



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00263

(22) Data de depozit: 13/05/2022

(41) Data publicării cererii:  
29/11/2023 BOPI nr. 11/2023

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
MICROTEHNOLOGIE-IMT BUCUREȘTI,  
STR.EROU IANCU NICOLAE 126A,  
VOLUNTARI, IF, RO

(72) Inventatori:  
• MIHAILESCU CARMEN MARINELA,  
STR.ARMASUL MARCU NR.11, BL.24,  
SC.1, ET.7, AP.48, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• SAVIN MIHAELA, STR.EROILOR, NR.14A,  
PANTELIMON, IF, RO;  
• MOLDOVAN CARMEN AURA,  
BD. ION MIHALACHE NR.166, BL.2, SC.B,  
AP.35, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;  
• FIRTAT BOGDAN, BD.PIPERA, NR.198/4,  
BL.L2B3, AP.2, VOLUNTARI, IF, RO;

• MUSCALU GEORGE-STELIAN,  
STR.NICOLAE TITULESCU, NR.87,  
GĂEȘTI, DB, RO;  
• ION MARIAN, STR.DEBRUN, NR.2,  
BL.M58, SC.1, AP.38, SECTOR 5,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• BOLDEIU FLORENTINA-ADINA,  
STR.COL.ȘTEFAN STOIKA, NR.20, BL.17A,  
SC.1, AP.18, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• ROMANITAN COSMIN, STR.BAICULEȘTI  
NR.23, BL.E9, SC.D, ET.8, AP.154,  
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;  
• BRINCOVEANU OANA-ANDREEA,  
STR.SAFIRULUI, NR.71, BRAGADIRU, IF,  
RO;  
• MIHALACHE IULIANA,  
STR.SOLDAT ZAMBILA IONITA, NR.1,  
BL.33A, AP.21, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B,  
RO

(54) **PROCEDEU DE SINTEZĂ ȘI CARACTERIZARE MOLECULE  
DE DETECȚIE FOLOSITE PENTRU DEZVOLTAREA  
DE TESTE RAPIDE IMUNOCROMATOGRFICE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a nanoparticulelor de aur (NPAu) utilizate ca molecule de detecție pentru teste rapide de tip imunocromatografie în flux lateral (ILF). Procedeu, conform invenției, constă în etapele: prepararea unei soluții S1 din 1 mM de H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> în apă și încălzire la temperatura de 60°C, prepararea unei soluții S2 din 100 ml apă și 6 g ceai verde, încălzire la temperatura de 80°C timp de 15 min, cu menținere în repaus 15 min și filtrare, prepararea unei soluții S3, din 100 ml apă deionizată, 6 mg ceai verde și 1 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, în aceleași condiții, prepararea unei soluții S4 formată din S1 și 1 ml S2, prepararea unei

soluții S5 formată din S1 și 250 μl S3 și caracterizarea soluțiilor prin metode analitice, rezultând în spectrele UV-VIS pentru S4 și S5, benzi de absorbție caracteristice NPAu obținute din ceai verde la lungimi de undă de 535 nm, respectiv, 530 nm, o dispersie bună în soluție, cu un potențial ζ negativ de -18,93 mV și dimensiuni medii ale NPAu de 20 nm, adecvate pentru testele rapide de tip ILF

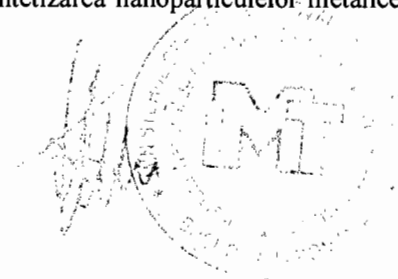
Revendicări: 1  
Figuri: 14

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



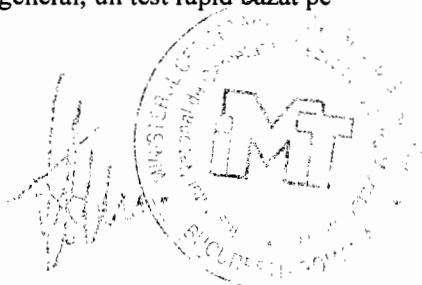
**PROCEDEU DE SINTEZA SI CARACTERIZARE MOLECULE DE DETECTIE FOLOSITE PENTRU DEZVOLTAREA DE TESTE RAPIDE IMUNOCROMATOGRAFICE**

Inventia se refera la procedeul de sinteza si caracterizare a nanoparticulelor de aur, sintetizate din ceai verde si dezvoltarea unui test rapid bazat pe tehnica binecunoscuta, imunocromatografia in flux lateral (IFL), utilizand ca molecule de detectie nanoparticulele de aur obtinute prin sinteza ecologica din ceai verde. Nanoparticulele metalice (NP), in special cele de aur si de argint, au atras atentia in multe domenii precum: cataliza [1], dezvoltarea de senzori [2], optica[3], imagistica [4], farmacie [5] precum si ca molecule de detectie, colorate, integrate in testele rapide pe baza de imunocromatografie in flux lateral (IFL) (asemanatoare cu testele rapide pentru detectie antigen/anticorpi COVID) [6]. Până în prezent, au fost raportate numeroase metode de sinteză, atat prin abordări chimice, cât și fizice, pentru o sinteza controlată a nanoparticulelor de aur (NPAu) sau argint NPAg obtinandu-se diferite dimensiuni și forme. Metoda tradițională și cea mai utilizată pentru sinteză NPAu este cea dezvoltată de Turkevich, care stabilizează nanoparticulele formate, permițând prepararea nanoparticulelor sferice de aur cu dimensiuni care variaza de la 5 la 50 nm [7]. Toate aceste metode chimice/fizice sunt adesea efectuate în prezența mai multor agenți reducători și stabilizatori toxici, cum ar fi borohidruș de sodiu ( $\text{NaBH}_4$ ) sau bromura de cetiltrimetilamoniu (CTAB), generând produse secundare toxice si periculoase. În acest sens, impactul toxicologic al nanoparticulelor este o problemă importantă de gestionat, întrucât numărul mare de studii *in vitro* efectuate în ultimii ani, au produs rezultate controversate, unele dintre ele arătându-și potențiala toxicitate. Astfel, odată cu nevoia tot mai mare de a minimiza sau elimina utilizarea substanțelor toxice cu risc pentru mediu, abordarea chimiei ecologice (biosintezei) reprezintă o alternativă valoroasă. Dezvoltarea metodelor de sinteză ecologică pentru prepararea nanomaterialelor a devenit o necesitate nu numai pentru farmacie dar si ca parte integranta a testelor rapide de tip IFL. Atunci cand NPAu sunt obtinute chimic pentru a fi folosite ca molecule de legare cu anticorpii, toxicitatea lor prin prezenta urmelor de substante chimice reducatoare poate afecta legarea probei de detectat cu anticorpii/antigenele pentru a forma bioconjugatele iar randamentul de legare este mult diminuat, de unde si eficienta scazuta in obtinerea bioconjugatelor ceea ce ar putea duce la o sensibilitate mult diminuată a testului rapid. Sensibilitatea acestui test este semnificativ influentata de cantitatea de NPAu captate in zona de test atunci cand are loc o reactie imuna de tip sandwich. Dar pentru a creste aceasta sensibilitate este nevoie de optimizarea largimii de distributie a NPAu utilizate pentru a vizualiza reactia. Numeroase studii au aratat ca diametrul acestora influenteaza mult sensibilitatea testelor de acest tip [8,9]. In mod normal, dimensiunea NPAu utilizate in testele rapide sunt cuprinse intre 15nm-60nm. O largime de distributie ingusta, bine definita al NPAu in tehnicile de caracterizare a distributiei de marime (de exemplu, tehnicile Dynamic Light Scattering (DLS) sau Small Angle X-ray Scattering (SAXS) care determina o suprafata mare a ariei de reactie cu anticorpii. Sintezele ecologice utilizand plantele, au luat amploare in domeniul farmaceutic si pentru faptul ca nanoparticulele obtinute pot purta compusi care ar putea potenta efectul terapeutic vizat asa cum s-a demonstrat si in unele studii ce vizau efectul antitumoral al unor NPAu obtinute ecologic [10,11]. In ceea ce privesc testele IFL, din cunostintele noastre, nu exista studii in care sa se utilizeze nanoparticule de aur, obtinute din plante, in scopul de a fi utilizate ca molecule de detectie a unor reactii immune de tip sandwich pe un test IFL, reactii ce pot determina vizual prezenta unor virusuri, bacterii, proteine, medicamente in anumite probe de origine umana (ser, sange, saliva) sau de origine alimentara (lapte, apa etc.). Unul din posibilele motive pentru care aceste studii nu exista ar putea fi ipoteza ca atunci cand se utilizeaza plantele, pe suprafata lor s-ar putea aseza compusi care ar putea impiedica reactia cu anticorpii in bioconjugate sau mai departe o posibila reactive cu markerul/ virusul/bacteria de detectat. Totusi, modificarea parametrilor de sinteza, folosirea unor plante ce contin substante reducatoare cu putere mare de reducere a aurului din sarurile din care provin fiind nevoie de un volum foarte mic de extract din acestea pentru a se forma nanoparticulele, concentrația potrivita de sare din care aceste nanoparticule se reduc duc la obtinerea unor nanoparticule care ar putea indeplinii conditiile unei molecule de detectie potrivita pentru a fi utilizata in testele IFL[12,13] . Se cunoaste că plantele contin o gamă largă de metaboliți. Cu toate acestea, potențialul lor nu a fost încă utilizat pe deplin pentru sintetizarea nanoparticulelor metalice



utilizate pe scara larga in industria farmaceutica sau alte industrii. Astfel, există o tot mai mare necesitate de a dezvolta procese ecologice și economice, care nu utilizează substanțe chimice toxice în protocoalele de sinteză chiar dacă aceste NPAu sunt utilizate și în alte scopuri decât cele terapeutice [14]: ca senzori, molecule colorimetrice de detecție, molecule de legare cu anticorpii etc. Este bine cunoscut faptul că specia *Camellia sinensis* (ceai verde) conține polifenoli. Un extract apos de ceai verde conține 59,8 mg CAE/g de compuși fenolici (CAE = echivalenți de acid clorogenic în miligrame per gram de material uscat) [15] și terpenoide, cum ar fi  $\beta$ -cariofilena (~ 800  $\mu\text{g/mL}$ ), linalol (~ 1600  $\mu\text{g/mL}$ ), cis-jasmonă (~ 800  $\mu\text{g/mL}$ ),  $\alpha$ -terpineol (~ 800  $\mu\text{g/mL}$ ),  $\delta$ -cadinenă (~ 1600  $\mu\text{g/mL}$ ), indole (~ 800  $\mu\text{g/mL}$ ), geraniol (~ 400  $\mu\text{g/mL}$ ), printre bio-componentele majore, care au activitate bactericidă și antioxidantă și câteva alte proprietăți utile [16]. Acest tip de compuși contribuie la procesele de reducere a ionilor metalici din sarurile lor, așa cum s-a afirmat în metodele de bioreducere raportate anterior [10], [11] și pot, de asemenea, controla dimensiunea și stabilitatea nanostructurilor formate. Acidul galic, un metabolit fenolic secundar prezent în plante precum ceaiul verde cu proprietăți antioxidante puternice, a fost folosit cu succes pentru a obține nanoparticule de Au și Ag solubile în apă și s-a dovedit a fi un agent eficient de acoperire a acestor nanoparticule de metale nobile [17], [18]. Spectrele UV-VIS ale nanoparticulelor de Au și Ag în soluție apoasă pot fi corelate cu dimensiunea lor [19], [20], [21], [22], [23]. De asemenea morfologia, dimensiunea, cristalinitatea și dispersia în soluție sunt analizate cu tehnici de caracterizare precum: microscopia electronica de baleiaj (SEM), Microscopie Electronica de Transmisie (TEM), Difractia de raze X (XRD). Există deja în studiile de literatură diverse metode de sinteză a nanoparticulelor de aur din ceai verde, în studiile existente dimensiunile obținute au fost începând de la 10nm până la 40 nm [16]. Studiile au arătat că în comparative cu alte extracte din plante, pentru obținerea nanoparticulelor de aur din ceai verde la scala de producție, ceaiul verde este cea mai bună alegere deoarece catehinele au un caracter oxidant puternic foarte puternic iar una dintre cele mai importante substanțe prezente în ceaiul verde este **galatul de epigallocatehina** (EGCG). Studiile referitoare la benzile de absorbție prezente în diferite formulări ale ceaiului verde, extract apos sau alcoolic, au arătat prezența benzilor maxime de absorbție pentru EGCG la lungimile de undă de cu valori între 270-277 nm [24, 25].

