

ROMÂNIA



OSIM



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENTII ȘI MĂRCI

# Brevet de invenție

## Nr.135090

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 - DEZVOALTARE PENTRU FIZICĂ ȘI INGINERIE NUCLEARĂ "HORIA HULUBEI"(IFIN-HH), MĂGURELE, IF, RO

Titlul invenției: PROCEDEU DE OBTINERE A NANOIMUNOSORBENTULUI TIP ANTIGEN FLUORESCENT PE BAZĂ DE  $\text{SiO}_2$  UTILIZAT ÎN TEHNICA NANOELISA PENTRU DETECȚIA 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

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.

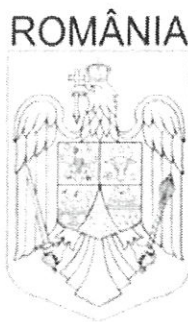
Confirm cele de mai sus prin  
semnarea și aplicarea sigiliului

**Director General**



București, Data eliberării 30/10/2025

(19) OFICIUL DE STAT  
PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI  
București



(11) RO 135090 B1

(51) Int.Cl.

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/02 (2006.01)

(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00881

(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)

(56) Documente din stadiul tehnicii:

RO 127570 B1  
RO 127441 B1  
US 4548908

(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]

(54)

PROCEDEU DE OBȚINERE A  
NANOIMUNOSORBENTULUI TIP ANTIGEN  
FLUORESCENT PE BAZĂ DE SiO<sub>2</sub> 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 135090 B1

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui nanoimunosorbent tip antigen fluorescent pe bază de  $\text{SiO}_2$  utilizat în tehnica nanoELISA pentru detecția pesticidului DICAMBA (acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic) din probe alimentare și de mediu.

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 immunosorbent (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 immunosorbenți 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. În general, anticorpii sunt legați de diferite tipuri de nanomateriale pe bază de Au, Fe,  $\text{SiO}_2$ , siliciu acoperit cu aur sau fluorescente. Prin utilizarea nanoparticulelor fluorescente se obține o sensibilitate mai bună față de metodele clasice care folosesc molecule fluorescente [1]. În tehnicile de analiză imunochimice se folosesc nanoparticule fluorescente cuplate cu anticorpi având ca nanomaterial: i) polistirenul funcționalizat cu albumină și anticorpi monoclonali dengue NS1 pentru detectarea bolii tropicale, febra Dengue [1], ii)  $\text{SiO}_2$  funcționalizat cu rodamina și combinat cu nanoparticule magnetice pe bază de oxid de fier funcționalizat cu polimetil metacrilat obținându-se nanocompozit magnetofluorescent funcționalizat cu anticorpi anti alfa-fetoproteina (anti-AFP) pentru detecția markerului tumoral AFP [2]. De asemenea nanoparticulele fluorescente pe bază de  $\text{SiO}_2$  pot fi funcționalizate și cu enzima cum ar peroxidaza conjugată cu tionina utilizată în tehnica imuno-electrochimică pe bază de nanoparticule pentru detecția markerului tumoral antigen carbohidrat 125 (CA125) [3]. Moleculele fluorescente se utilizează în tehnicile imunochimice fluorescente ca și marker fluorescent: i) cuplat cu anticorpul, izotiocianat de fluoresceina (FITC)-cuplat cu anticorpul anti-dimetil ftalat (anti-DMP) pentru detecția dimetil ftalatului, component al plastifiantilor, în probe apa [4]; ii) pe bază de nanoparticule de  $\text{SiO}_2$  funcționalizate cu chitosan și lucigenina utilizate în tehnica imunochimică bazată pe aptamer pentru determinarea trombinei din serul uman [5].

Problema pe care o rezolvă invenția constă în prezentarea unui procedeu de obținere a nanoimunosorbentului tip antigen fluorescent pe bază de  $\text{SiO}_2$  care poate fi utilizat în tehnica nanoELISA de detecție a pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic (dicamba) din probe alimentare și de mediu. Fluorescența nanoimunosorbentului tip antigen rezolvă problema identificării spectrale a speciilor reactive (complexul dintre nanoimunosorbentul tip antigen fluorescent și anticorpul antipesticid) din sistemul nanoELISA în procesul de analiză a pesticidului.

Nanoimunosorbenții prezintă următoarele avantaje: zona specifică a nanoimunosorbentului este de 100-200 m<sup>2</sup>/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 anticorpul este cuplat prin adsorbție pe suprafața godeurilor plăcii ELISA; legarea covalentă chimică elimină desorbția anticorpului de la suprafața 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 necesar 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 (faza 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.

