

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 946**

21 Número de solicitud: 201900006

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)
C01B 17/20 (2006.01)
C01G 5/00 (2006.01)
B82Y 40/00 (2011.01)
B82Y 30/00 (2011.01)
B82Y 15/00 (2011.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

15.01.2019

43 Fecha de publicación de la solicitud:

15.07.2020

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(50.0%)

Sección de Contratos y Patentes(OTRI), Facultad
de Medicina (Edificio Entrepabellones 7 y 8)
C/ Dr.Severo Ochoa, 7 Ciudad Universitaria
28040 Madrid ES y
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (50.0%)

72 Inventor/es:

RUBIO RETAMA, Jorge;
MÉNDEZ GONZÁLEZ, Diego;
LAURENTI, Marco;
JAQUE GARCIA, Daniel y
ASSIS SANTOS, Harrison David

54 Título: **Nanopartículas de Ag₂S súper fluorescentes en la región del infrarrojo cercano y método de obtención**

57 Resumen:

Nanopartículas de Ag₂S súper fluorescentes en la región del infrarrojo cercano y método de obtención.

El marcaje con sondas fluorescentes juega un papel importante en los estudios a nivel celular y tisular tanto en investigación biomédica como en estudios in vivo. Las sondas de partículas de Ag₂S presentan la ventaja de baja o nula toxicidad, a la vez que exhiben fluorescencia en el infrarrojo cercano. Pero las sondas de Ag₂S presentan el inconveniente de tener una baja eficiencia cuántica (alrededor de un 0,2 %).

La presente invención describe nanopartículas de Ag₂S capaces de emitir en el infrarrojo cercano con una eficiencia cuántica del 10% (lo que supone un incremento de 50 veces con respecto a la eficacia de las nanopartículas obtenidas hasta el momento) así como su método de síntesis, el cual es un método sencillo que da lugar a partículas estables coloidalmente y que pueden ser funcionalizadas superficialmente.

ES 2 773 946 A1

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas de Ag_2S súper fluorescentes en la región del infrarrojo cercano y método de obtención

5 SECTOR DE LA TÉCNICA

La invención pertenece al campo de la Química de Materiales de aplicación en Biología y Medicina. De forma más concreta, se refiere a la obtención de materiales inorgánicos con propiedades fluorescentes para su aplicación en sistemas avanzados de contraste de imagen en medios biológicos.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El marcaje con sondas fluorescentes juega un papel importante en los estudios a nivel celular y tisular tanto en investigación biomédica como en estudios *in vivo*.

15 En el caso de estudios *in vivo*, las imágenes fluorescentes obtenidas en el infrarrojo cercano presentan una serie de ventajas que las hace únicas. Por un lado, la mayor capacidad de penetración de la luz infrarroja permite iluminar y visualizar tejidos profundos a los que la luz visible no puede llegar. Por otro lado, la menor abundancia de moléculas biológicas capaces de emitir en el infrarrojo cercano permite reducir la
20 señal de fondo, permitiendo incrementar la sensibilidad de la técnica.

Por este motivo, durante los últimos años, se ha prestado una gran atención al desarrollo de sondas capaces de emitir en el infrarrojo cercano para aplicación en diagnóstico médico por imagen, biología molecular, etc. Actualmente, las sondas más utilizadas para
25 emisión en el infrarrojo cercano contienen Cd^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , entre otros. Pero sería interesante desarrollar sondas que emitan en la región del infrarrojo cercano pero con baja toxicidad.

En este sentido, las partículas de Ag_2S constituyen una alternativa ideal debido a su
30 baja o nula toxicidad, a la vez que exhiben fluorescencia en el infrarrojo cercano. Pero las sondas de Ag_2S presentan el inconveniente de tener una baja eficiencia cuántica (alrededor de un 0,2 %) por lo que es necesario una modificación química de su superficie para incrementar dicha eficiencia. Sin embargo, su estructura cristalina dificulta sustancialmente tal modificación de su superficie.

