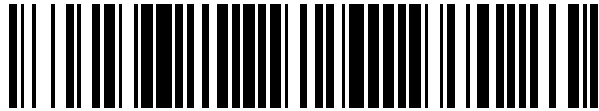


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 351 017**

21 Número de solicitud: 200900418

51 Int. Cl.:

**G01N 21/31** (2006.01)

**G01N 21/33** (2006.01)

**B82B 3/00** (2006.01)

**B22F 1/02** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **10.02.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **31.01.2011**

Fecha de la concesión: **07.11.2011**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **18.11.2011**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**18.11.2011**

73 Titular/es:  
**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID  
PLAZA DE SANTA CRUZ, 5 BAJO  
47002 VALLADOLID, ES**

72 Inventor/es:  
**RODRÍGUEZ CABELLO, JOSÉ CARLOS;  
ÁLVAREZ RODRÍGUEZ, RUBÉN y  
SANTOS GARCIA, MERCEDES**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **NANOPARTÍCULAS METÁLICAS FUNCIONALIZADAS QUE COMPRENDEN UN SISTEMA SENSIBLE A VARIACIONES DE PH, TEMPERATURA Y RADIACIÓN ULTRAVIOLETA-VISIBLE.**

57 Resumen:

Nanopartículas sensibles a variaciones múltiples del medio. Las nanopartículas comprenden un núcleo metálico, un polímetro recombinante modificado y ciclodextrinas o derivados de la misma. Dichas nanopartículas son metálicas y comprenden un sistema sensible a variaciones de pH, temperatura y radiación ultravioleta-visible.

ES 2 351 017 B1

## DESCRIPCIÓN

Nanopartículas metálicas funcionalizadas que comprenden un sistema sensible a variaciones de pH, temperatura y radiación ultra violeta-visible.

La presente invención se refiere a la inmovilización de fragmentos moleculares con sensibilidad específica a temperatura, pH y radiación ultravioleta-visible (UV-visible), sobre la superficie de la nanopartícula metálica.

La invención proporciona también métodos para la producción de nanopartícula funcionalizadas (por ejemplo, estabilizadas). Además, la presente invención puede proporcionar por ejemplo, monocapas de polímero derivado de la elastina auto-estructuradas (SAM's), donde la monocapa se forma sobre una nanopartícula metálica.

Las nanopartículas pueden ser utilizadas como sensores multirespuesta para aplicaciones biomédicas.

El término "metálico" queda referido en este contexto como derivados de la síntesis de metales, óxidos metálicos y otras composiciones que contengan uno o varios metales.

El término "híbrido" queda referido en este contexto como la asociación físico-química de un material o varios de origen inorgánico con un material o varios de origen orgánico. La mencionada asociación debe de ser conceptualizada como una unidad discreta que muestra una fusión sinérgica de las propiedades de los bloques constituyentes.

### Antecedentes de la invención

El número creciente de artículos de investigación que describen el diseño y la síntesis de nuevas estructuras auto-ensambladas basadas en la combinación de nanopartículas metálicas y moléculas orgánicas refleja la importancia de esta asociación sinérgica de compuesto inorgánico-orgánico en relación a la producción de nuevos materiales híbridos interesantes para aplicaciones biomédicas y biotecnológicas que abarcan desde el campo de la biología hasta el terreno de la ingeniería de materiales.<sup>1-7</sup>

El desarrollo de los primeros protocolos de síntesis de nanopartículas de oro ha permitido el estudio de la interacción metal-ligando necesario para estabilizar el metal nanoscópico y segundo para amplificar las propiedades físico-químicas del agregado en vista a aplicaciones prácticas.<sup>8-10</sup>

En particular, el estudio de la interacción entre polímeros derivados de la elastina (PDE) y nanopartículas de oro ha dado lugar a la creación de sensores y detectores.<sup>11</sup>

Los PDE son biocompatibles y biodegradables. Esto supone una ventaja a la hora de su utilización en aplicaciones biotecnológicas. Los PDE están basados en sutiles modificaciones de la estructura original de la proteína elastina que exhiben los mamíferos superiores.<sup>12</sup> Además, el desarrollo de la ingeniería genética ha permitido la obtención de estos materiales como polímeros recombinantes.<sup>13</sup> Los PDE de naturaleza recombinante suponen una alternativa a protocolos tradicionales, generalmente complejos, donde parámetros como el peso molecular y la estructura (conectividad molecular) pueden ser controlados con incomparable precisión respecto a las técnicas de síntesis actuales.<sup>14</sup> Además, los PDE exhiben un comportamiento reversible de agregación-expansión de su estructura molecular en función de la variación de propiedades del medio como temperatura, pH, concentración iónica, entre otras.<sup>15</sup> Este auto-ensamblaje mostrado por los PDE en la fase condensada constituye uno de los factores más relevantes de la naturaleza inteligente atribuida a estos materiales. Propiedad explotada en la creación de nuevos artefactos basados en auto-ensamblaje de estructuras nanoscópicas.<sup>16,17</sup>

La versatilidad de los PDE abarca también aplicaciones biomédicas. Recientemente han sido publicadas aplicaciones de PDE como vehículos de transporte y liberación controlada de fármacos.<sup>14,18</sup> De manera paralela, la conceptualización de plataformas de PDE han sido hasta la fecha, una contribución sustanciosa para el avance de la medicina regenerativa a nivel de control del crecimiento y proliferación celular para la creación y reparación de tejidos.<sup>13</sup>

Los autores de la presente publicación ya han presentado el comportamiento inteligente de PDE funcionalizados con grupos fotocromáticos. La modificación de PDE con moléculas fotosensibles ha dado lugar a materiales sensibles a múltiples estímulos incluyendo sensibilidad a radiación UV-visible.<sup>19</sup> La radiación UV-visible puede inducir en materiales fotosensibles modificaciones de las propiedades moleculares de estos materiales, tales como la estructura electrónica, geometría, momento bipolar y polarizabilidad.<sup>20</sup>

En este contexto, los compuestos fotocromáticos al ser expuestos a radiación UV-visible muestran un mecanismo de foto-isomerización que generalmente involucra isomerizaciones cis-trans, cicloadiciones, pasos de apertura o enlace de compuestos cíclicos o transferencia de protones o electrones, por ejemplo.<sup>20</sup>

La literatura que describe la inmovilización de grupos fotosensibles sobre la superficie de nanopartículas que exhiben propiedades foto-físicas es muy escasa. En muchos casos las propiedades de fotocromáticas de los grupos fotosensibles se ven comprometidas por la distancia a la superficie metálica.<sup>21</sup> Por ejemplo, procesos de transferencia de energía o de electrones en las proximidades de la interfase grupo fotosensible y superficie metálica nanoscópica pueden causar la extinción del comportamiento fotosensible de la asociación híbrida compuesto inorgánico-compuesto

orgánico.<sup>22</sup> Esto supone un retraso a la hora de diseñar artefactos manométricos sensibles a múltiples variaciones, como cambios de pH, temperatura y radiación UV-vis del medio.

En particular, la investigación en el campo de materiales fotosensibles es de especial interés en el ámbito del desarrollo de sondas sensibles a estímulos luminosos para aplicaciones biomiméticas, tales como el diseño de membranas foto-funcionales,<sup>23</sup> el fotocontrol de la adhesión y la proliferación de células en cultivos *in-vitro*,<sup>24,25</sup> así como el desarrollo de procesos fotosintéticos artificiales.<sup>26</sup>

La combinación de materiales fotosensibles con nanopartículas que exhiben propiedades foto-físicas reviste gran interés. Hasta la fecha, existe escasa bibliografía que asegure un entendimiento y dominio de la técnica de fusión de compuestos fotosensibles con nanopartículas metálicas para la creación de materiales avanzados. En este aspecto, los biomateriales inteligentes constituyen una posible aplicación para esta tecnología.

### Compendio de la invención

La presente invención proporciona la primera preparación con éxito de nanopartículas fiincionalizadas (por ejemplo estabilizadas) con PDE sensibles a varios estímulos externos. Además, las nanopartículas de oro fiincionalizadas fueron obtenidas en una única etapa y en un medio homogéneo de un único disolvente. Simultáneo a la formación de las nanopartículas ha sido su funcionalización con materiales muy sensibles a variaciones de las propiedades del medio.

El modo de realización preferido utiliza un PDE de origen recombinante que se une a la nanopartículas de oro a través de un enlace azufre-oro entre el PDE y la superficie de la nanopartícula. Las nanopartículas funcionalizadas exhiben respuestas cuantificables físicamente expresadas como resultado de cambios en la estructura de sus componentes moleculares que inducen modificaciones de la estructura de la fase condensada en función a variaciones de temperatura, pH y radiación UV-vis del medio.

La Figura 1 muestra la secuencia del PDE modificado de origen recombinante utilizado en el modo preferido de realización para funcionalizar las nanopartículas. Su estructura incluye la siguiente secuencia aminoacídica: C-[(VPGVG)<sub>2</sub>(VPGE<sub>pho0.5</sub>G)(VPGVG)<sub>2</sub>]<sub>15</sub> Donde las letras C, V, P, G, E corresponde con los aminoácidos cisteína, valina, prolina, glicina y ácido glutámico, respectivamente. El subíndice “pho0.5” indica que el 50% de los aminoácidos E (ácido glutámico) se encuentran funcionalizados covalentemente con una molécula fotocromática.

