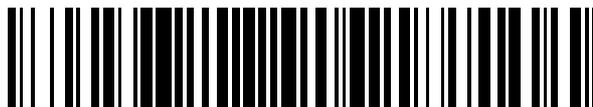


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 186**

21 Número de solicitud: 201130447

51 Int. Cl.:

**B22F 9/16** (2006.01)

**C09K 11/06** (2006.01)

**G01N 33/52** (2006.01)

**B82Y 40/00** (2011.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**25.03.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**24.10.2012**

Fecha de la concesión:

**02.09.2013**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**12.09.2013**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE (50.0%)  
CTRA. DE UTRERA, KM. 1, EDIFICIO FRANCISCO  
DE MIRANDA Nº 9  
41013 SEVILLA (Sevilla) ES y  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ZADERENKO PARTIDA, Ana Paula;  
CARO SALAZAR, Carlos;  
MEJÍAS ROMERO, José Antonio y  
SAYAGUÉS DE VEGA, María Jesús**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS FUNCIONALIZADAS  
CON MOLÉCULAS ORGÁNICAS FLUORESCENTES**

57 Resumen:

Procedimiento de obtención de nanopartículas metálicas funcionalizadas con moléculas orgánicas fluorescentes.

La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de nanopartículas metálicas funcionalizadas con moléculas orgánicas fluorescentes mediante el tratamiento de una o más sales metálicas con un agente reductor en presencia de una molécula orgánica fluorescente. La invención se refiere también a las nanopartículas metálicas obtenibles por dicho procedimiento y a su uso para la detección de moléculas y analitos.

ES 2 389 186 B1

## DESCRIPCIÓN

**PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS  
FUNCIONALIZADAS CON MOLÉCULAS ORGÁNICAS FLUORESCENTES****CAMPO DE LA TÉCNICA**

5 La presente invención se refiere a nanopartículas metálicas con propiedades fluorescentes, a un método para la preparación de las mismas y a sus usos.

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

10 La detección mediante técnicas de fluorescencia constituye la base de la mayoría de los ensayos biológicos actualmente disponibles. No obstante, la detección fluorescente a nivel molecular presenta serias limitaciones derivadas del uso de fluoróforos orgánicos, tales como una baja relación señal/ruido, la baja fotoestabilidad de los fluoróforos y su elevada fotointermitencia (en inglés “photoblinking”).

15 A lo largo de la última década se está realizando un gran esfuerzo por encontrar alternativas a la utilización de moléculas orgánicas fluorescentes, que ofrezcan una solución aceptable a las limitaciones que presentan estas moléculas. En este sentido, las nanopartículas semiconductoras o puntos cuánticos (en inglés “Quantum Dots” (QD)), poseen rendimientos cuánticos similares a los de los fluoróforos orgánicos pero mayores coeficientes de extinción y mayor fotoestabilidad [Gao, X.; Yang, L.; Petros, J.A., Curr. Opin. Biotechnol. 2005, 16, 63–72]. Aunque los QD son muy prometedores en  
20 aplicaciones biológicas [Fernandez-Arguelles, M.T.; Costa-Fernandez, J.M.; Pereiro, R.; Sanz-Medel, A., Analyst. 2008, 133, 444-447; Xue, X.; Pan, J.; Xie, H.; Wang, J.; Zhang, S., Talanta 2009, 77, 1808-1813; Ishihama, Y.; Funatsu, T., Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009, 381, 33–38; Yong, K.T.; Roy, I.; Ding, H.; Bergey, E.J.; Prasad, P.N., Small. 2009, 5, 1997–2004; Bentolila, L.A.; Ebenstein, Y.; Weiss, S. J., Nucl. Med. 2009, 50, 493–496; Gill, R.; Zayats, M.; Willner, I., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2008, 47, 7602–7625], presentan también serias desventajas debidas a sus propiedades  
25 superficiales, tales como la necesidad de utilizar disolventes orgánicos en su síntesis, la complejidad de su síntesis, su baja estabilidad en agua, su difícil funcionalización o su unión inespecífica a biomoléculas. Además de sus desfavorables propiedades  
30 superficiales, otro problema que presentan los QD en aplicaciones in vivo es su elevada toxicidad [Drummen, P.C., Int. J. Mol. Sci. 2010, 11, 154-163; Singh, N.; Manshian, B.; Jenkins, G.J.; Griffiths, S.M.; Williams, P.M.; Maffei, T.G.; Wright, C.J.; Doak, S.H.,

Biomaterials. 2009, 30, 3891–3914; Lewinski, N.; Colvin, V.; Drezek, R. Small. 2008, 4, 26–49; Hsieh, M.S.; Shiao, N.H.; Chan, W.H. Int. J. Mol. Sci. 2009, 10, 2122–2135; Roiter, Y.; Ornatska, M.; Rammohan, A.R.; Balakrishnan, J.; Heine, D.R.; Minko, S., Langmuir 2009, 25, 6287–6299; Chen, J.; Hessler, J.A.; Putchakayala, K.; Panama, B.K.; Khan, D.P.; Hong, S.; Mullen, D.G.; Dimaggio, S.C.; Som, A.; Tew, G.N.; Lopatin, A.N.; Baker, J.R.; Holl, M.M.; Orr, B.G., J. Phys. Chem. B. 2009, 113, 11179–11185]. Por otra parte, este tipo de nanopartículas no permite la detección mediante espectroscopias vibracionales amplificadas en superficie, quedando limitado su uso a la detección por fluorescencia.

10 Se sabe que las nanopartículas metálicas interaccionan con fluoróforos cercanos a su superficie afectando a la intensidad de su emisión, ya sea disminuyéndola o aumentándola. Cuando esta interacción conduce a un aumento de la fluorescencia, el efecto se conoce como Fluorescencia Amplificada por el Metal (“Metal Enhanced Fluorescence”, MEF). El efecto MEF se puede explicar por la confluencia de dos  
15 mecanismos, por un lado, el aumento de los campos electromagnéticos incidentes asociado a la nanopartícula metálica conduce a un aumento en la emisión del fluoróforo, de forma similar a lo que sucede en el efecto SERS (Espectroscopia Raman Amplificada en Superficie). Por otra parte, la interacción del fluoróforo con el plasmón de superficie de las nanopartículas conduce a un aumento de las velocidades de  
20 decaimiento, tanto radiativa como no radiativa, y, consecuentemente, al aumento del rendimiento cuántico y la disminución del tiempo de vida [Lakowicz, J.R.; Gryczynski, I.; Malicka, J.; Gryczynski, Z.; Geddes, C.D., J. Fluores. 2002, 12, 299-302; Lakowicz, J. R., Analytical Biochem. 2005, 337, 171-194; Cade, N. I.; Ritman-Meer, T.; Kwakwa K. A.; Richards, D., Nanotechnology 2009, 20, 285201-285206]. Adicionalmente, y  
25 debido a la disminución del tiempo de vida, la fotoestabilidad del fluoróforo aumenta [Lakowicz, J.R.; Shen, Y.; D’Auria, S.; Malicka, J.; Fang, J.; Gryczynski, Z.; Gryczynski, I., Analytical Biochem. 2002, 301, 261-277; Lakowicz, J.R.; Malicka, J.; D’Auria, S.; Gryczynski, I., Analytical Biochem. 2003, 320, 13-20; Lukomska, J.; Malicka, J.; Gryczynski, I.; Lakowicz, J. R., J. Fluores. 2004, 14, 417-423]. Algunos de  
30 los factores que afectan la obtención de efecto MEF son: la naturaleza del metal, la distancia nanopartícula-fluoróforo, el estado de agregación de las nanopartículas, y el solapamiento espectral existente entre el plasmón de superficie de las nanopartículas y la emisión del fluoróforo [Huang, T.; Murray, R.W., Langmuir 2002, 18, 7077–7081;

Kühn, S.; Håkanson, U.; Rogobete, L.; Sandoghdar, V., Phys. Rev. Lett. 2006, 97, 17402-17405; Anger, P.; Bharadwaj, P.; Novotny, L., Phys. Rev. Lett. 2006, 96, 113002-113003; Zhang, J.; Malicka, J.; Gryczynski, I.; Lakowicz, J. R., Analytical Biochem. 2004, 330, 81-86; Zhang, J.; Fu, Y.; Chowdhury, M. H.; Lakowicz, J. R.,  
5 Nano Lett. 2007, 7, 2101-2107; Chen, Y.; Munechika, K.; Ginger, D. S., Nano Lett. 2007, 7, 690-696].