Procedeu conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus (timp de analiză, echipament costisitor, separarea complexului imun) prin aceea că 100 mg de nanoparticule de SiO<sub>2</sub> de mărime  $\Phi = 15$  nm sunt tratate cu 20 ml soluție de HNO<sub>3</sub> 10% la temperatura de 80°C, timp de 1 h și nanoparticulele se separă prin centrifugare la 1500 x g timp de 15 min, se spală cu apă deionizată 30 ml și apoi se tratează cu 5 ml soluție de 3-aminopropiltriethoxisilan 10% în apă deionizată sub continuă agitare la 50°C timp de 3 h, după care nanoparticulele sunt centrifugate la 1500 x g timp de 15 min, apoi spălate cu 25 ml apă deionizată, din nou centrifugate la 1500 x g timp de 15 min iar complexul obținut nanoparticulă SiO<sub>2</sub>-3-aminopropiltriethoxisilan este resuspendat în 4 ml tampon carbonat 50 mM pH 9,6 și tratat cu 2 mg pesticid acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic activ, pesticid activat obținut prin reacția pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic cu 10 mg 1-etil-3(3'-diaminopropil)carbodiimidă și 2 mg N-hidroxisuccinimidă în mediu de 1 ml dimetilformamidă timp de 3 h la temperatura camerei, nanoimunosorbentul tip antigen obținut (complex nanoparticule de SiO<sub>2</sub>-dicamba) prin centrifugare la 1500 x g timp de 15 min este spălat cu apă deionizată 20 ml apoi centrifugat la 1500 x g timp de 15 min și 50 mg din nanoimunosorbentul tip antigen obținut este resuspendat în 2 ml de tampon carbonat 50 mM pH 9,6 și tratat cu o soluție de 5 mg izotiocianat de fluoresceină în 400  $\mu$ l dimetilsulfoxid sub continuă agitare pentru 6 h iar nanoimunosorbentul fluorescent tip antigen este separat prin centrifugare spălat cu 5 ml alcool etilic absolut și resuspendat în 10 ml tampon fosfat 10 mM pH 7,2 depozitat la 4°C în vederea utilizării în tehnica nanoELISA de detecție a pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic din probe alimentare și de mediu.

Nanoimunosorbentul tip antigen fluorescent pe bază de SiO<sub>2</sub> la a cărui suprafață este cuplat covalent pesticidul acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic și izotiocianatul de fluoresceină se obține în cinci etape principale: Etapa I, Etapa a II-a, Etapa a III-a, Etapa a IV-a și Etapa a V-a și sunt redate schematic după descrierea acestora.

Etapa I: Activarea nanoparticulei de SiO<sub>2</sub> 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 SiO<sub>2</sub>-APTES.

Etapa a IV-a: Cuplarea izotiocianatului de fluoresceină (FITC) la complexul nanoparticulă de SiO<sub>2</sub>-APTES.

Etapa a V-a: Obținerea nanoimunosorbentului tip antigen fluorescent.

*Descrierea etapelor procedurii de obținere a nanoimunosorbentului tip antigen fluorescent*

Etapa I: Activarea nanoparticulei de  $\text{SiO}_2$  cu 3-aminopropil trietoxisilan (APTES). Această etapă conține două reacții: Reacția 1-tratamentul nanoparticulelor de  $\text{SiO}_2$  cu  $\text{HNO}_3$  și reacția 2: Activarea nanoparticulelor de  $\text{SiO}_2$  cu 3-aminopropil trietoxisilan și formarea complexului nanoparticule  $\text{SiO}_2$ -APTES.

Reacția 1: Tratamentul nanoparticulelor de  $\text{SiO}_2$  cu  $\text{HNO}_3$

100 mg de nanoparticule de  $\text{SiO}_2$  mărime  $\Phi = 15$  nm sunt tratate cu 20 ml soluție de  $\text{HNO}_3$  10% la temperatura de  $80^\circ\text{C}$  timp de 1 h apoi sunt centrifugate la,  $1500 \times g$  timp de 15 min, spălate cu 30 ml apă deionizată.

