

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 805**

51 Int. Cl.:

C09K 11/02 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/542 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

C09K 11/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2012 E 12729481 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015 EP 2721120**

54 Título: **Nanosistemas luminiscentes**

30 Prioridad:

15.06.2011 EP 11382196

16.08.2011 US 201161524311 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

23.11.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (100.0%)
Edificio Emprendia - Campus Vida
15782 Santiago de Compostela - A Coruña, ES**

72 Inventor/es:

LÓPEZ QUINTELA, MANUEL ARTURO

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 551 805 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nanosistemas luminiscentes

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a nanosistemas que comprenden clústeres cuánticos atómicos (AQC) metálicos para su uso como nanosistemas luminiscentes, particularmente para su uso como nanosistemas fluorescentes.

Antecedentes

10 En la actualidad, el empleo de técnicas de fluorescencia como la espectroscopía de fluorescencia, la microscopía de fluorescencia, la citometría de flujo o la imagen fluorescente *in vivo*, permite la detección rápida, sensible, fiable y sencilla de la interacción entre biomoléculas, o la interacción de estas biomoléculas con otras moléculas inorgánicas u orgánicas, como por ejemplo fármacos. Estas técnicas requieren la medida de ciertos parámetros experimentales como son la longitud de onda de excitación ($\lambda_{exc.}$), la longitud de onda de emisión ($\lambda_{em.}$), la intensidad o rendimiento cuántico, el tiempo de vida media y la anisotropía de fluorescencia.

15 Una sonda fluorescente adecuada para ser utilizada como nanosensor o biosonda en el descubrimiento de fármacos, en el análisis genético, en citometría de flujo o cribado de alto rendimiento debería tener las siguientes propiedades: se debe poder excitar sin afectar a la matriz que le rodea, detectarse de manera sencilla, tener un alto rendimiento cuántico, ser adaptable al medio, por ejemplo, a un cultivo celular, ser estable y tener grupos funcionales que permitan el marcaje molecular. Además puede ser favorable que estas sondas luminiscentes tengan un tiempo de vida media largo, que no sean tóxicas y que sus parámetros de luminiscencia sean reproducibles en el tiempo.

20 En la actualidad, los únicos sistemas fluorescentes conocidos que poseen grandes desplazamientos de Stokes, superiores a 200 nm y tiempos de decaimientos lentos, superiores al microsegundo, son basados en iones de tierras raras. Sin embargo, presentan múltiples desventajas como son: la difícil incorporación de los mismos en matrices de forma que no pierdan sus características fluorescentes; la existencia de unas características fijas y determinadas de excitación, emisión y desplazamiento de Stokes, correspondientes a cada tierra rara y que por lo tanto no sean susceptibles de ser cambiadas y que son materiales caros y escasos. Ejemplos de estos sistemas están descritos en Sardar, D.K. *et al.*, *Biophotonics*, enero de 2008; Resch-Genger, U., *Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology II Springer Series on Fluorescence*, 2010, volumen 9, parte 1, 3-40; Harma H. *et al.*, *Analytical Chemistry*, 2005, 77, 2643-2648; documentos US7465747B2; US 2010/0224831 A1 y US 4283382.

30 Por lo tanto, sería necesario encontrar sondas luminiscentes que superen estas desventajas de las nanopartículas basadas en los elementos de las tierras raras.

Breve descripción de la invención

35 Sorprendentemente, los inventores de la presente invención han descubierto nanosistemas fluorescentes con grandes desplazamientos de Stokes y tiempos de decaimiento muy superiores a los descritos en el estado de la técnica que no emplean elementos de las tierras raras. Estos nanosistemas comprenden una cavidad interna, o nanocavidad, donde se encuentran encapsulados clústeres cuánticos atómicos (AQC) de metales preferiblemente de transición de al menos dos tamaños diferentes. La superficie interna de esta cavidad interna se encuentra funcionalizada para poder estabilizar adecuadamente los AQC y dicha cavidad tiene un diámetro interno nanométrico lo que permite que la distancia entre los AQC de al menos dos tamaños diferentes presentes en dicha nanocavidad sea menor o igual de aproximadamente 10 nm. Este hecho permite que se pueda dar transferencia de energía de resonancia Förster (FRET) dando lugar a la luminiscencia. Al presentar estas nanocavidades un diámetro interior inferior a la distancia Förster, distancia menor o igual de 10 nm y dado que solamente se encuentran presentes en dichas nanocavidades las especies activas, se impide la desactivación de la luminiscencia, en particular de la fluorescencia, pudiendo conseguirse con estos sistemas altos rendimientos cuánticos, superiores a los que se obtienen con sistemas basados en tierras raras.

45 Las longitudes de onda de excitación y emisión dependen del tamaño de los AQC presentes en la nanocavidad del nanosistema. Por lo tanto, las longitudes de onda de excitación y emisión se pueden seleccionar a voluntad dirigiendo la formación de AQC de los tamaños necesarios para que en dicha nanocavidad se dé el FRET entre los AQC de al menos dos tamaños diferentes. Para optimizar el FRET, la longitud de onda de emisión ($\lambda_{em.}$) del AQC pequeño, o AQC de tamaño inferior, que es el AQC que actúa como un donador se ha de solapar lo más posible con la excitación del AQC mayor o AQC de tamaño superior que es el AQC que actúa como un aceptor. De esta forma se puede seleccionar a voluntad el desplazamiento de Stokes que se desea obtener, liberándose así de la imposición fija y determinada que existe en los métodos de fluorescencia basados en tierras raras. Además, por las características de los AQC utilizados no existe *photobleaching* y el empleo del proceso FRET como base del método propuesto garantiza tiempos de decaimientos largos de la fluorescencia superiores a un microsegundo.

55 Se pueden utilizar elementos metálicos de transición como por ejemplo Au o Ag, que no son tóxicos al presentarse en concentraciones muy bajas. Además, la gran abundancia natural de estos elementos hace de este un método

totalmente sostenible. Los nanosistemas luminiscentes sintetizados:

- son estables sin pérdida de sus propiedades por un período de al menos un año almacenados bajo luz natural y temperatura ambiente,
- son estables en el intervalo de pH de 3 a 10,
- 5 - se pueden concentrar hasta sequedad sin perder sus propiedades fluorescentes incluso en seco,
- pueden redisolverse una vez secos sin pérdida de sus propiedades fluorescentes y también
- se emplean en una concentración menor que la empleada con sistemas luminiscentes basados en elementos de las tierras raras.

El nanosistema además puede funcionalizarse en su superficie exterior para su utilización en diferentes entornos.

- 10 Por lo tanto, un aspecto de la presente invención se refiere al uso de un nanosistema que comprende clústeres cuánticos atómicos (AQC) de al menos dos tamaños diferentes encapsulados en una cavidad de diámetro interior menor o igual a 10 nm, preferiblemente menor o igual a 5 nm como un nanosistema luminiscente.

Otro aspecto de la presente invención es el método de detección de dichos nanosistemas fluorescentes.

- 15 Un aspecto adicional se refiere a los nanosistemas *per se* que comprenden clústeres cuánticos atómicos (AQC) de al menos dos tamaños diferentes encapsulados en una cavidad de diámetro interior menor o igual a 10 nm donde el metal de los AQC es un metal de transición, exceptuando el Au, o una combinación de metales de transición.

- 20 Otro aspecto de la invención se refiere al método de obtención de los nanosistemas que comprenden clústeres cuánticos atómicos (AQC) de al menos dos tamaños diferentes encapsulados en una cavidad con un diámetro interior menor o igual a 10 nm, preferiblemente menor o igual a 5 nm, donde el metal de los AQC es un metal de transición exceptuando el Au o una combinación de metales de transición.

Breve descripción de las figuras

- 25 Figura 1 muestra una representación esquemática de la invención donde los números se refieren a: 1, nanosistema; 2, AQC pequeño o donador; 3, AQC grande o aceptor; 4, funcionalización de la superficie externa del nanosistema; 5, funcionalización de la cavidad interna; 6, diámetro interno de la nanocavidad que entra dentro del rango de la distancia Förster, de aproximadamente 10 nm o menor; 7, excitación de los electrones a niveles de energía superiores ($\lambda_{exc.}$); 8, emisión ($\lambda_{em.}$); y la flecha indica la presencia de Transferencia de Energía de Resonancia Förster (FRET).

- 30 Figura 2 muestra una representación esquemática del nanosistema en particular un nanosoma donde los ω -hidroxiácidos y ω -mercaptoácidos forman la monocapa del nanosoma donde la monocapa tiene un grosor aproximado de 5 nm, observándose que los grupos ácido forman la superficie externa del nanosoma y los grupos hidroxilo, OH y mercapto, SH, quedan hacia el interior formando la superficie de la cavidad interna del nanosoma.

- 35 Figura 3 muestra una representación esquemática de la formación de los AQC en el interior del nanosistema, en particular de los nanosomas de los ejemplos 1 y 2. En una primera etapa, los ω -hidroxiácidos y ω -mercaptoácidos en presencia de un medio básico forman el nanosoma en agua. En una segunda etapa, se añade el metal de transición o combinación de metales que mediante reducción darán lugar a los AQC pequeños o donadores y a los AQC grandes o aceptores. El ejemplo es esquemático mostrando un solo AQC de cada tipo, pero puede haber un número variado de ambos en el interior de la cavidad.