De asemenea studiile existente au arătat că un important parametru care influențează dimensiunea NPAu din acidul cloroauric este procentul de extract adăugat, un procent de 1% determină un maxim al lungimii de undă în Spectrometru UV-VIS de 538 nm corespunzător unei dimensiuni mici de 8-24nm. Un procent de 5% a extrasului adăugat determină un maxim de absorbție de 566nm, iar un procent de 10% determină un maxim al absorbției lungimii de undă de 602 nm care corelate cu dimensiunile nanoparticulei de aur acesta a prezentat dimensiuni între 57-113 nm conform autorilor studiului [26]. Procentul cât mai mic de extract apos adăugat a determinat o dimensiune mică a nanoparticulei corelată cu o lungime de undă cât mai aproape de 500nm, lungime de undă caracteristică dimensiunii de nanometrii a nanoparticulei de aur. Optimizările realizate asupra parametrilor de sinteză a dus și la obținerea unor NPAu din ceai verde de foarte mici dimensiuni de până în 10nm într-un studiu recent [27]. Aceste dimensiuni sunt potrivite pentru o mulțime de aplicații biologice, medicale de inginerie a tesuturilor sau ca și vehicul de transport pentru unele medicamente sau gene, sau ca molecule de detecție vizuală și fluorescență. Deși cercetarea în nanotehnologia aplicată pentru dezvoltarea de teste rapide de tip IFL a avansat în ultima perioadă către gazearea unor alte nanomolecule de detecție mai sensibile (doturi cuantice (QDs), oxid de grafenă(GO-QDs)) decât cele folosite în mod curent (particulele coloidale de aur), totuși nu s-a reușit avansarea către aria comercială cu astfel de molecule probabil, încă, datorită inconsistentei pe care acestea o manifestă de la un test la altul și datorită și lipsei caracterizării, riguroase și precise a acestor molecule după sinteza lor [ 28, 29]. Nanoparticulele metalice, în special nanoparticulele de aur (NPAu), prezintă un interes deosebit datorită proprietăților lor optice și electrice unice care au încurajat dezvoltarea unei game largi de aplicații. Metoda curgerii în flux lateral pe membrane este o metodă simplă care poate detecta o varietate de proteine marker din sângele uman de la micotoxine și până la agenți virali și bacterii. Sensibilitatea testelor depinde foarte mult de schimbările colorimetrice datorate agregării NPAu coloidale. În general, un test rapid bazat pe



cromatografia in flux lateral este format din: zona de aplicare a probei, o zona de depunere a bioconjugatelor cu rol de molecule de detectie, formate din NPAu si anticorpi, o zona de reactie (cea mai mare arie a testului) si o zona de absorbtie. Schema de realizare a unui test rapid bazat pe IFL este prezentata in Figura 1. Principiul de functionare al acestor microsenzori se bazeaza pe imunocromatografia in flux lateral de tip sandwich. Astfel, dupa pipetarea probei de ser, sange sau plasma in aria specifica pentru depunerea probei (vezi Fig.1....exemplul...), acesta migreaza prin capilaritate de-a lungul membranei de proba pana ajunge in dreptul membranelor impregnate cu biomolecule formate din anticorpi legati de nanoparticulele metalice de aur (Ac1-NPAu), cu rol de detectie. Acestea vor recunoaste markerul de detectat (cu rol de antigen -Ag) din proba si vor forma un complex cu acesta (Ag-Ac1-NPAu). Fluxul de lichid va antrena complexul format pana in dreptul membranei de test unde se vor afla anticorpii de captura (specificali markerului din proba) care vor forma un sandwich cu complexul (Ag-Ac1-NPAu-Ac2). Daca proba contine o anumita concentratie de marker ce poate fi detectata, linia de test va putea fi vizualizata in vizibil sau in fluorescenta. Excesul de lichid va continua sa inainteze in membrana test pana va ajunge in dreptul liniei control unde obligatoriu, pentru validare, linia va trebui sa se coloreze (rosu sau albastru in functie de agregare si marime nanoparticule). Absenta culorii liniei de test sugereaza un nivel al concentratiei markerului prezent in proba sub nivelul minim de detectie. Drept control al testului membrana test prezinta o linie de control (unde se afla anticorpii care vor recunoaste anticorpii care formeaza bioconjugatele folosite pentru detectie) care, daca se coloreaza, indica daca testul s-a realizat corect. Toate membranele sunt lipite perfect pe o membrana suport cu rolul de a le alinia, uniformiza si de a le stabiliza. Majoritatea testelor imunocromatografice contin o membrana de conjugate formate din anticorpi legati de nanoparticule de aur in solutie dar care apoi dupa impregnare, solutia este deshidratata asa cum a fost deja descries in patentul US 6485982 [30]. Se poate intalni si cazul cand stripul (testul) este imersat intr-o solutie de conjugat si proba intr-un mod vertical iar prin capilaritate fluxul de lichid format din proba si bioconjugate trece prin membranele testului pana la final/ in acest caz se utilizeaza nanoparticulele de aur legate de anticorpi in solutie nu uscate pe membrana conjugat, asa cum a fost descries pe larg de patentul US2005/0124077 [31]. Numeroase patente s-au ocupat cu cresterea sensibilitatii si specificitatii testelor IFL prin folosirea unor metode chimice de legare a acestora cu anticorpii vizand urmatoarele grupari ale anticorpilor: gruparile amino, gruparile aldehida, sulfhidril sau gruparile carboxil. Aceste legari chimice de tip covalent utilizeaza agenti chimici de legare. Aceste proceduri pot afecta situsurile de legare ale anticorpilor, implica etape numeroase dar pot creste eficienta de legare cu antigenul in comparatie cu metoda de adsorbție fizica a carei eficienta de legare este mult mai mica. Fiecare din producatorii testelor aleg dintre aceste metode cea mai potrivita si specifica pentru analitii de detectat. La nivel mondial, China este cea mai mare producatoare a testelor rapide. Totusi si la nivel mondial, exista putini producatori reali: Roche Diagnostics (Elvetia), Siemens Healthineers (Germania), Danaher Corporation (SUA), Abbott (SUA), and Thermo Fisher Scientific (SUA) are the leading players in this market. Other players in this market are Johnson & Johnson (SUA), Becton, Dickinson and Company (SUA), Bio-Rad Laboratories (SUA), Sysmex Corporation (Japonia), bioMérieux (Franta), DiaSorin (Italia), Ortho Clinical Diagnostics (SUA), and QIAGEN N.V. (Olanda). Majoritatea patentelor pe astfel de teste apartin firmei Abbot si Syntex (SUA): EP0267006A2, EP0168689A2, EP0262328A2. Niciun patent existent nu contine nanoparticule de aur sintetizate ecologic utilizand specia de *Camellia Sinesis* ba chiar nicio sinteza a nanoparticulelor de aur utilizate nu este una ecologica [32].

**Avantajele utilizarii protocoalelor ecologice** utilizate pentru sinteza de nanoparticule cu aplicatii ca molecule de detectie si legare a anticorpilor ar fi ca acestea deja sunt stabile in solutie (ceaiul verde continand unele substante, pe post de detergent (saponine), aditivi de stabilizare in solutie iar dimensiunile și morfologiile nanoparticulelor pot fi controlate prin modificarea unor condiții critice de sinteza, inclusiv concentrația extractului, pH-ul, lumina, temperatura, stabilitatea solutiei tampon de lucru, compusii donatori de electroni (de exemplu, glucoza sau fructoza), concentrația biomasei și a substratului, viteza de amestecare și timpul de expunere. Totodata sinteza ecologica este eficienta, cu randamente mari si nanoparticulele pot fi produse la scara larga [33, 34]. Avand in vedere cererea tot



mai mare de teste rapide de tip IFL, sinteza acestor nanoparticule din ceai verde ar putea fi o alternativa ieftina, eficienta (se obtin randamente mai mari in comparative cu sinteza chimica) dar si calitativ mai buna deoarece nu se utilizeaza si alte substante chimice toxice pt stabilizarea lor in solutie (asa cum s-a mai descries anterior) si in consecinta, in cazul legarii lor de anticorpii monoclonali (pentru o mai buna specificitate a testului si in consecinta un test calitativ superior) acestea nu ar afecta situsurile specific de legare al anticorpului cu analitul de detectat.

**Problema tehnica** pe care o rezolva inventia de fata este realizarea unei metode simple, ecologice de sinteza a nanoparticulelor de aur in locul celor chimice, toxice existente si utilizarea lor ca molecule de detectie pentru dezvoltarea unor metode imunocromatografice. Prezenta catehinelor in cantitate mare in ceaiul verde ar fi cauza reducerii rapide al aurului din acidul cloroauric si formarea nanoparticulelor cu o dimensiune potrivita pentru a fi utilizate in testele imunocromatografice. Metodele imunocromatografice sunt cele mai utilizate metode de diagnostic rapid utilizate in prezent.

**Procedeul conform inventiei**, pornind de la principiile unei sinteza ecologice, este o metoda de sinteza a nanoparticulelor de aur coloidale utilizand extractul apos de *Camellia sinensis* (ceaiul verde) care datorita prezentei puternice a substantelor antioxidante/reducatoare nu este nevoie decat de un volum foarte mic pentru ca aurul sa fie redus puternic dintr-o solutie de sare de 1mM  $\text{HAuCl}_4$  in apa la o dimensiune de nanometrii, de aproximativ 20 nm, potrivita pentru a fi utilizata in testele imunocromatografice de tip IFL. Gradul de controlabilitate al dimensiunii nanoparticulelor in urma sintezei este datorat si posibilitatii de a varia volumele dintre cele doua solutii (extract apos si solutia de acid cloroauric) si a concentratiei de carbonat de sodiu, care de fapt este si substanta care ajuta nanoparticulele de aur sa ajunga la un anumit pH, optim pentru a putea fi utilizate mai departe in sinteza bioconjugatelor, formate prin legarea NPAu cu anticorpii de detectie (NPAu-Ac2), bioconjugate utilizate mai departe pentru a detecta un anumit analit (proteina, bacterie, virus) din probe de ser/sange cu ajutorul testelor de tip IFL pentru detectia proteinei marker cardiac, Creatin Kinaza MB. Procedeul de obtinerea al nanoparticulelor de o anumita dimensiune este urmat pas cu pas de metode de caracterizare care sa vin ca dovada clara a dimensiunii de nanometri obtinute. Pentru demonstrarea utilizarii nanoparticulelor ecologice in aplicatii IFL s-a dezvoltat si un test IFL pentru detectia marker-ului cardiac, important in infarctul miocardic acut (IMA), Creatin-Kinaza MB (CK-MB). CK-MB este una dintre cele 3 forme (izoenzime) ale enzimei creatinkinaza (CK). Aceste enzime includ: CK-MM (aflata in muschii scheletici si in inimă), CK-MB (gasita mai ales in inimă, si in cantitati mici in muschii scheletici), CK-BB (aflat mai ales in creier si in muschiul neted, MB cum ar fi intestinul si uterul) CK-MB, in mod normal este nedetectabil sau foarte scazut in sange. Daca prezenta CK-MB in sange este in cantitati semnificative, atunci este clar ca inima este afectata. Testul IFL pentru CK-MB poate fi utilizat pentru a determina daca se datoreaza leziunilor cardiace sau este mai probabil sa fie legat de leziuni ale muschilor scheletici. Durerea toracica si cresterea valorilor CK totale plus CK-MB indica faptul ca este probabil ca persoana sa fi avut recent un atac de cord. Cresterea CK-MB poate fi detectata la o persoana care sufera de atac de cord, la aproximativ 3-6 ore de la aparitia durerii toracice. Nivelul CK-MB atinge varful la 12-24 ore si apoi revin la normal in aproximativ 48-72 ore. Daca exista un al doilea atac de cord sau o deteriorare continua, nivelurile pot creste din nou si/sau se pot mentine timp mai indelungat.

