

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 013**

51 Int. Cl.:

B22F 1/00 (2006.01)

B22F 9/24 (2006.01)

G01N 21/65 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.12.2014 PCT/EP2014/076627**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.06.2016 WO16086999**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2014 E 14812429 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 3227037**

54 Título: **Síntesis universal de una única reacción y realizable a gran escala de nanopartículas codificadas con SERS**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.06.2018

73 Titular/es:
MEDCOM ADVANCE, S.A. (100.0%)
Avda. Roma, 35 Ent 1
08029 Barcelona, ES

72 Inventor/es:
PAZOS PÉREZ, NICOLÁS y
MIR DE SIMÓN, BERNAT

74 Agente/Representante:
ISERN JARA, Jorge

ES 2 673 013 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

Síntesis universal de una única reacción y realizable a gran escala de nanopartículas codificadas con SERS

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para sintetizar nanopartículas codificadas con SERS (Espectroscopía Raman de superficie mejorada). Estas partículas son útiles en diferentes campos, como la detección múltiple de alto rendimiento^[1] en la tecnología de micromatrices,^[2] diagnóstico^[3] e imágenes biológicas.^[4]

10

Antecedentes de la invención

Las nanopartículas codificadas se encuentran entre las alternativas más potentes para la detección múltiple de alto rendimiento^[1] en la tecnología de microarrays,^[2] diagnóstico^[3] e imágenes biológicas.^[4] Estos materiales son plataformas simples y rentables que permiten un análisis rápido, sensible y fiable.^[1b, 5] Durante la última década, se han preparado varias partículas codificadas^[6] utilizando estrategias de codificación basadas en cambios en la forma,^[7] composición,^[8] marcas físicas^[6c] o propiedades espectroscópicas (por ejemplo, luminiscencia o huellas dactilares vibratorias),^[4, 9] de las partículas. Entre todas ellas, están adquiriendo importancia las basadas en la Espectroscopía Raman de superficie mejorada (SERS)^[10] debido a: i) la capacidad de multiplexación prácticamente ilimitada asociada con la huella digital vibratoria única de los diferentes códigos, ii) los tiempos de detección cortos (milisegundos) gracias a la sensibilidad intrínseca del fenómeno SERS,^[11] iii) el tamaño pequeño, lo que permite la creación de imágenes biológicas,^[12] y, iv) la fotoestabilidad y la baja toxicidad (en comparación con las de los colorantes o puntos cuánticos).[13]

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

En esencia, una nanopartícula codificada con SERS (también indicada como etiqueta SERS) comprende un núcleo plasmónico, responsable de la generación del campo eléctrico necesario para la amplificación Raman; una sonda Raman (es decir, código), responsable de la huella digital vibratoria única de la partícula codificada; y, una capa de recubrimiento. Este recubrimiento externo tiene una importancia clave ya que: i) evita que el código se filtre en el medio, evitando así los efectos tóxicos o la contaminación cruzada por vibración con los códigos de otras partículas; ii) protege la partícula plasmónica de las contaminaciones del medio que pueden dar lugar a ruido vibratorio que dificulta la lectura de partículas; iii) aumenta la estabilidad coloidal de la partícula; iv) proporciona una superficie conveniente para una mayor funcionalización química; y, v) protege el núcleo plasmónico de la interacción con otras partículas plasmónicas, evitando el acoplamiento de plasmón y, por lo tanto, la generación incontrolada de puntos calientes. Aunque se han descrito polímeros como recubrimientos de partículas,^[12b, 14] las propiedades únicas de la sílice (es decir, la química superficial conocida, la biocompatibilidad, la transparencia óptica y la estabilidad coloidal) hacen de este material la capa protectora más eficiente para las nanopartículas con diferencia.^[15] La patente US2006054506A1 divulga un método para sintetizar nanopartículas codificadas con SERS encapsuladas en las que se añade una molécula con codificación SERS seleccionada a una suspensión acuosa de nanopartículas metálicas, y después de eso, las nanopartículas codificadas con SERS se encapsulan en una matriz de sílice. Sin embargo, este procedimiento está restringido solo a un número limitado de moléculas codificantes, las que contienen grupos ya sea piridilo o silano, porque estos grupos pueden actuar como precursores de sílice.