- 40 Figura 4 muestra las imágenes de microscopía electrónica HAADF STEM de los nanosistemas obtenidos en el ejemplo 1, observándose que el tamaño aproximado de las nanocavidades conteniendo los clústeres de oro es de 1,5 nm.

Figura 5 muestra el Mapa EDX de las imágenes de la figura 4 que muestran la composición de los nanosistemas, observándose que los clústeres de oro están protegidos por las moléculas que forman los nanosomas (C, O, S).

- 45 Figura 6 muestra el espectro EDX de un nanosistema individual extraído del mapa anterior. El espectro muestra una señal importante de S y O en la región del nanosistema lo que indica la presencia de moléculas conteniendo estos átomos (hidroxi y mercapto ácido del nanosoma) protegiendo los clústeres de Au.

- 50 Figura 7 muestra la fluorescencia de los nanosistemas obtenidos en el ejemplo 1, donde A es la absorbancia; B es la curva de de excitación para la emisión a 600 nm, observándose que tiene un máximo a una longitud de onda de excitación de aproximadamente 300 nm y C es la curva de emisión para la excitación a 300 nm, observándose que presenta un máximo a una longitud de onda de aproximadamente 600 nm. Los resultados indican un desplazamiento de Stokes de 300 nm. La intensidad, I, se mide en unidades arbitrarias (u.a.) y las longitudes de onda (λ) en nanómetros (nm).

Figura 8 muestra las imágenes de microscopía electrónica HAADF STEM de los nanosistemas de oro obtenidos en el ejemplo 2. Se observa que el diámetro interno aproximado de las nanocavidades que contienen los clústeres es de aproximadamente 1,8 nm. Se pueden observar asimismo los átomos individuales de los clústeres en el interior de la cavidad.

- 5 Figura 9 muestra la fluorescencia de los nanosistemas obtenidos en el ejemplo 2 donde A representa la curva de excitación para la emisión a 620 nm, observándose que tiene un máximo a una longitud de onda de excitación de aproximadamente 250 nm y B es la curva de emisión para la excitación a 250 nm, observándose que presenta un máximo a una longitud de onda de aproximadamente 620 nm. Los resultados indican un desplazamiento de Stokes de 370 nm. La intensidad, I, se mide en unidades arbitrarias (u.a.) y las longitudes de onda (λ) en nanómetros (nm).

10 Descripción detallada de la invención

Los significados de los siguientes términos de la presente invención se detallan a continuación.

- 15 El término “nanosistema” se refiere a una estructura supramolecular nanométrica similar a un esferoide formada por una o dos capas de moléculas anfífilas, en la que dichas moléculas anfífilas forman una nanocavidad en el interior del nanosistema. Particularmente, teniendo el nanosistema un diámetro externo aproximadamente igual o menor de 20 nm, preferiblemente igual o menor de 18 nm y más preferiblemente igual o menor de 15 nm. El interior del nanosistema comprende al menos una nanocavidad con un diámetro interior menor o igual a 10 nm, preferiblemente aproximadamente menor o igual a 5 nm, más preferiblemente entre 0,8 y 4 nm. En una realización particular, el diámetro interno de la nanocavidad es aproximadamente entre 1,5-1,8 nm. Ejemplos no limitantes de nanosistemas son nanosomas, micelas, micelas inversas, nanoemulsiones o microemulsiones.

- 20 La expresión “similar a un esferoide” quiere decir que ello tiene una figura geométrica sólida similar en forma a una esfera.

Las moléculas anfífilas que forman los nanosistemas pueden ser la misma o diferentes, preferentemente dos tipos diferentes de moléculas y cada molécula posee tanto propiedades hidrófilas como lipófilas.

- 25 Las propiedades lipófilas se dan por un grupo que es típicamente un resto hidrocarburo, tal como una cadena alifática de la forma $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)-}$ o $\text{-(CH}_2\text{)-}$ siendo $30 > n > 2$, preferentemente $20 > n > 10$.

- 30 Las propiedades hidrófilas se dan por un grupo hidrófilo. El grupo hidrófilo puede ser un grupo cargado o un grupo polar no cargado. El grupo cargado se selecciona a partir de grupos aniónicos, preferentemente se selecciona a partir del grupo formado por carboxilatos, sulfatos, sulfonatos y fosfatos. El grupo no cargado polar se selecciona del grupo formado por -OH , -SH , -NH_2 , -NH- , -Cl- , -PH_3 , -SR , -OR , -NR_2 y -NR- , en el que R representa un grupo alquilo orgánico de una cadena de hidrocarburo corta, $\text{C}_2\text{-C}_4$, preferentemente grupo metilo, etilo o propilo.

Las moléculas anfífilas pueden tener una cadena $\text{-CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-}$ y un grupo hidrófilo unido a ella o dos grupos hidrófilos unidos cada uno en un extremo de la cadena $\text{-(CH}_2\text{)-}$ alifática.

- 35 El término “nanosoma” en el ámbito de la presente invención se refiere a una vesícula de tamaño nanométrico preparada artificialmente y formada por una capa lipídica. Así, el término “nanosoma” se refiere a una estructura supramolecular nanométrica esferoide formada por una capa de moléculas anfífilas (lípidos) que tienen dos grupos hidrófilos unidos cada uno a cada extremo de la cadena $\text{-(CH}_2\text{)-}$ alifática, o en las posiciones antepenúltima, χ , o penúltima, ψ , de la cadena $\text{-CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-}$ alifática.

Por lo tanto, los lípidos que forman dicha monocapa en los nanosomas de la invención comprenden (véase figura 2):

- 40 - en un extremo de la cadena alifática un grupo hidrófilo tal como, por ejemplo, un grupo carboxilo (COO^-) o fosfato (PO_4^-) que están en la superficie externa de la vesícula, en un extremo de la cadena alifática y

- 45 - sustituidos en las posiciones antepenúltima, χ , penúltima, ψ , de la cadena $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-}$ alifática, o en las posiciones últimas, ω , de la cadena $\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-}$ con grupos tales como por ejemplo -OH , -SH , -NH_2 , -NH- , -Cl- , -PH_3 , -SR , -OR , -NR_2 , -NHR , o -NR- , en donde R representa un grupo orgánico de cadena hidrocarbonada corta, $\text{C}_1\text{-C}_4$, capaz de formar nanosomas, que quedan situados hacia el interior de la vesícula y el otro extremo de la cadena alifática o en las posiciones últimas de dicha cadena alifática con respecto al grupo hidrófilo, formando dichos grupos la nanocavidad con un diámetro interior menor o igual a 10 nm, preferiblemente menor o igual a aproximadamente 5 nm, más preferiblemente entre 0,8 y 4 nm. En una realización particular, el diámetro interno de la nanocavidad está entre aproximadamente 1,5-1,8 nm.

- 50 El término “micela” se refiere a agregados de moléculas anfífilas. En un medio acuoso, los dominios lipófilos de las moléculas del agregado están orientados hacia el interior de la micela y los dominios hidrófilos están en contacto con el medio. En las “micelas inversas” las moléculas se organizan de forma que la región lipófila queda expuesta hacia el exterior y la región hidrófila hacia el interior. En el estado de la técnica el término “microemulsión” se usa también para referirse a una “micela inversa”, es decir la “microemulsión” es una realización particular de una “micela inversa”. El término “microemulsión” se refiere a un sistema de al menos tres componentes (agua, disolvente

orgánico -denominado comúnmente aceite- y compuesto anfífilo), monofásico y termodinámicamente estable, formado por gotitas de tamaños nanométricos. Aunque no es restrictivo, la utilización de microemulsiones de agua en aceite en donde las gotitas de agua están dispersas en el medio orgánico es de particular interés para la presente invención. Entre estas microemulsiones de agua-en-aceite, es también de interés debido a su estabilidad la utilización de microemulsiones polimerizadas que se refieren a microemulsiones conteniendo monómeros acrílicos en el interior de las gotitas de agua, por ejemplo acrilamida o 1,6-hexanodiol diacrilato que se polimerizan mediante la introducción de algún iniciador, como por ejemplo un fotoiniciador radicalario. De esta forma, las gotitas de la microemulsión se pueden hacer más resistentes.

El término "nanoemulsión" se refiere a un sistema de al menos tres componentes (agua, disolvente orgánico y compuesto estabilizante), bifásico y termodinámicamente inestable pero que por procedimientos químicos o físicos se logra estabilizar temporalmente y está formado por gotas nanométricas. La formación de gotas nanométricas es lo único que diferencia a las nanoemulsiones de las emulsiones conocidas en el estado de la técnica, por lo que el término "nanoemulsión" se refiere en general a una emulsión en la que las gotas son de tamaño nanométrico.

En una realización particular el nanosistema se selecciona del grupo formado por nanosoma, micela y micela inversa, preferiblemente el nanosistema es un nanosoma.