Procedeul de sinteza ecologica si caracterizare molecule de detectie pentru a fi utilizate in teste IFL, incepe prin realizarea nanoparticulelor de aur si a bioconjugatelor si apoi integrarea lor in testul de tip IFL si demonstrarea utilitatii lui in detectia biomarkerului CK-MB, astfel:

**preparare solutie S1** din 1mM de  $\text{HAuCl}_4$  in apa si incalzirea acesteia la 60 °C intr-un pahar Berzelius (fig.1B)

**preparare solutie S2** formata din 100mL de apa si aproximativ 6 grame de ceai verde (in pliculete, fig.1A) incalzita la maxim 80 °C timp de 15minute si lasata in repaus acoperita timp de inca 15 minute iar dupa racire se filtreaza si solutia rezultata se caracterizeaza cu spectrometria UV-VIS (**exemplul 1, fig.1 E si spectrele UV-VIS in fig.2B** )



**preparare solutia S3** formata din 100mL de apa deionizata si aproximativ 6 g ceai verde (pliculete) si 1gNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> si incalzita la maxim 80 °C timp de 15minute si lasata in repaus acoperita timp de inca 15 minute iar dupa racire se caracterizeaza cu Spectrometria UV-VIS (**exemplul 1, fig.1F si fig.2A**)

**solutia S4** formata din solutia S1, incalzire la 60 °C peste care se adauga sub agitare magnetica la 800 RPM 1mL din solutia S2 cand solutia isi schimba culoarea in violet (**exemplul 2, fig. 1C si D**), incalzire timp de 15 minute pana nu se mai schimba culoarea iar dupa racire se caracterizeaza cu metodele : Spectrometria UV-VIS (**exemplul 2, fig.3a**), DLS (**fig.4 B**), XRD (**fig.6**) si SEM (**fig.7A**)

**solutia S5** formata din solutia S1, incalzire la 60 °C, peste care se adauga sub agitare magnetica la 800 RPM 250μL din solutia S3 cand solutia isi schimba culoarea in violet (**exemplul 2, fig. 1C si D**), incalzire timp de 15 minute pana nu se mai schimba culoarea iar dupa racire se caracterizeaza cu metodele : Spectrometria UV-VIS (**fig.3b-B**), DLS (**fig. 5**), XRD (**fig.6**), potential zetta (**fig. 4A**) si SEM (**fig.7B**)

**solutia S6** formata prin amestecarea a 10mL din solutia S4 cu 100μg de anticorp policlonal anti-soarece anti-CK-MB si incubare pentru 30 minute la temperatura camerei, centrifugare la 8500RPM timp de 45 minute, indepartarea supernatantului si resuspendarea peletului intr-un mL de tampon Tris-HCl 0,02M cu 1%BSA, 8% sucroza si 1%Tween (**exemplul 3**), caracterizare cu spectrometria UV-VIS (**fig.3b-B**) si cu tehnica DLS (**fig.**)

**solutia S7** formata prin amestecarea a 10mL din solutia S5 cu 100μg de anticorp policlonal anti-soarece anti-CK-MB si incubare pentru 30 minute la temperatura camerei, centrifugare la 8500RPM timp de 45 minute, indepartarea supernatantului si resuspendarea peletului intr-un mL de tampon Tris-HCl 0,02M cu 1%BSA, 8% sucroza si 1%Tween si caracterizare prin Spectrometrie UV-VIS (**exemplul 3, fig.3b-C**) si tehnica DLS (**exemplul 3, fig.8**)

**solutie martor M** realizata la fel ca solutia S6/S7 dar fara adaugarea de anticorpi policlonal anti-soarece anti-CK-MB caracterizata prin spectrometria UV-VIS (**exemplul 3, fig.3a- spectrul A**)

**membrane de bioconjugate din fibra de sticla** de dimensiuni 30cmx0,7cm tratate prin imersie in 400μL din solutia S6/S7 formulata cu 0,5% BSA, 1% sucroza si 0,01% Tween, uscare 2h la 40°C si pastrate la o temperatura de 20°C -22°C, umiditate ≈25-30% pana la asamblarea testului IFL (**exemplul 4, fig.9- C**)

**utilizare membrane de nitroceluloza** taiate in dimensiuni de 2,4cmx30 cm (**exemplul4, fig.9-B**)

**realizare membrane de proba** de dimensiuni 30cmx 2,5 cm, pretratate anterior asamblarii in test prin imersarea in 2mL de solutie de tampon PBS 7,4 cu BSA 0,5%, 1% sucroza si 0,02% tween, lasata sa se usuce 2h la 37°C si apoi introdusa in punca de aluminiu in care se introduce 5-8 pliculete de silicagel si se videaza pana la asamblarea testului IFL (**exemplul 4, fig.9-D**)

utilizare **membrana de absorbtie** de dimensiuni 2,5 cmx30 cm (**exemplul 4,fig.9-A**)

imersarea membranelor de bioconjugate mici de dimensiuni 30x0,7cm in cate 200 μL de **solutie S7** asamblarea pe un suport PVC a membranei de nitroceluloza de dimensiune 2,4cm x35 cm, cand se adauga pe mijlocul suportului, dupa indepartarea benzii cu lipici aflata la mijlocul suportului pregatirea solutiei **S8** pentru linia de test (LT), formata din anticorp de captura Ac1-clona M1202222 (anti CK-MB) in concentrația de 2mg/mL realizate in solutia tampon PBS, pH 7,4 in care s-a introdus BSA 0,25%, sucroza 0,25% si metanol (MeOH) 1,50%

pregatirea solutiei **S9** pentru linia de control (LC) formata din anticorp de captura policlonal, anti-soarece in concentrația de 2mg/mL realizate in solutia tampon PBS, pH 7,4 in care sa- introdus BSA 0,25%, sucroza 0,25% si methanol (MeOH) 1,50%

introducerea solutiei **S8** (LT) intr-un recipient corespunzator locului de depunere pe LT a membrane de nitroceluloza, aparat Agismart RG 1000, Regabio (India) si depunerea solutiei S8 pe membrana de nitroceluloza la 1cm distanta de membrana de bioconjugate (**exemplul 4- fig.10-A**)

introducerea solutiei S9 in recipientul pentru LC al aparatului de depunere, marca Agismart RG 1000, Regabio (India) si depunerea solutiei S9 pe membrana de nitroceluloza la 0,7 cm de de LT (**exemplul 4-fig.10-B**)

adaugarea membranei de proba de dimensiune 30cmx 2,5 cm pe cardul PVC, a membranei de absorbtie si a membranei cu bioconjugate impregnata cu solutiile S6/S7





depunerea solutiilor S8 si S9 din recipientele A si B pe membrana din mijloc (nitroceluloza)-fig.10 si 11

taierea in transversala a unor benzi (stripuri de testare de tip IFL) de dimensiune, 0,4cmX6cm (fig.12,a) pregatirea a 6 concentratii de marker cardiac IMA, CK-MB in solutie de tampon PBS, pH 7,4: 0 ng/mL;5ng/mL; 10ng/mL;40ng/mL;100ng/mL ; 200ng/mL

adaugarea fiecarei concentratii pe cate un test de tip IFL in zona membrane de proba in volum de 100μL cu concentratiile de CK-MB pregatite anterior

trecerea fluxului de lichid prin toate membranele in timpul a maxim 15 minute si

colorarea in violet a LT si LC proportional, ca intensitate vizuala a culorii, cu concentrația adaugata de biomarker CK-MB ca marturie demonstrarii utilitatii moleculelor de detectie sintetizate in mod ecologic din ceai verde (exemplul 5, fig.13,14)

aparitia liniei de control in culoare violet ca o marturie a functionarii corecte a testului cu moleculele ecologice de nanoparticule de aur sintetizate din ceai verde

**In continuare**, se dau exemple de realizare a inventiei, in legatura cu **fig.1..14**, care reprezinta:

- **fig. 1.**, imagini ale solutiilor preparate: solutia S1 din 1mM H<sub>Au</sub>Cl<sub>4</sub> (A), solutia S2 (D) si S3(E) in conformitate cu exemplul 1 , solutia S4 sau S5(C) (cand vireaza culoarea spre culoarea finala, violet),

-**fig.2.**, spectrele UV-VIS suprapuse pentru solutiile S2 (A), S3 (B) in care se observa benzile de absorbtie prezente la ambele solutii intre 272-275 nm, benzi caracteristice galatului de epigallocatechina din ceaiul verde,

-**fig.3.a**, spectrele UV-VIS pentru solutiile S4 unde apare banda caracteristica a NPAu obtinute din ceai verde la 535nm

-**fig.3b** spectrele UV-VIS pentru solutiile S5 unde apare: banda caracteristica a NPAu obtinute din ceai verde la 530nm (B); banda caracteristica NPAu la 530nm din solutia martor M (cu NPAu din solutia S5) fara anticorp (A) si solutia de bioconjugate cu deplasarea la lungimea de unda de la 530nm la 540nm atunci cand are loc conjugarea nanoparticulelor de aur cu anticorpilor (spectrul C );

- **fig.4.**, potential zeta pentru S4 si S5, ambele au prezentat o dispersie buna in solutie cu un potential negativ de -18,93 mV ( A) si spectrele DLS cu distributia nanoparticulelor de aur in solutie, dimensiunea lor medie de 93,4 nm si indicii de polidispersie pentru solutia S4 (B)

-**fig.5.**, spectrele DLS cu distributia nanoparticulelor de aur si indicii de polidispersie pentru solutia S5, diametrul mediu al nanoparticulelor de 31,5 nm mai mic decat in cazul solutiei S4

-**fig.6.**, Spectre experimentale de difracție și analiza Rietveld în vederea studiului purității și a dimensiunii domeniilor cristaline pentru nanoparticulele de aur din solutiile cu nanoparticule de aur (S4 si S5)

-**fig.7.**, imagini SEM ale nanoparticulelor de aur din solutiile S4 (A) si S5(B) unde se observa dimensiuni medii de 20 nm pentru ambele solutii cu NPAu, dimensiuni potrivite pentru testele de tip IFL

-**fig.8.**, spectrul DLS al solutiei de bioconjugate S7 prezentat in Fig.6, nanoparticulele prezentand acelasi aspect al distributiei dar o marire a nanoparticulei de 2 ori

