



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 01255**

(22) Data de depozit: **28.11.2011**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29.08.2014** BOPI nr. **8/2014**

(41) Data publicării cererii:  
**28.06.2013** BOPI nr. **6/2013**

(73) Titular:  
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
MICROTEHNOLOGIE,  
STR.EROU IANCU NICOLAE NR.126 A,  
BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:  
• **AVRAM MARIOARA, STR.FELEACU  
NR.19, BL.12 C, SC.3, AP.31, SECTOR 1,  
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **PETRESCU INA RUXANDRA,  
STR.SABINELOR NR.98, AP.3, SECTOR 5,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **AVRAM MARIUS ANDREI,  
STR. FELEACU NR.19, BL.12 C, SC.3,  
AP.31, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **RĂDOI ANTONIO MARIAN, ALEEA ISTRU  
NR.7, BL.A 3, SC.E, ET.4, AP.75,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**RO/EP 1585770 T2; RO/EP 1572747 T2;  
RO 85716**

(54) **REACTIV PE BAZĂ DE NANOPARTICULE DE AUR,  
PROCEDU DE PREPARARE A ACESTUIA ȘI UTILIZAREA  
SA PENTRU CARTOGRAFIEREA ARHITECTURII  
ȚESUTURILOR TUMORALE**



# RO 128557 B1

1           Invenția se referă la un reactiv pe bază de nanoparticule de aur, la un procedeu de  
preparare a acestuia și la utilizarea sa pentru cartografierea tisulară, în scopul determinării  
3           limitelor tumorale, pe suprafață și în profunzime, inclusiv de evidențiere a cuiburilor de celule  
tumorale, aflate în vecinătatea tumorii.

5           Utilizarea nanoparticulelor de aur (AuNPs) în scop de diagnostic a început să fie  
studiată recent, datorită proprietăților optice, specifice, diverse.

7           Nanosferele de aur, cu dimensiuni cuprinse între 2 și 100 nm, se obțin prin reacția  
de reducere a soluției de tetrahidroaurat (HAuCl<sub>4</sub>), utilizând citratul, iar dimensiunea acestora  
9           este invers proporțională cu cantitatea de citrat. Menținerea în dispersie a nanoparticulelor  
de aur se realizează cu ajutorul soluției de citrat, iar apa nu poate fi utilizată ca solvent.

11          În spectrul vizibil, nanosferele de aur prezintă un singur maxim local, cuprins în  
intervalul 510...550 nm, iar creșterea dimensiunilor nanoparticulelor generează un nou  
13          maxim local de absorbție, la o lungime de undă superioară.

Principalele aplicații ale AuNPs sunt:

15          - în analize imunologice, Hirsch, L. R., Jackson, J. B., Lee, A., Halas, N. J., West, J.  
L., „A whole blood immunoassay using gold nanoshells”, *Analytical Chemistry* 75, 10 (2003)  
17          p. 2377-81);

19          - electroforeza capilară, W. L. Tseng, M. F. Huang, Y. F. Huang, H. T. Chang,  
„Nanoparticle-filled capillary electrophoresis for the separation of long DNA molecules in the  
21          presence of hydrodynamic and electrokinetic forces”, *Electrophoresis* 26, 16 (2005) p. 3069-  
75;

23          - detecția celulelor tumorale, J. C. Y. Kah, K. W. Kho, C. G. L. Lee, C. J. Richard,  
Sheppard, Z. X. Shen, K. C. Soo, and M. C. Olivo, „Early diagnosis of oral cancer based on  
25          the surface plasmon resonance of gold nanoparticles”, *Int. J. Nanomedicine* 2, 4 (2007)  
p.785-98;

27          - analiza culturilor de celule utilizând o substanță fluorescentă conjugată cu AuNPs,  
J. Aaron, N. Nitin, K. Travis, S. Kumar, M. Jose-Yacamán, L. Coghlan, M. Follen, R.  
Richards-Kortum, K. Sokolov, T. Collier, S.Y. Park, „Plasmon resonance coupling of metal  
29          nanoparticles for molecular imaging of carcinogenesis in vivo”, *J. Biomed. Opt.* 12, 3 (2007)  
034007;

31          - agent fotoluminiscent datorită luminiscenței crescute, H. Wang, T. B. Huff, D. A.  
Zweifel, W. He, P. S. Low, A. Wei, and J. X. Cheng, „In vitro and in vivo two-photon  
33          luminescence imaging of single gold nanorods”, *Proceedings of the National Academy of  
Sciences of the United States of America* 102, 44 (2005) 15752-6;