La distancia entre el fluoróforo y la superficie de la nanopartícula resulta crítica. En este sentido, se ha descrito que la fluorescencia de un fluoróforo se desactiva cuando la distancia al metal es demasiado corta (Anger, P.; Bharadwaj, P.; Novotny, L., Phys.  
10 Rev. Lett. 2006, 96, 113002-113003; Principles of nano-optics, L. Novotny, B. Hecht, Cambridge University Press., p. 346). La distancia ideal nanopartícula-metal se encuentra en el rango de 4-10 nm, haciendo necesario el uso de espaciadores en la conjugación fluoróforo-nanopartícula para obtener esta distancia, lo que dificulta la funcionalización de las nanopartículas con el fluoróforo, ya que se requiere una síntesis  
15 en varias etapas y la modificación química del fluoróforo.

Existe, por tanto, la necesidad de disponer de nuevos agentes fluorescentes, estables en medio acuoso, biocompatibles, fácilmente funcionalizables con moléculas y biomoléculas de interés, y que se puedan utilizar en ensayos de detección mediante técnicas de fluorescencia, así como de procedimientos más sencillos que permitan  
20 obtener dichos agentes fluorescentes.

### **OBJETO DE LA INVENCION**

El problema técnico al que se enfrenta la presente invención es la obtención de nanopartículas metálicas funcionalizadas con moléculas orgánicas fluorescentes, en las  
25 que el fluoróforo no se desactive por la proximidad del metal, que sean estables en medio acuoso, susceptibles de ser funcionalizadas con otras moléculas de interés (por ejemplo anticuerpos para aplicaciones biomédicas) y biocompatibles. Además, estas nanopartículas preferiblemente deben poder ser detectadas por otras técnicas diferentes a la fluorescencia, en concreto UV-Vis, IR y Raman.

30 La presente invención establece un método sencillo de obtención, en una sola etapa, de nanopartículas metálicas con propiedades fluorescentes a partir de disoluciones de sales metálicas, tales como sales de plata, oro, cobre, aluminio, platino, cobalto y paladio, mediante tratamiento en medio acuoso con un agente reductor en

presencia de una molécula orgánica fluorescente. La invención se dirige también a las nanopartículas metálicas obtenibles por dicho procedimiento y a su uso como biomarcadores.

A diferencia de los métodos habituales de síntesis, en la presente invención se  
5 adiciona el fluoróforo al medio acuoso en el que se lleva a cabo la reducción. Según se ha comentado previamente, al no utilizar espaciadores para unir el fluoróforo a la nanopartícula, era esperable que el fluoróforo se desactivase al absorberse directamente sobre la superficie de la nanopartícula. Sin embargo, sorprendentemente, los inventores han encontrado que la adición al medio de reducción del fluoróforo conduce a  
10 nanopartículas funcionalizadas en las que el fluoróforo no resulta desactivado.

Adicionalmente, los inventores también observaron que la presencia de la molécula orgánica fluorescente durante el proceso de reducción conduce a nanopartículas estables. Por el contrario, si la molécula fluorescente se añade posteriormente sobre las nanopartículas metálicas ya preparadas, lo que se obtienen son  
15 nanopartículas inestables que se agregan (Figura 5).

Por otro lado, se pueden incorporar polímeros que también quedan unidos a la superficie de la nanopartícula. Dichos polímeros se pueden adicionar bien al medio de reducción, conjuntamente al fluoróforo, o se pueden incorporar posteriormente, una vez formadas las nanopartículas metálicas. Estos polímeros hacen a las nanopartículas más  
20 estables en medio acuoso y les proporcionan una primera capa orgánica dotada de grupos funcionales adecuados para posteriores procesos de funcionalización.

Además de la sencillez de su síntesis, y las posibilidades de funcionalización que ofrecen estas nanopartículas, cabe destacar que poseen tanto las propiedades ventajosas características de las nanopartículas metálicas (intenso plasmón de superficie en el  
25 visible, capacidad de ser detectadas mediante espectroscopias amplificadas en superficie) como las de los QD (intensa fluorescencia).

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

Por el término “nanopartícula” se entiende una estructura con un tamaño medio  
30 de partícula inferior a 1  $\mu\text{m}$ , y generalmente comprendido entre 1 y 100 nm.

Un aspecto de la presente invención es un nuevo procedimiento de obtención de nanopartículas metálicas funcionalizadas con moléculas orgánicas fluorescentes que

comprende tratar una o más sales metálicas con un agente reductor capaz de reducir el catión de la sal metálica al estado metálico, en medio acuoso y en presencia de una molécula orgánica fluorescente.

En una realización de la presente invención, el procedimiento de obtención de nanopartículas metálicas funcionalizadas con moléculas orgánicas fluorescentes comprende las siguientes etapas:

- (a) Preparar una disolución acuosa que comprende una o más sales metálicas y una molécula orgánica fluorescente,
- (b) Mezclar el agente reductor capaz de reducir el catión de la sal metálica al estado metálico, opcionalmente en forma de una disolución acuosa que comprende dicho agente reductor, con la disolución de la etapa (a),
- (c) Opcionalmente recolectar las nanopartículas.

Cuando la molécula orgánica fluorescente no es soluble en agua, ésta se puede disolver previamente en un disolvente orgánico miscible con agua, para formar la disolución de la etapa (a). Por tanto, en una realización particular, la disolución de la etapa (a) puede comprender además un disolvente orgánico miscible con agua, preferiblemente un alcohol, como por ejemplo, metanol, etanol, propanol o butanol, o acetona. De acuerdo con una realización de la invención, cuando la molécula orgánica fluorescente es fluoresceína, ésta se disuelve previamente en etanol antes de formar la disolución de la etapa (a).

En una realización de la presente invención, el procedimiento se realiza a una temperatura entre 0 y 100°C, preferiblemente entre 0 y 80°C, más preferiblemente entre 0 y 60°C, aún más preferiblemente entre 0 y 40 °C.

En otra realización de la presente invención, el procedimiento se realiza a una temperatura entre 0 y 30°C, preferiblemente entre 0 y 10°C, más preferiblemente entre 0 y 4°C.

En una realización particular, las sales metálicas se seleccionan del grupo que comprende sales de plata, oro, cobre, aluminio, platino, cobalto y paladio. Preferiblemente, del grupo que comprende sales de oro o plata. Más preferiblemente,  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{HAuCl}_4$  o sus hidratos, tal como  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ .

Los agentes reductores capaces de reducir el catión de la sal metálica al estado metálico útiles para reducir las sales metálicas son conocidos para el experto en la materia (Bradley, J. S., Schmid, G., Talapin, D. V., Shevchenko, E. V. and Weller, H.

(2005) Syntheses and Characterizations: 3.2 Synthesis of Metal Nanoparticles, in Nanoparticles: From Theory to Application (ed G. Schmid), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG. doi: 10.1002/3527602399.ch3b. ISBN: 9783527305070). De forma particular, se pueden emplear como agentes reductores  
5 hidruros, citratos, alcoholes, polímeros reductores, hidracina, hidroxilamina o sus derivados y mezclas de los mismos. En una realización particular, el agente reductor se selecciona entre  $\text{NaBH}_4$ , citrato sódico, preferiblemente  $\text{NaBH}_4$ , citrato trisódico, hidroxilamina, polivinilpirrolidona (PVP) y sus mezclas.