La Figura 2 muestra un ejemplo esquemático de la foto-isomerización (cis-trans) del grupo fotosensible incluido en la estructura del PDE en función de la radiación incidente. De manera esquemática únicamente ha sido dibujado el pentapéptido (VPGE<sub>pho0.5</sub>G) donde las letras V, P, G, E corresponden con los aminoácidos valina, prolina, glicina y ácido glutámico, respectivamente. El subíndice “pho0.5” indica que el 50% de los ácidos glutámicos se encuentran funcionalizados covalentemente con una molécula fotocromática que coincide con la preferida en el método de realización, por ejemplo, la molécula de azobenzeno.

La Figura 3 muestra una micrografía de transmisión de electrones (TEM) de nanopartículas de oro funcionalizadas con el PDE (oro-PDE) utilizado en el modo preferido de realización. La barra de escala representa nanómetros.

La Figura 4 muestra el espectro de infrarrojos (FT-IR) de los materiales que han sido sintetizados en el modo de realización preferido y son los siguientes: ciclodextrina tiolada, PDE, nanopartículas de oro funcionalizadas con PDE (oro-PDE) y nanopartículas fiincionalizadas con PDE y ciclodextrinas doladas (oro-PDE-ciclodextrina).

La Figura 5 muestra espectrogramas de absorción de radiación UV-vis realizado en el rango comprendido entre 250 y 800 nm y llevado a cabo para disoluciones a pH ácido del híbrido que no contiene ciclodextrinas (oro-PDE), híbrido que contiene ciclodextrinas (oro-PDE-CD), y el experimento de control.

La Figura 6 muestra dos espectrogramas de absorción de radiación UV-vis superponibles. El análisis espectrofotométrico fue llevado a cabo en el rango comprendido entre 250 y 800 nm y realizado para una disolución acuosa a pH ácido del híbrido que no contiene ciclodextrinas (oro-PDE). Los espectrogramas corresponden con los análisis obtenidos para las nanopartículas fiincionalizadas (oro-PDE) que reposaron 48 horas en la oscuridad y después de ser irradiadas con luz UV (por ejemplo a 350 nm) durante 5 minutos.

La Figura 7 muestra un espectrograma de absorción de radiación UV-vis comprendido entre 250 y 800 nm realizado para una disolución acuosa a pH ácido de híbrido que no contiene ciclodextrinas (oro-PDE), donde se observa una amplificación de la absorción de radiación UV-vis en función de la temperatura del medio.

La Figura 8 muestra dos electro micrografías (Cryo-TEM) de nanopartículas de oro fiincionalizadas con el PDE utilizado en el modo preferido de realización del híbrido sensible a temperatura, pH y radiación UV-vis (oro-PDE-CD). En las micrografías se observa que la distancia entre las nanopartículas fiincionalizadas es dependiente de la temperatura. La electromicrografía de la izquierda ha sido tomada a 4°C y la de la derecha a 40°C. Comparando la densidad y la distancia entre partículas que aparecen en ambas micrografías es posible razonar que las nanopartículas fiincionalizadas oro-PDE-CD muestran un comportamiento de agregación y separación en función de la temperatura a pH ácido.

La Figura 9 muestra una repetición de ciclos de calentamiento y de enfriamiento entre 20°C y 40°C llevado a cabo para las nanopartículas fiincionalizadas oro-PDE-CD en los que se ha medido la absorción de radiación UV-vis a 500 nm en función de la temperatura y el número ciclos de calentamiento-enfriamiento.

5 La Figura 10 muestra un espectrograma donde se demuestra la fotomodulación observada para una disolución de ñaño partículas fiincionalizadas oro-PDE-CD a pH ácido una vez adaptadas a la oscuridad (después de 48 horas) y después de ser irradiadas con luz ultravioleta durante 5 minutos. Por motivos de claridad, una magnificación de la zona comprendida entre 300 y 450 nm se encuentra en la parte derecha superior de la gráfica.

10 La Figura 11 muestra un espectrograma donde se demuestra la fotomodulación observada para una disolución acuosa de nanopartículas fiincionalizadas oro-PDE-CD a pH neutro una vez adaptadas a la oscuridad (después de 48 horas) y después de ser irradiadas con luz ultravioleta durante 5 minutos. Por motivos de claridad, una magnificación de la zona comprendida entre 300 y 450 nm se encuentra en la parte derecha superior de la gráfica.

15 La Figura 12 muestra un espectrograma donde se demuestra la fotomodulación observada para una disolución acuosa de nanopartículas fiincionalizadas oro-PDE-CD a pH básico una vez adaptadas a la oscuridad (después de 48 horas) y después de ser irradiadas con luz ultravioleta durante 5 minutos. Por motivos de claridad, una magnificación de la zona comprendida entre 250 y 500 nm se encuentra una en la parte derecha superior de la gráfica.

## 20 Descripción detallada del modo de realización preferido de la invención

La síntesis de nanopartículas fiincionalizadas de oro se llevó a cabo basándose en el método de Brust y col.<sup>27</sup> modificado por los autores de la presente invención. La síntesis del PDE utilizado en el modo de realización preferido ya ha sido descrita en la literatura por los autores de la presente invención.<sup>19</sup> La estructura del PDE utilizado en el modo de realización preferido de la invención está incluido en la Figura 1 y corresponde con la siguiente secuencia aminoacídica C-[(VPGVG)<sub>2</sub>(VPGE<sub>pho0.5</sub>G)(VPGVG)<sub>2</sub>]<sub>15</sub> donde las letras C, V, P, G, y E corresponden con los aminoácidos cisteína, valina, prolina, glicina y ácido glutámico respectivamente. El término E<sub>pho0.5</sub> significa que el 50% de los aminoácidos E (ácido glutámico) están fiincionalizadas covalentemente con grupos fotosensibles a través de un enlace amida entre el ácido glutámico y la molécula de aminoazobenzeno. El grupo fotocromico (por ejemplo, azobenzeno) ha sido incluido en el pentapéptido (VPGE<sub>pho0.5</sub>G) cuya estructura foto-isomerable en función de la radiación incidente se muestra en la Figura 2.

Brevemente, se disolvió el reductor NaBH<sub>4</sub> en 1 mL de agua ultrapura (5.2 mg, 0.137 mmol) y se añadió a una disolución acuosa de PDE (19.8 mg, 5.963 x 10<sup>-4</sup> mmol en 19 ml). La disolución resultante fue agitada a 4°C durante 10 minutos. Posteriormente, se añadió una disolución acuosa del complejo de oro HAuCl<sub>4</sub> disuelto en agua (10.5 mg, 2.666 x 10<sup>-2</sup> mmol, en 1 mL) manteniendo la agitación. Los reactivos son solubles en medio acuoso, luego no es necesario el uso de codisolventes ni de agentes de transferencia de fase para que la reacción de reducción y de crecimiento de las nanopartículas de oro tenga lugar. La disolución roja resultante fue agitada durante 2 horas a 4°C. Posteriormente, la mezcla de reacción fue filtrada (tamaño de poro del filtro 0.22 μm). El híbrido oro-PDE obtenido fue separado de subproductos y reactivos en un proceso de purificación basado en diálisis frente a agua ultrapura. La diálisis de las nanopartículas fiincionalizadas oro-PDE fue llevada a cabo durante 48 horas (tripas de diálisis 12-14000 Dalton). Las nanopartículas fiincionalizadas oro-PDE fueron obtenidas como un sólido de aspecto algodonoso de color rojo oscuro después de la liofilización de la disolución dializada.

45 El contenido en oro metálico presente en las nanopartículas fiincionalizadas oro-PDE fue estimado a través de técnicas espectroscópicas (ICP-AES). El contenido en Au<sup>0</sup> encontrado fue de 11.52% en peso.

Las micrograffas electrónicas de transmisión (TEM) de las nanopartículas fiincionalizadas oro-PDE se corresponden con las publicadas por otros investigadores para otros híbridos metal-compuesto orgánico en que se muestran pequeñas partículas no agregadas de tamaño comprendido entre 1 nm y 10 nm (Figura 3).

Las partículas mostradas en la Figura 3 sugieren que el PDE actúa como monocapa estabilizante que impide la formación de agregados de mayor tamaño.

55 El análisis de espectroscopia infrarroja (FT-IR) muestra que el híbrido oro-PDE muestra las bandas de absorción características del material de partida PDE (Figura 4). Un sistema híbrido inorgánico-orgánico sería particularmente ventajoso al ser soluble en medio acuoso y contener las propiedades originales del material modificado de elastina para aplicaciones biomédicas.

60 El espectro de absorción en el UV-vis (Figura 5) del híbrido oro-PDE muestra una banda de absorción con λ<sub>max</sub> = 500 nm. Esta banda ha sido atribuida a la resonancia de plasmones superficiales (SPR) de partículas de oro de tamaño manométrico.<sup>8</sup> Sin embargo la banda correspondiente al material fotosensible (por ejemplo, azobenzeno) no puede ser diferenciada del resto del espectro de absorción de las nanopartículas fiincionalizadas oro-PDE. Esto es fundamentalmente importante a la hora de obtener nanopartículas fiincionalizadas sensibles a la radiación UV-vis.