El revestimiento de sílice de las nanopartículas requiere la estabilización coloidal de las partículas en solución etanólica antes de la hidrólisis/condensación del ortosilicato de tetraetilo (TEOS). Aunque se han descrito diversos polímeros para esta tarea,^[15a, 16] el más común es la polivinilpirrolidona (PVP).^[15a, 16] Por otro lado, los tensioactivos tales como el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) también se usan comúnmente para esta reacción.^[15a] No obstante, el hecho de que el factor más importante para la generación de partículas con codificación SERS activa se basa en el contacto íntimo entre el código Raman y la partícula plasmónica, introduce una complejidad adicional al proceso de recubrimiento asociado con las propiedades de la química superficial. Tanto la PVP como el CTAB forman capas sólidas de recubrimiento en la superficie de las partículas que limitan o incluso evitan la interacción del agente de codificación con la superficie metálica cuando se añaden a la solución.^[17] Por lo tanto, para aumentar la eficacia de la adsorción del código en la estructura plasmónica, y por lo tanto, la señal SERS, las especies PVP y CTAB deben eliminarse de las superficies metálicas. Por otro lado, esto generalmente tiene como resultado una reducción drástica de la estabilidad coloidal, que se agrava aún más por la naturaleza no polar de la mayoría de los códigos, lo que conduce a la aglomeración de partículas no controladas.^[11, 18] o incluso a la precipitación irreversible. La agregación de nanopartículas marcadas en grupos de diferentes tamaños y geometrías genera estructuras de SERS muy activas pero con una respuesta de SERS altamente no homogénea. Además, estos métodos de fabricación normalmente funcionan para un número muy limitado de moléculas de codificación ya que, en muchos casos, la precipitación de los coloides enteros se produce tras la adición del código. De hecho, esto explica por qué en la mayoría de los casos descritos en la bibliografía, los ejemplos de partículas codificadas con SERS incluyen una pequeña cantidad de códigos, generalmente solo tres o cuatro.

60

65

Como una alternativa a los polímeros o tensioactivos convencionales, el poli(etilenglicol) (PEG) tiolado se había empleado con éxito para el revestimiento de sílice controlada de nanopartículas metálicas únicas. La alta polaridad y porosidad de este polímero estabiliza de manera eficiente las partículas en el alcohol y el agua, al tiempo que permite la difusión del código a la superficie metálica.^[19] Esto no importa, ya que normalmente en los polímeros, la

65

distribución del tamaño del PEG normalmente experimenta grandes fluctuaciones de lote a lote, incluso para la misma marca comercial. Como resultado, el protocolo sintético para codificar partículas usando este método debe ajustarse cada vez que se compra un nuevo PEG. Además, el alto precio del PEG tiolado dificulta su uso para la preparación a gran escala de partículas codificadas como se requiere para aplicaciones de la vida real.

5

Sumario de la invención

En consecuencia, el problema que debe resolver el experto en la materia es proporcionar un método alternativo para sintetizar nanopartículas codificadas con SERS que supere las desventajas de los métodos de la técnica anterior. La solución se basa en un método que se basa en la coabsorción controlada del ácido mercaptoundecanoico (MUA) y el código Raman en las superficies metálicas. El MUA se une a la superficie de la partícula a través del grupo tiol proporcionando estabilidad estérica y electrostática a las partículas debido a su cadena alifática y al grupo carboxílico final. Por otro lado, debido a su naturaleza alifática, su sección transversal de SERS es casi insignificante en comparación con la de los códigos Raman. Este proceso permite el uso de una biblioteca muy grande de códigos Raman porque, usando una cantidad muy pequeña de MUA, es posible estabilizar las partículas, a la vez que se deja una gran cantidad de superficie libre para el código Raman. Además, debido a su grupo carboxílico final, es capaz de actuar como precursor del crecimiento de sílice.