Las moléculas orgánicas fluorescentes son aquellas capaces de emitir luz  
10 fluorescente cuando se iluminan con una radiación de la longitud de onda adecuada. Ejemplos de moléculas orgánicas fluorescentes son conocidas y el experto en la materia puede encontrarlas en documentos de referencia como, por ejemplo, "Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity. A Practical Guide to Technology for Quantitative Real-Time Analysis", 2ª Ed. W. T. Mason, Ed. Academic Press (1999). En  
15 una realización particular, la molécula orgánica fluorescente se selecciona entre fluoresceína, rodaminas, cumarinas, azul de metileno, azul Cascade, naranja de metilo, amarillo Lucifer, boro-dipirrometano y mezclas de los mismos. Preferiblemente, la molécula orgánica fluorescente se selecciona entre Rodamina 6G, fluoresceína y 3-hidroxycumarina.

20 En otra realización particular la molécula orgánica fluorescente es un colorante, como por ejemplo azul de metileno, azul Cascade, naranja de metilo, etc., obteniéndose nanopartículas metálicas que presentan, además de la emisión debida al plasmón de superficie, una fuerte emisión debida al colorante conjugado a la nanopartícula.

En una realización de la presente invención, la concentración de la molécula  
25 fluorescente en la disolución acuosa de la etapa (a) definida anteriormente se encuentra en un intervalo entre  $10^{-1}$  y  $10^{-6}$  M, preferiblemente entre  $10^{-2}$  y  $10^{-5}$  M, más preferiblemente entre  $10^{-2}$  y  $10^{-4}$  M, aún más preferiblemente entre  $0,8 \cdot 10^{-3}$  M y  $1,2 \cdot 10^{-3}$  M.

Aunque las nanopartículas obtenidas son estables en medio acuoso, es posible  
30 aumentar aún más su estabilidad mediante la adición de polímeros. Además, estos polímeros proporcionan a las nanopartículas una primera capa orgánica dotada de grupos funcionales adecuados para posteriores procesos de funcionalización. Por lo tanto, de acuerdo con una realización particular, las nanopartículas metálicas obtenidas

mediante el procedimiento de la invención se recubren con un polímero. En una realización particular, la obtención de las nanopartículas metálicas funcionalizadas con una molécula orgánica fluorescente y la etapa de recubrimiento con un polímero se realizan en un procedimiento one-pot, es decir, el polímero se añade a la disolución acuosa obtenida tras adición del agente reductor sin aislamiento previo de las nanopartículas obtenidas tras la etapa de reducción.

En una realización de la presente invención, el procedimiento de obtención de nanopartículas metálicas funcionalizadas con moléculas orgánicas fluorescentes comprende las siguientes etapas:

- 10 (a) Preparar una disolución acuosa que comprende una o más sales metálicas y una molécula orgánica fluorescente,
- (b) Mezclar el agente reductor capaz de reducir el catión de la sal metálica al estado metálico, opcionalmente en forma de una disolución acuosa que comprende dicho agente reductor, a la disolución obtenida en la etapa (a),
- 15 (c) Adicionar un polímero, opcionalmente disuelto en agua, a la mezcla resultante de la etapa (b),
- (d) Opcionalmente recolectar las nanopartículas.

De acuerdo con otra realización de la presente invención, el polímero forma parte de la disolución acuosa inicial junto con la una o más sales metálicas y la molécula orgánica fluorescente. Por tanto, en una realización de la presente invención, el procedimiento de obtención de nanopartículas metálicas funcionalizadas con moléculas orgánicas fluorescentes comprende las siguientes etapas:

- (a) Preparar una disolución acuosa que comprende una o más sales metálicas, una molécula orgánica fluorescente y un polímero,
- 25 (b) Mezclar un agente reductor capaz de reducir el catión de la sal metálica al estado metálico, opcionalmente en forma de una disolución acuosa que comprende dicho agente reductor, a la disolución obtenida en la etapa (a),
- (c) Opcionalmente recolectar las nanopartículas.

En este caso, cuando el polímero está presente en la disolución durante la etapa de reducción, las nanopartículas resultantes son aún más estables que cuando el polímero se adiciona sobre las nanopartículas ya obtenidas tras la etapa de reducción.

En la presente invención, el término "polímero" incluye oligómeros y tanto homopolímeros como copolímeros, y puede seleccionarse entre polímeros naturales y

sintéticos. En una realización particular, el polímero empleado es un polímero biocompatible. El término polímero biocompatible se refiere a polímero formado por un material biocompatible, es decir que no presenta toxicidad ni induce reacciones adversas en sistemas biológicos. En una realización, el polímero biocompatible se  
5 selecciona entre el grupo formado por polisacáridos, tales como dextrano, pectina, carrageno, quitosano o derivados de los mismos; ciclodextrinas; celulosa o derivados de celulosa; almidón o derivados de almidón; polivinilpirrolidona; polietilenglicol; polímeros de ácido láctico y glicólico así como sus copolímeros; y mezclas de los mismos. Preferiblemente se emplean polivinilpirrolidona (PVP) y polietilenglicol  
10 (PEG).

Como polivinilpirrolidona se emplean preferiblemente los polímeros con peso molecular medio superior a 12.000 Da, más preferiblemente superior a 20.000 Da y más preferiblemente entre 27.000 y 60.000 Da.

15 En otra realización de la invención las nanopartículas obtenidas se recolectan, preferiblemente mediante centrifugación, y opcionalmente se purifican. La purificación de las nanopartículas se puede llevar a cabo mediante procesos de lavado/centrifugación en un disolvente adecuado, preferiblemente agua, o mediante diálisis.

20 Otro aspecto de la presente invención se dirige a las nanopartículas metálicas funcionalizadas con moléculas orgánicas fluorescentes obtenibles mediante cualquiera de los procedimientos anteriormente descritos.

Las nanopartículas de la presente invención se pueden detectar por fluorescencia. En una realización particular, las nanopartículas se pueden detectar  
25 también por UV-Vis, IR y/o Raman.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de las nanopartículas metálicas funcionalizadas con moléculas orgánicas fluorescentes obtenibles mediante los procedimientos anteriormente descritos, para la detección de moléculas o analitos, tales como células, virus, bacterias, proteínas, enzimas, péptidos, aminoácidos, ácidos  
30 nucleicos, nucleótidos, hidratos de carbono, anticuerpos, antígenos, fármacos o similares. Preferiblemente, la detección se realiza mediante técnicas de fluorescencia o espectroscopias vibracionales amplificadas en superficie.

### Explicación detallada de las figuras

Figura 1. Espectro de fluorescencia de nanopartículas de plata funcionalizadas con rodamina 6G (a) y fluoresceína (b), obtenidas según el Ejemplo 2, registrado en un fluorímetro Ocean Optics USB2000+.

5            Figura 2. Espectros UV-Visible, obtenidos con un espectrómetro Ocean Optics equipado con un detector HR4000, de las nanopartículas de plata funcionalizadas con PVP (a), nanopartículas de plata funcionalizadas con rodamina 6G y PVP (b), obtenidas según el Ejemplo 2, y nanopartículas de plata funcionalizadas con fluoresceína y PVP (c), obtenidas según el Ejemplo 1.

10           Figura 3. Espectro de IR de nanopartículas (a) de plata obtenidas por reducción de nitrato de plata con  $\text{NaBH}_4$  en medio acuoso, (b) de plata obtenidas según el Ejemplo 2. Los espectros se han registrado en un espectrómetro FTIR Bruker IFS 66/s, con una resolución de  $2 \text{ cm}^{-1}$  y 100 scans.