-**fig.9.**, fasii de membrane asamblate pe suportul PVC: A. Membrana de absorbtie; B. membrana de nitroceluloza cu puncte de ghidaj pentru linia de test (LT) si linia de control (LC); C. Membrana in care se impregneza solutiile S4/S5 de bioconjugate; D. Membrana de proba

-**fig.10.**, recipiente pentru depunere solutii cu aparatul Agismart: A. recipient pentru depunerea solutiei pe linia de test (LT-S9); B. recipient pentru depunerea solutiei pe linia de control (LC-S10)

-**fig.11.**, printarea liniilor cu solutia S8 (A) si cu solutia S9 (B) folosind viteza 1,5 a aparatului si o latime lichid disperat in membrana de nitroceluloza <5mm

**fig. 12.**, schema test de tip IFL taiat transversal si format din: A.suport laminat pentru membrane (60 mm x 4 mm); B. membrana de absorbtie (14mmx4mm);C.membrana de nitroceluloza; D.linia de control (LC); E. linia de test (LT); membrana de bioconjugate (6mmx4mm); membrana de proba (14mmx4mm); S.suprafete suprapuse (2mmx4mm)

**fig.13.**, teste IFL cu bioconjugate formate din NPAu obtinute ecologic unde s-a demonstrat functionalitatea reactia imune dintre bioconjugatele antrenate pana la linia de control si anticorpilor aflati pe linia de control; probele au prezentat concentratii de 5ng/mL CK-MB in solutia de tampon PBS 7,4



**fig.14.**, teste IFL cu aparitia in culoarea violet a liniilor de test si control dupa adaugarea a 6 concentratii de CK-MB in solutie de tampon PBS astfel : A. 0ng/mL; B. 5ng/mL;C.10ng/mL; D. 50ng/mL;E.400ng/mL.

### Exemplul 1.

S-au realizat doua retete de obtinere a nanoparticulelor de aur din ceai verde, conform cu procedeul descris anterior, astfel : solutia S2 care in care extrasul apos obtinut nu contine carbonat de sodiu (solutia S2) si solutia S3 care contine 1g de carbonat de sodiu (solutia S3). Solutiile cu extractele apoase de ceai verde S2 si S3 au fost caracterizate prin spectrofotometria UV-VIS unde s-au putut vedea la ambele spectre banda de absorbtie caracteristica a galatului de epigallocatechina din ceaiul verde de la 272 nm-275 nm. Aceasta banda a fost mai intensa in cazul solutiei de ceai verde obtinuta prin adaugarea si a Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in solutie in timpul infuziei (fig...UV-VIS extract) asa cum se poate vedea in fig.1 B (S2) comparativ cu A (S1).

### Exemplul 2.

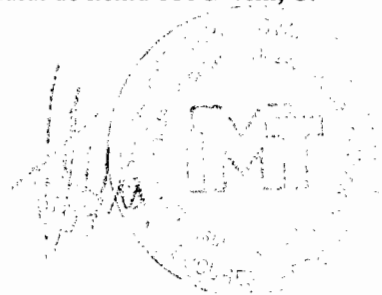
Solutiile S2 si S3 au fost folosite pentru a titra o solutie de acid cloroauric 1mM (solutia S1, fig.1- B) pana la aparitia culorii violet care este dovada formarii nanoparticulelor de aur (fig.1, C si D). Pentru obtinerea NPAu cu solutia S2 si S1 a fost nevoie de adaugarea unui volum de 1mL de solutie S2 (E)peste 80mL solutie S1(D) la incalzire si in timpul a 2 minute. Pentru obtinerea NPAu cu solutia S3 a fost nevoie de 250  $\mu$ L din solutia S3 (F) si un timp de 1 minut. Caracterizarea formarii NPAu in cazul utilizarii celor doua extracte apoase pentru titrarea S1 s-a realizat prin evidentierea benzii de la 530nm in cazul solutiei noi formate, S4 si banda de la 535 nm pentru solutia S5. Diferenta de lungime de unda a fost datorata dimensiunilor mai mari pe care le-au avut NPAu din solutia S4 care a fost titrata cu S2 (extract fara carbonat de sodiu) cu un volum de extract mai mare, de 1,23%, comparativ cu S5 care a fost titrata cu doar 250 $\mu$ L din S3 adica cu un procent de 0,31%. Dispersia NPAu in solutie, morfologia si marimea diferita in cazul solutiilor S4 si S5 au fost verificate si prin spectrometria UV-VIS (Fig., 3a-S4 si Fig. 3b (solutia S5-B), si tehnica DLS (Fig.4 - solutia S4 si Fig 5-solutia S5), prin morfologia SEM (Fig.5 a- solutia S4 si Fig.5b- solutia S5) si tehnica XRD (Fig.6, solutia S5).

### Exemplul 3.

Sinteza bioconjugatelor formate din NPAu si anticorpii anti-CK-MB s-a realizat utilizand solutia S5 si S4 astfel: formata prin amestecarea a 10mL din solutia S5/S4 cu 100 $\mu$ g de anticorp policlonal anti-soarece anti-CK-MB si incubare pentru 30 minute la temperatura camerei, centrifugare la 8500RPM timp de 45 minute, indepartarea supernatantului si resuspendarea peletului intr-un mL de tampon Tris-HCl 0,02M cu 1%BSA, 8% sucroza si 1%Tween si caracterizare prin Spectrometrie UV-VIS si tehnica DLS. S-a utilizat o **solutia martor M** care a fost realizata in mod identic doar ca nu s-au utilizat anticorpi. Se poate observa in Fig. 3b – ca banda prezentata de solutia martor M (A) se deplaseaza de la 530 nm la 540 nm aceasta fiind o confirmare a maririi nanoparticulei datorita conjugarii cu anticorpu. Aceasta marire s-a observant si in spectrul DLS al solutiei de bioconjugate S7 prezentat in Fig.6, nanoparticulele prezentand acelasi aspect al distributiei dar o marire a nanoparticulei de 2 ori.

### Exemplul 4. Etapele de fabricare a testului IFL

Testele de tip IFL sunt formate din 4 membrane importante toate asezate in modul favorizarii curgerii uniforme a lichidului de-a lungul intregului test conform cu principiul imunocromatografiei in flux lateral. Testele realizate pentru aplicatie au fost taiate in dimensiunile pentru testare dintr-o folie mai mare de 6 cm x30 cm, un test avand dimensiunile de 0,4cmx6cm. Folia este formata din 4 membrane suprapuse conform Fig.9 in care membranele sunt: A. membrana de absorbtie (din celuloza, dimensiune pori 40  $\mu$ m, grosime 1,5 mm); B. membrana de nitroceluloza cu viteza fluxului de lichid 180 s/ 4cm; C.





membrana de bioconjugate din fibra de sticla , dimensiuni 1cmx30cm (1xL); D. Membrana de proba, dimensiuni 0,4 cmX 1,6cm, grosime 110-160  $\mu\text{m}$ .

Dupa formarea foliei cu membranele lipite pe un suport PVC, etapele urmatoare au fost:

-introducerea solutiilor in recipientele aparatului specifice pentru depunerea solutiilor S9 (A) si S10(B) (fig.10)

-depunerea solutiilor cu o dispersie a lichidului in latime de maxim 5mm (fig.11)

-taierea testelor IFL in dimensiuni conform schemei din fig. 12

#### Exemplul 5. Demonstrarea aplicatiei

**Pentru aplicatie in testele IFL**, s-au utilizat 5 probe cu CK-MB realizate in solutie de tampon PBS si o proba care nu a prezentat CK-MB. S-a picurat pe fiecare test cate 100 $\mu\text{L}$  de solutie de CK-MB cu urmatoarele concentratii : A. 0ng/mL; B. 5ng/mL;C.10ng/mL; D. 50ng/mL;E.400ng/mL. S-au realizate si mai multe teste utilizand doar solutia tampon fara CK-MB. Functionalitatea testelor se poate demonstra si doar atunci cand apare doar linia de control colorata in violet (fig.13 si 14 ) asta, insemnand ca reactia dintre anticorpii marcati cu NPAu ecologice si cei aflati pe linia de control a avut loc. In cazul concentratiilor de CK-MB s-a observat colorarea liniilor de test vizibil proportional cu cresterea concentratiei de CK-MB din probe (fig.14).

[1] M.A. El-Sayed, Some Interesting Properties of Metals Confined in Time and Nanometer Space of Different Shapes, *Acc. Chem. Res.* 34 (2001) 257-264.

[2] M.A. El-Sayed, S. Link, Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals, *Int. Rev. Phys. Chem.* 19 (2000) 409-453.

[3]L. Caillard, O. Seitz, P. M. Campbell, R. P. Doherty, A.-F. Lamic-Humblot, E. Lacaze, Y. J. Chabal, O. Pluchery, Gold nanoparticles on oxide-free silicon-molecule interface for single electron transport, *Langmuir* 29 (2013) 5066-5073.

[4] Y. Yeh, B. Czeran, V. Rotello, Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology, *Nanoscale* 4 (2012) 1871-1880;

[5] R.A. Sperling, P.R. Gil, F. Zhang, M. Zanella, W.J. Parak, Biological applications of gold nanoparticles, *Chem. Soc. Rev.* 37 (2008) 1896-1908.

[6] L. Vigdeman, B.P. Khanal E.R. Zubarev, Functional gold nanorods: synthesis, self-assembly, and sensing applications, *Adv. Mater.* 24 (2012) 4811-4841.

[7] J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier, A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discuss Faraday Soc.* 11 (1951) 55-75.

[8] Khlebtsov, B. N., Tumskiy, R. S., Burov, A. M., Pylaev, T. E., & Khlebtsov, N. G. (2019). Quantifying the numbers of gold nanoparticles in the test zone of lateral flow immunoassay strips. *ACS Applied Nano Materials*, 2(8), 5020-5028.

[9] Zhan, L., Guo, S. Z., Song, F., Gong, Y., Xu, F., Boulware, D. R., ... & Bischof, J. C. (2017). The role of nanoparticle design in determining analytical performance of lateral flow immunoassays. *Nano letters*, 17(12), 7207-7212.

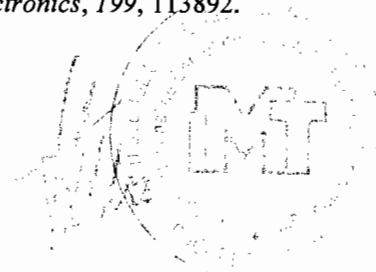
[10] Elbially, N. S., Abdelfatah, E. A., & Khalil, W. A. (2019). Antitumor activity of curcumin-green synthesized gold nanoparticles: In vitro study. *BioNanoScience*, 9(4), 813-820.

[11] Geetha, R., Ashokkumar, T., Tamilselvan, S., Govindaraju, K., Sadiq, M., & Singaravelu, G. (2013). Green synthesis of gold nanoparticles and their anticancer activity. *Cancer Nanotechnology*, 4(4), 91-98.

[12] Byzova, N. A., Zherdev, A. V., Khlebtsov, B. N., Burov, A. M., Khlebtsov, N. G., & Dzantiev, B. B. (2020). Advantages of highly spherical gold nanoparticles as labels for lateral flow immunoassay. *Sensors*, 20(12), 3608.