En una realización particular el nanosistema es un nanosoma, el nanosoma comprende ω -hidroxiácidos ($\text{HO}-(\text{CH}_2)_m\text{-COOH}$) y ω -mercaptoácidos ($\text{HS}-(\text{CH}_2)_p\text{-COOH}$) donde m y p tienen un valor de entre 2 y 30, preferiblemente m y p tienen un valor de entre 10 y 20. En una realización particular m y p tienen un valor de 15. El valor de m y p puede ser diferente o igual. En el caso de que m y p sean diferentes la diferencia entre ellos es menor de 6 carbonos, preferiblemente la diferencia de los valores de m y p es de entre 1 y 4. En una realización preferida m y p son iguales. Los ω -hidroxiácidos y ω -mercaptoácidos presentes en el nanosoma están formando una monocapa esférica con los grupos ácido, $-\text{COOH}$, (o $-\text{COO}^-$, si se emplea la sal del ácido correspondiente) dirigidos hacia la superficie externa del nanosistema y los grupos $-\text{OH}$ y $-\text{SH}$ dirigidos hacia el interior formando una cavidad interna en el nanosoma de forma tal que se forman dos esferas aproximadamente concéntricas, o como se denomina en la bibliografía, en forma de ácidos grasos "bola". Esta monocapa esférica puede tener un grosor de entre aproximadamente 2-10 nm, preferiblemente es aproximadamente 5 nm.

En la realización particular en la que el nanosistema es una micela inversa, la micela inversa comprende al menos dos tensioactivos diferentes, en los que al menos uno comprende un grupo tiol o tioéter como su grupo polar. En una realización más particular, los al menos dos tensioactivos son un alcohol etoxilado y un ω -mercaptoácido.

La cavidad interna del nanosistema es cerrada. Tal y como se comenta más arriba, el diámetro interno de dicha cavidad interna es menor o igual a 10 nm, preferiblemente es menor o igual a aproximadamente 5 nm y más preferiblemente el diámetro interno de dicha cavidad interna es entre aproximadamente 0,8 y 4 nm. En una realización particular el diámetro de esta nanocavidad interna es aproximadamente entre 1,5-1,8 nm. En la realización particular de los nanosomas, dicha nanocavidad está formada por grupos hidroxilo, $-\text{OH}$ y mercapto, $-\text{SH}$, sin embargo es posible intercambiar estos grupos funcionales por otros que también interaccionan con los metales, tales como, $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}-$, $-\text{Cl}$, $-\text{PH}_3$, $-\text{SR}$, $-\text{OR}$, $-\text{NR}_2$, $-\text{NHR}$, $-\text{NR}-$, en donde R representa un grupo orgánico de cadena hidrocarbonada corta, $\text{C}_1\text{-C}_4$, capaz de formar nanosomas.

Un ejemplo particular de estos nanosomas está descrito en Gaillard, C., *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 337, 2, 610-613, que describe la síntesis de partículas de oro dentro de estos nanosistemas.

El término "clúster cuántico atómico", abreviado como AQC, se entiende, como se dice anteriormente, como clúster cuántico atómico metálico. Los clústeres cuánticos atómicos metálicos están formados exclusivamente por átomos metálicos de estado de oxidación cero, Mn, con menos de 200 átomos metálicos (Mn , $n < 200$) y con un tamaño de menos de 2 nm. Los AQCs son estables a lo largo del tiempo.

El nanosistema descrito comprende, en el interior de su cavidad interna, es decir, encapsulados, clústeres cuánticos atómicos, que son conocidos por ser una familia de metales de valencia cero que dejan de comportarse de una manera "metálica" y su comportamiento se vuelve de naturaleza molecular. Por tanto, aparecen nuevas propiedades en estos clústeres que no se observan en las nanopartículas, micropartículas o materiales metálicos en masa. Por lo tanto las propiedades fisicoquímicas de los AQC no pueden simplemente extrapolarse a partir de aquellas de las nano/micropartículas.

En la presente invención dichos AQCs encapsulados dentro de la mencionada cavidad interna están formados por elementos metálicos, M_n , de metales de transición o sus combinaciones bimetalicas y están presentes en el nanosistema en al menos dos tamaños diferentes donde n es el número de átomos metálicos presentes, n tiene un valor de:

- entre 2 y 309 átomos de metal (M_n , $2 \leq n \leq 309$),
- entre 2 y 102 átomos de metal (M_n , $2 \leq n \leq 102$),
- entre 2 y 55 átomos de metal (M_n , $2 \leq n \leq 55$), o
- entre 2 y 25 átomos de metal (M_n , $2 \leq n \leq 25$).

Los AQC's de la invención tienen tamaños comprendidos entre aproximadamente 0,3 y 2,2 nm, preferiblemente entre aproximadamente 0,3 y 2 nm, más preferiblemente entre aproximadamente 0,3 y 1,8 nm.

Una realización de la presente invención se refiere al uso de un nanosistema como el descrito más arriba que comprende clústeres cuánticos atómicos (AQC's) de al menos dos tamaños diferentes encapsulados en una cavidad de diámetro interior menor o igual a 10 nm, preferiblemente menor o igual a 5 nm como un nanosistema luminiscente. Preferiblemente se usa como un nanosistema fluorescente. En el uso de estos nanosistemas el metal M de los AQC's es un metal de transición o una combinación de los mismos. Preferiblemente el metal de transición se selecciona de entre Au, Ag, Co, Cu, Pt, Fe, Cr, Pd, Ni, Rh y combinaciones de los mismos, preferentemente se selecciona de Au, Ag, Cu y combinaciones de los mismos y más preferiblemente se selecciona de entre Au, Ag y la combinación de los mismos.

En el ámbito de esta invención el término "combinación de metales de transición" se refiere a AQC's que tienen átomos de al menos dos metales de transición diferentes así como a la presencia de AQC's de un único metal de transición en presencia de AQC's de otro metal de transición diferente al primero de tal manera que los al menos dos AQC's de tamaño diferente pueden ser AQC's del mismo metal de transición, AQC's de diferente metal de transición, o bien AQC's de la misma o diferente combinación bimetálica.

Lo que permite usar los nanosistemas descritos como nanosistemas luminiscentes es la presencia en la nanocavidad interior de AQC's de al menos dos tamaños diferentes. En una realización particular, la presencia de los grupos OH y SH presentes en la cavidad interna del nanosoma permite seleccionar la producción de los al menos dos tipos de clústeres y sus tamaños, es decir, variando la relación OH/SH se puede seleccionar el tamaño de los dos tipos de clústeres producidos tal como se puede ver esquemáticamente en las figuras 2 y 3.

Los tamaños de los clústeres a sintetizar están determinados por la relación de concentraciones $[\text{mercapto}]/[\text{M}] = R1$ e $[\text{hidroxi}]/[\text{mercapto}] = R2$.

La relación R1 determina el tamaño del clúster más pequeño, el clúster donador, de forma tal que un aumento de la relación disminuye el tamaño de los clústeres más pequeños producidos ("arrested growth").

La relación R2 determina el tamaño del clúster mayor (clúster aceptor), de forma tal que un aumento de esta relación aumenta el tamaño de los clústeres más grandes producidos.

La expresión "tamaño diferente" de los AQC's se refiere al hecho de que los al menos dos AQC's se diferencian en número en al menos tres átomos metálicos. Preferiblemente se diferencian en al menos cuatro átomos metálicos. Más preferiblemente se diferencian en al menos cinco átomos metálicos.

Sin vincularse a ninguna teoría en particular, se cree que la luminiscencia se produce por la Transferencia de Energía de Resonancia Förster (FRET) que implica la absorción de energía por parte de un fluoróforo a una longitud de onda de excitación ($\lambda_{exc.}$) seguida de la emisión por parte de otro fluoróforo de una longitud de onda de emisión ($\lambda_{em.}$) mayor que la longitud de onda de excitación, es decir, $\lambda_{em.} > \lambda_{exc.}$. La interacción para que se de FRET ocurre solo a muy corta distancia, menor o igual de aproximadamente 10 nm, entre dos estados de excitación electrónica de dos moléculas fluorescentes en las que la longitud de onda de emisión de una de ellas coincide con la de excitación de la otra. Esa energía de excitación se transfiere a través de un acoplamiento intermolecular dipolo-dipolo sin radiación. Ambas longitudes de onda, $\lambda_{exc.}$ y $\lambda_{em.}$, están separadas por decenas o centenas de nanómetros. Esta diferencia entre las longitudes de onda es lo que se denomina desplazamiento de Stokes, $\delta_{Stokes} = \lambda_{em} - \lambda_{exc.}$

Por lo tanto, en el ámbito de la presente invención, para que se de lugar la luminiscencia a través de Transferencia de Energía de Resonancia Förster (FRET) entre los AQC's de al menos dos tamaños diferentes, el AQC de menor tamaño o clúster de excitación que actúa como un AQC donador recibe la excitación externa a una longitud de onda determinada de excitación, por lo que pasa a estar en un estado electrónico excitado. Esta energía de excitación se transfiere al AQC aceptor o al clúster de emisión que está a una distancia menor o igual de 10 nm, distancia Förster, tal como se representa esquemáticamente en la figura 1.