65 En el caso particular de la molécula fotocromica de azobenzeno, ésta muestra dos foto-isómeros inter-convertibles cis-trans en función de la radiación incidente (Figura 2). La radiación visible o la oscuridad inducen la formación del foto-isómero trans. De manera alternativa, la radiación ultravioleta (por ejemplo a 350 nm) induce la formación

del foto-isómero cis de la molécula de azobenceno. Ambos foto-isómeros pueden ser bien diferenciados a través de técnicas de espectroscopia de absorción UV-vis, donde el foto-isómero cis muestra una banda de absorción en torno a 350 nm y el isómero trans muestra un máximo de absorción en el rango de longitudes de onda visible, en torno a 420 nm.<sup>19</sup>

5

El comportamiento fotosensible de las nanopartículas funcionalizadas oro-PDE fue investigado utilizando las condiciones espectroscópicas de irradiación y detección publicadas recientemente por los autores de la presente invención.<sup>19</sup>

10

Brevemente, una disolución acuosa de nanopartículas funcionalizadas oro-PDE fue preservada en la oscuridad durante 48 h antes de ser analizada por espectroscopia UV-vis. Posterior irradiación con luz ultravioleta (350 nm) durante 5 minutos resultó en un espectro superponible con el anterior. Las nanopartículas funcionalizadas oro-PDE no muestran evidencia de foto-isomerización del grupo fotocromico mediante espectroscopia UV-vis (Figura 6).

15

Varios razonamientos pueden ser válidos para explicar este fenómeno. Los autores de la presente invención proponen que la consecuencia de que no exista fotomodulación UV-vía se debe a un acoplamiento energético entre el grupo fotosensible y la superficie de la nanopartículas. Existen en la literatura artículos científicos que describen asociaciones físico-químicas entre grupos fotosensibles y nanopartículas metálicas que muestran propiedades foto-físicas, donde la interacción inorgánica-orgánica compromete el comportamiento del grupo fotosensible.<sup>22</sup>

20

Por otro lado el híbrido oro-PDE exhibe propiedades espectroscópicas que pueden ser moduladas en función de la temperatura y el pH del medio (Figura 7). A pH ácido, las nanopartículas funcionalizadas muestran una amplificación de la absorción de la radiación UV-vis en función de la temperatura (Figura 7). Este comportamiento no se observa a pH neutro ni a pH básico.

25

Los autores de la presente investigación ya han explicado la influencia del pH y de la temperatura en las propiedades de PDE.<sup>28</sup>

30

Queda claro en este punto que es necesario desacoplar la absorción de radiación UV-vis del grupo fotosensible respecto de la absorción mostrada por la nanopartículas metálicas. Por ello hemos procedido con la aproximación de desacoplar dicha absorción del grupo fotosensible a través de la formación de complejos de inclusión entre las moléculas fotocromicas (por ejemplo, azobenceno) de las nanopartículas funcionalizadas oro-PDE y moléculas susceptibles de incluir en sus cavidades moleculares grupos fotosensibles (por ejemplo,  $\beta$ -ciclodextrinas). La aproximación mas inteligente resultaría de la inmovilización de las ciclodextrinas de una manera uniforme en la fase condensada donde pueden estar disponibles y accesibles a los grupos fotosensibles que van a ser incluidos en su cavidad hidrófoba. En este punto, los autores de la presente invención procedieron a inmovilizar las moléculas susceptibles de formar complejos de inclusión (por ejemplo  $\beta$ -ciclodextrina) sobre la superficie de la nanopartículas metálica como mejor aproximación. La formación de complejos de inclusión de ciclodextrinas con moléculas fotocromicas ya ha sido investigado por los autores de la presente invención en PDE funcionalizados con grupos fotosensibles.<sup>19</sup>

40

La inclusión y exclusión de moléculas cromóforas en la cavidad de la ciclodextrina está regulada por la estructura del grupo cromóforo que depende a su vez del tipo de radiación que incide sobre el medio.

45

Entonces, los autores de la presente invención han procedido con la síntesis de una ciclodextrina tiolada (por ejemplo,  $\beta$ -ciclodextrina tiolada) susceptible de formar enlaces covalentes con superficies metálicas de oro. Este procedimiento es el general para la síntesis de racimos protegidos monocapa (MPC).<sup>8</sup>

50

La  $\beta$ -ciclodextrina tiolada sintetizada y utilizada en el modo de realización preferido corresponde con 6-Deoxy-6-mercapto- $\beta$ -ciclodextrina. Fue obtenida siguiendo los pasos detallados a continuación.

55

Brevemente, el material disponible comercialmente  $\beta$ -ciclodextrina (heptacicloamilosa) fue transformada en el derivado tosilado 6-desoxy-6-OTs- $\beta$ -ciclodextrina mediante la reacción de cloruro de p-tosilo con uno de los grupos hidroxilos primarios de la  $\beta$ -ciclodextrina de partida. La reacción fue llevada a cabo en medio básico catalizado por Cu (II).<sup>29</sup> Posteriormente, el intermedio 6-desoxy-6-OTs- $\beta$ -ciclodextrina fue transformado en el producto final 6-Deoxy-6-mercapto- $\beta$ -ciclodextrina mediante la reacción con tiourea y reflujo llevado a cabo en una mezcla metanol-agua.<sup>30</sup>

60

La formación de monocapas de ciclodextrina en la superficie del híbrido oro-PDE se llevó a cabo en un solo paso. Brevemente, se preparó una solución acuosa de nanopartículas fiionalizadas oro-PDE (6.86 mg en 0.2 mL) que mostraba color rojo oscuro. Después se procedió con la adición de 1 mL de disolución acuosa de  $\beta$ -ciclodextrina tiolada (2.12 g,  $1.84 \times 10^{-3}$  mmol). Rápidamente, después de la adición de la disolución de ciclodextrinas se observó una decoloración del color rojo inicial de la disolución de nanopartículas fiionalizadas a tonos anaranjados. La reacción fue instantánea, sin embargo la mezcla fue agitada durante 8 horas a 4°C. Posteriormente, la mezcla de reacción fue filtrada (tamaño de poro del filtro 0.22  $\mu$ m). El híbrido final que contiene nanopartículas fiionalizadas de oro con PDE y ciclodextrinas (oro-PDE-CD) fue separado de subproductos y reactivos en un proceso de purificación basado en diálisis frente a agua ultrapura. La diálisis de las nanopartículas fiionalizadas oro-PDE-CD fue llevada a cabo durante 48 horas (tripas de diálisis 12-14000 Dalton). Las nanopartículas fiionalizadas oro-PDE-CD fueron obtenidas como un sólido de aspecto algodonoso de color rojo oscuro después de la liofilización de la disolución dializada.

65

La proporción de  $\beta$ -ciclodextrina tiolada utilizada en la síntesis de las nanopartículas fiincionalizadas oro-PDE-CD en relación a los grupos fotosensibles fue aproximadamente 1:1.

5 El contenido en oro metálico presente en las nanopartículas fiincionalizadas oro-PDE-CD fue estimado a través de técnicas espectroscópicas (ICP-AES). El contenido en Au<sup>0</sup> encontrado fue de 10.83% en peso.

10 Análisis de espectroscopia de infrarrojos (FT-IR) llevado a cabo para las nanopartículas fiincionalizadas oro-PDE-CD (Figura 4) muestra la presencia de bandas de absorción características de los materiales constituyentes; ciclodextrina y material derivado de elastina respectivamente.

15 Las micrografías electrónicas de transmisión (Cryo-TEM) del híbrido oro-PDE-CD se corresponden con las publicadas por otros investigadores para otros híbridos metal-compuesto orgánico en que se muestran pequeñas partículas no agregadas de tamaño comprendido entre 1 nm y 10 nm (Figura 8). Además, no se observo un cambio sustancial en el tamaño de partícula o en su estado de agregación después al ser incluida las ciclodextrinas en la superficie de las nanopartículas.

20 La respuesta a las variaciones térmicas del material derivado de elastina inmovilizado en la superficie de las nanopartículas de oro no sufrió modificaciones notables. De este modo, mediante la observación de micrografías electrónicas de transmisión llevadas a cabo a dos temperaturas distintas, fue posible observar directamente la agregación y separación de las nanopartículas en función de la temperatura y a pH ácido (Figura 8). En las micrografías mostradas en la Figura 8 se observa que la distancia entre las nanopartículas funcionalizadas es dependiente de la temperatura. La electro micrografía de la izquierda ha sido tomada a 4°C y la de la derecha a 40°C. Comparando la densidad y la distancia entre partículas que aparecen en ambas micrografías es posible razonar que las nanopartículas funcionalizadas oro-PDE-CD muestran un comportamiento de agregación y separación en función de la temperatura (en disolución a pH ácido). A 4°C las nanopartículas funcionalizadas están separadas (distancia entre las nanopartículas es de varios ordenes de magnitud con respecto al diámetro de las nanopartículas) y la densidad de partículas es relativamente baja en la zona de estudio. A 40°C se produce una agregación de las nanopartículas que conlleva un aumento de la densidad de partículas y una disminución general de la distancia entre partículas vecinas, donde en algunas áreas de la zona de estudio la distancia entre partículas adyacentes es del orden del diámetro de las nanopartículas.