10

15

Por consiguiente, un primer aspecto de la invención se refiere a un método para sintetizar nanopartículas codificadas con SERS encapsuladas que comprende las siguientes etapas:

20

- a) proporcionar una suspensión acuosa coloidal de nanopartículas metálicas;
- b) añadir ácido mercaptoundecanoico (MUA) a la suspensión para producir nanopartículas estabilizadas con MUA sin formar una monocapa completa;
- c) añadir una molécula con codificación SERS seleccionada a la suspensión seleccionada de moléculas que tienen un grupo funcional con alta afinidad por las superficies metálicas, tales como tioles, aminas o cianuros; y
- d) encapsular las nanopartículas codificadas con SERS en una matriz de sílice.

25

Al contrario de lo que sucede con la mayoría de los procedimientos descritos que normalmente implican etapas complejas, en la presente memoria demostramos un enfoque fácil y rápido de una sola reacción para la producción de nanopartículas codificadas con SERS. Esta estrategia versátil permite la codificación con SERS de partículas con cada molécula con afinidad hacia la superficie del metal, independientemente de su naturaleza química, como se ilustra aquí en la fabricación de 31 partículas codificadas diferentes que usan exactamente el mismo procedimiento estándar. Además de la facilidad de preparación, escalabilidad al régimen de litro, estabilidad en soluciones acuosas que incluyen PBS y diversidad química, nuestras partículas con codificación SERS muestran una eficacia óptica considerablemente más alta que las fabricadas mediante el uso de polímeros de PEG o PVP.

30

35

En un segundo aspecto, la suspensión de nanopartículas metálicas es una suspensión de nanopartículas de oro, plata, cobre, aluminio, sus aleaciones consigo mismas o sus aleaciones con otros.

40

En un tercer aspecto, la etapa b) del método de la invención se lleva a cabo añadiendo una solución que contiene NH_4OH y MUA rápidamente y con agitación vigorosa a la suspensión de nanopartículas metálicas.

En un cuarto aspecto, la etapa c) del método de la invención se lleva a cabo añadiendo una solución que contiene EtOH y NH_4OH a la suspensión de nanopartículas estabilizadas con MUA y después añadiendo a la misma una solución que contiene la molécula con codificación SERS seleccionada.

45

En un quinto aspecto, la etapa c) del método de la invención se lleva a cabo mediante la adición de una solución que contiene EtOH y NH_4OH a la suspensión de nanopartículas estabilizadas con MUA y después añadiendo a la misma una solución que contiene la molécula con codificación SERS seleccionada. Preferiblemente, la solución que contiene la molécula con codificación SERS se añade a la suspensión de nanopartículas estabilizadas con MUA con fuerte agitación magnética y en un gran exceso de moléculas por nm^2 con respecto a las nanopartículas estabilizadas con MUA.

50

Otro aspecto de la invención es que las nanopartículas están formadas por una suspensión de nanopartículas de oro esféricas cubiertas de citrato que se produce añadiendo una solución acuosa de HAuCl_4 en una solución acuosa en ebullición de citrato de sodio con agitación vigorosa, y luego manteniendo el calentamiento y la agitación a niveles apropiados hasta que el disolvente se evapore al menos parcialmente.

55

De acuerdo con otro aspecto, la molécula con codificación SERS se selecciona de moléculas que tienen un grupo funcional con alta afinidad por las superficies metálicas como tioles, aminas o cianuros. Preferiblemente, la molécula con codificación SERS se selecciona del grupo que consiste en: 2-mercaptopiridina; bencenotiol; ácido mercaptobenzoico; 4-nitrobenceno-tiol; 3,4-diclorobencenotiol, 3-fluorotiofenol; 4-fluorotiofenol; 3-5-bis(trifluorometil)bencenotiol; azul de metileno; azul Nilo A; rodamina 6G; azul de toluidina O, 2-feniletanotiol, 4-mercaptofenol, bifenil-4-tiol, 7-mercapto-4-metilcumarina, 4-hidroxifenil)-1H-tetrazol-5-tiol, 2-fluorotiofenol, violeta cristal, 2-naftalenotiol, 4-(((3-Mercapto-5-(2-metoxifenil)-4H-1,2,4-triazol-4-il)imino)metil)fenol, (2-

65

trifluorometil)bencenotiol, 4-aminotiofenol, 1-Naftalenotiol, 1,1',4,1"-terfenil-4-tiol, bifenil-4,4'-ditiol, ácido tiosalicílico, 4-(((3-mercapto-5-(2-piridinil)-4H-1,2,4-triazol-4-il)imino)metil)-1,2-bencenodiol, 4-(((3-Mercapto-5-(2-piridinil)-4H-1,2,4-triazol-4-il)imino)metil)benzoico, 2,3,4,6-tetrafluorobencenotiol y (5-(4-metoxifenil)-1,3,4-oxazol-2-tiol).