              Figura 4. Caracterización microestructural de las nanopartículas del Ejemplo 2.  
 15 (a) Imagen de microscopía electrónica de transmisión y (b) su correspondiente diagrama de difracción de electrones de las nanopartículas de plata funcionalizadas con rodamina 6G y protegidas con PVP durante la síntesis (Ejemplo 2 de esta memoria). En la micrografía se puede apreciar el carácter nanométrico de las nanopartículas, con un tamaño comprendido entre 25 y 50 nm, y forma en la mayoría de ellas facetada,  
 20 apreciándose claramente las aristas. También se observa la capa del material amorfo de aprox. 10 nm que rodea las nanopartículas de plata. En el diagrama de difracción de electrones se aprecia el carácter nanocristalino, todos los anillos de difracción se han asignado a planos (*hkl*) correspondientes a la plata metálica (marcados en la figura). La imagen TEM se ha obtenido en un microscopio electrónico de transmisión Philips  
 25 CM200 con filamento de  $\text{LaB}_6$  (resolución puntual de 0,3 nm) y voltaje de aceleración de 200 kV.

              Figura 5. Comparación entre la estabilidad de la nanopartículas de la invención y la de nanopartículas a las que la molécula orgánica fluorescente y el polímero se les  
 añade tras su síntesis. **1:** Nanopartículas de plata sintetizadas por reducción de nitrato de  
 30 plata con  $\text{NaBH}_4$  en medio acuoso. **2:** Nanopartículas de plata sintetizadas por reducción de nitrato de plata con  $\text{NaBH}_4$  en medio acuoso, tras adicionar rodamina 6G y PVP en las mismas concentraciones que el ejemplo 2 de la presente solicitud. Las nanopartículas 2 no resultan estables, formando agregados (la flecha en la figura señala

uno de estos agregados). **3:** Nanopartículas obtenidas según el método descrito en el ejemplo 2 de la memoria.

### **EJEMPLOS**

5

#### Ejemplo 1. Síntesis de nanopartículas de plata funcionalizadas con rodamina 6G y protegidas con PVP tras su síntesis

Se disuelven 3,4 mg de nitrato de plata (concentración final 1 mM) en 20 mL de una disolución acuosa de rodamina 6G ( $10^{-3}$  M). A la disolución resultante se le  
10 adicionan, gota a gota y en baño de hielo, 4 mL de una disolución acuosa de  $\text{NaBH}_4$  (10mM). Una vez obtenidas las nanopartículas, se adicionan 100  $\mu\text{L}$  de una disolución acuosa de PVP (1,4 mM; peso molecular promedio PVP: 29.000 g/mol) y se someten a procesos sucesivos de lavado/centrifugación con agua Milli-Q.

#### 15 Ejemplo 2. Síntesis de nanopartículas de plata funcionalizadas con rodamina 6G y protegidas con PVP durante la síntesis

Se disuelven 3,4 mg de nitrato de plata (concentración final 1 mM) en 20 mL de una disolución acuosa de rodamina 6G ( $10^{-3}$  M) y PVP (5% en peso). A la disolución resultante se le adicionan, gota a gota y en baño de hielo, 4 mL de una disolución  
20 acuosa de  $\text{NaBH}_4$  (10mM). Finalizada la adición, se purifican las nanopartículas obtenidas por procesos sucesivos de lavado/centrifugación con agua Milli-Q, seguidos de diálisis frente a agua Milli-Q.

En las Figuras 1 y 2 se muestran los espectros de fluorescencia y UV-Vis, respectivamente, de las nanopartículas obtenidas, así como los espectros de  
25 nanopartículas obtenidas según el Ejemplo 2, utilizando en la preparación fluoresceína en lugar de rodamina 6G.

En la Figura 3 se muestra el espectro de IR de las nanopartículas obtenidas en el ejemplo de realización 2 (Fig. 3b), en comparación con el espectro de las correspondientes nanopartículas metálicas sin funcionalizar ni proteger durante el  
30 proceso de síntesis (Fig. 3a). Como se aprecia en la figura, las nanopartículas del ejemplo presentan bandas características de rodamina 6G y PVP.

En la Figura 4 se muestra la caracterización por microscopía electrónica de transmisión de las nanopartículas.

Según se muestra en la Figura 5, las nanopartículas obtenidas por este procedimiento son estables (**3**). Sin embargo, las nanopartículas obtenidas mediante un procedimiento similar, pero adicionando rodamina 6G y PVP después de la formación de las nanopartículas metálicas, no son estables lo que da lugar a la aparición de agregados de gran tamaño (**2**). La formación de los agregados también se pone de manifiesto en la desaparición de la banda del plasmón de las nanopartículas en el espectro UV-Visible. Por el contrario, ni las nanopartículas **1** ni las **3** agregan, presentando bandas de plasmón de superficie en los correspondientes espectros UV-Visible.

Ejemplo 3. Síntesis de nanopartículas de plata funcionalizadas con rodamina 6G y protegidas con PVP durante la síntesis, utilizando como agente reductor la PVP

A 10 mL de una disolución acuosa de rodamina 6G ( $10^{-3}$  M) y PVP (10% en peso), previamente calentada a 65°C, se añaden 10 mL de una disolución acuosa de rodamina 6G ( $10^{-3}$  M) y nitrato de plata (1 mM). Se deja reaccionar la mezcla durante 6 h a 65°C y, transcurrido este tiempo, se recolectan y purifican las nanopartículas obtenidas mediante procesos sucesivos de lavado/centrifugación con agua Milli-Q, seguidos de diálisis frente a agua Milli-Q.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la obtención de nanopartículas metálicas funcionalizadas con moléculas orgánicas fluorescentes que comprende tratar una o más sales metálicas con un agente reductor capaz de reducir el catión de la sal metálica al estado metálico, en medio acuoso, caracterizado porque el tratamiento de la una o más sales metálicas con el agente reductor se realiza en presencia de una molécula orgánica fluorescente.
2. Un procedimiento según la reivindicación 1 caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
  - (a) Preparar una disolución acuosa que comprende una o más sales metálicas y una molécula orgánica fluorescente,
  - (b) Mezclar el agente reductor capaz de reducir el catión de la sal metálica al estado metálico, opcionalmente en forma de una disolución acuosa que comprende dicho agente reductor, a la disolución obtenida en la etapa (a), y
  - (c) Opcionalmente recolectar las nanopartículas.
3. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque las sales metálicas se seleccionan del grupo que comprenden sales de plata, oro, cobre, aluminio, platino, cobalto y paladio.
4. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque el agente reductor es un hidruro, citrato, alcohol, polímero reductor, hidracina, hidroxilamina o mezclas de los mismos.
5. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque la molécula orgánica fluorescente se selecciona entre fluoresceína, rodamina, cumarina, azul de metileno, azul Cascade, amarillo Lucifer, boro-dipirrometano, y mezclas de los mismos.
6. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque se realiza a una temperatura entre 0 y 100°C.

7. Un procedimiento según la reivindicación 6 caracterizado porque se realiza a una temperatura entre 0 y 30°C.
8. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque la reducción se realiza en presencia de un polímero.
9. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8 caracterizado porque la disolución acuosa definida en la etapa (a) comprende un polímero.
10. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque las nanopartículas obtenidas se recubren posteriormente con un polímero.
11. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, caracterizado porque el polímero es un polímero biocompatible.
12. Un procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado porque el polímero biocompatible se selecciona de entre polivinilpirrolidona y polietilenglicol.
13. Nanopartículas metálicas funcionalizadas con moléculas orgánicas fluorescentes obtenibles mediante el procedimiento definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
14. Uso de las nanopartículas de la reivindicación 13 para la detección de moléculas o analitos mediante técnicas de fluorescencia o espectroscopias vibracionales amplificadas en superficie.