35

Todo lo anteriormente expuesto hace que sea de gran interés en el estado de la técnica actual desarrollar un método que permita obtener sondas de Ag_2S con elevada eficiencia cuántica mediante un método sencillo de síntesis que produzca nanopartículas de tamaño controlado, fácilmente dispersables, con elevado grado de reproducibilidad y que, además, permita una sencilla funcionalización superficial para su posterior aplicación en la toma de imágenes fluorescentes.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a nanopartículas de Ag_2S capaces de emitir en el infrarrojo cercano con una eficiencia cuántica del 10% (lo que supone un incremento de 50 veces con respecto a la eficacia de las nanopartículas obtenidas hasta el momento) así como su método de síntesis el cual es un método sencillo que da lugar a partículas estables coloidalmente y que pueden ser funcionalizadas superficialmente, lo cual las hace interesantes como agentes de contraste de imagen en aplicaciones biológicas.

El método de síntesis de nanopartículas de Ag_2S comprende las siguientes etapas:

- 1) Preparación de nanopartículas de Ag_2S hidrofóbicas.
 - a) Se mezclan una fuente de Ag y una fuente de S con una molécula orgánica de cadena larga conteniendo una amina y/o un tiol y la mezcla se hace reaccionar a una temperatura entre 80°C y 320°C en una atmósfera cerrada.
 - b) Tras un proceso de enfriamiento pasivo, se añade a la mezcla anterior un disolvente orgánico polar, se centrifuga y las nanopartículas obtenidas se lavan dando lugar a nanopartículas hidrofóbicas.
- 2) Tratamiento con láser ultra-rápido.
- 3) Intercambio de ligando para general partículas de Ag_2S hidrofílicas.

En el paso 1a) de preparación de nanopartículas de Ag_2S hidrofóbicas la fuente de plata puede ser cualquier nitrato de plata, dihidrocarbilo-tiofosfato de plata, dioctil sulfosuccinato de plata, tiobenzoato de plata, acetato de plata, dodecanoato de plata, tetradecanoato de plata y octadecanoato de plata. Entre las moléculas orgánicas de cadena larga pueden emplearse, octilamina, trioctilamina, dodecilamina, octadecilamina, octaenotiol, undecanotiol, dodecanotiol, tridecanotiol, tetradecanotiol, pentadecanotiol, hexadecanotiol, eicosaenotiol,

En paso 2) de tratamiento con láser ultrarrápido induce un cambio estructural que

elimina los defectos e incrementa la eficiencia cuántica de las nanopartículas. Este proceso, preferiblemente, se realiza dispersando las nanopartículas de Ag_2S en cloroformo, diclorometano, dicloroetano, tricloroetano o cualquier solvente orgánico que contenga cloro. En el proceso de optimización de la muestra se emplea un láser ultra-
 5 rápido durante un intervalo de tiempo que depende de características específicas del láser entre las que cabe destacar: longitud de onda, longitud del pulso, frecuencia, densidad de potencia aplicada y tamaño del diámetro del haz.

El paso 3) de intercambio de ligando se lleva a cabo mezclando nanopartículas de Ag_2S hidrofóbicas obtenidas en el paso anterior con una cantidad equivalente o un exceso de alguna molécula hidrofílica que contenga un grupo tiol de tal forma que la superficie de las nanopartículas de Ag_2S sea funcionalizada por el grupo hidrofílico obteniéndose de esta forma partículas hidrofílicas. El grupo hidrofílico es cualquiera de entre: ácido mercaptoacético, ácido mercaptopropiónico, cisteína, cisteínamina, ácido tioctico,
 15 mercaptoacetato de amonio, o cualquier combinación de los mismos. El disolvente orgánico puede ser, entre otros, etanol, metanol, acetona, cloroformo, diclorometano, tolueno, 1-metil-2-pirrolidona o cualquier combinación de los mismos. En este solvente orgánico la reacción de sustitución es realizada a una temperatura comprendida entre 0 y 80°C durante un período de unas 1 horas o más. El tiempo de reacción puede ser
 20 modificado de acuerdo a la reactividad y solubilidad de la molécula estabilizante. El pH de las soluciones acuosas empleadas durante el paso 3 está comprendido entre 7 y 14. Tras esto, los puntos cuánticos son lavados con soluciones acuosas para eliminar restos de reactivos.