- [13] Khlebtsov, B. N., Tumskiy, R. S., Burov, A. M., Pylaev, T. E., & Khlebtsov, N. G. (2019). Quantifying the numbers of gold nanoparticles in the test zone of lateral flow immunoassay strips. *ACS Applied Nano Materials*, 2(8), 5020-5028.
- [14] Vilela, D., González, M. C., & Escarpa, A. (2012). Sensing colorimetric approaches based on gold and silver nanoparticles aggregation: chemical creativity behind the assay. A review. *Analytica chimica acta*, 751, 24-43.
- [15] Silva-Ramírez, K. A., Álvarez-Bernal, D., Oregel-Zamudio, E., Guízar-González, C., & Medina-Medrano, J. R. (2020). Effect of drying and steeping temperatures on the phenolic content, antioxidant activity, aromatic compounds and sensory properties of *Cunila polyantha* Benth. Infusions. *Processes*, 8(11), 1378.
- [16] Vilchis-Nestor, A. R., Sánchez-Mendieta, V., Camacho-López, M. A., Gómez-Espinosa, R. M., Camacho-López, M. A., & Arenas-Alatorre, J. A. (2008). Solventless synthesis and optical properties of Au and Ag nanoparticles using *Camellia sinensis* extract. *Materials letters*, 62(17-18), 3103-3105.
- [17] Beğić, N., Bener, M., & Apak, R. (2021). Development of a green synthesized silver nanoparticle-based antioxidant capacity method using carob extract. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 11(3), 381-394.
- [18] El Shafey, A. M. (2020). Green synthesis of metal and metal oxide nanoparticles from plant leaf extracts and their applications: A review. *Green Processing and Synthesis*, 9(1), 304-339.
- [19] Parashar, V., Parashar, R., Sharma, B., & Pandey, A. C. (2009). Parthenium leaf extract mediated synthesis of silver nanoparticles: a novel approach towards weed utilization. *Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures (DJNB)*, 4(1).
- [20] Seney, C. S., Gutzman, B. M., & Goddard, R. H. (2009). Correlation of size and surface-enhanced Raman scattering activity of optical and spectroscopic properties for silver nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(1), 74-80.
- [21] Rivera-Rangel, R. D., González-Muñoz, M. P., Avila-Rodriguez, M., Razo-Lazcano, T. A., & Solans, C. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles in oil-in-water microemulsion and nanoemulsion using geranium leaf aqueous extract as a reducing agent. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 536, 60-67.
- [22] Chandran, S. P., Chaudhary, M., Pasricha, R., Ahmad, A., & Sastry, M. (2006). Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using *Aloe vera* plant extract. *Biotechnology progress*, 22(2), 577-583.
- [23] Selvan, D. A., Mahendiran, D., Kumar, R. S., & Rahiman, A. K. (2018). Garlic, green tea and turmeric extracts-mediated green synthesis of silver nanoparticles: Phytochemical, antioxidant and in vitro cytotoxicity studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 180, 243-252.
- [24] Ibrahim, Y. M., Musa, A., & Yakasai, I. A. (2017). Spectrophotometric method for determination of catechins in green tea and herbal formulations. *Nigerian J. Pharm. Sci.*, 16, 25-30.
- [25] Atomssa, T., & Gholap, A. V. (2015). Characterization and determination of catechins in green tea leaves using UV-visible spectrometer. *Journal of Engineering and Technology Research*, 7(1), 22-31.
- [26] Sharma, R. K., Gulati, S., & Mehta, S. (2012). Preparation of gold nanoparticles using tea: A green chemistry experiment. *Journal of Chemical Education*, 89(10), 1316-1318.
- [27] Pirko, Y., Borovaya, M., Danylenko, I., Kolomys, O., Smertenko, P., Lytvyn, O., ... & Blume, Y. (2021). Eco-friendly Synthesis of Gold Nanoparticles Using *Camellia sinensis* Phytoextracts. *Lett. Appl. NanoBioSci*, 10, 2515-2524.
- [28] Beloglazova, N. V., Sobolev, A. M., Tessier, M. D., Hens, Z., Goryacheva, I. Y., & De Saeger, S. (2017). Fluorescently labelled multiplex lateral flow immunoassay based on cadmium-free quantum dots. *Methods*, 116, 141-148.
- [29] Gao, F., Liu, C., Yao, Y., Lei, C., Li, S., Yuan, L., ... & Yu, C. (2022). Quantum dots' size matters for balancing their quantity and quality in label materials to improve lateral flow immunoassay performance for C-reactive protein determination. *Biosensors and Bioelectronics*, 199, 113892.



---

[30] TEST DEVICE AND METHOD FOR DE 3044385 6/1982 COLORED PARTICLE IMMUNOASSAY, Patent No.: US 6,485,982 B1

[31] Patent : **US2005/0124077**

[32] <https://patents.justia.com/patent/20100330585>

33 Vahabi, K., Mansoori, G. A., & Karimi, S. (2011). Biosynthesis of silver nanoparticles by fungus *Trichoderma reesei* (a route for large-scale production of AgNPs). *Insciencas J.*, 1(1), 65-79.

34 Iravani, S., & Varma, R. S. (2020). Greener synthesis of lignin nanoparticles and their applications. *Green Chemistry*, 22(3), 612-636.



## REVENDICARE

1. Procedeu de sinteza si caracterizare a unor molecule de detectie sintetizate ecologic din ceai verde si utilizate in teste bazate pe tehnica imunocromatografiei in flux lateral pentru detectia markerul cardiac CK-MB, **caracterizat prin aceea ca** are urmatoarele etape:

**1/a) preparare solutie S1** din 1mM de  $\text{HAuCl}_4$  in apa si incalzirea acesteia la 60 °C intr-un pahar Berzelius (fig.1B); **1/b) preparare solutie S2** formata din 100mL de apa si aproximativ 6 grame de ceai verde incalzita la maxim 80 °C timp de 15minute si lasata in repaus acoperita timp de inca 15 minute iar dupa racire se filtreaza si solutia rezultata se caracterizeaza cu spectrometria UV-VIS;**1/c) preparare solutia S3** formata din 100mL de apa deionizata si aproximativ 6 g ceai verde (pliculete) si  $\text{1gNa}_2\text{CO}_3$  si incalzita la maxim 80 °C timp de 15minute si lasata in repaus acoperita timp de inca 15 minute iar dupa racire se caracterizeaza cu Spectrometria UV-VIS; **1/d) solutia S4** formata din solutia S1, incalzire la 60 °C peste care se adauga sub agitare magnetica la 800 RPM 1mL din solutia S2 cand solutia isi schimba culoarea in violet, incalzire timp de 15 minute pana nu se mai schimba culoarea iar dupa racire se caracterizeaza cu metodele : Spectrometria UV-VIS , DLS, XRD si SEM; **1/e) solutia S5** formata din solutia S1, incalzire la 60 °C, peste care se adauga sub agitare magnetica la 800 RPM 250 $\mu\text{L}$  din solutia S3 cand solutia isi schimba culoarea in violet, incalzire timp de 15 minute pana nu se mai schimba culoarea iar dupa racire se caracterizeaza cu metodele : Spectrometria UV-VIS, DLS , XRD, potential zeta si SEM;**1/f) solutia S6** formata prin amestecarea a 10mL din solutia S4 cu 100 $\mu\text{g}$  de anticorp policlonal anti-soarece anti-CK-MB si incubare pentru 30 minute la temperatura camerei, centrifugare la 8500RPM timp de 45 minute, indepartarea supernatantului si resuspendarea peletului intr-un mL de tampon Tris-HCl 0,02M cu 1%BSA, 8% sucroza si 1%Tween, caracterizare cu spectrometria UV-VIS si cu tehnica DLS;**1/g) solutia S7** formata prin amestecarea a 10mL din solutia S5 cu 100 $\mu\text{g}$  de anticorp policlonal anti-soarece anti-CK-MB si incubare pentru 30 minute la temperatura camerei, centrifugare la 8500RPM timp de 45 minute, indepartarea supernatantului si resuspendarea peletului intr-un mL de tampon Tris-HCl 0,02M cu 1%BSA, 8% sucroza si 1%Tween si caracterizare prin Spectrometrie UV-VIS si tehnica DLS;**1/h) solutie martor M** realizata la fel ca solutia S6/S7 dar fara adaugarea de anticorpi policlonal anti-soarece anti-CK-MB caracterizata prin spectrometria UV-VIS; **1/i) membrane de bioconjugate din fibra de sticla** de dimensiuni 30cmx0,7cm tratate prin imersie in 400 $\mu\text{L}$  din solutia S6/S7 formulata cu 0,5% BSA, 1% sucroza si 0,01% Tween, uscare 2h la 40°C si pastrate la o temperatura de 20°C -22°C, umiditate  $\approx$ 25-30% pana la asamblarea testului IFL; **1/j) utilizare membrane de nitroceluloza** taiate in dimensiuni de 2,4cmx30 cm; **1/k) realizare membrane de proba** de dimensiuni 30cmx 2,5 cm, pretratate anterior asamblarii in test prin imersarea in 2mL de solutie de tampon PBS 7,4 cu BSA 0,5%, 1% sucroza si 0,02% tween, lasata sa se usuce 2h la 37°C si apoi introdusa in pungă de aluminiu in care se introduce 5-8 pliculete de silicagel si se videaza pana la asamblarea testului IFL;**1/l)utilizare membrana de absorbtie** de dimensiuni 2,5 cmx30 cm; **1/m)** imersarea membranelor de bioconjugate mici de dimensiuni 30x0,7cm in cate 200  $\mu\text{L}$  de **solutie S7**; **1/n)** asamblarea pe un suport PVC a membranei de nitroceluloza de dimensiune 2,4cm x35 cm, cand se adauga pe mijlocul suportului, dupa indepartarea benzii cu lipici aflata la mijlocul suportului; **1/o)** pregatirea solutiei **S8** pentru linia de test (LT), formata din anticorp de captura Ac1-clona M1202222 (anti CK-MB) in concentrația de 2mg/mL realizate in solutia tampon PBS, pH 7,4 in care s-a introdus BSA 0,25%, sucroza 0,25% si metanol (MeOH) 1,50%; **1/o)** pregatirea solutiei **S9** pentru linia de control (LC) formata din anticorp de captura policlonal, anti-soarece in concentrația de 2mg/mL realizate in solutia tampon PBS, pH 7,4 in care sa- introdus BSA 0,25%, sucroza 0,25% si methanol (MeOH) 1,50%;**1/p)** introducerea solutiei **S8** (LT) intr-un recipient corespunzator locului de depunere pe LT a membrane de nitroceluloza, aparat Agismart RG 1000, Regabio (India) si depunerea solutiei S8 pe membrana de nitroceluloza la 1cm distanta de membrana de bioconjugate;**1/r)**introducerea solutiei S9 in recipientul pentru LC al aparatului de depunere, marca Agismart RG 1000, Regabio (India) si depunerea solutiei S9 pe membrana de nitroceluloza la 0,7 cm de LT;**1/s)** adaugarea membranei



de proba de dimensiune 30cmx 2,5 cm pe cardul PVC, a membranei de absorbtie si a membranei cu bioconjugate impregnata cu solutiile S6/S7;1/t) depunerea solutiilor S8 si S9 din recipientele A si B pe membrana din mijloc (nitroceluloza);1/u) taierea in transversala a unor benzi (stripuri de testare de tip IFL) de dimensiune, 0,4cmX6cm;1/v) pregatirea a 6 concentratii de marker cardiac IMA, CK-MB in solutie de tampon PBS, pH 7,4: 0 ng/mL;5ng/mL; 10ng/mL;40ng/mL;100ng/mL ; 200ng/mL;1/w) adaugarea fiecarei concentratii pe cate un test de tip IFL in zona membrane de proba in volum de 100 $\mu$ L cu concentratiile de CK-MB pregatite anterior;1/x) trecerea fluxului de lichid prin toate membranele in timpul a maxim 15 minute si colorarea in violet a LT si LC proportional, ca intensitate vizuala a culorii, cu concentrația adaugata de biomarker CK-MB ca marturie demonstrarii utilitatii moleculelor de detectie sintetizate in mod ecologic din ceai verde;1/y) aparitia liniei de control in culoare violet ca o marturie a functionarii corecte a testului cu moleculele ecologice de nanoparticule de aur sintetizate din ceai verde.