Una estimación aproximada de las longitudes de onda de excitación y de emisión de los clústeres puede determinarse de forma aproximada mediante el modelo de Jellium (véase por ejemplo J. Calvo et al., *Encyclopedia of Nanotechnology*, Ed. por B. Bhushan, Springer Verlag, 2011). Este modelo predice de forma bastante aproximada la banda de energías prohibida (bandgap) de los clústeres y por lo tanto, la posición de la banda de emisión de los mismos. Por su parte la banda de excitación de los clústeres se puede predecir a partir de la banda de emisión teniendo en cuenta que el desplazamiento Stokes en clústeres de un tamaño determinado es de aprox. 50-100 nm. En la siguiente tabla, tabla 1, se muestran los datos teóricos para AQC's de Au o Ag según este modo, es decir, se han calculado las longitudes de onda aproximadas de excitación, $\lambda_{exc.}$ y emisión, $\lambda_{em.}$, con un error de ± 50 nm en AQC's de Au o Ag mediante dicho modelo Jellium: $E_{em} = E_F/N^{1/3}$; donde E_{em} = energía de emisión; $N = n.^{\circ}$ de átomos en el AQC; y E_F = nivel de Fermi, que para oro y plata es aproximadamente el mismo, 5,5 eV.

Clúster	$\lambda_{exc.}(nm)$	$\lambda_{em.}(nm)$
A ₂	200-250	300
A ₃	240-290	340
A ₄	270-320	370
A ₅	300-350	400
A ₆	325-375	425
A ₇	350-400	450
A ₁₀	400-450	500
A ₁₂	440-490	540
A ₁₅	475-525	575
A ₂₀	535-585	635
A ₂₅	580-630	680
A ₃₀	630-680	730
A ₄₀	700-750	800

Tabla 1.

Estos valores además se pueden variar en la práctica cuando se hace reaccionar el nanosistema para intercambiar los grupos OH y SH con otros ligandos en la cavidad interna del nanosistema. Los ligandos a intercambiar pueden escogerse, sin ser limitativos, entre -NH₂, -NH-, -Cl, -PH₃, -SR, -OR, -NR₂, -NHR, -NR-, en donde R representa un grupo orgánico de cadena corta capaz de formar nanosomas.

En el contexto de la presente invención, los nanosistemas luminiscentes descritos presentan desplazamientos de Stokes mayores que aproximadamente 150 nm, preferiblemente mayores que aproximadamente 300 nm.

En otras palabras, a partir de la tabla anterior se puede decidir el tipo de clústeres a utilizar para obtener una longitud de onda de excitación y emisión determinadas. Así, por ejemplo, para obtener un sistema con una longitud de onda de excitación a 300 nm, una longitud de onda de emisión a 550 nm y un desplazamiento de Stokes de 250 nm, deberíamos seleccionar los siguientes tamaños de clústeres:

- clúster de excitación ("dador"): A₃/A₄,
- clúster de emisión ("aceptor"): A₁₂.

Por lo tanto otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de detección de los nanosistemas descritos que comprende las etapas de:

- a) excitar el nanosistema con una fuente de excitación externa a una longitud de onda de excitación, $\lambda_{exc.}$ y
- b) detectar uno o más de los siguientes parámetros:

- longitud de onda de emisión ($\lambda_{em.}$),
- intensidad,
- tiempo de vida media,
- anisotropía,

que presenta dicho nanosistema con medios de detección adecuados.

En una realización preferida el método de detección del nanosistema comprende adicionalmente el que la etapa b) de detección de uno o más de los siguientes parámetros, longitud de onda de emisión, intensidad, tiempo de vida media o anisotropía, se realice con un tiempo de retardo determinado. Esta realización se basa en el hecho de que los tiempos de vida media de la luminiscencia de los nanosistemas de la invención son mayores de 0,1 μ s. El tiempo de retardo para detectar y medir uno o más de los parámetros es mayor de 0,1 μ s y preferiblemente es mayor de 1 μ s. De esta forma se evitan las posibles interferencias debidas otras longitudes de onda de emisión, $\lambda_{em.}$, que se puedan crear tras la excitación con una fuente de excitación externa a una longitud de onda de excitación, $\lambda_{exc.}$, además de la longitud de onda de emisión del nanosistema objeto de la presente invención.

En el ámbito de la presente invención se entiende por "excitar" a irradiar el nanosistema con una radiación lumínica de una longitud de onda determinada.

Los “medios de detección adecuados” se refieren a métodos de detección y opcionalmente medición de los parámetros indicados conocidos por el experto en la materia, es decir, métodos de detección de la longitud de onda de emisión de la luminiscencia, particularmente de la fluorescencia, métodos de detección de la intensidad de la luminiscencia particularmente de la fluorescencia, métodos de detección del tiempo de vida media de la intensidad de la luminiscencia o métodos de detección de la anisotropía.

Debido a que no hay presentes otras moléculas en la nanocavidad interna del nanosistema, la energía no se disipa o pierde, es decir, la luminiscencia se mantiene. En una realización particular, no presentan parpadeo (“*blinking*”) ni “*photobleaching*”, al menos durante 500 minutos excitando las muestras a 300 nm cada 30 segundos.

Se puede medir el tiempo de vida de emisión (τ), que es el tiempo de extinción de la luminiscencia o el tiempo de vida media que es el tiempo transcurrido desde el final de la excitación hasta que la intensidad de emisión desciende a 1/e del valor máximo de la intensidad, es decir, hasta que desciende aproximadamente un 37 %. En una realización de la presente invención el tiempo de vida media de la luminiscencia, preferiblemente fluorescencia, es mayor de 0,1 μ s, preferiblemente mayor de 1 μ s. En una realización particular, los nanosistemas sintetizados presentan un tiempo de vida de emisión superior al microsegundo para más de un 37 % de la señal de fluorescencia.

Los nanosistemas descritos poseen grupos funcionales en su exterior, por ejemplo, los nanosomas poseen grupos COOH que pueden ser utilizados para unirse covalentemente con proteínas, ácidos nucleicos y otras biomoléculas. Por lo tanto, otro aspecto adicional debido a esta propiedad se refiere al empleo de los nanosistemas luminiscentes de la invención como una sonda fluorescente, un biomarcador o un agente de contraste. Estos nanosistemas se pueden emplear en sistemas biológicos tanto *in vitro* como *in vivo*.

Otro aspecto adicional se refiere a los nanosistemas que comprenden clústeres cuánticos atómicos (AQC) de al menos dos tamaños diferentes encapsulados en una cavidad de diámetro interior menor o igual a 10 nm, preferiblemente menor o igual a 5 nm, donde el metal de los AQC es un metal de transición exceptuando el Au o una combinación de metales de transición en la cual se puede incluir el Au y donde el metal de transición se selecciona preferiblemente de entre Ag, Cu y una combinación de metales de transición. En una realización particular la cavidad es la cavidad interna de un nanosoma que comprende ω -hidroxiácidos y ω -mercaptoácidos y donde los AQC de al menos dos tamaños diferentes están caracterizados por estar compuestos de:

- entre 2 y 309 átomos de metal (M_n , $2 \leq n \leq 309$),
- entre 2 y 102 átomos de metal (M_n , $2 \leq n \leq 102$),
- entre 2 y 55 átomos de metal (M_n , $2 \leq n \leq 55$) y
- entre 2 y 25 átomos de metal (M_n , $2 \leq n \leq 25$).

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de los nanosistemas descritos en la presente invención que comprenden clústeres cuánticos atómicos (AQC) de al menos dos tamaños diferentes encapsulados en una cavidad de diámetro interior menor o igual a 10 nm, preferiblemente menor o igual a 5 nm, donde el metal de los AQC es un metal de transición exceptuando el Au o una combinación de metales de transición, preferiblemente el metal de transición se selecciona de entre Ag, Cu y una combinación de metales de transición, que comprende las etapas de:

- a) preparar un nanosoma por mezcla de ω -hidroxiácidos y ω -mercaptoácidos en presencia de una base en medio acuoso,
- b) añadir al menos una sal metálica a la mezcla preparada en la etapa a) y
- c) realizar una reducción de la mezcla obtenida en la etapa b).

En la etapa a) se puede utilizar como base hidróxido de tetrabutilamonio, hidróxido de tetraoctilamonio, hidróxido de trietilbencilamonio, hidróxido de tri-n-octilmetilamonio, hidróxido de trimetildecilamonio, hidróxido de tetrametilamonio, hidróxido de tetraetilamonio o cualquier otro hidróxido que posea un grupo voluminoso como contraión, preferiblemente hidróxido de tetrabutilamonio.