Reacția 2: Activarea nanoparticulelor de  $\text{SiO}_2$  cu 3-aminopropil trietoxisilan Nanoparticulele în cadrul Etapei I, Reacția 1 sunt tratate cu 5 ml soluție de 3-aminopropil trietoxisilan (APTES) 10% în apă deionizată sub continua agitare la  $50^\circ\text{C}$  timp de 3 h după care sunt colectate prin centrifugare la  $1500 \times g$  timp de 15 min, spălate cu 25 ml apă deionizată, din nou centrifugate la  $1500 \times g$  timp de 15 min, iar complexul obținut nanoparticulă  $\text{SiO}_2$ -APTES este resuspendat în 4 ml tampon carbonat 50 mM pH 9,6.

Etapa a II-a: Activarea pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic (dicamba). Această etapă cuprinde două reacții: Reacția 1 - Activarea pesticidului cu 1-etil-3(3'-diaminopropil)carbodiimidă (CDI) și Reacția 2 - Activarea complexului pesticid-CDI cu N-hidroxisuccinimidă.

Reacția 1 - Activarea pesticidului cu 1-etil-3(3'-diaminopropil)carbodiimidă (CDI)

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

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

Complexul pesticid-CDI rezultat în cadrul Etapei a II-a, Reacția. 1 este adăugat la 2 mg de N-hidroxisuccinimida în 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  $\text{SiO}_2$ -APTES

Amestecul de pesticid activat obținut în cadrul Etapei a II-a, Reacția 2 este adăugat la 50 mg suspensie de complex nanoparticulă  $\text{SiO}_2$ -APTES în 4 ml tampon carbonat 50 mM pH 9,6 sub continuă agitare timp de 3 h la temperatura camerei. Complexul nanoparticulă  $\text{SiO}_2$ -dicamba obținut este centrifugat la  $1500 \times g$  timp de 15 min, spălat cu 20 ml apă deionizată, centrifugat din nou la  $1500 \times g$  și resuspendat în 2 ml tampon carbonat 50 mM pH 9,6.

Etapa a IV-a: Cuplarea izotiocianatului de fluoresceină (FITC) la complexul nanoparticulă de  $\text{SiO}_2$ -APTES.

50 mg de complex nanoparticule  $\text{SiO}_2$ -APTES în 2 ml tampon carbonat 50 mM pH 9,6 sunt tratate cu o soluție de 5 mg izotiocianat de fluoresceină în 400  $\mu\text{l}$  dimetilsulfoxid (DMSO) sub continuă agitare, apoi nanoparticulele de  $\text{SiO}_2$  fluorescente obținute sunt separate prin centrifugare la  $1500 \times g$  și spălate cu 5 ml alcool etilic absolut și resuspendate în 10 ml tampon fosfat 10 mM pH 7,2. Acest complex nanoparticule  $\text{SiO}_2$ -FITC este un produs intermediar de sinteza fluorescentă și este utilizat ca și control spectral al produsului final, nanoimunosorbentul tip antigen fluorescent.

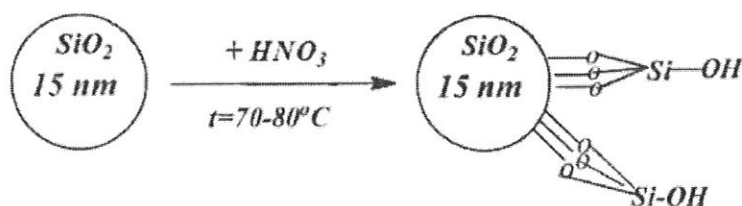
Etapa a V-a: Obținerea nanoimunosorbentului tip antigen fluorescent

50 mg complex nanoparticule de  $\text{SiO}_2$ -dicamba obținut în cadrul etapei a III-a resuspendat în 2 ml tampon carbonat 50 mM pH 9,6 este tratat cu o soluție de 5 mg izotiocianat de fluoresceină în 400  $\mu\text{l}$  de dimetilsulfoxid sub continuă agitare pentru 6 h iar nanoimunosorbentul tip antigen fluorescent obținut este separat prin centrifugare spălat cu 5 ml de alcool etilic absolut și resuspendat în 10 ml tampon fosfat 10 mM pH 7,2 în vederea utilizării în tehnica nanoELISA de detecție a pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic din probe alimentare și de mediu.