5 De acuerdo con otro aspecto, la encapsulación de las nanopartículas codificadas con SERS en una matriz de sílice se lleva a cabo añadiendo a la dispersión de nanopartículas codificadas con SERS cantidades apropiadas de etanol y NH_4OH para proporcionar una relación molar $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ entre 0,2 y 5, y después añadir ortosilicato de tetraetilo para iniciar el crecimiento de la sílice. Preferiblemente, a continuación, la solución se deja reaccionar entre 1 h y 24 h a temperatura ambiente y luego se somete a varios ciclos de lavado.

10

De acuerdo con otro aspecto, el método de invención es escalable al régimen de litro.

Breve descripción de las figuras

15 Figura 1: Representación esquemática del procedimiento sintético para la producción de nanopartículas codificadas con SERS que muestran las diferentes etapas implicadas en la síntesis. En primer lugar, se producen nanopartículas de Au recubiertas con citrato. En segundo lugar, se usa MUA para estabilizar las partículas en medio básico. En tercer lugar, se añade un exceso de código SERS para codificar las partículas. En cuarto lugar, una capa de sílice crece sobre las partículas para asegurar la estabilidad durante largos períodos de tiempo y evitar el acoplamiento de plasmón no deseado.

20

Figura 2: (A) Espectros de extinción de las nanopartículas Au@MUA/MPy con diferente cantidad de MUA (moléculas nm^{-2}). La MPy siempre se añadió en un gran exceso para garantizar el recubrimiento completo de las nanopartículas. Por debajo de 0,8 moléculas de MUA nm^{-2} , es posible reconocer un régimen coloidal inestable (las nanopartículas comienzan a agregarse). (B) Espectros SERS de nanopartículas Au@MUA/MPy con diferente cantidad de MUA (moléculas nm^{-2}) (C) Relación de intensidad entre la Abs a 535 y la Abs a 750 nm para las nanopartículas Au@MUA/MPy en función de la diferente cantidad de MUA. (D) Intensidad SERS de nanopartículas Au@MUA/MPy en función de diferentes cantidades de MUA.

25

30 Figura 3: (A) Espectros de extinción de las partículas de Au durante todas las etapas implicados en la formación de las nanopartículas codificadas. Se observar que las partículas no se agregan durante el proceso. (B, C y D) Imágenes TEM representativas a diferentes aumentos de las nanopartículas de MPy codificadas con SERS.

30

Figura 4: Espectros SERS de diez nanopartículas codificadas con SERS representativas. De arriba a abajo: 2-mercaptopiridina (MPy); bencenotiol (BT); ácido mercaptobenzoico (MBA); 4-nitrobencenotiol (4-NBT); 3,4-diclorobencenotiol (DBT), 3-fluorotiofenol (3-FTP); 4-fluorotiofenol (4-FTP); 3-5-bis(trifluorometil)bencenotiol (3-FMBT); azul de metileno (MB); azul Nilo A (NBA); y rodamina 6G (R6G).

35

Figura 5: (A) Espectros SERS en la región de $900\text{-}1210\text{ cm}^{-1}$ de comparación de nanopartículas de MPy codificadas preparadas usando los enfoques de PVP, PEG-SH y MUA. (B) Relación de la eficiencia de SERS de los tres métodos sintéticos para nanopartículas codificadas de 1NT, NBA, MBA, TB, MPy, TFBT y 4NBT (los espectros de SERS correspondientes se muestran en la Fig. S6) (C) Espectros SERS en la región de $1000\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$ de comparación de nanopartículas de MBA codificadas preparadas utilizando una monocapa completa de MBA (púrpura) y combinaciones con los diferentes agentes estabilizantes utilizados: MUA + MBA (verde), PEG-SH + MBA (rojo) y PVP + MBA (azul).