35          - agent de contrast pentru diagnosticul imagistic al tumorilor profunde (N. J. Durr, T.  
Larson, D. K. Smith, B. A. Korgel, K. Sokolov, and A. Ben-Yakar, „Two-Photon  
37          Luminescence Imaging of Cancer Cells Using Molecularly Targeted Gold Nanorods”, *Nano  
Letters* 7,4 (2007) 941-5;

39          - spectroscopia Raman: imaginile obținute prin absorbția albastrului de metilen pe un  
singur strat de AuNPs sunt utile în studierea proprietăților plasmonilor (G. Laurent, N. Féridj,  
41          J. Aubard, G. Lévi, J. R. Krenn, A. Hohenau, G. Schider, A. Leitner, and F. R. Aussenegg,  
„Evidence of multipolar excitations in surface enhanced Raman scattering”, *Physical Review  
43          B* 71, 4 (2005) 045430-6;

45          - terapia neoplaziilor bazată pe proprietatea fototermală de distrugere a celulelor  
tumorale (C. Loo, A. Lowery, N. Halas, J. West, and R. Drezek, „Immunotargeted Nanoshells  
for Integrated Cancer Imaging and Therapy”, *Nano Letters* 5, 4 (2005) 709-11; X. Huang, I.  
47          H. El-Sayed, W. Qian, and M. A. El-Sayed, „Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy  
*Society* 128, 6 (2006) 2115-20; J. Chen, D. Wang, J. Xi, L. Au, A. Siekkinen, A. Warsen, Z.

<p>in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods", <i>Journal of the American Chemical Y.</i></p> <p>Li, H. Zhang, Y. Xia, and X. Li, „Immuno Gold Nanocages with Tailored Optical Properties for Targeted Photothermal Destruction of Cancer Cells", <i>Nano Letters</i> 7, 5 (2007) 1318-22;</p> <p style="padding-left: 2em;">- nanotransportori pentru diferite medicamente.</p> <p>Nanoparticulele de aur sunt biocompatibile cu organismul uman, fără să prezinte efecte citotoxice, A. M. Alkilany, P. K. Nagaria, C. R. Hexel, T. J. Shaw, C. J. Murphy, M. D. Wyatt, „Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: Molecular origin of cytotoxicity and surface effects", <i>Small</i> 5, 6 (2009) 701-8. Studiile privind biocompatibilitatea AuNPs au arătat absența efectului citotoxic asupra macrofagelor, la o concentrație de 100 <math>\mu</math>M, timp de 72 h (R. Shukla, V. Bansal, M. Chaudhary, A. Basu, R. R. Bhonde, and M. Sastry, „Biocompatibility of Gold Nanoparticles and Their Endocytotic Fate Inside the Cellular Compartment: A Microscopic Overview", <i>Langmuir</i> 21, 23 (2005) 10644-54.</p> <p>AuNPs mai mici de 20 nm trec în celulă prin endocitoză, însă nu pătrund în nucleu. Chithrani et al., B. D. Chithrani, A. A. Ghazani, and W. C. W. Chan, în „Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells", <i>Nano Letters</i> 6, 4 (2006) 662-8, au studiat relația între caracteristicile AuNPs (dimensiuni, formă, concentrație) și nivelul de absorbție celulară, constatând că cel mai rapid proces a avut loc în cazul AuNPs cu dimensiuni de 20 nm, iar trecerea intracelulară a AuNPs a fost confirmată la TEM (NA intracelular, în vezicule localizate în citoplasmă, dar în afara nucleului). În momentul actual, există un interes crescut privitor la proprietățile optice ale AuNPs, datorat potențialului imens de aplicații în domeniul imagistic.</p> <p>Emisia în spectrul fluorescent a AuNPs a fost recent studiată, J. Zhang, L. Wang, H. Zhang, F. Boey, S. Song, C. Fan, „Aptamer-Based Multicolor Fluorescent Gold Nanoprobes for Multiplex Detection in Homogeneous Solution", <i>Small</i> 6, 2 (2009) 201-4; C. C. Huang, Z. Yang, K. H. Lee, H. T. Chang, „Synthesis of Highly Fluorescent Gold Nanoparticles for Sensing Mercury(II)", <i>Angewandte Chemie</i> 119, 36 (2007) 6948-52, care au sintetizat AuNPs fluorescente și au constatat emisia sub forma unor spoturi luminoase de culoare albastru-deschis sub excitația UV la lungimea de undă de 365 nm.</p> <p>Acest efect imagistic se explică teoretic prin rezonanța plasmonică, localizată, de suprafață, care apare la interfața dintre AuNPs și un mediu dielectric în care sunt imersate, intensitatea luminoasă a plasmonilor fiind cu atât mai intensă, cu cât indicele de refracție al mediului în care se află AuNPs este mai mare, și implicit permitivitatea electrică a mediului este mai mare, conform teoriei lui Gustav Mie. La interfață, fotonii pot fi împrăștiați sau absorbiți. Fotonii absorbiți pot crea excitații electronice interne în nanoparticule sau, în cazul în care au suficientă energie (e.g. excitația UV), pot scoate electroni din nanoparticule. AuNPs sunt cunoscute pentru puternica absorbție optică și împrăștiere a luminii în UV și vizibil, datorită excitației rezonante, localizată, a plasmonilor la suprafața nanoparticulelor. Factorul determinant al caracteristicilor optice de absorbție este rezonanța plasmonică de suprafață, care poate apărea în particule cu diametru mai mic decât lungimea de undă a luminii de excitație. Teoria care explică acest comportament a fost dezvoltată pentru prima oară de Gustav Mie (1908). Numeroasele raportări recente corelează comportamentul spectroscopic al AuNPs cu teoria Mie. Studiul rezonanței plasmonice de suprafață a rămas un domeniu de cercetare foarte activ atât științific, cât și tehnologic, în special, atunci când particulele sunt înglobate în matrice ionice (E. Boisselier, D. Astruc, „Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity", <i>Chemical Society Reviews</i> 38, 6 (2009) 1759-82).</p>	<p>1</p> <p>3</p> <p>5</p> <p>7</p> <p>9</p> <p>11</p> <p>13</p> <p>15</p> <p>17</p> <p>19</p> <p>21</p> <p>23</p> <p>25</p> <p>27</p> <p>29</p> <p>31</p> <p>33</p> <p>35</p> <p>37</p> <p>39</p> <p>41</p> <p>43</p> <p>45</p>
---	--