25 El método es sencillo y aporta reproducibilidad al sistema.

Las partículas obtenidas presentan una eficiencia cuántica próxima al 10% y presentan elevada fluorescencia, estabilidad y excelente biocompatibilidad por lo que pueden ser empleadas como agentes de contraste tanto en imagen celular como en imagen *in vivo*.

30

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Imagen TEM De nanopartículas de Ag_2S .

Figura 2. Eficiencia cuántica de las nanopartículas de Ag_2S antes y después del
 35 tratamiento con láser.

Figura 3. Tiempos de vida de las nanopartículas antes y después del tratamiento con láser.

5 Figura 4. Intensidad de la fluorescencia emitida por las nanopartículas antes y después del tratamiento con láser.

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que
10 no pretenden ser limitativos de su alcance.

Ejemplo 1:

Se mezclan 0,1 mmol de dietilditiocarbamato de plata y 10 g de dodecanotiol en un reactor y se calienta hasta 200°C en atmósfera de N₂ durante 1 hora. Tras esto, se deja
15 enfriar la reacción de forma natural y se añaden 50 ml de etanol anhidro. La mezcla es centrifugada, Lavada y dispersada en hexano. La muestra así obtenida es identificada como nanopartículas de Ag₂S monoclinico mediante difracción de rayos X y microscopía de transmisión de electrones. El tamaño de las partículas es de 5 nm tal y como se muestra en la Figura 1. Estas nanopartículas presentan un espectro de emisión
20 en el infrarrojo tal y como se muestra en la figura 2.

A la dispersión anterior se añaden 0,2 g de ácido tioctico y un volumen similar de etanol anhidro y se redispersa en CHCl₃. La mezcla resultante se sónica y ultrasonica durante 4 h; después se centrifuga y lava con agua desionizada para obtener nanopartículas de
25 Ag₂S dispersables en agua. La fluorescencia de las partículas solubles en agua es mostrada en la figura 3. El rendimiento cuántico de la muestra es de 0,17%.

Ejemplo 2:

Se mezclan en un matraz de tres bocas 0,1 mmol de nitrato de plata, 8 g de dodecanetiol
30 y 5,4 g de oleilamina y se calienta la mezcla a 180°C durante 1 h. Después, la solución se enfría a temperatura ambiente y se añaden 50 ml de etanol anhidro. La mezcla resultante se centrifuga, se lava y se dispersa en cloroformo. La muestra obtenida se caracteriza mediante difracción de rayos X y microscopia electrónica de transmisión. Los resultados de esta caracterización dan como resultado que las nanopartículas
35 sintetizadas presentan una corteza de Ag₂S, tienen una fase monoclinica y un pequeño

núcleo de plata. El tamaño de las nanopartículas es de 10 nm. Un análisis espectroscópico muestra que las nanopartículas presentan un buen espectro de emisión de fluorescencia en el infrarrojo cercano.

- 5 Se añaden 0,2 g de L-cisteína a la dispersión de ciclohexano anterior, luego se añade un volumen igual de etanol anhidro. La mezcla resultante se agita durante 24 h, luego se centrifuga y se lava con agua desionizada para obtener puntos cuánticos Ag_2S solubles en agua con tamaños de partícula de aproximadamente 8 nm, que todavía tienen una emisión de fluorescencia muy fuerte. El rendimiento cuántico de la muestra
- 10 es de 0,14%

Ejemplo 3:

- Se disuelven 3 mmol de AgNO_3 , como fuente de plata, en 10 ml de octadecilamina a 150°C (en un baño de aceite). Después de 10 minutos la solución adquiere un color azul
- 15 intenso metálico, lo que indica la formación de nanopartículas de Ag. Después se agrega 1 mmol de L-cistina a la mezcla previa como fuente de azufre. La reacción se mantiene durante 20 minutos en atmósfera de aire tras lo cual se obtienen nanopartículas de Ag_2S hidrofóbicas.