30 Esto supone una demostración directa de que el mecanismo de agregación-expansión mostrado por las nanopartículas funcionalizadas (oro-PDE) en función de la temperatura y a su vez las propiedades de autoensamblaje de las nanopartículas funcionalizadas que contienen monocapas de ciclodextrinas en su superficie (oro-PDE-CD) no han sido aniquiladas por la formación de las monocapas de ciclodextrinas en la superficie de las nanopartículas funcionalizadas oro-PDE.

35 Las partículas mostradas en la Figura 8 sugieren que el material de elastina actúa como monocapa estabilizante que impide la formación de agregados de mayor tamaño.

40 El espectro de absorción UV-vis (Figura 5) del híbrido oro-PDE-CD muestra una banda de absorción a una  $\lambda_{\max} = 500$  nm. Esta banda ha sido atribuida a la resonancia de plasmones superficiales del núcleo del oro.<sup>8</sup> Sin embargo, la banda correspondiente al material fotosensible en las nanopartículas funcionalizadas oro-PDE-CD puede ser diferenciada como un máximo local a una  $\lambda_{\max} = 350$  nm. Dicha banda puede ser relacionada con la foto-isomerización del grupo fotosensible en función de la radiación UV-vis.

45 Entonces, para demostrar que la formación de complejos de inclusión entre los grupos fotosensibles de las nanopartículas funcionalizadas y ciclodextrinas inmovilizadas en la superficie de las nanopartículas es responsable de la sensibilidad a radiación UV-vis de las nanopartículas fiincionalizadas oro-PDE-CD, se llevaron a cabo diferentes experimentos con las mismas condiciones espectroscópicas de irradiación y detección descritas anteriormente para investigar el comportamiento fotosensible del híbrido oro-PDE.

50 Por lo tanto se prepararon disoluciones acuosas de nanopartículas funcionalizadas oro-PDE-CD a pH ácido, neutro y básico para cuantificar la respuesta de las nanopartículas fiincionalizadas a radiación UV-vis.

55 Tanto a pH ácido (Figura 10), como pH neutro (Figura 11) y pH básico (Figura 12) las nanopartículas de oro-PDE-CD muestran foto-sensibilidad reversible a la radiación UV-vis, donde la absorbancia puede ser modulada en función de la radiación incidente independientemente del pH.

60 El nuevo híbrido oro-PDE-CD que resultó de la modificación del híbrido oro-PDE con ciclodextrinas, exhibe propiedades espectroscópicas que pueden ser moduladas en función de la temperatura, pH y radiación UV-vis del medio.

65 Disoluciones acuosas a pH ácido de las nanopartículas fiincionalizadas de oro-PDE-CD muestran una amplificación reversible de la absorbancia a 500 nm en función de la temperatura (Figura 9). El híbrido oro-PDE-CD puede ser sometido a ciclos de calentamiento y enfriamiento entre 20 y 40°C de manera reversible (Figura 9).

Esta modulación de la absorbancia en función de la temperatura es dependiente del pH, y por lo tanto no puede ser observada a pH neutro o pH básico.

Un experimento de control fue diseñado por los autores de la presente invención para demostrar que el desacoplamiento de la absorción del grupo fotosensible se debe a la formación de complejos de inclusión entre el grupo fotosensible y la ciclodextrina en la superficie de la nanopartículas.

5 El experimento de control consistió en una disolución acuosa de nanopartículas funcionalizadas oro-PDE a la cual se añadió una disolución de ciclodextrinas no tioladas. La ciclodextrina utilizada en el experimento de control carece de grupos sulfhidrilo en su estructura susceptibles de formar enlaces covalentes con superficies de oro y por lo tanto no se puede asegurar concienzudamente que va a quedar inmovilizada en la superficie de la nanopartícula.

10 En todo caso, al mezclar una disolución acuosa de  $\beta$ -ciclodextrina sobre otra disolución acuosa de híbrido oro-PDE se asegura una distribución uniforme del compuesto susceptible de formar complejos de inclusión con grupos fotosensibles (por ejemplo ciclodextrinas) en toda la fase condensada.

15 Brevemente, a una disolución acuosa de nanopartículas funcionalizadas oro-PDE (0.128 mg en 0.1 mL) se añadió de  $\beta$ -ciclodextrina (por ejemplo, cicloheptaamilosa) en disolución acuosa (0.04 mg en 0.4 mL). Después de la adición del la disolución de ciclodextrina no tiolada, no se observó ningún cambio sustancial de la coloración inicial de la disolución de nanopartículas funcionalizadas oro-PDE iniciales. La mezcla final fue agitada durante media hora a temperatura ambiente. Posteriormente, la disolución se guardo en la oscuridad a 4°C y protegida de radiación UV-vis.

20 La misma relación en peso de compuesto susceptible de formar complejos de inclusión (por ejemplo, ciclodextrina fue añadido con respecto a la cantidad de grupos fotosensibles, asegurándonos que la proporción de ciclodextrinas por grupos fotocromicos es lo mas aproximada 1:1 y que por lo tanto el experimento de control resulta lo menos modificado posible respecto del experimento de síntesis del híbrido oro-PDE-CD descrito en el modo de realización preferido de la invención.

25 Mediante análisis espectroscópicos de absorción UV-vis se confirmó que la mezcla física de  $\beta$ -ciclodextrina (no tiolada) con nanopartículas funcionalizadas oro-PDE no desacopla la absorción de los grupos fotosensibles respecto de la absorción de las nanopartículas de oro, y por lo tanto no dota a la mezcla de sensibilidad a radiación UV-vis, necesaria para dotar al material de propiedades de respuesta a múltiples estímulos (Figura 5). El espectro de absorción UV-vis del experimento de control es superponible al espectro de absorción del híbrido oro-PDE. Esto supone que la presencia en disolución de ciclodextrinas (por ejemplo  $\beta$ -ciclodextrinas) no induce ninguna modificación de los mecanismos de absorción de radiación UV-vis de las nanopartículas funcionalizadas. Además, es posible correlacionar la presencia de moléculas que forman complejos de inclusión con grupos fotosensibles con modificaciones de la estructura de la fase condensada que las alberga. Desafortunadamente este no es el caso, ya que la respuesta espectroscópica observada es idéntica a la inicial obtenida sin las moléculas que forman complejos de inclusión, luego no existe ninguna modificación de la estructura de la fase condensada que pueda dar lugar a un desacoplamiento de la absorción UV-vis de los grupos fotosensibles.

40 De esta manera, a través del experimento de control que contiene una disolución de moléculas susceptibles de formar complejos de inclusión (por ejemplo, ciclodextrinas) con los grupos fotosensibles (por ejemplo, azobenzenos) se demuestra que únicamente es posible desacoplar la absorción de las moléculas fotocromicas en el híbrido oro-PDE mediante la formación de complejos de inclusión en la superficie de las nanopartículas funcionalizadas (por ejemplo, oro-PDE-CD).

45 De manera explícita, el experimento de control fue realizado con disoluciones tampón a pH ácido, básico y neutro, para demostrar que el pH no es una variable que condicione la formación de complejos de inclusión que desacoplen la absorción de los grupos fotosensibles en la mezcla física de ciclodextrinas (por ejemplo,  $\beta$ -ciclodextrina) y nanopartículas funcionalizadas (por ejemplo, oro-PDE) y por lo tanto que doten a las nanopartículas funcionalizadas de sensibilidad UV-vis.

50 En todos los casos anteriores los espectros fueron superponibles indicando que el pH no es una variable que condicione el desacoplamiento de la absorción de los grupos fotosensibles.

55 De manera similar, Peng y col.<sup>31</sup> han utilizado la formación de complejos de inclusión de azobenzeno y ciclodextrinas sobre nanopartículas de oro para lograr el autoensamblado de racimos de oro en función de la temperatura y radiación UV-vis. Desafortunadamente, estos materiales pierden las propiedades termosensibles cuando son irradiados con radiación ultravioleta.

60 Queda de manifiesto que el material oro-PDE-CD descrito en nuestra invención exhibe propiedades espectroscópicas sensibles a variaciones de pH, temperatura, y radiación UV-vis del medio.

65 Además, ha sido demostrado en esta invención la necesidad de localizar la formación de complejos de inclusión de grupos fotosensibles y ciclodextrinas sobre la superficie de la nanopartícula metálica para impedir acoplamiento energético entre el grupo fotocromico y la superficie metálica y por lo tanto evitar la pérdida de sensibilidad a la radiación UV-vis.

**Descripción de los modos de realización alternativos de la invención**

Habiéndose descrito la invención con respecto a los modos de realización preferidos actualmente, la invención no queda limitada por ellos. Existen alternativas para los diversos elementos que constituyen el híbrido fotosensible como se describe a continuación. Estas alternativas se pueden emplear individualmente o en consonancia con otras variantes.