# RO 128557 B1

1 Conform teoriei Mie, secțiunea transversală, totală, compusă din suprafața plasmone-  
nilor absorbiți și împrăștiați, este dată ca o însumare peste toate oscilațiile electrice și  
3 magnetice (S. Buchanan, E. C. Le Ru, P. G. Etchegoin, „Plasmon-dispersion corrections and  
constraints for surface selection rules of single molecule SERS spectra”, *Physical Chemistry  
5 Chemical Physics* 11, 34 (2009) 7406-11. Rezonanța  
plasmonică de suprafață a fost descrisă cantitativ prin rezolvarea ecuațiilor lui Maxwell  
7 pentru particule sferice cu condițiile la limita corespunzătoare. Teoria Mie atribuie apariția  
plasmonilor la suprafața AuNPs oscilației dipolilor corespunzători electronilor liberi din banda  
9 de conducție care ocupă stări energetice imediat deasupra nivelului de energie Fermi, M. M.  
Alvarez, J. T. Khoury, T. G. Schaaff, M. N. Shafiqullin, I. Vezmar, and R.L. Whetten, „Optical  
11 Absorption Spectra of Nanocrystal Gold Molecules”, *Journal of Physical Chemistry B* 101,  
19 (1997) 3706-12.

13 Problema tehnică, pe care își propune să o rezolve prezenta invenție, constă în  
cartografierea arhitecturii țesuturilor tumorale, pentru determinarea limitelor tumorale, pe  
15 suprafață și în profunzime. Pentru soluționarea acestei probleme, pornind de la conceptul  
teoretic al rezonanței plasmonice de suprafață al nanoparticulelor de aur în spectru UV,  
17 prezenței inventatorilor au studiat rezonanța plasmonică de suprafață a nanoparticulelor de aur  
cu diametrul de 5,6 nm în țesutul tumoral, melanomul B16 la șoareci, formă de melanom  
19 asemănătoare cu melanomul uman cutanat. Scopul experimentului a fost de investigare  
histopatologică a țesutului tumoral în lumină UV cu lungimea de undă de excitație de  
21 450 nm, după administrare de nanoparticule de aur. Ca urmare, soluția propusă de prezenta  
invenție constă, într-un prim aspect, dintr-un reactiv pe bază de nanoparticule de aur, pentru  
23 cartografierea tisulară, constituit din nanoparticule de aur cu diametrul de 5...7 nm, sub formă  
de suspensie în soluție de citrat de sodiu.