### Figuri

Fig.1

Fig.2

Fig.3 (a,b)

Fig.4

Fig.5

Fig.6

Fig.7

Fig.8

Fig.9

Fig.10

Fig.11

Fig.12

Fig.13

Fig.14



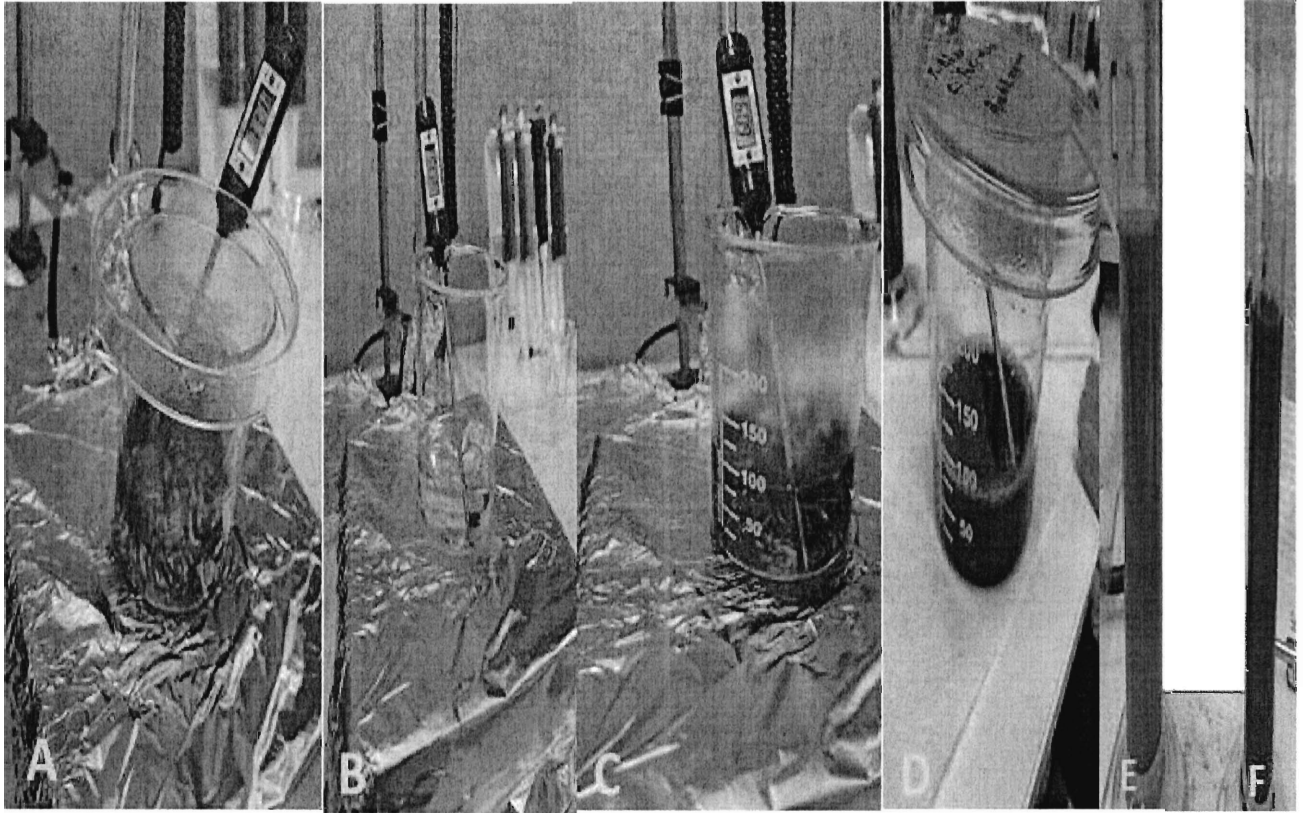


Fig.1





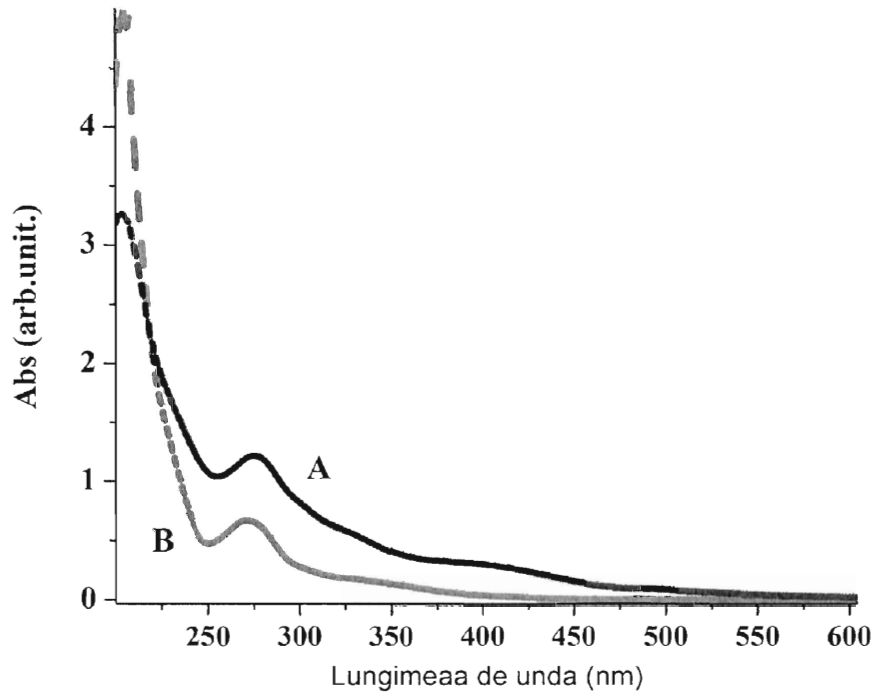


Fig. 2



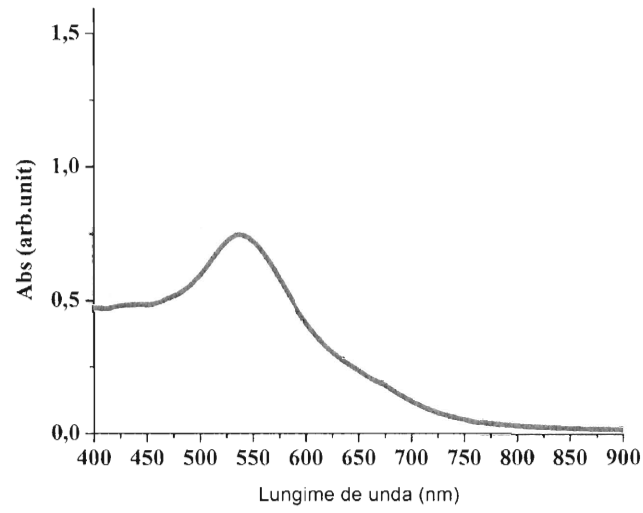


Fig.3a



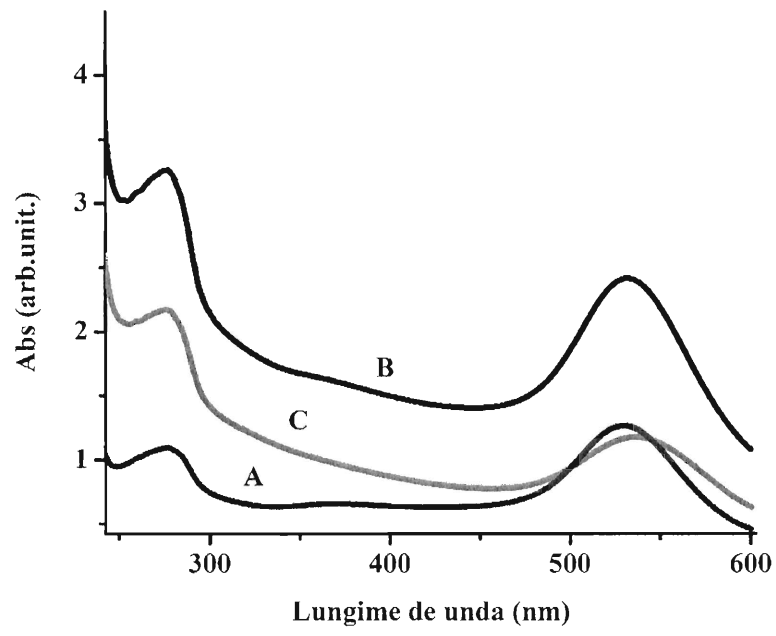


Fig. 3b



68

**Analysis Results**

Zeta Potential	: -18.93	(mV)	Zeta Potential of Cell (Upper)	: -36.05	(mV)
Mobility	: -1.475e-004	(cm <sup>2</sup> /Vs)	Zeta Potential of Cell (Lower)	: -14.06	(mV)
Conductivity	: 1.2275	(mS/cm)	Base Frequency	: 122.7	(Hz)

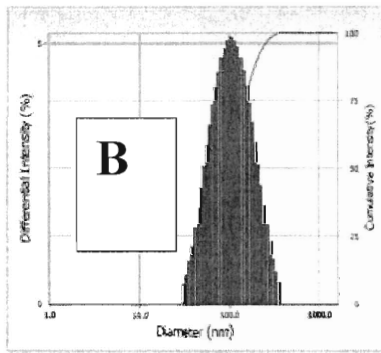
**Analysis Parameters**

Lorentz Fitting	: 1 peak
Conversion Equation	: Smoluchowski

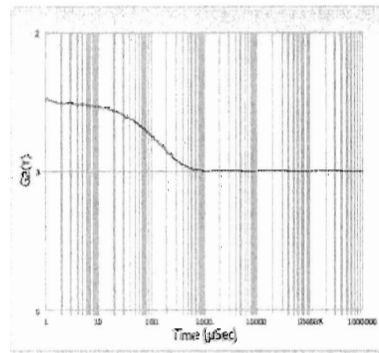


Version 3.73 / 2.30

Intensity Distribution



ACF



**Distribution Results (Contin)**

Peak	Diameter (nm)	Std. Dev.
1	121.5	65.2
2	0.0	0.0
3	0.0	0.0
4	0.0	0.0
5	0.0	0.0
Average	121.5	65.2
Residual :	1.863e-003	(O.K)

**Cumulants Results**

Diameter (d)	: 93.4	(nm)
Polydispersity Index (P.I.)	: 0.206	
Diffusion Const. (D)	: 5.267e-008	(cm <sup>2</sup> /sec)
Molecular Weight	: 3.605e+008	
<b>Measurement Condition</b>		
Temperature	: 25.0	(°C)
Diluent Name	: WATER	
Refractive Index	: 1.3328	
Viscosity	: 0.8878	(cP)
Scattering Intensity	: 29452	(cps)
Attenuator 1	: 77.77	(%)