*1- Nanopartícula metálica*

Las nanopartículas son generalmente partículas de tamaños nanoscópicos y que pueden mostrar geometrías variadas como octaedros, esferas, cilindros etc. Los autores de la presente invención han obtenido nanopartículas de forma esférica. La forma puede cubrir todas las posibilidades indicadas para nanopartículas. Tal y como aquí se utiliza el término, por partícula se entiende las de un tamaño de 500 nm o inferior, preferiblemente entre 1 y 10 nm y más preferiblemente entre 1 y 3 nm. Se puede utilizar una serie de materiales metálicos como parte inorgánica del híbrido. El material preferido en la presente invención es un metal, preferiblemente oro. De manera alternativa, el metal puede seleccionarse entre otros metales como por ejemplo plata, cobre, platino, cobalto, hierro entre todos los metales restantes de la tabla periódica. La presente invención no excluye la posible utilización de compuestos metálicos y aleaciones. Dos ejemplos de materiales que pueden estar formados de mezclas de metales y óxidos metálicos son el FePt y el Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> respectivamente.

*2- El material fotosensible*

Tal y como se indica en la presente invención, la característica de un material fotosensible es que puede ser capaz de ser inmovilizado sobre una nanopartícula metálica a la vez que puede controlar el estado de agregación atómico durante el crecimiento de la nanopartícula. Debe ser capaz de actuar como grupo fotosensible al medio y ser susceptible de formar complejos de inclusión con moléculas que exhiben cavidades en su estructura como por ejemplo las ciclodextrinas y sus derivados.

El material fotosensible preferido en la presente invención es un grupo azobenzeno. No obstante, no ha de entenderse que se excluyen del marco de la presente invención el uso de otras moléculas fotocromáticas derivados del la molécula de azobenzeno.

Se sabe que el azobenzeno o algunos derivados del azobenzeno forman complejos de inclusión con moléculas que exhiben cavidades en su interior. Por lo tanto, en la presente invención se ha preferido el uso de una  $\beta$ -ciclodextrina tiolada, pero no ha de entenderse sin embargo, la exclusión del marco de la presente invención el uso de otras moléculas como alfa ( $\alpha$ ) y ( $\gamma$ ) gamma ciclodextrinas y sus derivados.

*3- El PDE (polímero derivado de elastina)*

La matriz polimérica por la cual se une el grupo fotosensible a la superficie derivada del núcleo de la nanopartícula es una característica importante del modo de realización preferido de la invención. Se prefiere una secuencia aminoacídica del tipo VPGXG donde V, P y G corresponden con los aminoácidos valina, prolina, glicina respectivamente y X corresponde con cualquier aminoácido.

En el modo preferido de realización de la invención se ha seleccionado por grupo X el aminoácido ácido glutámico porque puede formar enlaces covalentes (por ejemplo de tipo amida) con grupos fotosensibles. Sin embargo, no hay que entender que se excluye del marco de la presente invención otros aminoácidos susceptibles de formar enlaces covalentes con grupos fotosensibles, como por ejemplo los aminoácidos lisina y ácido aspártico.

La secuencia aminoacídica expresada en el modo preferido de realización de la presente invención corresponde con la repetición de las secuencias pentapeptídicas (VPGVG) y (VPGXG). Sin embargo, tampoco se excluye del marco de la presente invención otras secuencias aminoacídicas pentapeptídicas ni de las combinaciones o repeticiones de las mismas que conlleve estructuras diferentes y pesos moleculares variados.

En el modo preferido de realización de la invención únicamente se han funcionalizado con grupos fotosensibles el 50% de los aminoácidos denotados como X (por ejemplo, ácido glutámico). No obstante, no quedan excluidas fuera del marco de la presente invención otras proporciones de funcionalización de los aminoácidos denotados como X tanto por debajo (por ejemplo, 40%) como por encima (por ejemplo, 60%) del porcentaje utilizado en el modo preferido de realización de la invención.

La matriz polimérica derivada de la elastina (PDE) se puede unir por otros medios a la superficie de la nanopartícula en lugar de hacerlo a través del enlace SH, como está expresado en el modo preferido de realización de la invención. No obstante, no se excluyen del marco de la presente invención otros modos covalentes de enlace entre el PDE con la superficie de la nanopartícula, como por ejemplo, a través de enlaces de puente disulfuro S-S.

El PDE se puede unir por otros medios a la superficie de la nanopartícula en lugar de hacerlo a través del aminoácido cisteína, como está expresado en el modo preferido de realización de la invención. No obstante, no se excluyen del marco de la presente invención otros aminoácidos susceptibles de formar enlaces covalentes con la superficie de la nanopartículas metálicas.



El número de grupos sulfhidrilo (SH) susceptibles de enlazar covalentemente a la superficie de la nanopartícula es uno por unidad de PDE, pero este número de grupos puede ser de orden superior. Por lo tanto, no se excluyen del marco de la presente invención otros PDE diferentes del utilizado en el modo preferido de realización que muestre uno o mas (por ejemplo, dos o tres) grupos SH susceptibles de enlazar covalentemente con la superficie de la nanopartícula.

El PDE utilizado en el modo preferido de realización de la invención muestra el aminoácido cisteína esta en la posición terminal. Este aminoácido es el responsable de la quimisorción del PDE a la superficie de la nanopartícula. Pero este aminoácido puede estar en cualquier parte de la estructura del PDE. Luego, no se excluye del marco de la presente invención otras posiciones para el aminoácido cisteína (por ejemplo, en cualquier otro lugar que no sea el principio o el termino de la secuencia aminoacídica del PDE) dentro de la estructura del PDE.

La síntesis del PDE utilizado en el modo preferido de realización de la invención se ha llevado a cabo mediante técnicas recombinantes. Sin embargo, no se excluyen del marco de la presente invención la síntesis de PDE a través de técnicas de síntesis tradicionales.

Las propiedades inteligentes atribuidas al PDE corresponden con sensibilidad a temperatura, pH y radiación UV-vis. Sin embargo, no se excluyen del marco de la presente invención otras propiedades que pueda mostrar el PDE y que no hayan sido consideradas dentro del modo preferido de realización de la invención como son por ejemplo la modificación del estado de agregación del PDE en función de la concentración de iones del medio.

## Referencias

1) a) **Jiang, G.; Wang, Li.; Chen, T.; Yu, H.; Chen, C.** *Mat. Chem. Phys.* 2006, 98, 76-82. b) **Srivastava, S.; Frankamp, B. L.; Rotello, V. M.** *Chem. Mat.* 2005, 17, 487-490. c) **Frankamp, B. L.; Boal, A. K.; Rotello, V. M.** *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 15146.

2) a) **Shenhar, R.; Norsten, T. B.; Rotello, V. M;** *Adv. Mater.* 2005, 17, 6, 657-669. b) **Boal, A. K.; Ilhan, F.; DeRouchey, J. E.; Thurn-Albrecht, T.; Russell, T. P.; Rotello, V. M.** *Nature* 2000, 404, 746.

3) **Smart, T.; Lomas, H.; Massignani, M.; Flores-Merino, M. V.; Ruiz Perez, L.; Battaglia, G.** *NanoToday*, 2008, 3, (3-4), 38.

4) **Aili, D.; Enander, K.; Rydberg, J.; Lundstrom, I.; Baltzer, L.; Liedberg, B.** *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 2194.

5) **Bayraktar, H.; You, C.-C.; Rotello, V. M.; Knapp, M. J.** *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 2732.

6) **Li, Z.; Mirkin, C. A.** *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 11568.

7) **Storhoff, J. J.; Lazarides, A. A.; Mucic, R. C.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L.; Schatz, G. C.;** *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 4640.

8) **Daniel, M. C.; Astruc, D.** *Chem. Rev.* 2004, 104, 293.

9) **Fendler, J. H.;** *Chem. Mater.* 2001, 13, 3196.

10) **Ghosh, S. K.; Pal, T.** *Chem. Rev.* 2007, 107, 4797.

11) **Nath, N.; Chilkoti, A.** *Adv. Mat.* 2002, 14, 17, 1243.

12) **Urry, D.W.** *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1993, 32, 819.

13) **Girotti, A.; Reguera, J.; Rodríguez-Cabello, J. C.; Arias, F. J.; Alonso, M.; Testera, A. M.** *J. Mater. Sci-Mater. M.*, 2004, 15, 479.

14) **Herrero-Vanrell, R.; Rincón, A. C.; Alonso, M.; Reboto, V.; Molina-Martinez, I. T.; Rodríguez-Cabello, J. C.** *J. Control Release*, 2005, 102, 113.

15) **Urry, D. W.** *J. Phys. Chem B* 1997, 101, 11007.

16) **Reguera, J.; Fahmi, A.; Moriarty, P.; Girotti, A.; Rodríguez-Cabello, J. C.** *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 13212.

17) **Dreher, M. R.; Simnick, A. J.; Fischer, K.; Smith, R. J.; Patel, A.; Schmidt, M.; Chilkoti, A.** *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 687.

18) **Huang, H. C.; Korias, P.; Parker, S. M.; Selby, L.; Megeed, Z.; Rege, K.** *Langmuir*, 2008 asap communication.

19) **Rodríguez-Cabello, J. C.; Alonso, M.; Guiscardo, L.; Reboto, V.; Girotti, A.** *Adv. Mater.*, 2002, 14, 1151.