25 Într-un alt aspect, invenția se referă la un procedeu de preparare a reactivului definit  
mai sus, în care se aduc în reacție, într-un recipient închis, un amestec format din soluție  
27 apoasă de acid tetracloroacuric 4% : etanol : acid linoleic, la un raport de 5 : 4 : 1 v/v și  
linoleat de aur la un raport de 6% gr/v, care se agită timp de 1,5...2,5 h, timp în care  
29 temperatura este crescută de la 30 la 60°C, după care particulele de aur se suspendă sub  
agitare în soluție de citrat de sodiu.

31 Într-un alt aspect, invenția se referă la un reactiv pe bază de nanoparticule de aur,  
pentru cartografierea tisulară, pentru utilizarea la determinarea limitelor tumorale pe  
33 suprafață și în profunzime, prin rezonanța plasmonică, de suprafață, a nanoparticulelor de  
aur cu diametrul de 5...7 nm.

35 Într-un alt aspect specific, tumoarea este melanomul cutanat.

Invenția prezintă avantajul că propune un reactiv netoxic și ușor de obținut, eficient  
37 pentru utilizarea într-o metodă de analiză sigură atât a tumorii, cât și a vecinătăților acesteia,  
inclusiv vecinătăților acesteia.

39 AuNPs au o constantă dielectrică negativă. Într-un mediu dielectric melanom  
( $n=1.997$ ) și într-un mediu de țesut normal ( $n = 1.202$ ), lungimea de undă care determină  
41 intensitatea maximă a luminii este de aproximativ 490 nm.

43 Partea reală a constantei dielectrice este negativă ( $\epsilon_r(\lambda) = -6.14$ ), iar partea  
imaginară a constantei dielectrice este pozitivă ( $\epsilon_i(\lambda) = 1.77$ ).

45 Banda de absorbție a plasmonilor de suprafață apare atunci când  $\epsilon_r(\lambda) = -2n^2$ , unde  
 $n$  este indicele de refracție al mediului.

47 Conform teoriei Mie, eficiența împrăștierii este proporțională cu  $\lambda^4$ , ceea ce indică  
faptul că o lungime de undă a luminii incidente mai scurtă determină o împrăștiere mult mai  
mare a luminii, în acord cu rezonanța plasmonică la suprafața AuNPs, a teoriei Mie și a  
49 măsurărilor realizate în cadrul acestei invenții, am determinat că secțiunea eficace de  
împrăștiere a luminii este de 16 ori mai mare în melanom decât în țesutul sănătos.