Fig.4

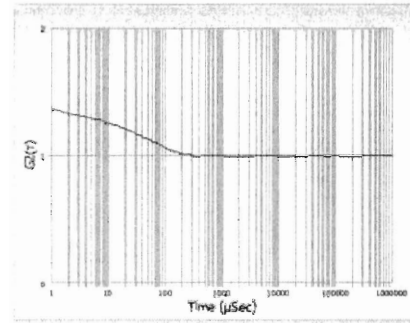
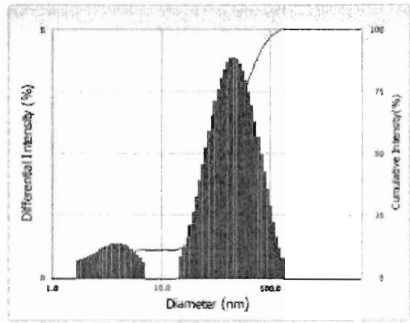


67

Version 3.73 / 2.30

Intensity Distribution

ACF



Distribution Results (Contin)

Peak	Diameter (nm)	Std. Dev.
1	3.7	1.4
2	50.8	24.4
3	0.0	0.0
4	0.0	0.0
5	0.0	0.0
Average	45.4	27.4
Residual :	1.694e-003	(O.K)

Cumulants Results

Diameter (d)	: 31.5	(nm)
Polydispersity Index (P.I.)	: 0.329	
Diffusion Const. (D)	: 1.557e-007	(cm <sup>2</sup> /sec)
Molecular Weight	: 4.124e+007	
Measurement Condition		
Temperature	: 24.9	(°C)
Diluent Name	: WATER	
Refractive Index	: 1.3328	
Viscosity	: 0.8898	(cP)
Scattering Intensity	: 30462	(cps)
Attenuator 1	: 9.07	(%)

Fig. 5



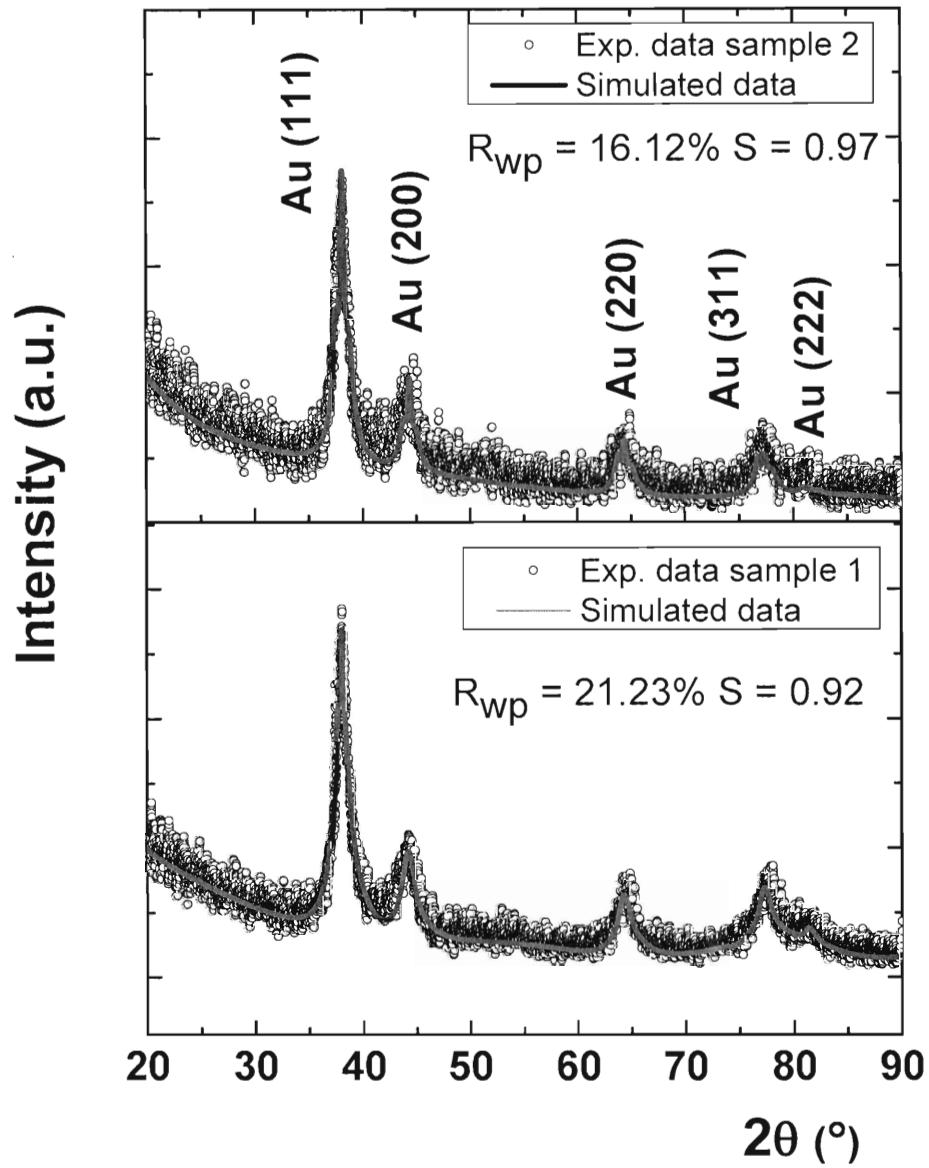


Fig. 6



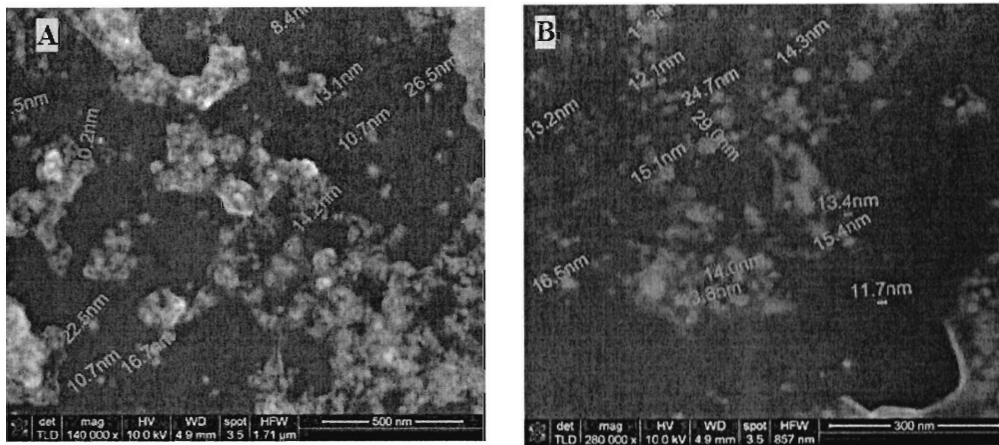


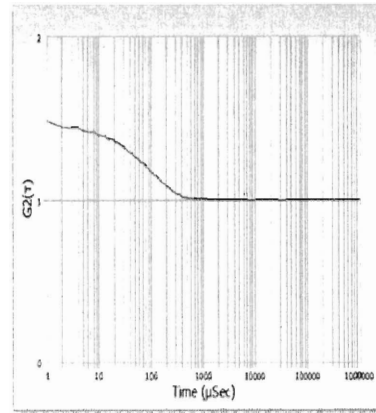
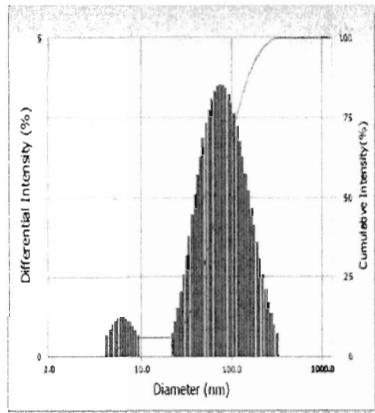
Fig.7



Version 3.73 / 2.30

Intensity Distribution

ACF



Distribution Results (Contin)			Cumulants Results		
Peak	Diameter (nm)	Std. Dev.	Diameter (d)	: 63.2	(nm)
1	6.5	1.5	Polydispersity Index (P.I.)	: 0.293	
2	97.8	59.1	Diffusion Const. (D)	: 7.797e-008	(cm <sup>2</sup> /sec)
3	0.0	0.0	Molecular Weight	: 1.645e+008	
4	0.0	0.0	Measurement Condition		
5	0.0	0.0	Temperature	: 25.1	(°C)
Average	92.5	61.2	Diluent Name	: WATER	
Residual :	2.227e-003	(O.K)	Refractive Index	: 1.3328	
			Viscosity	: 0.8858	(cP)
			Scattering Intensity	: 30561	(cps)
			Attenuator 1	: 6.52	(%)