20) J.C. Crano, R. Guglielmetti (Eds.), *Organic Photochromic and Thermochromic Compounds*, Vol 1, Plenum Press, New York, 1998, 1-9.

5 21) **Nishi, H., Kobatake, S.**, *Macromolecules*, 2008, 41, 3995.

22) **Thomas, K. G., Kamat, P. V.**, *Acc. Chem. Res.* 2003, 36, 888.

10 23) **Sunamoto, J., Iwamoto, K., Mohri, Y., Kominato, T.**, *J. Am. Chem. Soc.* 1982, 104, 5502.

24) **Nakayama, Y., Furomoto, A., Kidoaki, S., Matsuda, T.**, *Photochem. Photobiol.* 2003, 77, 480.

15 25) **Tada, Y., Sumaru, K., Kameda, M., Ohi, K., Takagi, T., Kanamori, T.**, *J. Appl. Polym. Sel.*, 2006, 100, 495.

26) **Imahori, H., Arimura, M., Hanada, T., Nishimura, Y., Yamazaki, I., Sakata, Y., Fukumuzi, S.**, *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 335.

20 27) **Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R.** *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1994, 801.

28) **Rodríguez-Cabello, J. C., Prieto, S., Reguera, J., Arias, F. J., Ribeiro, A.**, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, 2007, 18, 269.

25 29) **Tang, B., Liang, H-L., Xu, K-H., Mao, Z., Shi, X-F, Chen, Z-Z.**, *Analytica Chimica Acta* 2005, 554, 31.

30 30) **Baussanne, I., Benito, J.M., Ortiz Mellet, C., García Fernández, J.M., Law, H., Defaye, J.**, *Chem. Commun.*, 2000, 1489.

31) **Luo, C., Zuo, F., Zhaohui, Z., Cheng, X., Ding, X., Peng, Y.**, *Macromol. Rapid Commun.* 2008, 29, 149.

## REIVINDICACIONES

1. Una nanopartícula funcionalizada que comprende:
- 5 un núcleo metálico; y
- una monocapa unida químicamente al citado núcleo, la cual está formada por moléculas que producen complejos de inclusión y un PDE modificado que contiene grupos que muestran sensibilidad a la temperatura, pH y foto-excitación.
- 10
2. Una nanopartícula según la reivindicación 1, donde el núcleo comprende o consiste en un metal o metales seleccionados entre plata, cobre, platino, cobalto, hierro.
- 15
3. Una nanopartícula según la reivindicación 1, donde el núcleo es oro.
4. Una nanopartícula según las reivindicaciones precedentes, donde el grupo fotosensible es azobenzeno.
5. Una nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el grupo fotosensible esta unido al núcleo por una fracción de PDE.
- 20
6. Una nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el PDE muestra una secuencia aminoacídica del tipo VPGXG, donde X puede corresponder con cualquier aminoácido.
- 25
7. Una nanopartícula según las reivindicaciones precedentes donde el grupo fotosensible forma complejos de inclusión sobre la superficie del núcleo.
8. Una nanopartícula según las reivindicaciones precedentes donde la monocapa de ciclodextrinas inmovilizadas sobre la superficie del núcleo permite la inclusión de los grupos fotosensibles en su interior formando complejos de inclusión.
- 30
9. Una nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la formación de complejos de inclusión responsables del desacoplamiento del comportamiento fotocromico de los grupos fotosensibles tiene lugar únicamente y exclusivamente sobre la superficie de la nanopartícula.
- 35
10. Una nanopartícula según las reivindicaciones precedentes donde no es necesario el uso de agentes de transferencia de fase durante su síntesis.
- 40
11. Una nanopartícula según las reivindicaciones precedentes donde su síntesis tiene lugar en un medio único, homogéneo y acuoso.
12. Una nanopartícula según las reivindicaciones precedentes donde el agente estabilizador de las nanopartículas corresponde con un PDE.
- 45
13. Una nanopartícula según las reivindicaciones precedentes donde el agente estabilizador de las nanopartículas, por ejemplo PDE evita la agregación de las nanopartículas de forma irreversible durante su síntesis.
14. Una nanopartícula según las reivindicaciones precedentes donde el agente estabilizador de las nanopartículas (por ejemplo el PDE) promueve la agregación de las nanopartículas de forma reversible en función de la temperatura del medio.
- 50
15. Una nanopartícula según las reivindicaciones precedentes donde el agente estabilizador de las nanopartículas, por ejemplo PDE promueve la agregación de las nanopartículas de forma reversible en función del pH del medio.
- 55
16. Una nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el núcleo tiene un tamaño de 500 nm o inferior, preferiblemente entre 1 y 10 nm y mas preferiblemente entre 1 y 3 nm.
17. Un método para producir una nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores hasta la presente, incluye las siguientes etapas:
- 60 Disolver  $\text{HAuCl}_4$  en agua
- Añadir a una disolución acuosa de PDE
- 65 Agitar
- Añadir agente reductor

Agitar

Añadir disolución acuosa de ciclodextrina tiolada

5 Agitar

Purificar mediante diálisis

10 Aislar el producto mediante evaporación del agua (por ejemplo liofilización).

18. Un método para producir un sistema multirespuesta a variaciones del medio que module amplificando o disminuyendo la absorción de radiación UV-vis, que consiste en:

15 a) disolución de las nanopartículas funcionalizadas oro-PDE-CD en agua a una concentración adecuada con la instrumentación de medida espectroscópica de absorción de radiación UV-vis

20 b) excitación mediante radiación UV-vis de la disolución de nanopartículas funcionalizadas en función de la temperatura, pH, longitud de onda de la radiación incidente y de la ausencia (oscuridad) o presencia de luz visible.