40

45

Figura 6: Imagen TEM representativa (A) e histogramas de distribución de tamaño (B) de las nanopartículas de oro recubiertas con citrato sintetizadas.

Figura 7: Espectros SERS de partículas de Au recubiertas con una monocapa completa de MUA que muestra su pequeña sección transversal de Raman.

50

Figura 8: Comparación de los espectros SERS de CV en dos moléculas de MUA diferentes/ nm^2 (0,8 negro y 4 rojo). Se observa que casi no se obtiene señal cuando se usan 4 moléculas por nm^2 .

55

Figura 9: Imágenes TEM (A, B y C) que muestran los resultados de la codificación de nanopartículas en concentraciones de MUA por debajo de 0,8 moléculas nm^{-2} (0,7, 0,6 y 0,5 respectivamente). (D) imagen TEM que muestra la agregación incontrolada de las partículas por debajo de 0,7 moléculas nm^{-2} .

Figura 10: Espectro SERS de 20 nanopartículas codificadas con SERS representativas. Columna izquierda: azul de toluidina O, 2-feniletanotiol, 4-mercaptotiofenol, bifenil-4-tiol, 7-mercapto-4-metilcumarina, 4-hidroxifenil-1H-tetrazol-5-tiol, 2-fluorotiofenol, cristal violeta, 2-naftalenotiol, 4-(((3-Mercapto-5-(2-metoxifenil)-4H-1,2,4-triazol-4-il)imino)metil)fenol. Columna derecha: (2-trifluorometil)bencenotiol, 4-aminotiofenol, 1-naftalenotiol, 1,1',4,1"-terfenil-4-tiol, bifenil-4,4'-ditiol, ácido tiosalicílico, 4-(((3-Mercapto-5-(2-piridinil)-4H-1,2,4-triazol-4-il)imino)metil)-1,2-bencenodiol, ácido 4-(((3-Mercapto-5-(2-piridinil)-4H-1,2,4-triazol-4-il)imino)metil)benzoico, 2,3,4,6-tetrafluorobencenotiol, (5-(4-metoxifenil)-1,3,4-oxidozol-2-tiol).

65

Figura 11: (A) Fotografía de la síntesis en una sola reacción de un lote de litro de nanopartículas de MPy codificadas. (B) UV-Vis, (C) Espectros SERS y (D) imagen TEM de las nanopartículas codificadas.

Figura 12: (A) comparación de los espectros SERS de nanopartículas codificadas preparadas usando los enfoques de PVP, PEG-SH y MUA (azul, rojo y verde, respectivamente) de MBA, 4NBT, NBA, TB, TFBT y 1NT.

Figura 13: Comparación de espectros SERS de nanopartículas codificadas preparadas usando los enfoques de PVP, PEG-SH y MUA (azul, rojo y verde, respectivamente) de MBA, 4NBT, NBA, TB, TFBT y 1NT.

10 Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben considerarse como que definen el alcance total de la misma.