En la etapa b) se pueden emplear sales metálicas de metales de transición o combinaciones de las mismas. Ejemplos de sales metálicas, no limitantes, son nitratos, sulfatos, sulfitos, cloruros, bromuros, ioduros, fosfatos, hidróxidos, cianatos, carboxilatos, tiomalatos, tioglucosatos de los metales de transición. Ejemplos de estas sales metálicas para ser empleadas como única sal metálica o en combinación con otras sales metálicas son $AgNO_3$, CH_3COOAg , Ag_3AsO_4 , $AgBrO_3$, $AgBr$, Ag_2CO_3 , $AgClO_3$, $AgCl$, $AgCrO_4$, $AgOCN$, $AgIO_3$, AgI , Ag_2O , $AgClO_4$, Ag_3PO_4 , Ag_2SO_4 , Ag_2S , Ag_2SO_3 , $CuSO_4$, $CuCl_2$, $CuBr_2$, CuI_2 , Cu_2S , $CuSCN$, $CuCN$, $CuCO_3$, Cu_2O , $Cu(OH)_2$, $Cu(NO_3)_2$, $Cu(CIO_4)_2$, $Cu(HCO_2)_2$ o $Cu(CO_2CH_3)_2$. Ejemplos de sales metálicas de oro para utilizar en combinación, sin ser limitantes, son $HAuCl_4$, $AuCl$, $AuCl_3$, $HAuCl_4$, $HAuCl_4 \cdot aq$, $KAuCl_4$, $LiAuCl_4$, $(CH_3)_2SAuCl$, C_3H_9AuClP , $C_6H_{15}AuClP$, $C_{18}H_{15}AuClP$, $C_8H_{11}AuClP$, $C_5H_5AuCl_3N$, $(C_4H_9)_3PAuCl$, $C_{27}H_{36}AuClN_2$, $C_{21}H_{12}AuClF_9P$, $C_{20}H_{27}AuClP$, $C_{33}H_{49}AuClP$, $C_{42}H_{63}AuClO_3P$, $C_{21}H_{24}AuClN_2$, $C_{35}H_{49}AuF_6NO_4PS_2$ o $(C_{20}H_{15}AuF_6NO_4PS_2) \cdot 2C_7H_8$.

Ejemplos no limitantes de sistemas de reducción o reductores para ser empleados en la etapa c) para realizar la reducción de la mezcla obtenida en la etapa c) pueden ser $NaBH_4$, DIBAH, $LiAlH_4$, N_2H_4 o $SnCl_2$, así como también reductores más suaves como hipofosfito sódico, aminas, azúcares, ácidos orgánicos, polímeros tales como la polivinilpirrolidona, radiación UV-VIS, ultrasonidos y fotoreducción.

Tal como se usa en el presente documento, el término “aproximadamente” significa una ligera variación del valor especificado, preferiblemente dentro del 10 por ciento del valor especificado. No obstante, el término “aproximadamente” puede significar una mayor tolerancia de variación dependiendo de, por ejemplo, la técnica experimental usada. El experto entiende dichas variaciones de un valor especificado y estas se encuentran dentro del contexto de la presente invención. Además, para proporcionar una descripción más concisa, algunas de las expresiones cuantitativas facilitadas en el presente documento no se describen con el término “aproximadamente”. Se entiende que, se use o no de manera explícita el término “aproximadamente”, cada cantidad dada en el presente documento pretende referirse al valor dado real y también pretende referirse a la aproximación de tal valor dado que se deduciría de manera razonable basándose en la experiencia común en la técnica, incluyendo equivalentes y aproximaciones debidas a las condiciones experimentales y/o de medición para tal valor dado.

Ejemplos

Ejemplo 1. Síntesis de nanosomas de AQC de oro con desplazamiento de Stokes de 300 nm.

Para este ejemplo se siguió el procedimiento representado esquemáticamente en la figura 3.

Una disolución acuosa del ácido 16-hidroxipalmítico (2 ml, 10 mg/ml) se mezcló con una disolución acuosa del ácido 16-mercaptopalmítico (0,622 ml, 10 mg/ml) con agitación vigorosa en 5,4 ml de agua y el volumen necesario de hidróxido de tetrabutilamonio hasta producir un medio básico. A la disolución resultante de nanosomas se añadió un volumen de 400 μ l de una disolución de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (hidrato de cloruro de Au (III), metales base al 99,999 %, Aldrich) (5,8 mg/ml) con la consiguiente reducción mediante la adición de 400 μ l de una disolución de NaBH_4 (0,05 M). Para las concentraciones utilizadas, los valores de R1 y R2 son 3,7 y 3,4 respectivamente. Esta disolución madre de nanosomas de oro se agitó a 35 °C durante 1 h. Para purificar los nanosomas conteniendo los clústeres se precipita añadiendo ácido acético 0,5 M hasta pH 7,8 y se centrifuga para separar el sólido conteniendo el exceso de reactivos y nanosomas del sobrenadante que contiene los nanosomas con los clústeres. Finalmente se filtra este sobrenadante a través de un filtro de 0,45 micras. Una imagen de microscopía electrónica STEM (scanning transmission electron microscopy), obtenida mediante un microscopio Tecnai OSIRIS equipado con detectores HAADF (high angular annular dark field) y EDX (energy-dispersive X-ray spectroscopy), de las muestras de nanosomas de los AQC de Au obtenidas en el presente ejemplo se muestra en la figura 4, observándose que el tamaño aproximado de las nanocavidades de los nanosomas conteniendo los AQC es de aproximadamente 1,5 nm. En la figura 5 se muestra el análisis químico de la figura 4 mediante EDX, observándose que los clústeres de Au están protegidos por las moléculas que forman los nanosomas (C, O, S). En la figura 6 se muestra el resultado EDX del análisis típico de uno de los nanosomas individuales observados en la figura 4. El espectro muestra una señal importante de S y O en la región del nanosistema lo que indica la presencia de moléculas conteniendo estos átomos (hidroxilo y mercapto ácido del nanosoma) protegiendo los clústeres de Au. Por su parte, imágenes de HR-STEM (alta resolución) obtenidas con el mismo equipo muestran a su vez la ausencia total de cristalinidad característica de la presencia del Au en forma de clústeres (AQC). La figura 7 muestra el espectro de absorción (medido con un espectrofotómetro Hewlett-Packard HP8452A en una cubeta de cuarzo de 1 mm x 1 cm x 3 cm), el espectro de excitación y el espectro de emisión (medidos con un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse Varian) de los nanosomas de AQC de Au, observándose que presentan el máximo de excitación a 300 nm y el máximo de emisión a 600 nm, lo que indica un desplazamiento de Stokes de 300 nm. Por su parte, la excitación a 300 nm indica, de acuerdo con la tabla 1, que los clústeres dadores de excitación presentes en los nanosomas tienen entre 3 y 5 átomos, mientras que los clústeres aceptores de emisión tienen alrededor de 15 átomos.

Ejemplo 2. Síntesis de nanosomas de AQC de Au con desplazamiento de Stokes de 370 nm.

Para conseguir un desplazamiento de Stokes mayor que el descrito en el ejemplo 1, es necesario disminuir el tamaño de los clústeres aceptores y aumentar el de los donadores. Según lo descrito en la memoria eso se consigue aumentando los valores de R1 y R2 respecto de los valores utilizados en el ejemplo 1. Los valores elegidos en este ejemplo fueron R1 = 4,1 y R2 = 4,3. Se procedió entonces de la siguiente forma. Una disolución acuosa del ácido 16-hidroxipalmítico (2,52 ml, 10 mg/ml) se mezcló con la disolución acuosa de ácido 16-mercaptopalmítico (0,622 ml, 10 mg/ml) con agitación vigorosa en 4,9 ml de agua y el volumen necesario de hidróxido de tetrabutilamonio hasta la neutralización. A la disolución resultante de nanosomas se añadió un volumen de 360 μ l de una disolución de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (hidrato de cloruro de Au (III), metales base al 99,999 %, Aldrich) (5,8 mg/ml) con la consiguiente reducción mediante la adición de 400 μ l de una disolución de NaBH_4 (0,05 M). Esta disolución madre de nanosomas de oro se agitó a 25 °C durante 30 minutos. Para purificar los nanosomas conteniendo los clústeres, se precipitan añadiendo ácido acético 0,5 M hasta pH 7,8 y se centrifugan para separar el sólido conteniendo el exceso de reactivos y nanosomas del sobrenadante que contiene los nanosomas con los clústeres. Finalmente se filtra este sobrenadante a través de un filtro de 0,45 micras. La figura 8 muestra una imagen de HAADF-STEM de alta resolución obtenido mediante un microscopio Jeol JEM-ARM200F equipado con corrección de aberración esférica donde se pueden observar claramente los clústeres de Au de tamaño aproximado de 1,8 nm ocupando las cavidades de los nanosomas. La imagen nos permite ver los átomos que forman los clústeres encerrados dentro de las nanocavidades de los nanosomas. La figura 9 muestra los espectros de excitación y emisión (medidos con un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse Varian) de los nanosomas de AQC de Au, observándose que presentan el máximo de excitación a 250 nm y el máximo de emisión a 620 nm lo que indica un desplazamiento de Stokes de 370 nm. Por su parte, la posición de los máximos de excitación y emisión nos indica, de acuerdo con la

tabla 1, que los clústeres dadores de Au presentes en los nanosomas tienen entre 2 y 3 átomos, mientras que los clústeres aceptores de emisión tienen alrededor de 20 átomos.

Ejemplo 3. Síntesis de nanosomas de AQC's de Ag.

5 Primeramente, las soluciones madre de ácido 16-mercaptopalmitico y ácido 16-hidroxipalmitico se preparan a una concentración de 10 mg/ml, se añade un volumen dado de solución de hidróxido de tetrabutilamonio (1,5 M en agua) para asegurar una proporción molar de ácido graso/TBAOH de 1. Después los nanosomas se preparan mezclando un volumen dado de cada solución madre de cada ácido graso con 25 ml de agua pura (3,11ml de ácido 16-mercaptohexadecanoico y 10 ml de ácido 16-hidroxihexadecanoico).