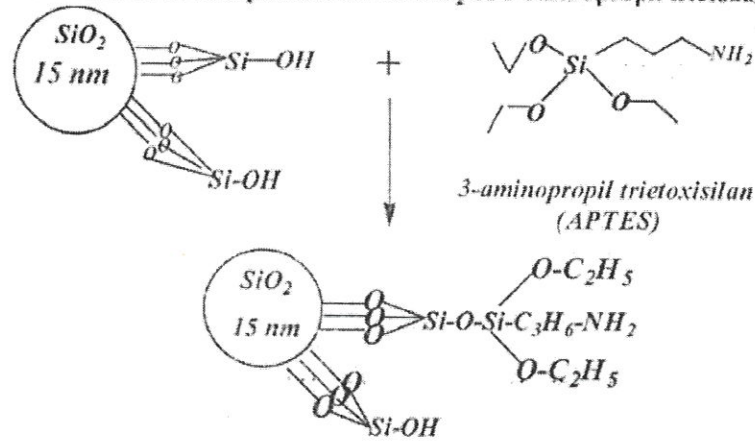
Reacțiile chimice de obținere a nanoimunosorbentului tip antigen fluorescent:

**Etapa I: Activarea nanoparticulelor de  $\text{SiO}_2$  cu 3-aminopropil trietoxisilan (APTES)**

**Reacția 1: Tratatamentul nanoparticulelor de  $\text{SiO}_2$  cu  $\text{HNO}_3$**



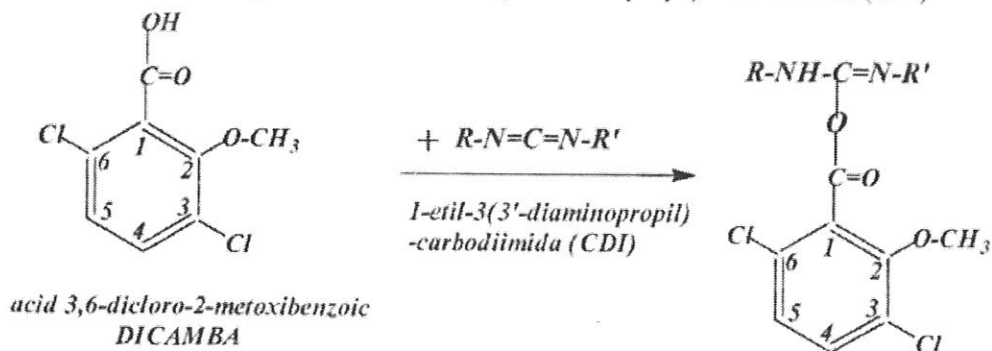
Reactia 2: Activarea nanoparticulelor de  $\text{SiO}_2$  cu 3-aminopropil trietoxisilan



complex nanoparticule  $\text{SiO}_2$ -APTES

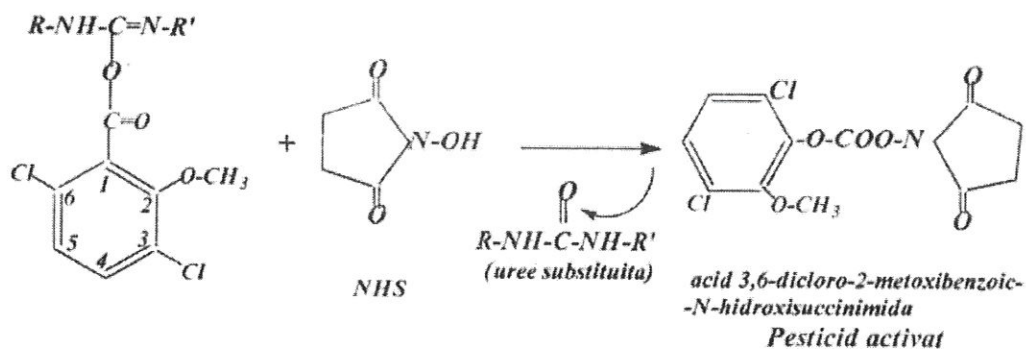
Etapa a II-a: Activarea pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic (dicamba)

