uniunii Europene a acelor exemplare de produs, obiect al invenției, care au fost vândute anterior de titularul de brevet ori cu acordul său expres;

e) folosirea în scopuri experimentale, exclusiv cu caracter necomercial, a obiectului invenției brevetate;

f) folosirea cu bună-credință sau luarea măsurilor efective și serioase de folosire a invenției de către terți în intervalul de timp dintre decăderea din drepturi a titularului de brevet și revalidarea brevetului. În acest caz, invenția poate fi folosită în continuare de acea persoană în volumul existent la data publicării mențiunii revalidării și dreptul la folosire nu poate fi transmis decât cu patrimoniul persoanei care utilizează invenția ori cu o fracțiune din patrimoniul care este afectat exploatarei invenției;

g) exploatarea de către terți a invenției sau a unei părți a acesteia la a cărei protecție s-a renunțat.

(2) Orice persoană care, cu bună-credință, folosește invenția sau a făcut pregătiri efective și serioase de folosire a invenției, fără ca această folosire să constituie o încălcare a cererii de brevet sau a brevetului european în traducerea inițială, poate, după ce traducerea corectată are efect, să continue folosirea invenției în întreprinderea sa ori pentru necesitățile acesteia, fără plată și fără să depășească volumul existent la data la care traducerea inițială a avut efect.

Art. 40

(1) Procedurile efectuate de OSIM privind cererile de brevet de invenție și brevetele de invenție prevăzute de prezenta lege și de regulamentul de aplicare a acesteia sunt supuse taxelor, în cuantumul și la termenele stabilite de lege.

(2) Pe întreaga durată de valabilitate a brevetului de invenție, titularul datorează anual taxe de menținere în vigoare a brevetului.

(3) Neplata acestor taxe atrage decăderea titularului din drepturile decurgând din brevet. Decăderea titularului din drepturi se înregistrează în Registrul național al brevetelor de invenție și se publică în Buletinul Oficial de Proprietate Industrială. Taxele de menținere în vigoare pot fi plătite și anticipat, în condițiile prevăzute de regulamentul de aplicare a prezentei legi, pentru o perioadă care nu poate depăși 4 ani.

(4) Taxele datorate de persoane fizice sau juridice străine se plătesc în valută, în contul OSIM.