# RO 128557 B1

În figurile anexate, care fac parte din prezenta invenție, sunt redată următoarele:	1
- fig. 1 ilustrează aspectul nanoparticulelor de aur la microscopul cu baleiaj de electroni (SEM), aspectul macroscopic al nanoparticulelor de aur în suspensie în soluția de citrat;	3
- fig. 2 ilustrează aspectul la microscopul optic 20x al melanomului B16 (tumoarea mator) la șoareci, în secțiunea proaspătă, necolorată;	5
- fig. 3 ilustrează aspectul la microscopul optic în lumină UV al tumorii mator, unde nu s-au administrat nanoparticule de aur;	7
- fig. 4 ilustrează aspectul fluorescent al melanomului B16 la microscopul optic 20x în spectru UV, în cazul inoculării tumorii șoarecilor cu nanoparticule de aur, se observă limita tumorii;	9
- fig. 5 ilustrează aspectul fluorescent al melanomului B16 la microscopul optic 20x în spectru UV, în cazul inoculării tumorii șoarecilor cu nanoparticule de aur, se observă, în dreapta, două structuri vasculare prin care au fost injectate nanoparticulele de aur în tumoare;	11
- fig. 6 ilustrează aspectul fluorescent al rădăcinilor tumorale, la microscopul optic 20x, în spectru UV.	13
În continuare, este redat un mod de realizare a invenției, cu scop exemplificativ și nelimitativ.	15
<b>Exemplul 1. Sintetizarea nanoparticulelor de aur</b>	17
Obținerea nanoparticulelor de aur uniforme se face prin reacția de reducere a ionilor de tetracloroaurat cu etanol, la temperaturi cuprinse între 30 și 60°C, la presiune atmosferică.	19
Substanțele utilizate au fost:	21
- 25 ml soluție apoasă de acid tetracloroauric (1 g HAuCl <sub>4</sub> );	23
- 3 g linoleat de AuNPs (C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> ONa);	25
- 20 mL etanol (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH);	27
- 5 mL acid linoleic (C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> ).	29
Compușii chimici enumerați sunt introduși într-un recipient închis și se agită, după care se mențin timp de 2 h, la temperatură, pornind de la 30 până la 60°C. Apoi, nanoparticulele de aur se resuspendă în soluție de citrat, pentru menținerea lor în dispersie.	31
Nanoparticulele de aur coloidal au fost obținute (Grabar, K. C., Freeman, R. G., Hommer, M. B., Natan, M. J., 1995, „Preparation and characterization of Au colloid monolayers”, <i>Anal. Chem.</i> 67, 735), plecând de la o soluție apoasă de acid tetracloroauric (0,01% v/v), preparată în apă distilată. Astfel, într-un pahar Erlenmayer, prevăzut cu o sticlă de ceas, drept capac, a fost introdus un volum de 250 mL (0,01% v/v soluție apoasă de HAuCl <sub>4</sub> ) și adus la fierbere, sub agitare mecanică continuă (300 rpm). Acestei soluții îi sunt adăugați 4 mL de citrat de sodiu (1%, m/v, soluție apoasă), în 2 tranșe a câte 2 mL, la interval de 2 min. Amestecul de reacție este lăsat să fiarbă în continuare timp de 10 min și apoi este răcit lent, la 4°C, sub agitare. Se observă o variație a culorii soluției inițiale, din slab gălbui în roșu purpuriu transparent și apoi roșu intens, schimbare care indică formarea aurului coloidal.	33
Spectrofotometric, a fost identificat un maximum de absorbție la 522 nm, maximum de absorbție datorat rezonanței plasmonice de suprafață a nanoparticulelor coloidale de aur. Sinteza nanoparticulelor de aur s-a efectuat în cadrul Laboratorului de Nanotehnologii al IMT București (fig. 1).	35
Analiza nanoparticulelor de aur s-a făcut la microscopul cu baleiaj electronic (SEM), disponibil în IMT București, iar imaginea obținută este prezentată în fig. 1.	37
	39
	41
	43
	45
	47

# RO 128557 B1

1 În această soluție, au loc următoarele procese chimice: o fază solidă de linoleat de  
sodiu, o fază lichidă de etanol și acid linoleic și apă, ce conține ioni de tetracloroaurat.  
3 Etanolul în fază de soluție reduce ionii de tetracloroaurat în nanoparticule de aur. Se obține  
o soluție de culoare roz - roșu pal, datorată nanopartiulelor de aur (fig. 1).

## 5 **Exemplul 2. Testarea biologică a reactivului preparat în exemplul 1.**

### *Materiale și metode. Materiale necesare*

7 Principalele materiale utilizate au fost:

- 8 - nanoparticule de aur cu dimensiuni cuprinse între 5 și 7nm în soluție de citrat;
- 9 - lot de 4 șoareci cu melanom B16 indus dintre care 2 șoareci martor;
- 10 - nanoparticule de aur dispersate în citrat;
- 11 - seringi, mănuși, instrumentar de recoltare a tumorilor;
- 12 - soluție de formol 10%, parafină pentru includerea pieselor, microtom, lame, lamele;
- 13 - microscop optic 10-60X, cu lampa de mercur calibrată la spectrul UV, cu unitate  
optică de captare a imaginii, conectată la notebook.

### *Etapele experimentului*

15 În ziua a 5-a de la inocularea șoarecilor cu celule de melanom B16, când tumoarea  
17 avea diametrul de 5...6 mm, s-a efectuat injectarea subcutanată peritumorală a 0,2 ml soluție  
de nanoparticule de aur - citrat. După 2 h, s-au recoltat tumorile melanom B16 și s-au  
19 introdus în formol 10%, în recipiente separate, etichetate. Prelucrarea primară a tumorilor,  
cu includerea în parafină și efectuarea de secțiuni de 2 μm, fixate pe lamele și lame. Apoi,  
21 s-a analizat țesutul tumoral la microscopul optic 10-60x, cu lampa cu mercur, în UV cu  
lungimea de undă de 450 nm.

23 Am studiat mai întâi aspectul țesutului tumoral fără nanoparticule, pe secțiune  
proaspăt înghețată și au măsurat diametrele celulelor tumorale: 9,89...13,44 μm (fig. 2 și 3,  
25 în UV).