10 En una segunda etapa, se prepara una solución de reserva de AgNO_3 0,0147 M en agua pura. Después 2,7 ml de esta solución se vierten en la muestra de nanosomas. Una cantidad extra de solución de TBAOH se añade a la mezcla para asegurar redispersión del material. Después, se añaden 2,7 ml de una solución de reserva recién preparada de NaBH_4 0,05 M a la misma gota a gota con agitación vigorosa. La reacción se termina después de 1 hora agitando a 35 °C en un baño termostático.

Ejemplo 4. Síntesis de nanosomas de cadena corta de AQC's de Au.

15 Primeramente, las soluciones madre de ácido 12-mercaptododecanoico y ácido 12-hidroxidodecanoico se preparan a una concentración de 10 mg/ml, se añade un volumen dado de solución de hidróxido de tetrabutilamonio (1,5 M en agua) para asegurar una proporción molar de ácido graso/TBAOH de 1. Después los nanosomas se prepararon mezclando un volumen dado de solución madre de cada ácido graso con 25 ml de agua pura (3,1 ml de ácido 12-mercaptododecanoico y 10 ml de ácido hidroxidodecanoico).

20 En una segunda etapa, se prepara una solución de reserva de HAuCl_4 0,0147 M, en agua pura. Después se vierten 2,7 ml de esta solución en la muestra de nanosomas. Una cantidad extra de solución de TBAOH se añade a la mezcla para asegurar redispersión del material. Después, se añaden 2,7 ml de una solución madre recién preparada de NaBH_4 0,05 M a la mezcla gota a gota en agitación vigorosa. La reacción se termina después de una hora agitando a 35 °C en un baño termostático.

Ejemplo 5. Síntesis de AQC's de Au encapsulados por micelas inversas (microemulsiones).

Se prepararon clústers de oro encapsulados por micelas inversas (microemulsiones) mezclando dos microemulsiones preparadas anteriormente diferentes: una conteniendo una sal de HAuCl_4 y la otra conteniendo NaBH_4 .

30 La primera microemulsión se prepara disolviendo 15,4 ml de Tergitol® 15S5, 1,37 ml de 1-butanotiol y 2,7 ml de una solución acuosa de HAuCl_4 (0,0147 m) en 80,6 ml de isooctano. La segunda se prepara disolviendo 15,4 ml de Tergitol® 15S5, 1,37 ml de 1-butanotiol y 2,7 ml de una solución acuosa de NaBH_4 (0,05 M) en 80,6 ml de isooctano.

Después, ambas microemulsiones se mezclan y la reacción se añade durante 24 horas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un nanosistema que comprende clústeres cuánticos atómicos (AQC) de al menos dos tamaños diferentes encapsulados en una nanocavidad con un diámetro interior menor o igual a 10 nm, como un nanosistema luminiscente, en el que el nanosistema es una estructura supramolecular nanométrica similar a un esferoide formada por una o dos capas de moléculas anfifílicas, en la que dichas moléculas anfifílicas forman la nanocavidad en el interior del nanosistema.
2. Uso de un nanosistema según la reivindicación 1, donde la nanocavidad es el núcleo de un nanosistema seleccionado de entre nanosoma, micela y micela inversa, preferiblemente es la cavidad interna de un nanosoma.
- 10 3. Uso de un nanosistema según la reivindicación 2, donde la nanocavidad es el núcleo de un nanosoma, el nanosoma comprende ω -hidroxiácidos y ω -mercaptoácidos.
4. Uso de un nanosistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los AQC metálicos de al menos dos tamaños diferentes están caracterizados por estar compuestos de:
- entre 2 y 309 átomos de metal (M_n , $2 \leq n \leq 309$),
 - entre 2 y 102 átomos de metal (M_n , $2 \leq n \leq 102$),
 - 15 - entre 2 y 55 átomos de metal (M_n , $2 \leq n \leq 55$) y
 - entre 2 y 25 átomos de metal (M_n , $2 \leq n \leq 25$).
5. Uso de un nanosistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los metales de los AQC son metales de transición o combinaciones de los mismos, preferiblemente el metal de transición se selecciona de entre Au, Ag, Cu y combinaciones de los mismos y más preferiblemente Au, Ag y la combinación de los mismos.
- 20 6. Uso de un nanosistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la luminiscencia se obtiene tras una excitación del nanosistema por una fuente de excitación externa.
7. Uso de un nanosistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la luminiscencia es fluorescencia.
8. Uso de un nanosistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el desplazamiento de Stokes es mayor que aproximadamente 150 nm, preferiblemente mayor que 300 nm.
- 25 9. Uso de un nanosistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la luminiscencia tiene un tiempo de decaimiento mayor de 0,1 μ s, preferiblemente mayor de 1 μ s.
10. Uso de un nanosistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, como sonda fluorescente, biomarcador o agente de contraste.
- 30 11. Un método de detección de un nanosistema definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-10 que comprende las etapas de:
- a) excitar el nanosistema con una fuente de excitación externa a una longitud de onda de excitación ($\lambda_{exc.}$) predeterminada y
 - b) detectar uno o más de los siguientes parámetros:
- 35 - longitud de onda de emisión ($\lambda_{em.}$),
- intensidad,
 - tiempo de vida media,
 - anisotropía,
- de dicho nanosistema con medios de detección adecuados.
- 40 12. Un nanosistema que comprende AQC de al menos dos tamaños diferentes encapsulados en una nanocavidad de diámetro interior menor o igual a 10 nm, donde el metal de los AQC es un metal de transición exceptuando el Au o una combinación de metales de transición y en el que el nanosistema es una estructura supramolecular nanométrica formada por una o dos capas de moléculas anfifílicas, en la que dichas moléculas anfifílicas forman la nanocavidad en el interior del nanosistema.
- 45 13. El nanosistema según la reivindicación 12, donde el metal de transición se selecciona preferiblemente de entre Ag y Cu.

14. El nanosistema según cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13 donde la nanocavidad es la cavidad interna de un nanosoma, que comprende ω -hidroxiácidos y ω -mercaptoácidos y donde los AQC's de al menos dos tamaños diferentes están caracterizados por estar compuestos de:

- entre 2 y 309 átomos de metal (M_n , $2 \leq n \leq 309$),
- 5 - entre 2 y 102 átomos de metal (M_n , $2 \leq n \leq 102$),
- entre 2 y 55 átomos de metal (M_n , $2 \leq n \leq 55$), o
- entre 2 y 25 átomos de metal (M_n , $2 \leq n \leq 25$).

15. Un método de obtención de un nanosistema según cualquiera de las reivindicaciones 12-14 que comprende las etapas de:

- 10 a) preparar un nanosoma por mezcla de ω -hidroxiácidos y ω -mercaptoácidos en presencia de una base en medio acuoso,
- b) añadir al menos una sal metálica a la mezcla preparada en la etapa a) y
- c) realizar una reducción de la mezcla obtenida en la etapa b).