15 Para los ejemplos de la invención se utilizan los siguientes materiales y métodos: trihidrato de cloruro de oro (III) (99,9 %, $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), citrato trisódico deshidratado ($\geq 99,5$ %, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), solución de amoníaco (29 %, NH_4OH), tetraetoxi silano (99,999 %, TEOS), etanol (99,5 %, EtOH), polivinilpirrolidona (PM promedio 58,000 g, PVP), bromuro de cetiltrimetilamonio (99,72 %, CTAB), ácido 11-mercapto undecanoico (95 %, MUA), 2-mercaptopiridina (97 %, MPy), 4-nitrobenzenotiol (80 %, 4NBT), 4-mercaptofenol (97 %, 4MP), ácido 4-mercaptobenzoico (99 %, MBA), 3,5-bis(trifluorometilo)benzenotiol (97 %, 35BTfMB), 4-fluorotiofenol (98 %, 4FTP), 2,3,5,6-tetrafluorobenzenotiol (97 %, 2346TFBT), 2- (trifluorometil)benzenotiol (96 %, 2TFMBT), 3-fluorotiofenol (95 %, 3FTP), azul Nilo A (95 %, NBA), 2-fluorotiofenol (97 %, 2FTP), azul de toluidina O (≥ 84 %, TB), benzenotiol (97 %, BT), 4-(((3-mercapto-5-(2-metoxifenil)-4H-1,2,4-triazol-4-il)imino)metil)fenol (97 %, MMPHTYIMP), ácido 4-(((3-mercapto-5)-(2-piridinil)-4H-1,2,4-triazol-4-il)imino)metil)benzoico (MPHTYIMBA), 4-(((3-mercapto-5)-(2-piridinil)-4H-1,2,4-triazol-4-il)imino)metil)-1,2-benzenodiol (MPHTYIMBDO), 1-(4-hidroxifenil)-1H-tetrazol-5-tiol (97 %, HPHTT), 1,1',4',1''-terfenil-4-tiol (97 %, TPT), 1-naftalenotiol (99 %, 1NT), 2-naftalenotiol (99 %, 2NT), 5-(4-metoxifenil)-1,3,4-oxidazol-2-tiol (97 %, MPOT), azul de metileno (≥ 82 %, MB), 3,4-diclorobenzenotiol (97 %, DCBT), bifeníl-4-tiol (97 %, BPT), 7-mercapto-4-metilcumarina (≥ 97 %, MMC), bifeníl-4-4'-ditiol (95 %, BPDT), ácido tiosalicílico (97 %, TSA), 5-amino-1,3,4-tiadiazol-2-tiol (87 %, ATT), 4-aminotiofenol (97 %, 4ATP), 2-feniletanotiol (98 %, 2PET), cristal violeta (≥ 90 %, CV) se adquirieron en Sigma-Aldrich (Alemania). Todos los reactivos se usaron sin purificación adicional. Se usó agua Mili-Q ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) en todas las soluciones acuosas, y todo el material de vidrio se limpió con agua regia antes de los experimentos.

35 Ejemplo 1

Síntesis de nanopartículas de oro esféricas estabilizadas con citrato: Se produjeron nanopartículas esféricas de oro de aprox. 50 nm de diámetro mediante una modificación del método de Turkevich. Brevemente, 308 μl de solución acuosa de HAuCl_4 (0,081 M) se añadieron a una solución acuosa en ebullición de citrato de sodio (100 ml, 0,27 mM) con agitación vigorosa. El calentamiento y la agitación se continuaron durante 30 min. Se utilizó un condensador para evitar la evaporación del disolvente. Durante este tiempo, el color de la solución cambia gradualmente de incoloro a púrpura para finalmente convertirse en rojo intenso. Después de este tiempo, se continuó calentando y se eliminó el condensador para permitir la evaporación del disolvente a la mitad de su volumen inicial, para lograr una $[\text{Au}]_{\text{final}} = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$.

45 Ejemplo 2

Funcionalización con ácido mercapto undecanoico de nanopartículas esféricas de oro: Con el fin de proporcionar estabilidad coloidal a las nanopartículas de oro durante el proceso de codificación y promover posteriormente el crecimiento de la sílice, se funcionalizaron 50 ml de las nanopartículas de oro esféricas producidas con una pequeña cantidad de MUA (0,8 moléculas nm^{-2}). Para ello, se preparó una solución que contiene NH_4OH (879 μl , solución acuosa al 29 %) y MUA (1 ml, $3,99 \times 10^{-5} \text{ M}$ en EtOH). Esta solución se añadió rápidamente con agitación vigorosa al sol de nanopartículas de oro (50 ml). La agitación se continuó durante 30 minutos para asegurar la funcionalización de MUA en la superficie de oro.