27 Proprietatea optică specială a nanoparticulelor de aur de a fi fluorescente în lumină  
UV a fost demonstrată prin injectarea peritumorală de soluție de nanoparticule de aur - citrat  
și examinarea secțiunilor necolorate de țesut tumoral de melanom la șoarecii B16 la  
29 microscopul optic cu lampa cu vapori de mercur, care generează radiații în spectrul UV,  
obținându-se o imagine fluorescentă în albastru-deschis a melanomului. Această  
31 luminozitate atât de puternică a AuNPs aflate în melanom față de AuNPs aflate în țesutul  
sănătos se explică teoretic pe baza rezonanței plasmonilor de suprafață și a teoriei Mie, așa  
33 cum a fost explicat mai sus.

35 Rezultatul imagistic obținut atestă aplicabilitatea nanoparticulelor de aur în studiul  
arhitecturii tisulare.

37 Imaginile fluorescente, obținute în spectru UV, al nanoparticulelor de aur ce au  
pătruns în țesutul tumoral, inclusiv în melanocitele tumorale, pot constitui un punct de  
plecare, pentru analiza histopatologică a țesuturilor.

39 Studierea limitelor tumorale, pentru îmbunătățirea marginilor de excizie tumorală,  
poate beneficia de aportul imagistic de informație, utilizând piesa operatorie în preparat  
41 proaspăt congelat din care se efectuează secțiuni similare examenului externporaneu  
intraoperator și se examinează la microscopul optic la care este atașată lampa ce generează  
43 spectrul UV.

45 Diagnosticul histopatologic, cert, al melanomului, în cazurile dificile, detecția corectă  
a primelor celule neoplazice din vecinătatea tumorii sunt aspecte care în momentul actual  
necesită optimizarea metodelor tehnice de analiză. De aceea, într-o etapă ulterioară, vom  
47 realiza funcționalizarea superioară a nanoparticulelor de aur cu molecule țintă pentru  
tumoare, pentru a crește specificitatea investigației.

# RO 128557 B1

## Revendicări

- |  |              |
|--|--------------|
|  | 1            |
| 1. Reactiv pe bază de nanoparticule de aur, pentru cartografierea tisulară, <b>caracterizat prin aceea că</b> este constituit din nanoparticule de aur cu diametrul de 5...7 nm, sub formă de suspensie în soluție de citrat de sodiu.   | 3<br>5       |
| 2. Procedeu de preparare a reactivului definit în revendicarea 1, <b>caracterizat prin aceea că</b> se aduc în reacție, într-un recipient închis, un amestec format din soluție apoasă de acid tetracloroauric 4% : etanol : acid linoleic la un raport 5 : 4 : 1 v/v și linoleat de aur la un raport de 6% gr/v, care se agită timp de 1,5..2,5 h, timp în care temperatura este crescută de la 30 la 60°C, după care nanoparticulele de aur se suspendă sub agitare în soluție de citrat de sodiu. | 7<br>9<br>11 |
| 3. Reactiv pe bază de nanoparticule de aur, pentru cartografierea tisulară, pentru utilizarea la determinarea limitelor tumorale pe suprafață și în profunzime prin rezonanța plasmonică de suprafață a nanoparticulelor de aur cu diametrul de 5...7 nm.  | 13           |
| 4. Reactiv conform revendicării 3, în care tumoarea este melanomul cutanat.  | 15           |

(51) Int.Cl.  
**G01N 33/52** (2006.01),  
**B82Y 5/00** (2011.01)