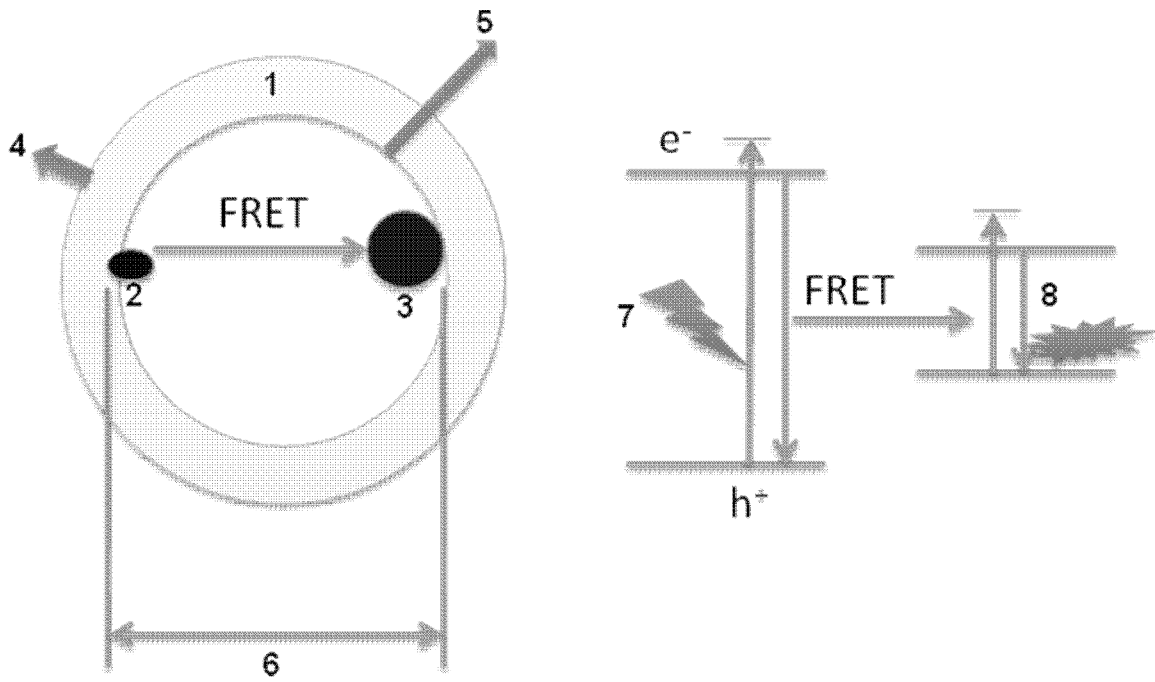


Fig. 1

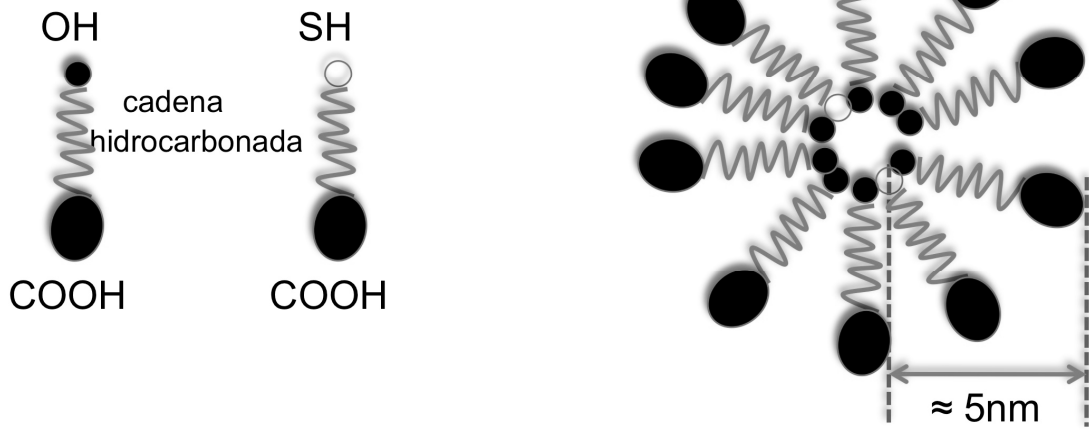


Fig. 2

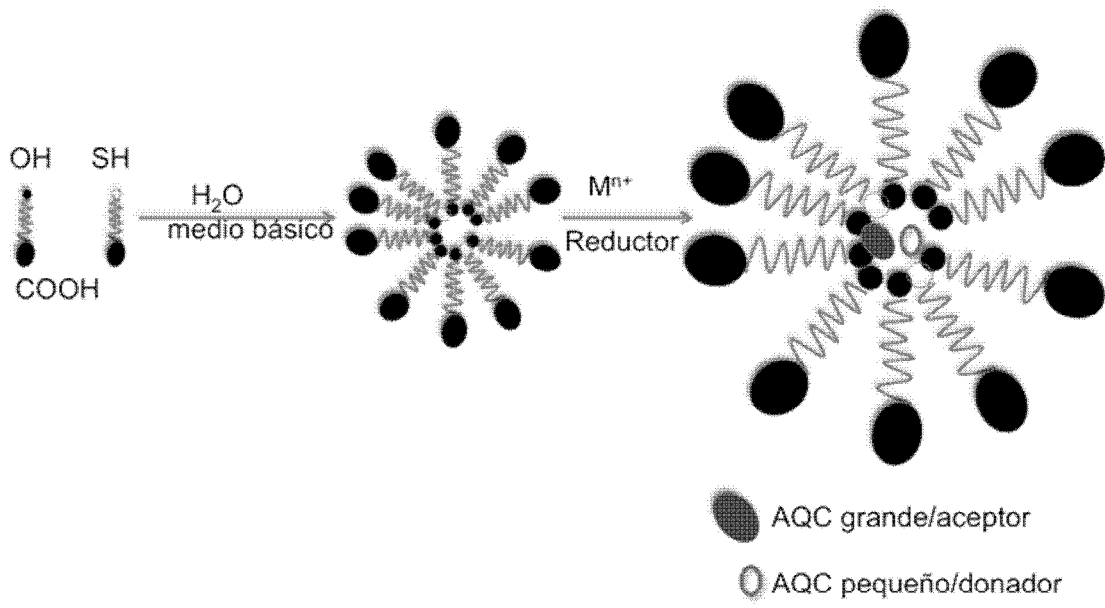


Fig.3

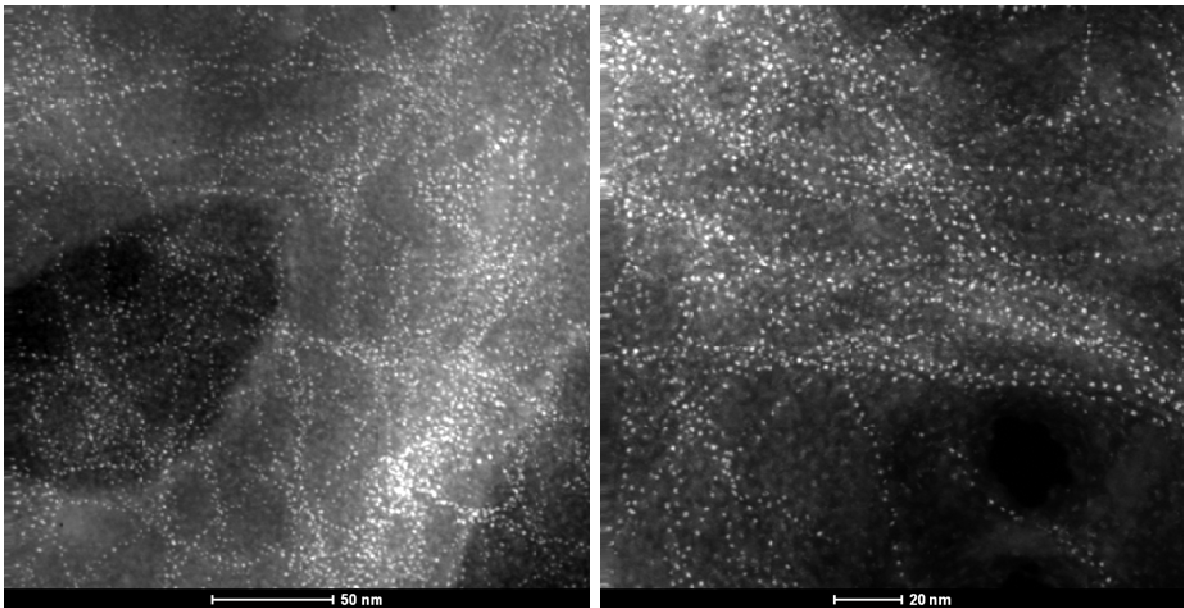


Fig. 4

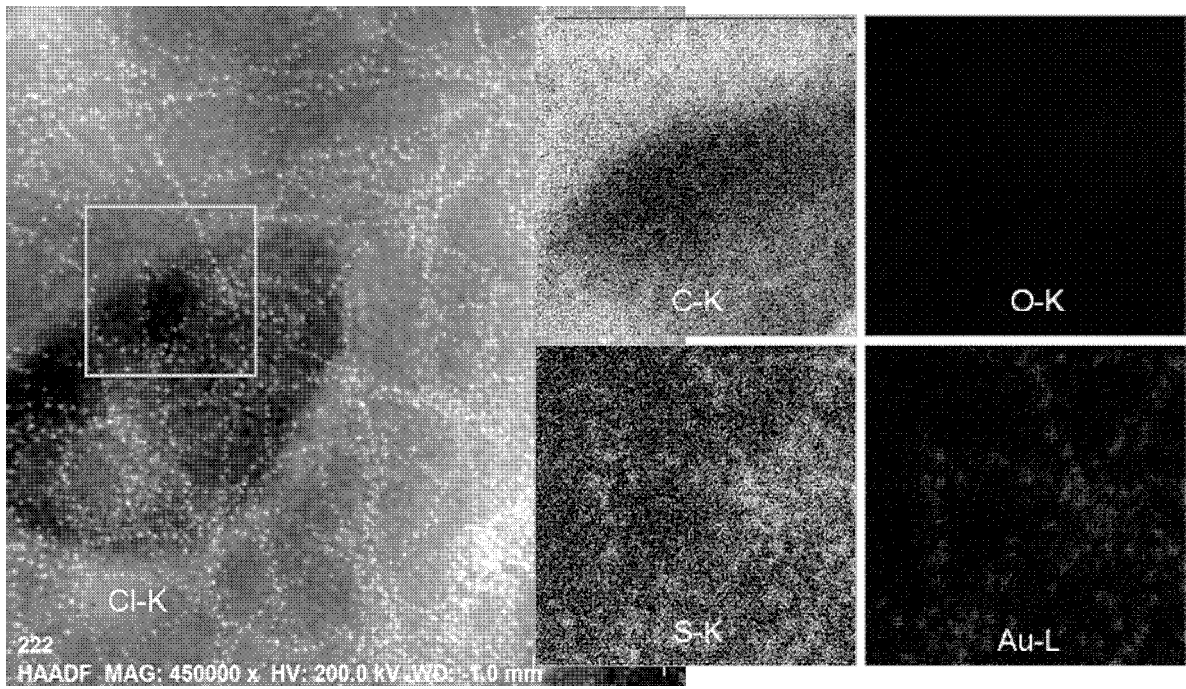