Fig. 8



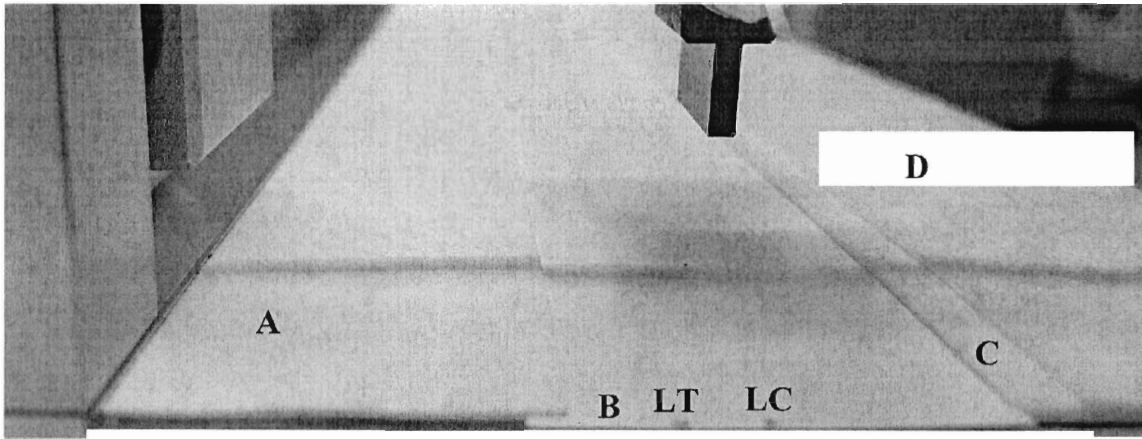


Fig. 9



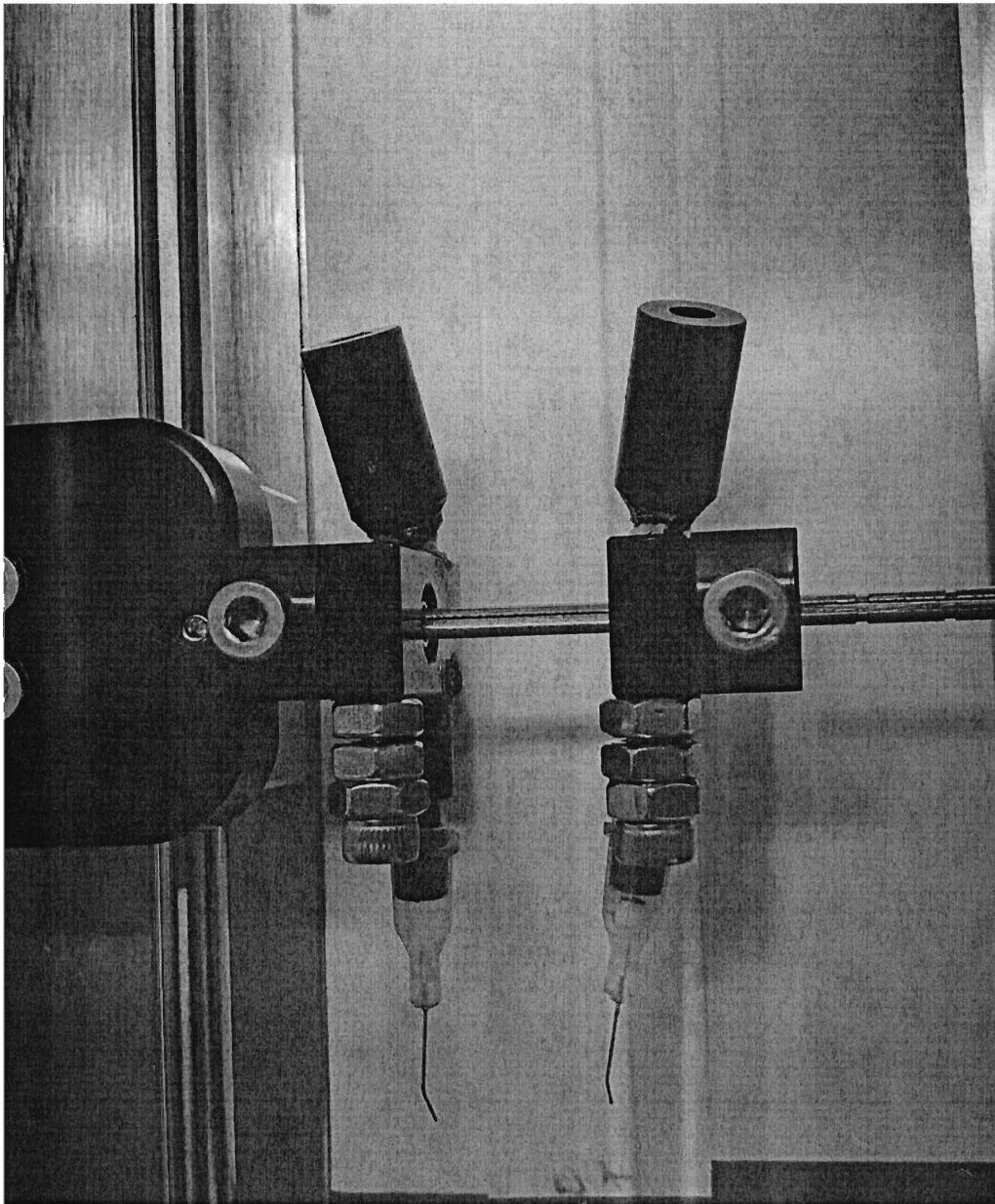


Fig. 10



Fig.11



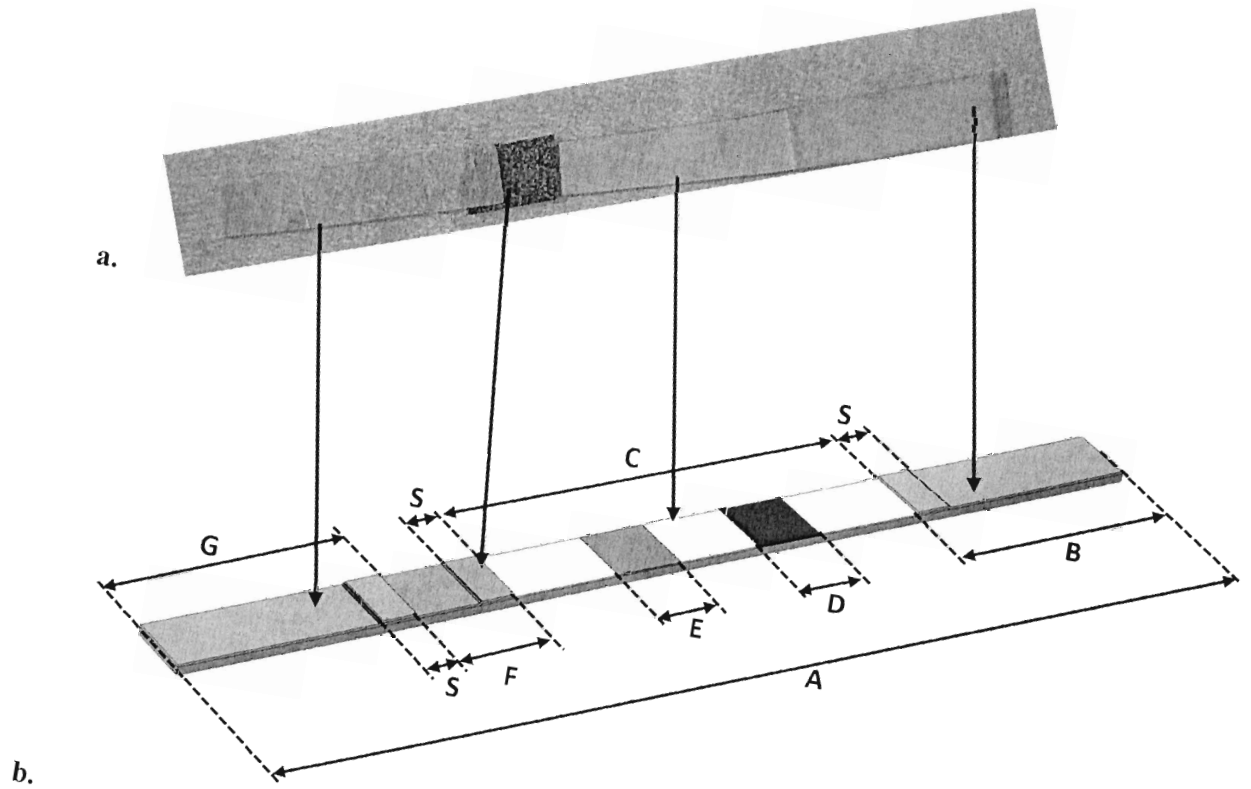


Fig. 12





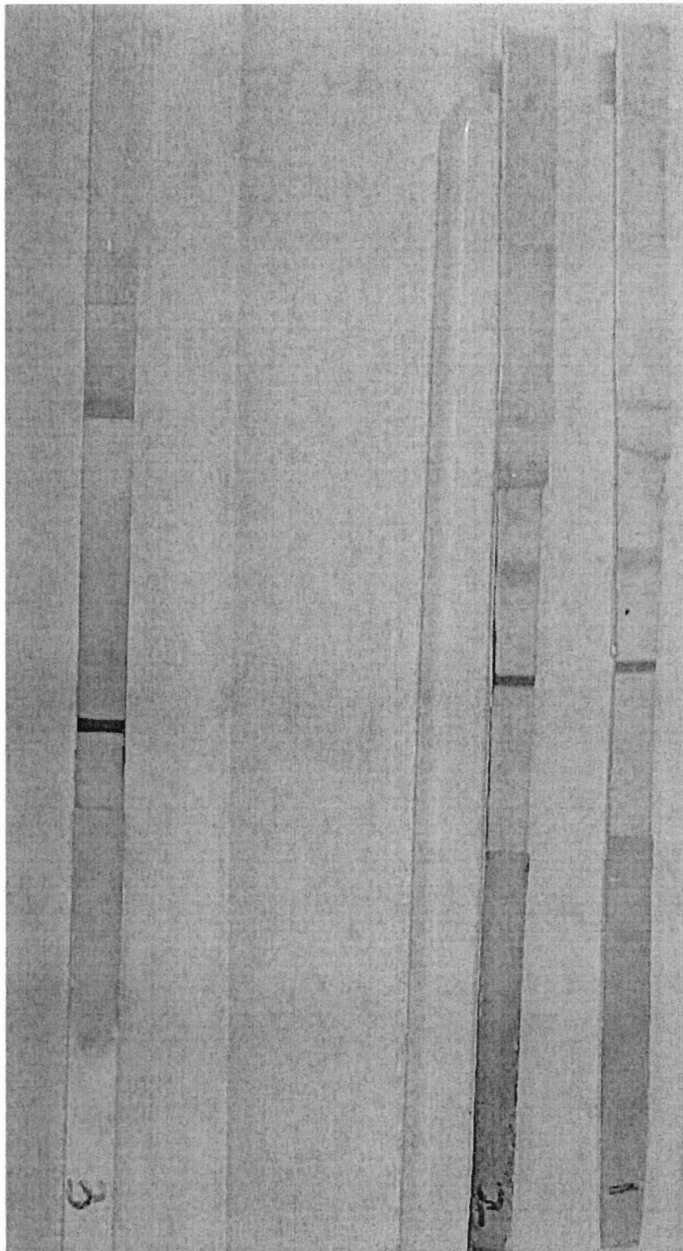


Fig. 13



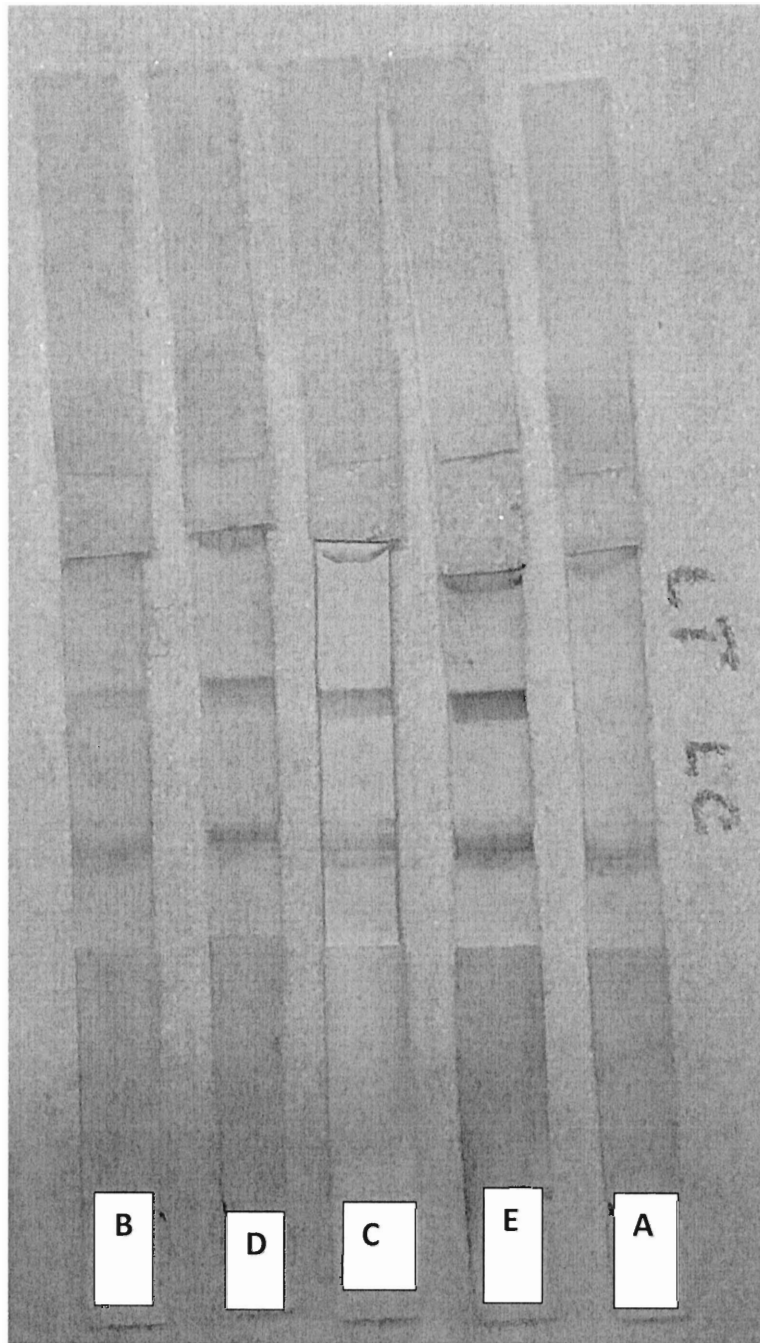


Fig.14.