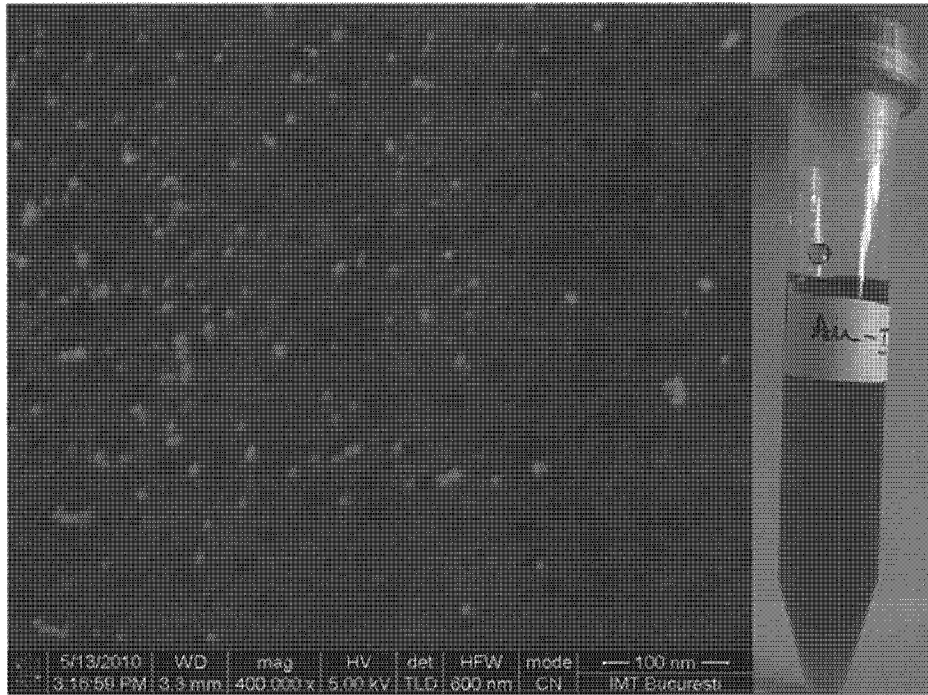


Fig. 1

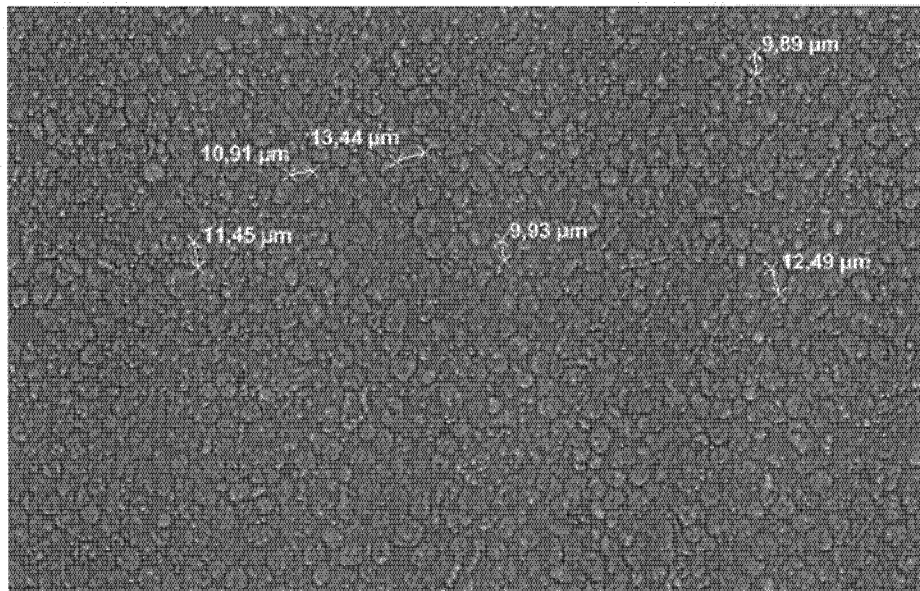


Fig. 2



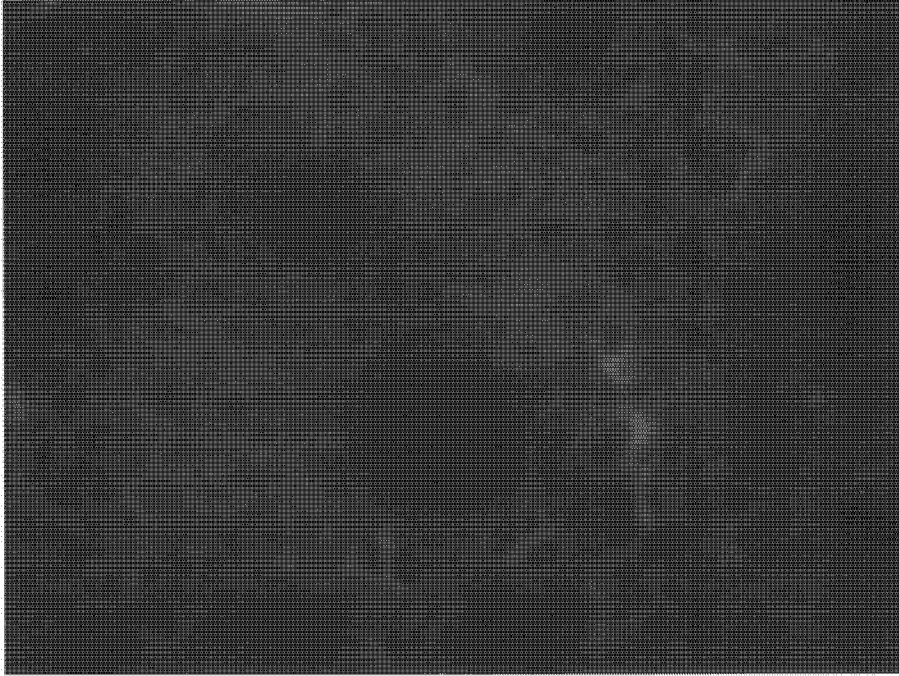


Fig. 3

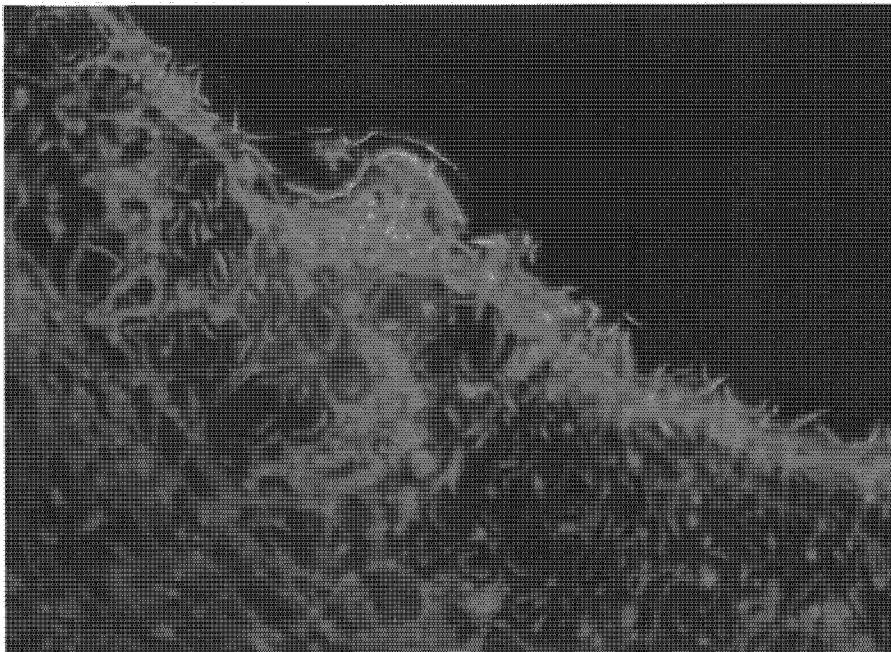


Fig. 4