Fig. 5

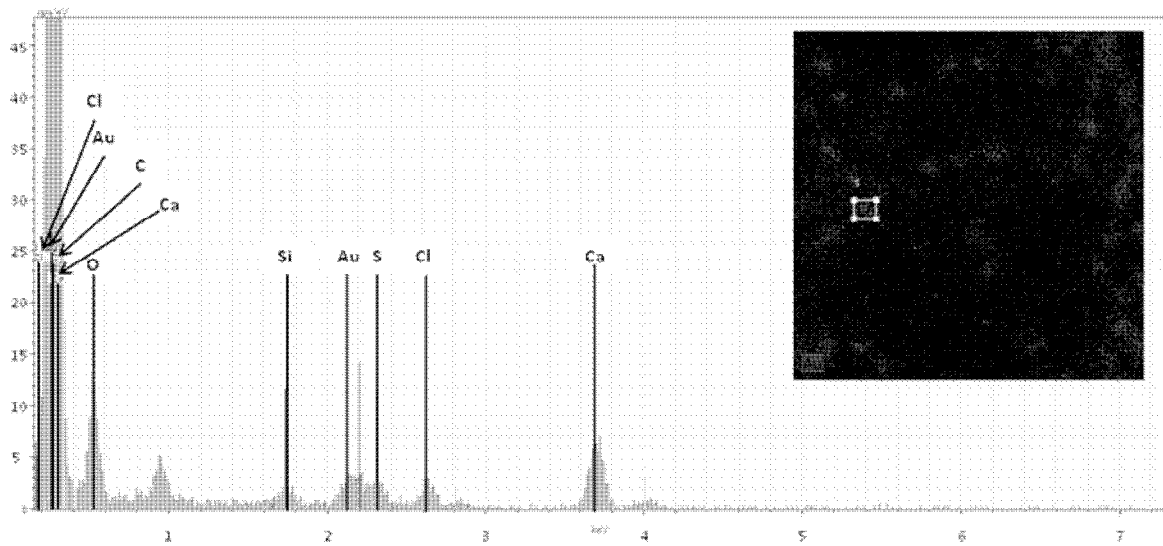


Fig. 6

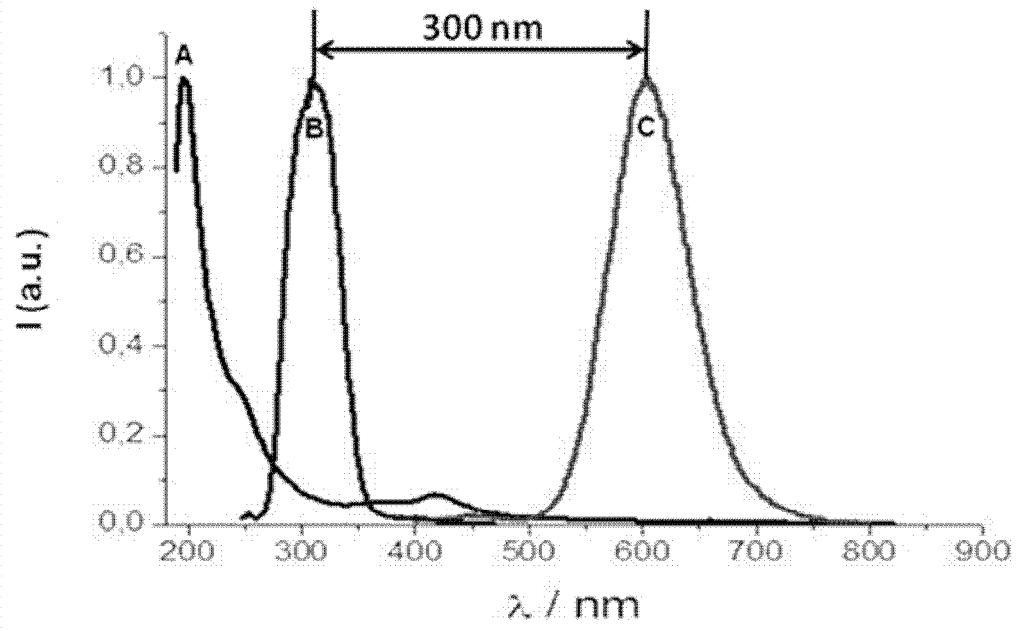


Fig. 7

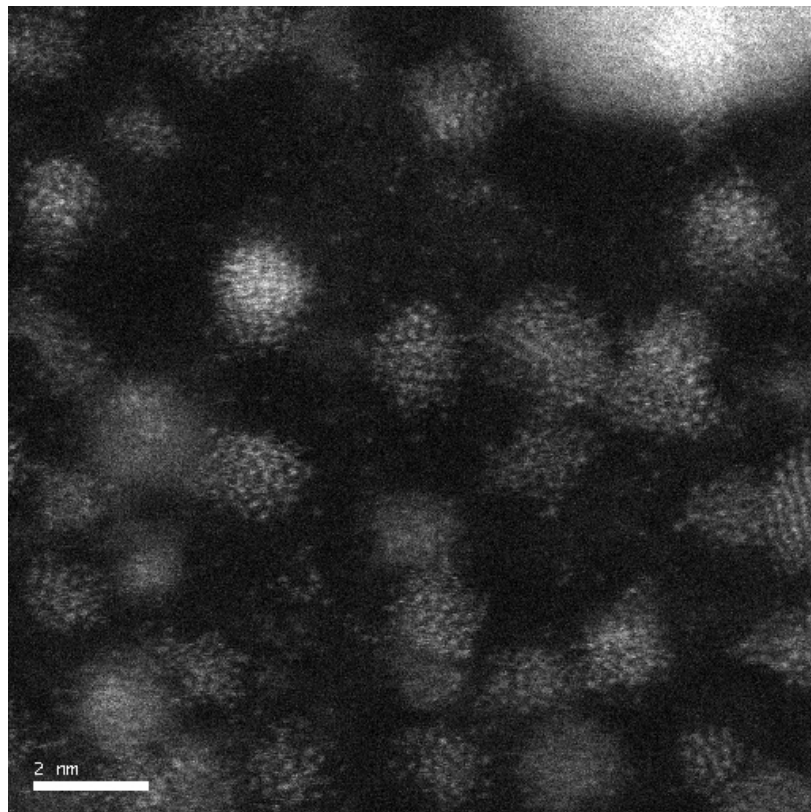


Fig. 8

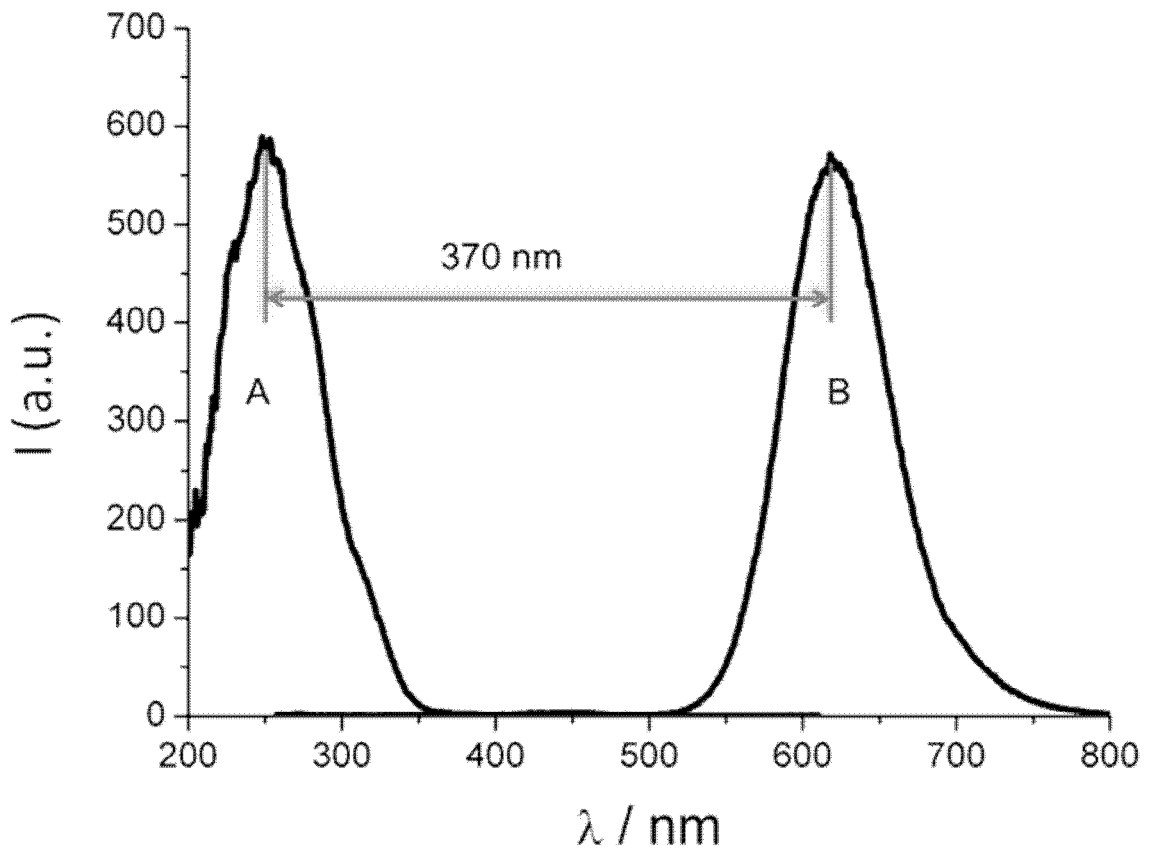


Fig. 9