- 20 Las nanopartículas así obtenidas presentan un tamaño de, aproximadamente, 12 nm y estructura de núcleo-corteza (núcleo de Ag y corteza de Ag_2S). Estas nanopartículas se precipitan mediante la adición de etanol anhidro y posteriormente se centrifugan y se redispersan en CHCl_3 . El rendimiento cuántico de estas nanopartículas es del 0,2 %.

25 Ejemplo 4:

En este ejemplo y lo siguientes se ilustra el tratamiento de las nanopartículas de Ag_2S con láser ultrarrápido.

- Las partículas hidrofóbicas obtenidas según el ejemplo 3, se dispersan en CHCl_3 u otros
- 30 disolventes clorados como CH_2Cl_2 , CCl_4 , etc. manteniendo una concentración de nanopartículas en disolución de 1 mg/ml. Posteriormente, se irradian utilizando un láser ultra-rápido a una longitud de onda de 800 nm y 3W con un haz de 0,8 mm diámetro (densidad de potencia $6\text{W}/\text{cm}^2$), con pulsos de 50 femto-segundos, a una frecuencia de 1 kHz durante, aproximadamente, 10 minutos. Tras ello, la muestra pasa de exhibir un
- 35 rendimiento cuántico de un 0,2% a un 10 %. Esta subida en la eficacia cuántica, tal y

como se muestra en la figura 2 está ligada a un incremento en los tiempos de vida de las nanopartículas (figura 3), así como en la fluorescencia de las nanopartículas tal y como se muestra en la figura 4.

5 Ejemplo 5:

La reacción de mejora puede ser realizada mediante la iluminación de la muestra con un láser ultra-rápido a una longitud de onda de 400 nm. En este caso, la mejora de las nanopartículas se realiza en un tiempo menor (figura 3^a).

10 Ejemplo 6:

La aplicación de pulsos por debajo de 500 fs permite realizar la transformación de las nanopartículas y mejorar su rendimiento cuántico siendo, entre los valores preferidos, un pulso de 50 fs tal y como se muestra en la figura 3b. La densidad de energía aplicada a la muestra puede ser también variada. Esto afecta a la velocidad de transformación del producto y la estructura de las nanopartículas. De tal forma que densidades de potencia superiores a 40 W/cm² producen daño en las nanopartículas y reduce su eficiencia cuántica. Por debajo de estas densidades de potencia la mejora la eficiencia cuántica de las nanopartículas siendo óptima para valores de 20 W/cm² e ineficientes para valores inferiores a 3W/cm².