25

30

35

40

45

50

55

60

65



C= cisteína  
V=valina  
P=prolina  
G=glicina  
E=ácido glutámico

Figura 1

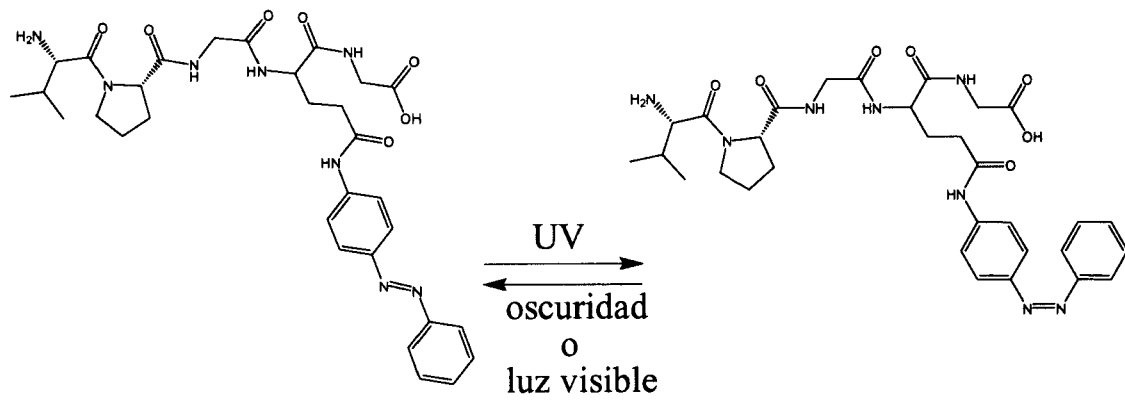


Figura 2

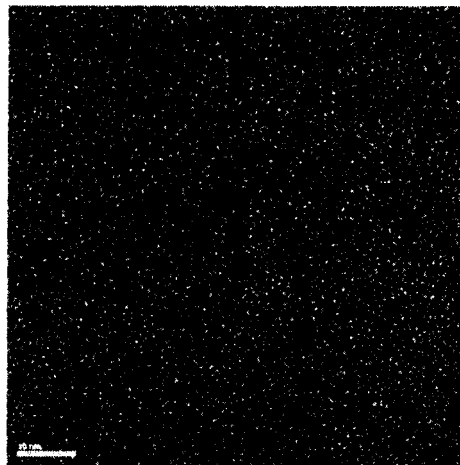


Figura 3

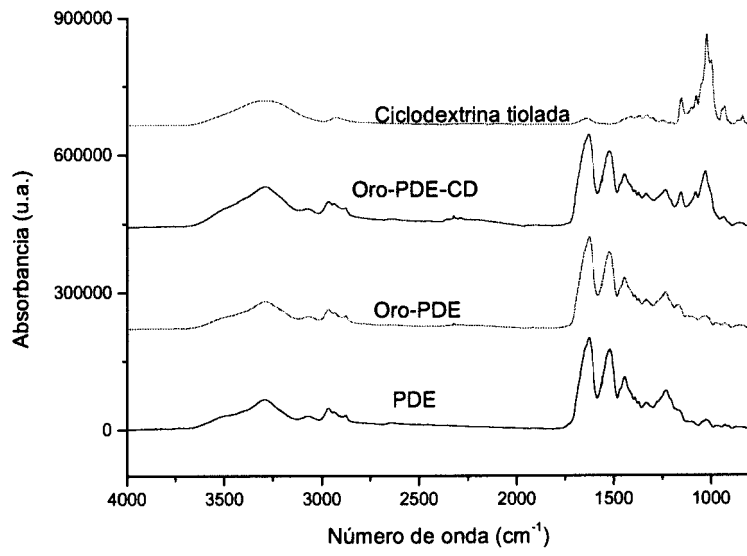


Figura 4



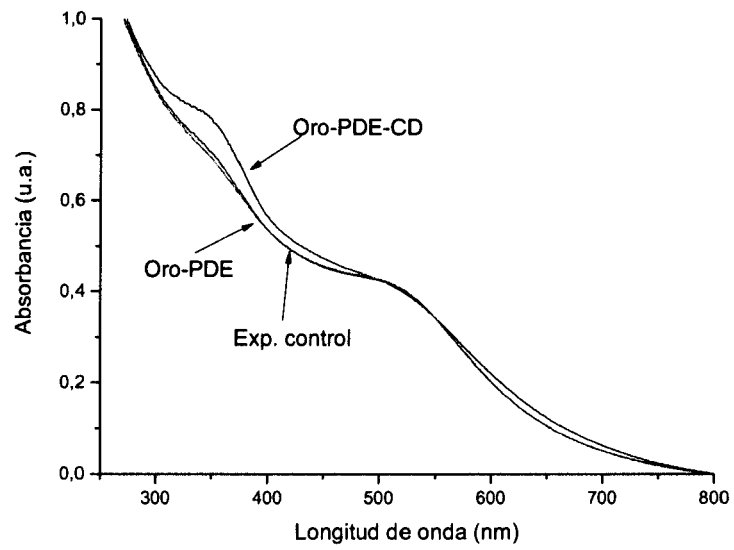


Figura 5

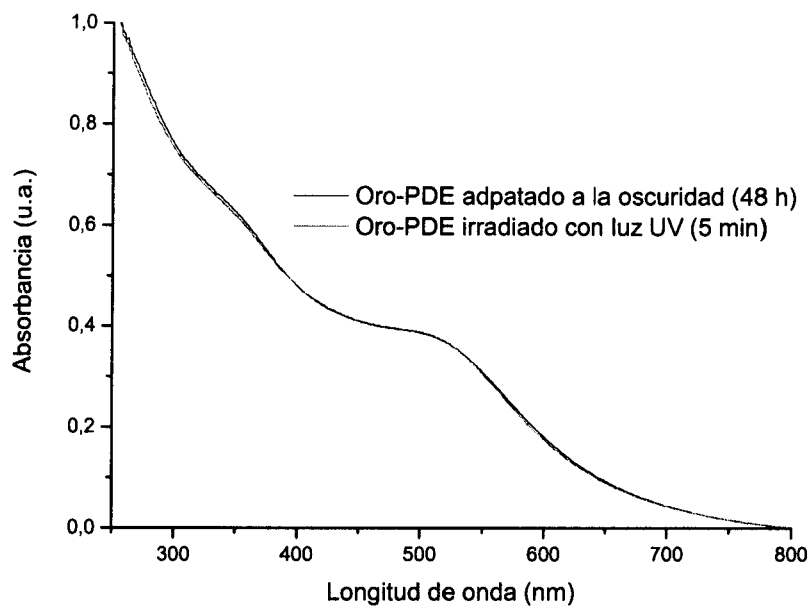


Figura 6

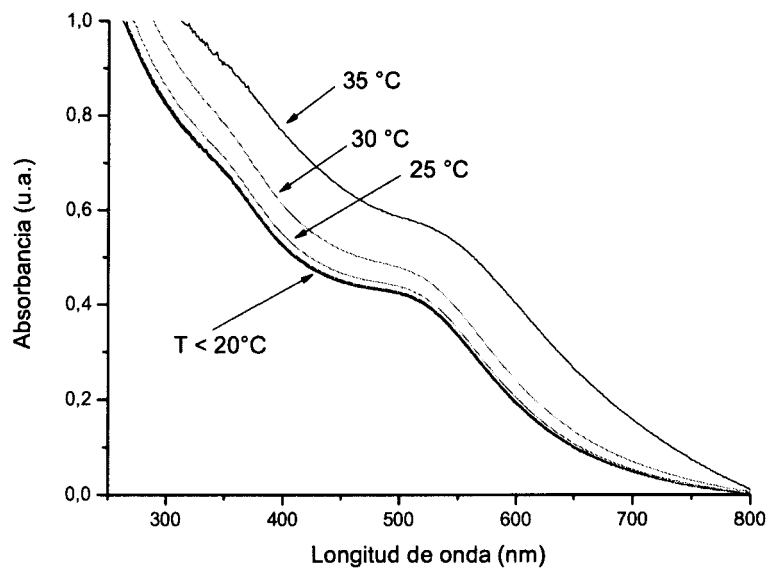


Figura 7

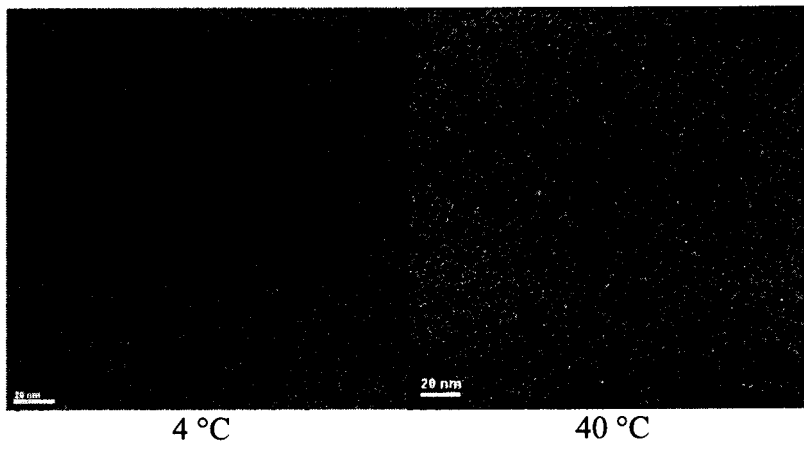


Figura 8

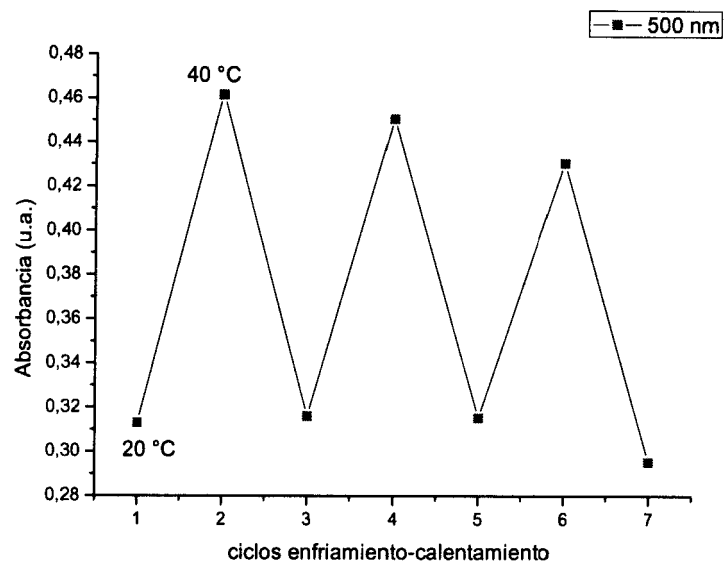


Figura 9

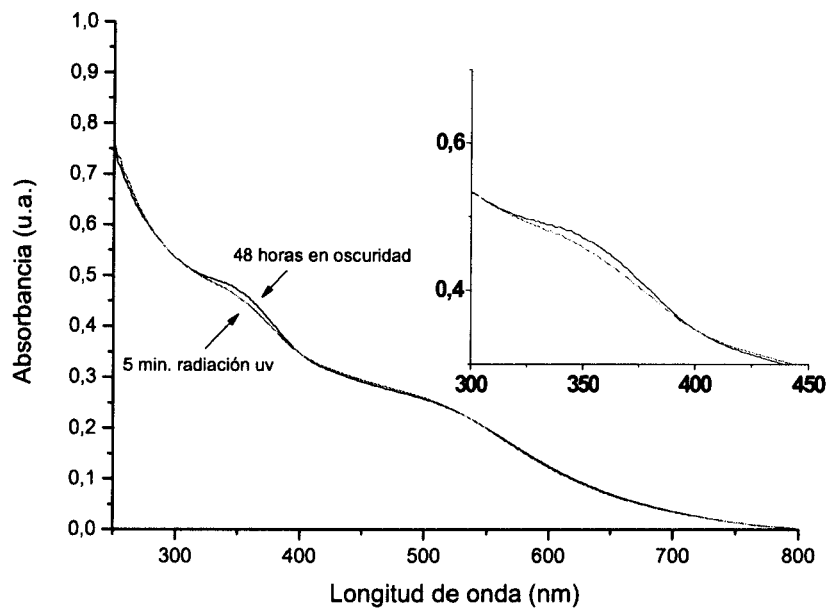


Figura 10

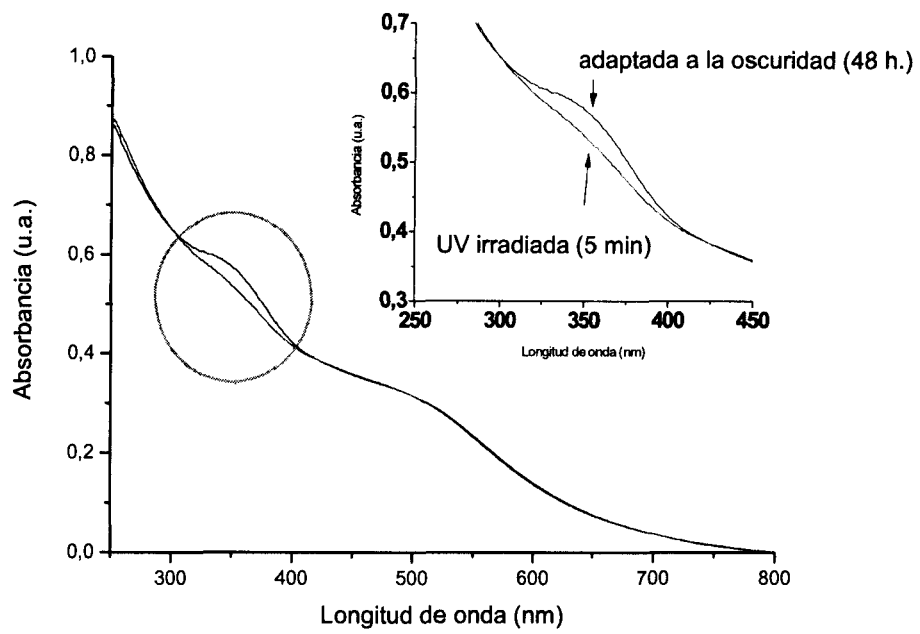


Figura 11

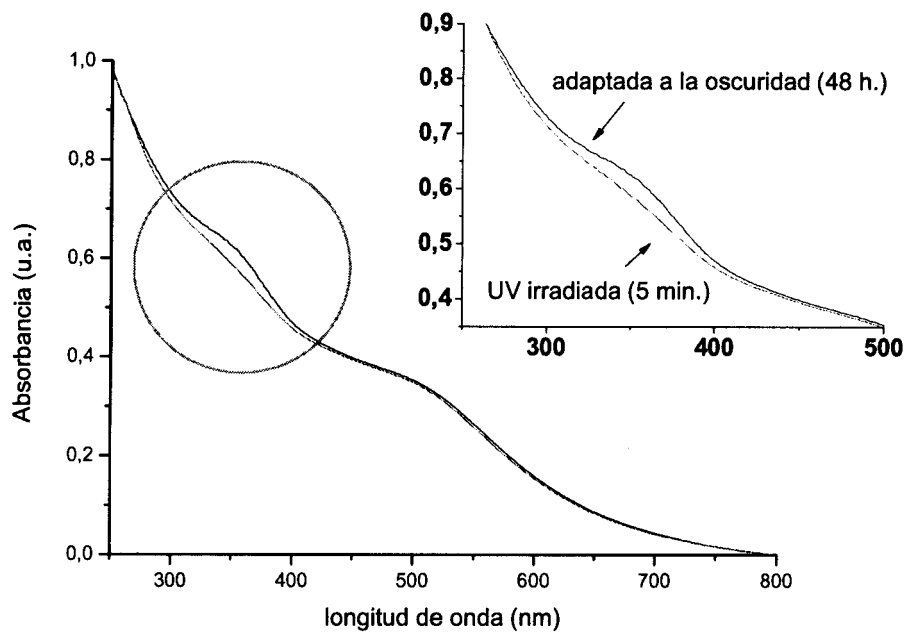


Figura 12





OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud:200900418

②② Fecha de presentación de la solicitud: 10.02.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	CH. LUO et al., "Tunable smart surface of gold nanoparticles achieved by light-controlled molecular recognition effect", Macromol. Rapid Commun., 2008, vol. 29, páginas 149-154.	1-18
Y	J. C. RODRÍGUEZ-CABELLO et al., "Amplified photoresponse of a p-phenylazobenzene derivative of an elastin-like polymer by $\alpha$ -cyclodextrin: The amplified $\Delta T_f$ mechanism", Adv. Mater., 2002, vol. 14, nº 16, páginas 1151-1154.	1-18
A	N. NATH et al., "Interfacial phase transition of an environmentally responsive elastin bipolymer adsorbed on functionalized gold nanoparticles studied by colloidal surface plasmon resonance", J. Am. Chem. Soc., 2001, vol. 123, páginas 8197-8202.	1-18
A	US 20080202195 A1 (S. W. JOO et al.) 28.08.2008, reivindicaciones.	1-18
A	S. CHAH et al., "Gold nanoparticles as a colorimetric sensor for protein conformational changes", Chemistry & Biology, 2005, vol. 12, páginas 323-328.	1-18

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  
30.12.2010

Examinador  
E. Davila Muro

Página  
1/4

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**G01N21/31** (01.01.2006)

**G01N21/33** (01.01.2006)

**B82B3/00** (01.01.2006)

**B22F1/02** (01.01.2006)

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

G01N, B82B, B22F

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

INVENES, EPODOC, XPESP, WPI, CAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.12.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-18	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-18	<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	CH. LUO et al., "Tunable smart surface of gold nanoparticles achieved by light-controlled molecular recognition effect", <i>Macromol. Rapid Commun.</i> , 2008, vol. 29, páginas 149-154	
D02	J. C. RODRIGUEZ-CABELLO et al., "Amplified photoresponse of a p-phenylazobenzene derivative of an elastin-like polymer by $\alpha$ -cyclodextrin: The amplified $\Delta T_t$ mechanism", <i>Adv. Mater.</i> , 2002, vol. 14, nº 16, páginas 1151-1154	
D03	N. NATH et al., "Interfacial phase transition of an environmentally responsive elastin biopolymer adsorbed on functionalized gold nanoparticles studied by colloidal surface plasmon resonance", <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 2001, vol. 123, páginas 8197-8202	