(51) Int.Cl.  
**G01N 33/52** (2006.01),  
**B82Y 5/00** (2011.01)

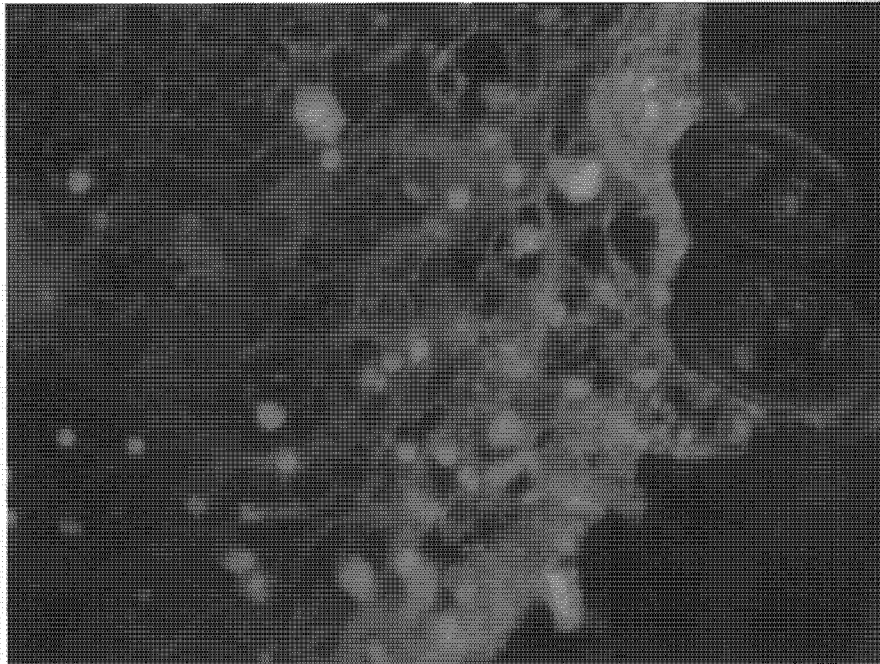


Fig. 5



Fig. 6



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
sub comanda nr. 581/2014