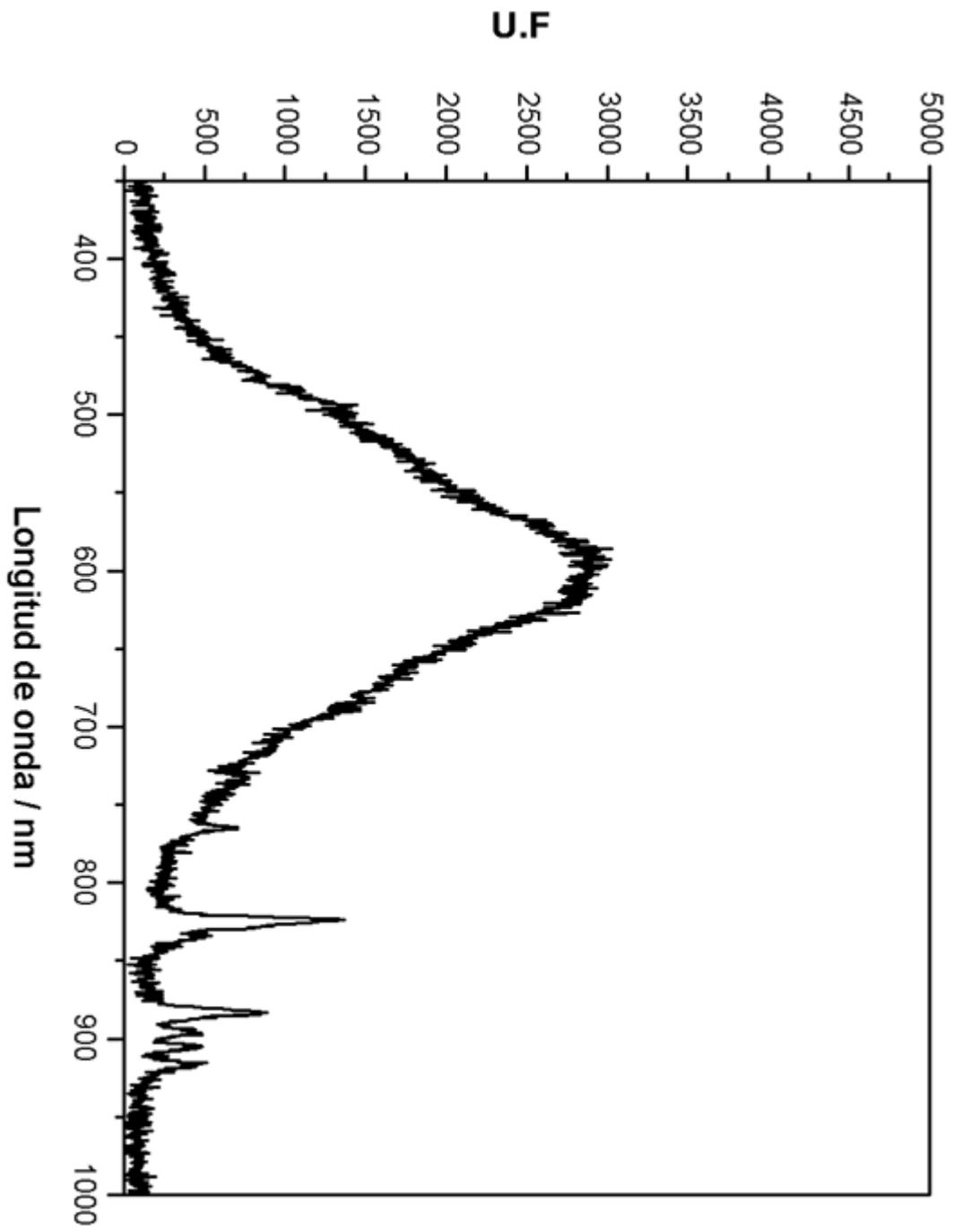


Figura 1a

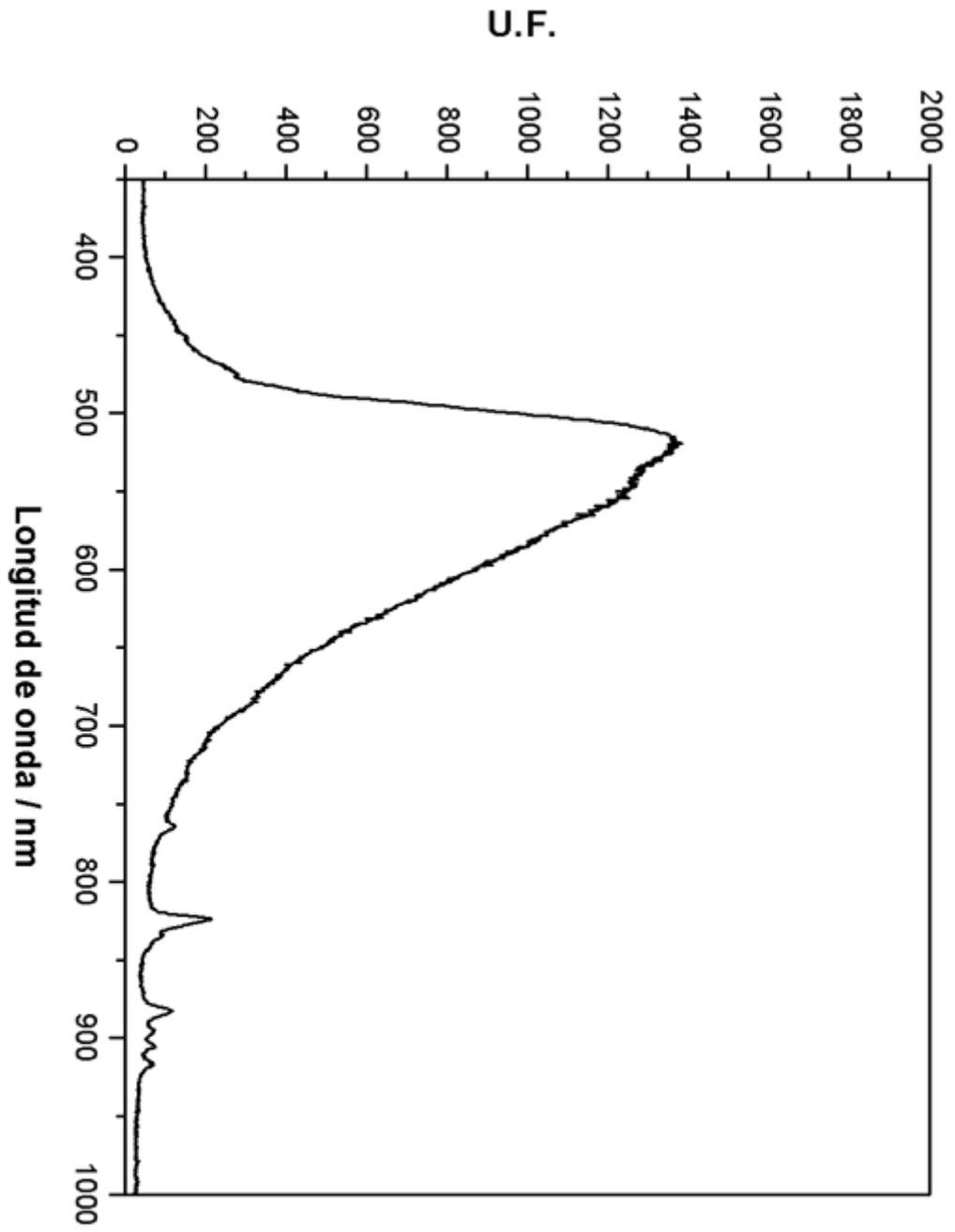


Figura 1b

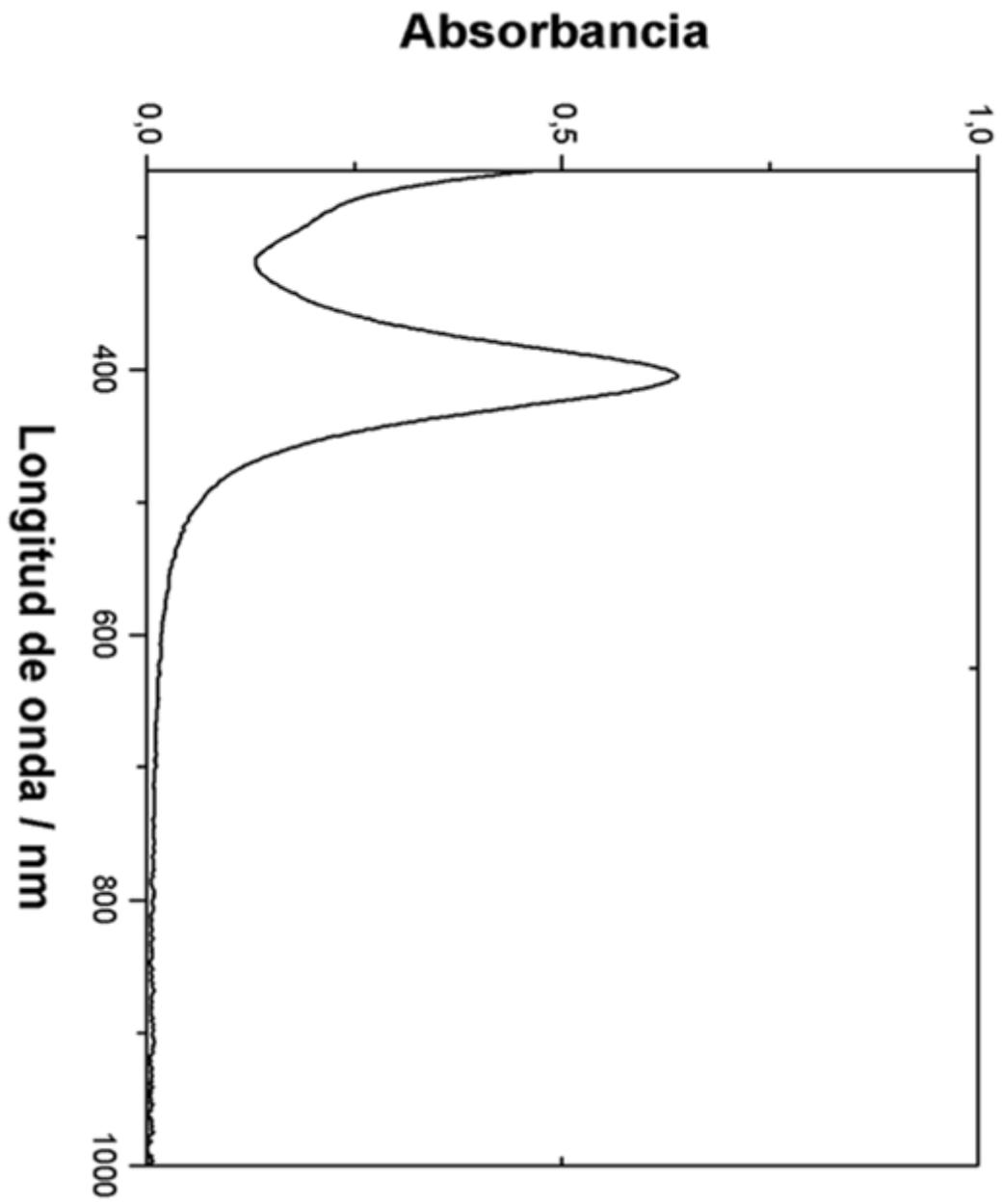


Figura 2a

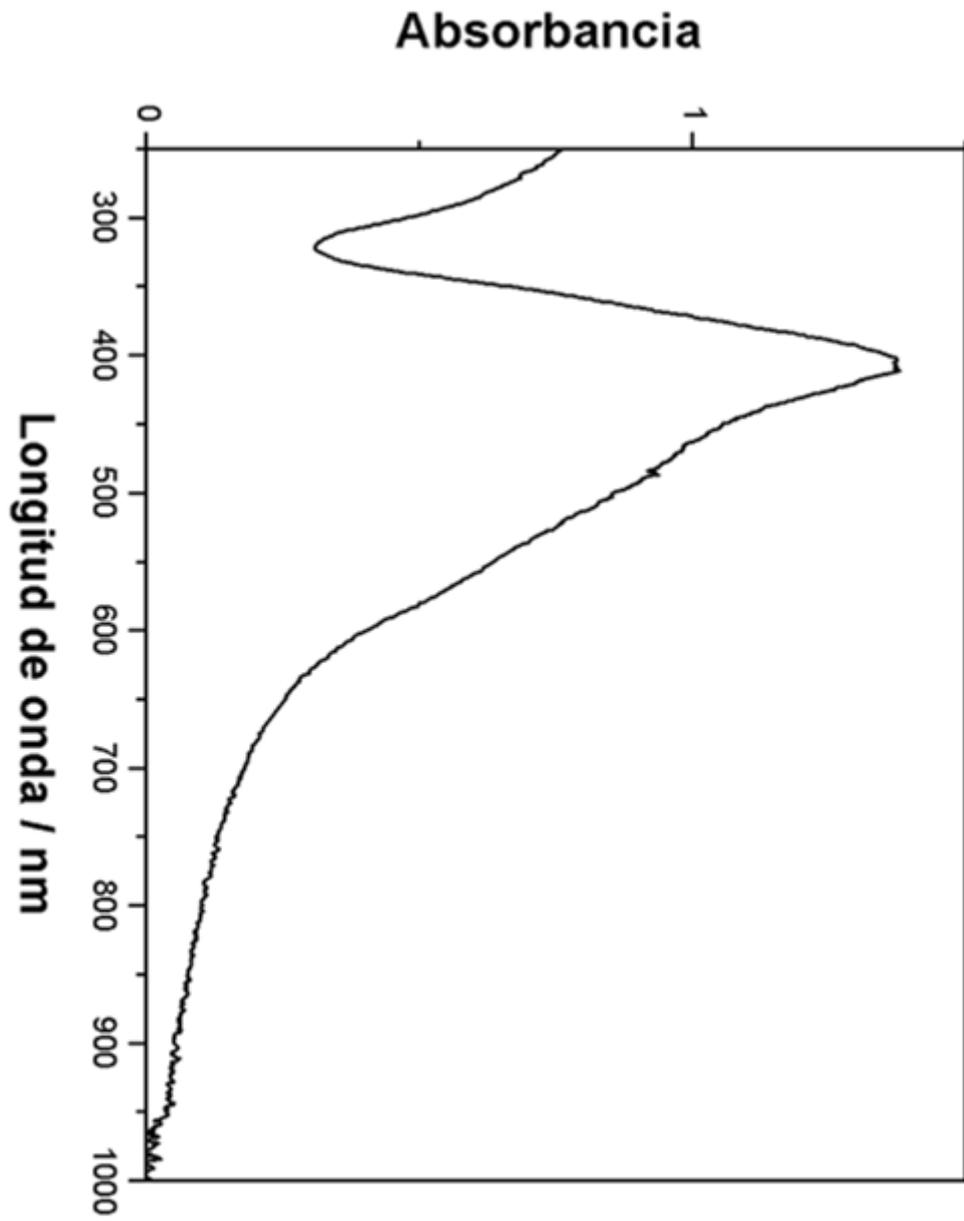


Figura 2b

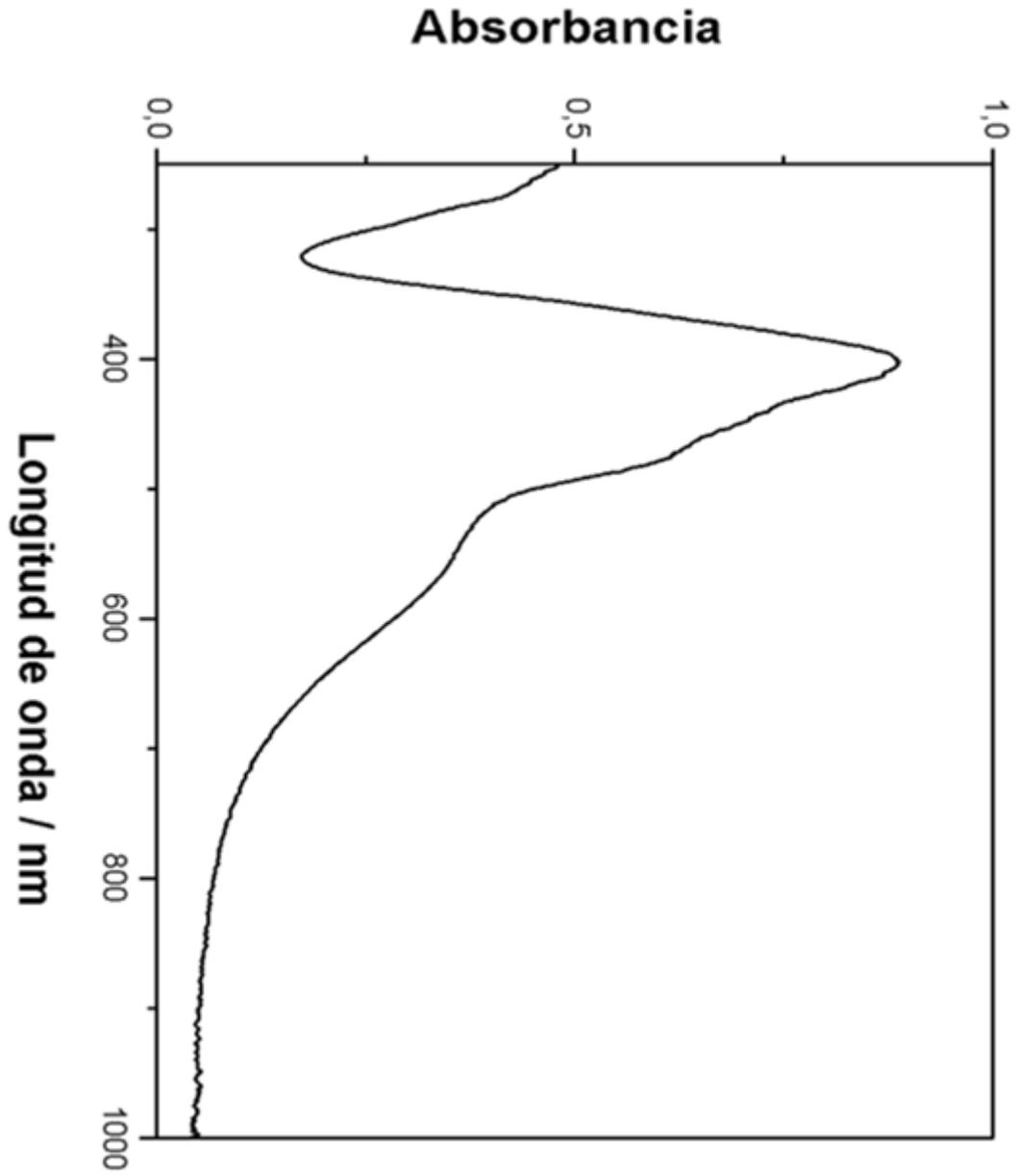


Figura 2c

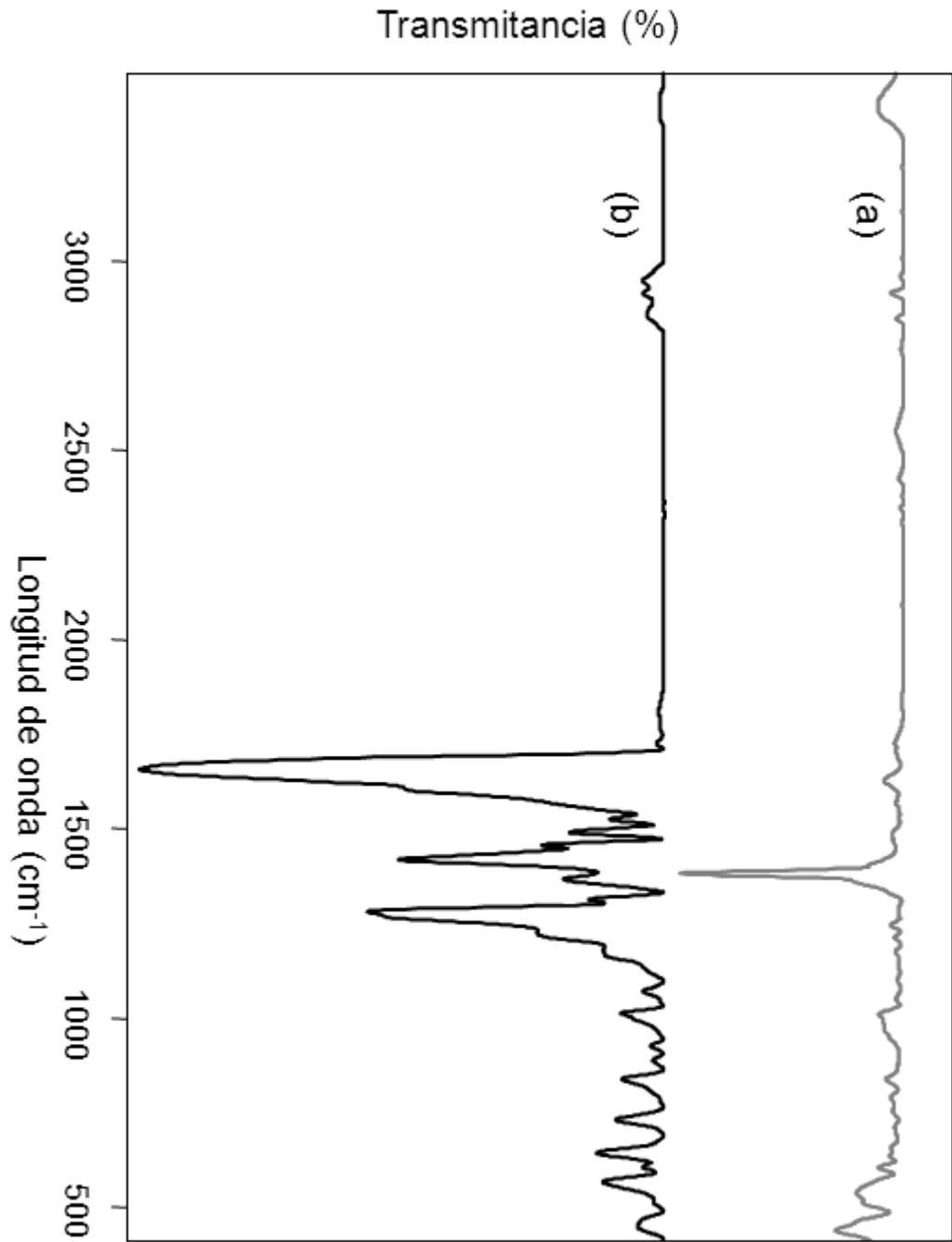


Figura 3

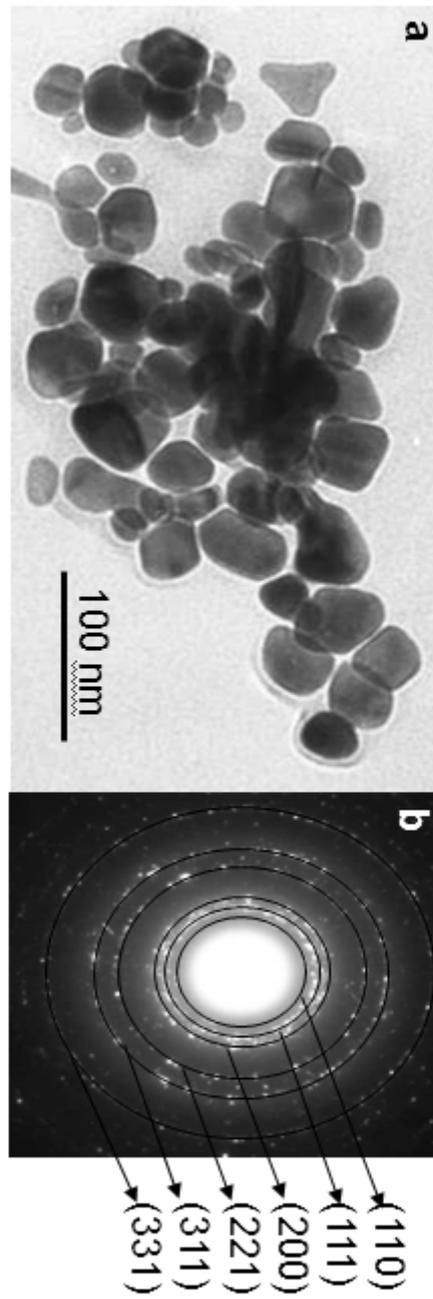


Figura 4

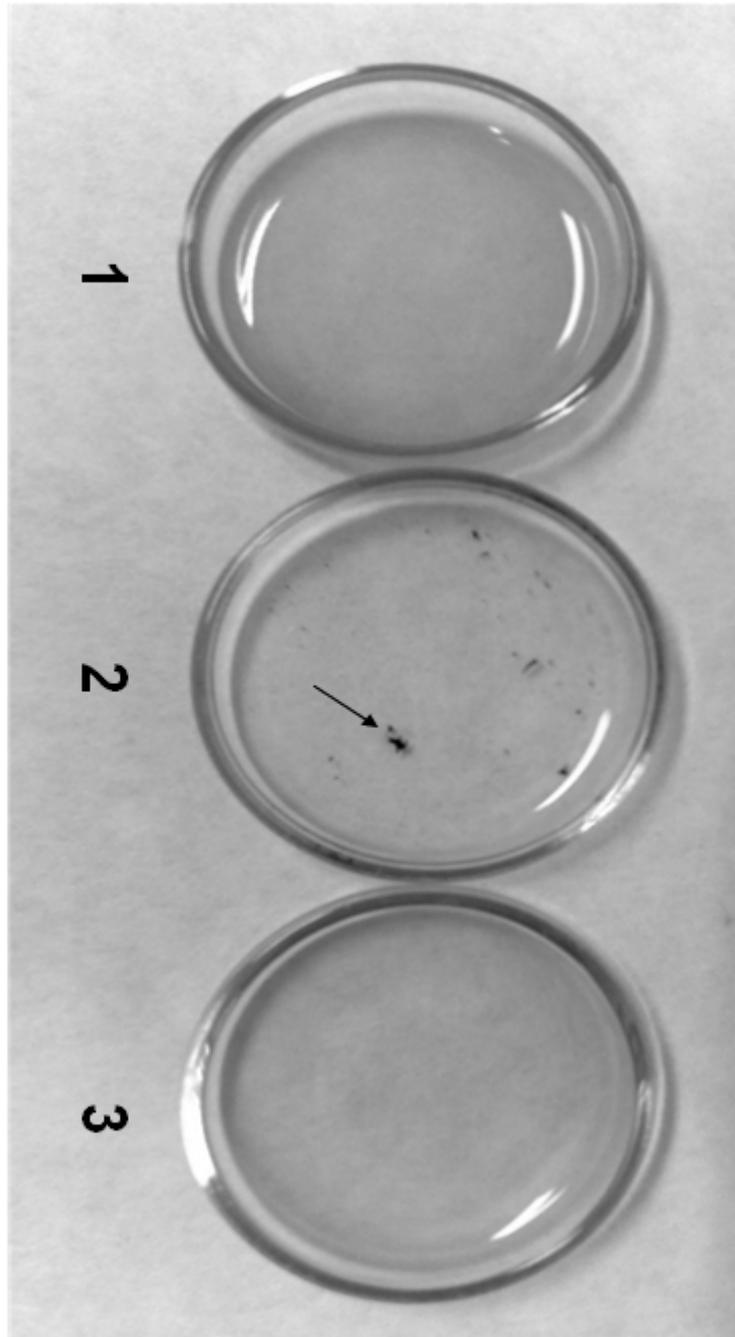


Figura 5



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②<sup>1</sup> N.º solicitud: 201130447

②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 25.03.2011

③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ <sup>6</sup> Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MAYAVAN, S., ET AL., Self-organization, interfacial interaction and photophysical properties of gold nanoparticle complexes derived from resilin-mimetic fluorescent protein rec1-resilin, Biomaterials, 2011, Vol.32, págs.2786-2796, disponible en línea el 03-02-2011, doi:10.1016/j.biomaterials.2010.12.030. Resumen, apartados: "1.Introduction" y "2.Experimental".	1-4,6,7,13,14
X	WO 2009117798 A2 (UNIV FED DE PERNAMBUCO UFPE ET AL.) 01/10/2009, todo el documento.	13,14