D04	US 20080202195 A1 (S. W. JOO et al.)	28.08.2008
D05	S. CHAH et al., "Gold nanoparticles as a colorimetric sensor for protein conformational changes", <i>Chemistry &amp; Biology</i> , 2005, vol. 12, páginas 323-328	

**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**

La invención se refiere a una nanopartícula funcionalizada que comprende un núcleo metálico (Au, Ag, Cu, Pt, Co, Fe, preferentemente Au) y una monocapa unida al núcleo constituida por moléculas que forman complejos de inclusión y un polímero derivado de elastina (PDE) con grupos fotosensibles (azobenceno) que producen respuesta a variaciones del medio como temperatura, pH y fotoexcitación con radiación UV-visible. La invención también se refiere al método para producir esta nanopartícula, así como al método para producir un sistema multirespuesta a variaciones del medio utilizando dichas nanopartículas funcionalizadas.

El documento D01, que se considera el estado de la técnica más próximo, divulga unas nanopartículas de oro recubiertas con un polímero N-isopropilacrilamida (PNIPAm) modificado con grupos fotosensibles (azobenceno), que se enlaza mediante auto-ensamblamiento con una monocapa de ciclodextrinas inmovilizadas sobre la superficie del núcleo metálico. Estas nanopartículas se preparan mezclando una solución de  $\text{HAuCl}_4$  en DMF, a la que se añade un reductor  $\text{NaBH}_4$  y una solución acuosa de nanopartículas de Au recubiertas de ciclodextrina con el polímero PNIPAm funcionalizado con grupos azobenceno (ver páginas 149-151,153). Se diferencian de las nanopartículas de la invención en que el polímero utilizado es PNIPAm y no un PDE.

El problema técnico que plantea la solicitud radica en proporcionar unas nanopartículas metálicas funcionalizadas con grupos sensibles a cambios del medio como temperatura, pH y fotoexcitación. La solución propuesta en la solicitud supone utilizar una monocapa, unida al núcleo metálico, de ciclodextrinas capaces de formar complejos de inclusión con los grupos sensibles a los cambios del medio, y como polímero una fracción de PDE modificado con dichos grupos sensibles, como azobenceno, tal como queda recogido en la reivindicación 1.

El documento D02 divulga el uso de polímeros PDE funcionalizados con grupos fotosensibles (derivados azobenceno) en conjunción con ciclodextrinas capaces de formar complejos de inclusión. Esta asociación permite obtener una respuesta óptica amplificada debida a los cambios estructurales reversibles inducidos en los grupos fotosensibles al ser irradiados con luz (ver página 1152, 1154).

Resultaría obvio para un experto en la materia, sobre todo cuando se pretende obtener el mismo resultado (nanopartículas metálicas funcionalizadas con una monocapa unida al núcleo y un polímero con grupos sensibles a cambios en el medio) utilizar un polímero PDE modificado con grupos fotosensibles como el descrito en D02 para la preparación de nanopartículas metálicas alternativas a las divulgadas en D01. Por lo tanto, el objeto de la invención recogido en las reivindicaciones 1-18 se considera que no implica actividad inventiva y no satisface el criterio establecido en el art. 8.1 LP 11/1986.