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

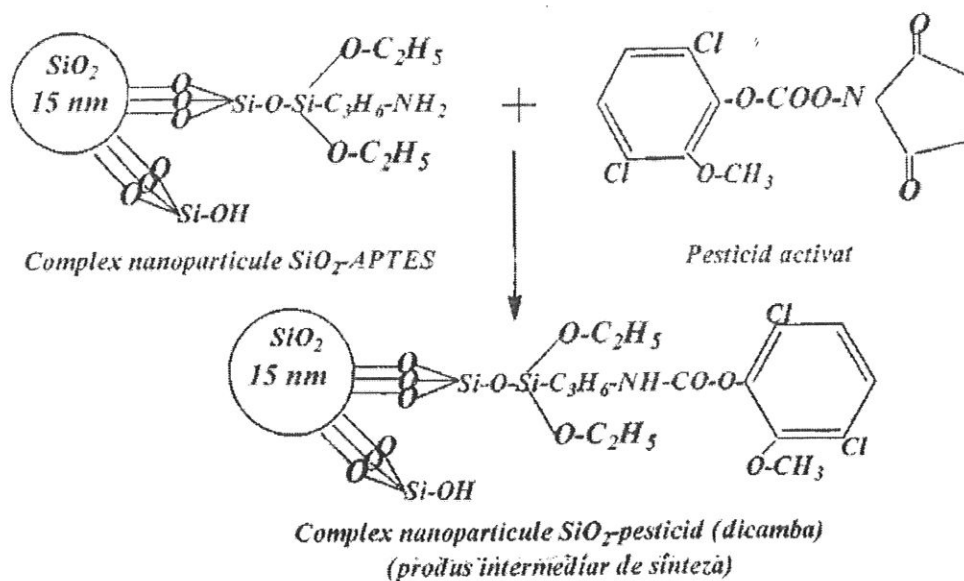
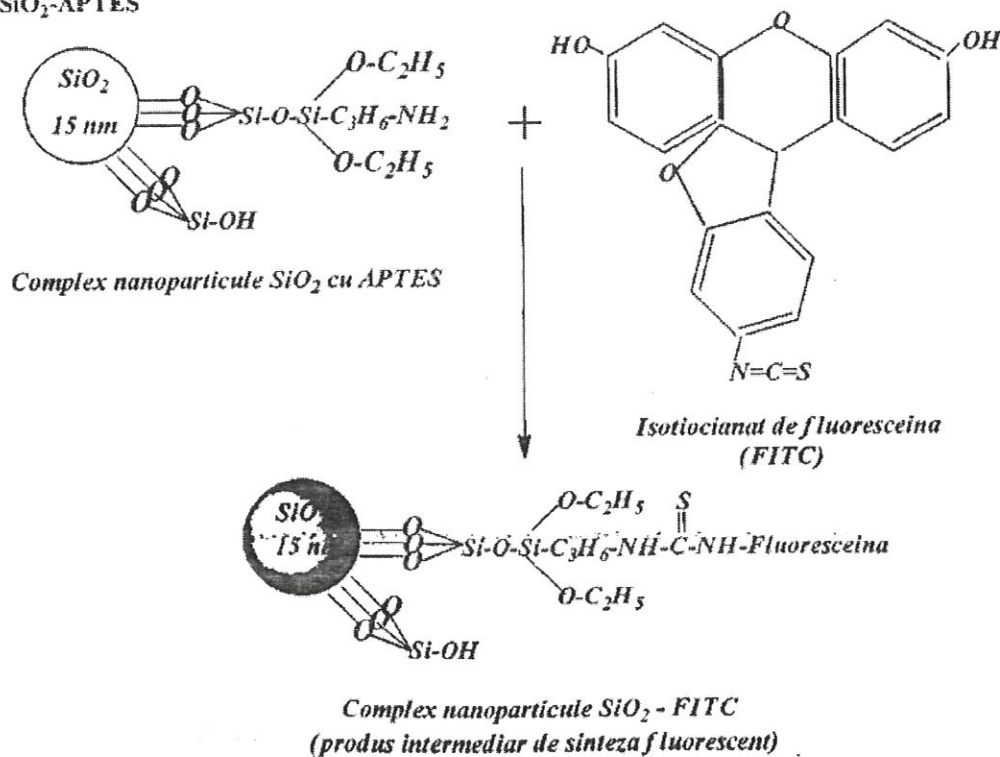


acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic  
DICAMBA

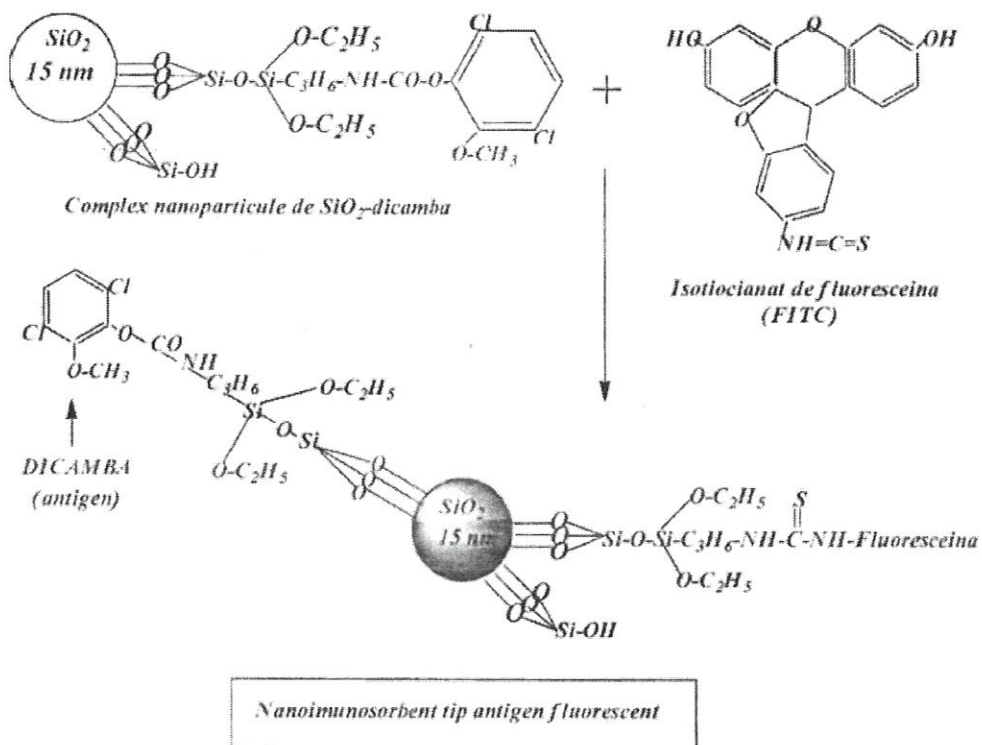
Reactia 2: Activarea complexului pesticid-CDI cu N-hidroxisuccinimida (NHS)



acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-  
N-hidroxisuccinimida  
Pesticid activat

Etapa a III-a: Cuplarea pesticidului activat la complexul nanoparticule  $\text{SiO}_2$ -APTESEtapa a IV-a: Cuplarea isotiocianatului de fluoresceina (FITC) la complexul nanoparticula de  $\text{SiO}_2$ -APTES

Etapa a V-a: Obținerea nanoimunosorbentului 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.

## Revendicare

Procedeu de obținere a unui nanoimunosorbent tip antigen fluorescent pe bază de  $\text{SiO}_2$  utilizat în tehnica nanoELISA pentru detecția pesticidului DICAMBA (acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic), **caracterizat prin aceea că**, se tratează 100 mg de nanoparticule de  $\text{SiO}_2$  de mărime  $\varphi = 15 \text{ nm}$  cu 20 ml soluție  $\text{HNO}_3$  10% la temperatura de  $80^\circ\text{C}$ , timp de 1 h, se separă nanoparticulele prin centrifugare la  $1500 \times g$  timp de 15 min, se spală cu 30 ml apă deionizată, se tratează cu 5ml soluție de 3-aminopropiltrietoxisilan 10% în apă deionizată sub continuă agitare la  $50^\circ\text{C}$  timp de 3 ore, se centrifughează nanoparticulele la  $1500 \times g$ , 15 min, se spală cu 25 ml apă deionizată, se centrifughează la  $1500 \times g$ , 15 min, rezultând un complex nanoparticulă  $\text{SiO}_2$ -3-aminopropiltrietoxisilan (APTES) care este resuspendat în 4 ml tampon carbonat 50 mM pH 9,6, iar apoi tratat cu 2 mg pesticid acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic activ, pesticid activat obținut prin reacția a 2 mg pesticid acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic cu 10 mg 1-etil-3(3'-diaminopropil)carbodiimidă și 2 mg N-hidroxisuccinimidă în mediu de 1 ml dimetilformamidă timp de 3 h la temperatura camerei, rezultând astfel un complex nanoparticulă  $\text{SiO}_2$  - dicamba care este centrifugat la  $1500 \times g$  timp de 15 min, resuspendat în 2 ml tampon carbonat 50 mM pH 9,6, iar 50 mg din acest complex este tratat cu 5 mg izotiocianat de fluoresceină în 400  $\mu\text{l}$  DMSO sub continuă agitare pentru 6 h, obținându-se nanoimunosorbentul tip antigen fluorescent care este separat prin centrifugare, spălat cu 5 ml alcool etilic și resuspendat în 10 ml tampon fosfat 10 mM pH 7,2 și depozitat la  $4^\circ\text{C}$  în vederea utilizării în tehnica nanoELISA de detecție a pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic din probe alimentare și de mediu.



**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 Industrial.

(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 procedeu 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 cuantumurile 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.