20

REIVINDICACIONES

1. Nanopartículas de Ag_2S hidrofílicas caracterizadas porque su superficie está funcionalizada por un grupo hidrofílico cualquiera de entre: ácido mercaptoacético, ácido mercaptopropiónico, cisteína, cisteínamina, ácido tioctico, mercaptoacetato de amonio, o cualquier combinación de los mismos.
2. Método de síntesis de nanopartículas de Ag_2S hidrofílicas que comprende las siguientes etapas:
 - 1) Preparación de nanopartículas de Ag_2S hidrofóbicas.
 - a) Se mezclan una fuente de Ag y una fuente de S con una molécula orgánica de cadena larga conteniendo una amina y/o un tiol y la mezcla se hace reaccionar a una temperatura entre 80°C y 320°C en una atmósfera cerrada.
 - b) Tras un proceso de enfriamiento pasivo, se añade a la mezcla anterior un disolvente orgánico polar, se centrifuga y las nanopartículas obtenidas se lavan dando lugar a nanopartículas hidrofóbicas.
 - 2) Tratamiento con láser ultra-rápido.
 - 3) Intercambio de ligando para generar partículas de Ag_2S hidrofílicas.
3. Método de síntesis de nanopartículas de Ag_2S , según reivindicación 2, donde la fuente de plata puede ser cualquier nitrato de plata, dihidrocarbilo-tiofosfato de plata, dioctil sulfosuccinato de plata, tiobenzoato de plata, acetato de plata, dodecanoato de plata, tetradecanoato de plata y octadecanoato de plata. Entre las moléculas orgánicas de cadena larga pueden emplearse, octilamina, trioctilamina, dodecilamina, octadecilamina, octaenotiol, undecanotiol, dodecanotiol, tridecanotiol, tetradecanotiol, pentadecanotiol, hexadecanotiol, eicosaenotiol.
4. Método de síntesis de nanopartículas de Ag_2S , según reivindicaciones 2 y 3, donde el tratamiento con láser se realiza dispersando las nanopartículas de Ag_2S en cloroformo, diclorometano, dicloroetano, tricloroetano o cualquier solvente orgánico que contenga cloro.
5. Método de síntesis de nanopartículas de Ag_2S , según reivindicación 4, donde se emplea un láser ultra-rápido durante un intervalo de tiempo que depende de

características específicas del láser entre las que cabe destacar: longitud de onda, longitud del pulso, frecuencia, densidad de potencia aplicada y tamaño del diámetro del haz.

- 5 6. Método de síntesis de nanopartículas de Ag_2S , según reivindicaciones 2 a 5, donde el intercambio iónico se lleva a cabo mezclando nanopartículas de Ag_2S hidrofóbicas con una cantidad equivalente o un exceso de alguna molécula hidrofílica que contenta un grupo tiol de tal forma que la superficie de las nanopartículas de Ag_2S sea funcionalizada por el grupo hidrofílico obteniéndose de esta forma partículas hidrofílicas.
- 10 7. Método de síntesis de nanopartículas de Ag_2S , según reivindicación 6, donde el grupo hidrofílico es cualquiera de entre: ácido mercaptoacético, ácido mercaptopropionico, cisteína, cisteínamina, ácido tioctico, mercaptoacetato de amonio, o cualquier combinación de los mismos. El disolvente orgánico puede ser, entre otros, etanol, metanol, acetona, cloroformo, diclorometano, tolueno, 1-metil-2-pirrolidona o cualquier combinación de los mismos.
- 15 8. Método de síntesis de nanopartículas de Ag_2S , según reivindicaciones 6 y 7, donde la reacción de sustitución es realizada a una temperatura comprendida entre 0 y 80°C durante un período de una 1 hora o más. El tiempo de reacción puede ser modificado de acuerdo a la reactividad y solubilidad de la molécula estabilizante. El pH de las soluciones acuosas empleadas está comprendido entre 7 y 14 y los puntos cuánticos son lavados con soluciones acuosas para eliminar restos de reactivos.
- 20 9. Método de síntesis de nanopartículas de Ag_2S , según reivindicaciones 6 y 7 Tras esto, los puntos cuánticos son lavados con soluciones acuosas para eliminar restos de reactivos.
- 25 10. Uso de las nanopartículas reivindicadas como sondas fluorescentes.
- 30