A	PANDA, B.R., ET AL., A water-soluble polythiophene-Au nanoparticle composite for pH sensing, Journal of Colloid and Interface Science, 2007, Vol. 316, págs. 962-967.	1-14
A	SANPUI, P., ET AL., Green fluorescent protein for in situ synthesis of highly uniform Au nanoparticles and monitoring protein denaturation, Journal of Colloid and Interface Science, 2008, Vol. 326, págs. 129-137.	1-14

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
23.07.2012

Examinador  
M. d. García Poza

Página  
1/4

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**B22F9/16** (2006.01)  
**C09K11/06** (2006.01)  
**G01N33/52** (2006.01)  
**B82Y40/00** (2011.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

B22F, C09K, G01N, B82Y

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, XPES, HCAPLUS, NPL

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 18.06.2012

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 5,8-12	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-4, 6,7,13,14	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 5,8-12	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-4, 6,7,13,14	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	MAYAVAN, S., ET AL., Self-organization, interfacial interaction and photophysical properties of gold nanoparticle complexes derived from resilin-mimetic fluorescent protein rec1-resilin, Biomaterials, 2011, Vol.32, págs.2786-2796.	
D02	WO 2009117798 A2 (UNIV FED DE PERNAMBUCO UFPE et al.)	01.10.2009

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El objeto de la invención es un procedimiento para la obtención de nanopartículas metálicas funcionalizadas con moléculas orgánicas fluorescentes.

El documento D01 anticipa las características técnicas del procedimiento de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1 a 4 y 6 y 7. Este documento divulga un procedimiento para la obtención de nanopartículas metálicas (nanopartículas de oro) funcionalizadas con moléculas orgánicas fluorescentes (resilina rec1), que comprende tratar una sal metálica (cloruro aúrico) con un agente reductor (borohidruro de sodio) capaz de reducir el catión de la sal metálica al estado metálico, en medio acuoso, en presencia de una molécula orgánica fluorescente (resilina rec1), a temperatura ambiente.

Por lo tanto, el procedimiento de la invención según se recoge en las reivindicaciones 1 a 4 y 6 y 7 carece de novedad y de actividad inventiva (Arts. 6.1 y 8.1 LP).

En relación a la reivindicación 13, referente a las nanopartículas metálicas definidas en términos de su procedimiento de preparación, esta reivindicación únicamente sería admisible si el producto, como tal, cumple los requisitos de patentabilidad, esto es, es nuevo y tiene actividad inventiva. Sin embargo, tales requisitos no se cumplen en este caso ya que los documentos D01 y D02 divulgan nanopartículas metálicas con las mismas características estructurales que las recogidas en la solicitud. En consecuencia, el objeto de la reivindicación recogido en la reivindicación 13 carece de novedad y de actividad inventiva, así como su uso, según se recoge en la reivindicación 14 (Arts. 6.1 y 8.1 LP).

Con respecto al procedimiento de la invención según se recoge en la reivindicación 5, esto es, el procedimiento donde la molécula orgánica fluorescente se selecciona entre fluoresceína, rodamina, cumarina, azul de metileno, azul Cascade, ..., se considera nuevo e inventivo (Arts. 6.1 y 8.1 LP). Por último, también se considera nuevo e inventivo el procedimiento recogido en las reivindicaciones 8-12, relativas a la incorporación de un polímero en la disolución.