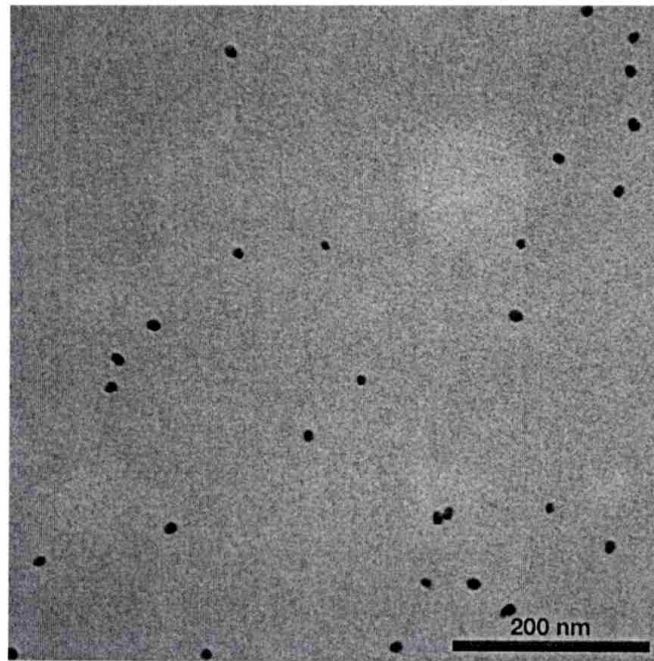


Figura 1

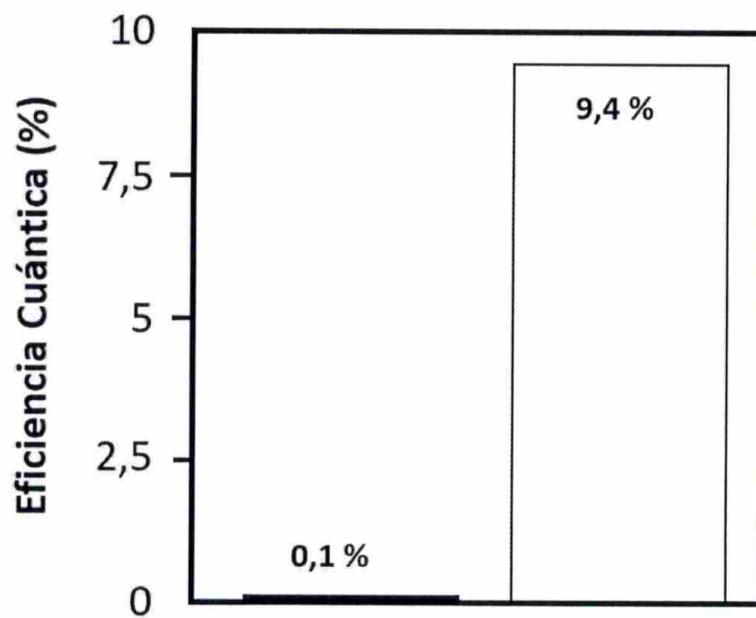


Figura 2

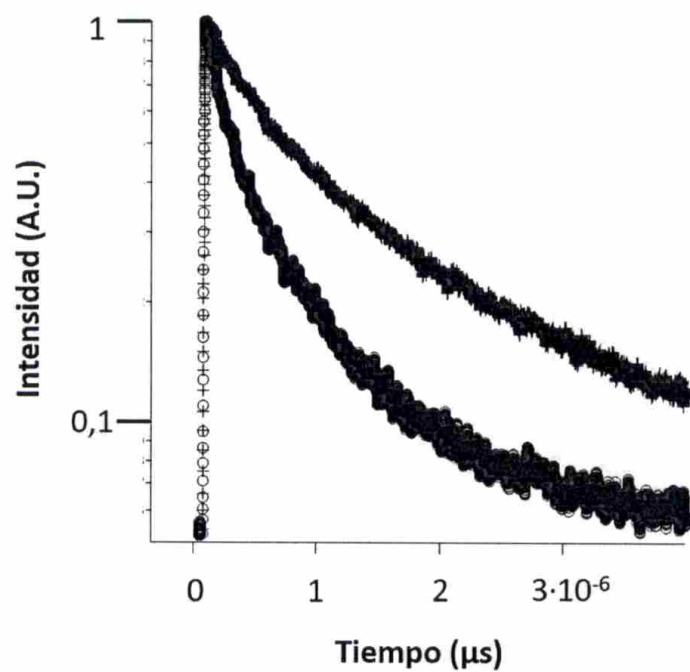


Figura 3

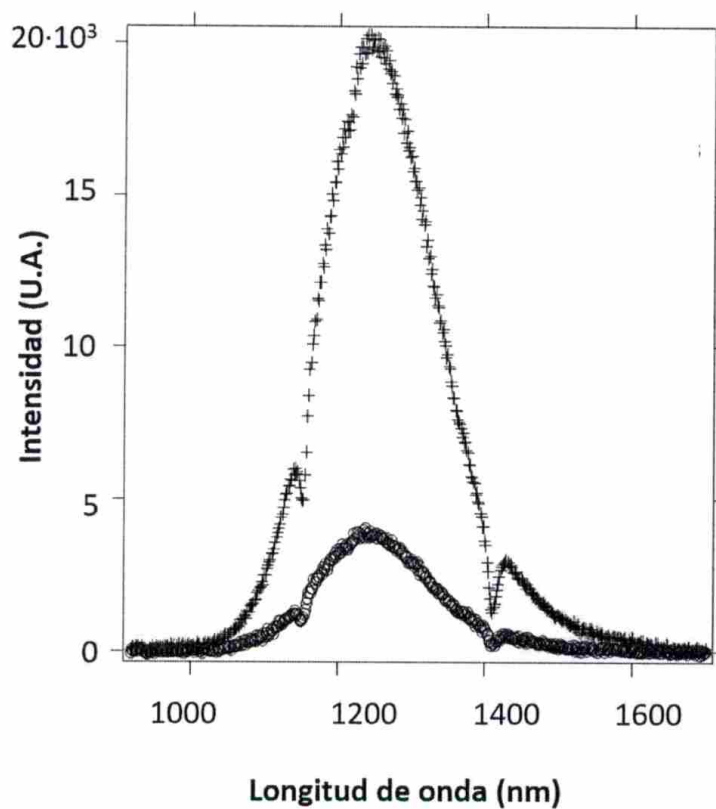


Figura 4



- ②① N.º solicitud: 201900006
②② Fecha de presentación de la solicitud: 15.01.2019
②③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 2016083647 A1 (WANG QIANGBIN <i>et al.</i>) 24/03/2016; Párrafos [0005]-[0020], ejemplos 1-6.	1, 10
X	CN 106753344 A (UNIV TSINGHUA) 31/05/2017, (Resumen). [en línea] [Recuperado el 17.09.2019]. Recuperado de: EPO WPI Database; DW201750; nº acceso 2017-40536W.	1, 10
A	WU, XIULAN <i>et al.</i> ; Near infrared emission of Ag2S quantum dots and their fluorescence quenched by gold nanoparticles; <i>Procedia Engineering</i> (2015) 102, páginas 273-277; apartado "1.Experiment".	1, 10
A	ZHANG, XIN. <i>et al.</i> ; Synthesis of biocompatible near infrared fluorescence Ag2S quantum dot and its application in bioimaging; <i>Journal of Innovative Optical Health Sciences : JIOHS</i> , World Scientific Publishing, Singapore, (2013) Vol. 7, Nº 2, páginas 1350059-1 - 1350059-7, ISSN 1793-5458, <DOI: doi:10.1142/S1793545813500594>	1, 10
A	HOCAOGLU, IBRAHIM, <i>et al.</i> ; Development of highly luminescent and cytocompatible near-IR-emitting aqueous Ag2S quantum dots; <i>J. Mater. Chem.</i> (2012), 22, páginas 14674-14681.	

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
19.09.2019

Examinador
N. Vera Gutierrez

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N21/64 (2006.01)

C01B17/20 (2006.01)

C01G5/00 (2006.01)

B82Y40/00 (2011.01)

B82Y30/00 (2011.01)

B82Y15/00 (2011.01)

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

G01N, C01B, C01G, 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, CAS, WPI, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP, PATENW