55 Ejemplo 3

Codificación de nanopartículas de oro: Con el objetivo de demostrar la versatilidad del método presentado, se utilizaron 31 moléculas activas con SERS diferentes MPy, 4NBT, 4MP, MBA, 35BTfMB, 4FTP, 2356TFBT, 2TFMBT, 3FTP, NBA, 2FTP, TB, BT, MMPHTYIMP, HPHTT, TPT, 1NT, 2NT, MPOT, MB, DCBT, BPT, MMC, BPDT, CV, 2PET, 4ATP, ATT, TSA, MPHTYIMBDO, MPHTYIMBA. El mismo procedimiento exacto se utilizó para cada molécula. Brevemente, se preparó una solución que contiene EtOH (324,89 ml) y NH_4OH (5,73 ml, solución acuosa al 29 %). Esta solución se añadió rápidamente con agitación vigorosa a las nanopartículas de oro estabilizadas con MUA (51,88 ml). A continuación, se preparó una solución madre de la molécula activa con SERS (10^{-2} M , en EtOH) y se añadieron 74,8 μl de esta solución a las partículas de Au funcionalizadas con MUA (382 ml) con fuerte agitación magnética durante 30 minutos (para asegurar la adecuada funcionalización del Au). La cantidad añadida de moléculas activas con SERS se calculó en 15 moléculas nm^{-2} .

Ejemplo 4

Encapsulación de la sílice: La encapsulación de la sílice de las nanopartículas codificadas se logró mediante un método modificado de Stöber usando el grupo carboxílico del MUA para promover el crecimiento de la sílice de la siguiente manera: Las concentraciones adecuadas de H₂O, NH₄OH y EtOH para el crecimiento de la sílice de la solución de partículas codificadas con el código MUA-SERS se ajustaron previamente, durante la etapa de codificación, para producir concentraciones finales de 7,94 M, 0,128 M y 14,60M, respectivamente (la relación molar EtOH/H₂O = 1,84). A continuación se añadió TEOS (13,20 µl), la solución se agitó enérgicamente y se dejó sin perturbaciones a temperatura ambiente durante 14 h. Finalmente, las NP núcleo-cubierta resultantes se limpiaron para eliminar el exceso de reactantes por centrifugación (3 x 6000 rpm, 20 min), y se redispersaron en etanol. Para concentrar la solución (10⁻³ M) para realizar la caracterización de SERS, se centrifugaron 15,29 ml de esta solución nuevamente (2 x 6000 rpm, 20 min) y se redispersaron en agua, después de la etapa de centrifugación final todo se resuspendió en un volumen final de 1 ml.

Ejemplo 5

Síntesis de nanopartículas de oro codificadas esféricas a base de PVP: Se usaron diferentes moléculas activas con SERS 1NT, MPy, 4NBT, MBA, NBA, TB y 2356TFBT. Se produjeron nanopartículas esféricas de oro de aprox. 51 nm de diámetro como se describió previamente. A 75 ml de la solución de PVP (0,69 mM), se añadieron gota a gota 50 ml de las partículas de Au recubiertas con citrato y se dejaron reaccionar durante la noche con agitación. A continuación, la solución se centrifugó (5400 rpm, 25 min) y se redispersó en 50 ml de EtOH ([Au] = 0,5 mM), para eliminar al máximo el exceso de PVP, este proceso se repitió cuatro veces. A continuación, la molécula del código SERS (74,8 µl; 10⁻² M) se añadió con agitación durante 2 h. Finalmente, el recubrimiento de sílice se llevó a cabo mediante el ajuste de las concentraciones finales de la siguiente manera (en una solución de 50 ml): [Au] = 0,5 mM, [H₂O] = 10,55 M, [NH₃] = 0,2 M, [EtOH] = 13,39 M y [TEOS] = 1,12 mM. La mezcla de reacción se dejó reaccionar durante 24 h. Cuando se completó el tiempo de reacción, las partículas se centrifugaron y se lavaron con etanol. Para concentrar la solución (10⁻³ M) para realizar las mediciones de SERS, 2 ml de esta solución se centrifugaron nuevamente (2 x 6000 rpm, 20 min) y se redispersaron en agua, después de la etapa de centrifugación final todo se resuspendió en un volumen final de 1 ml.

Ejemplo 6

Síntesis de nanopartículas de oro codificadas esféricas a base de PEG-SH: Se usaron diferentes moléculas activas con SERS 1NT, MPy, 4NBT, MBA, NBA, TB y 2356TFBT. En primer lugar, se prepararon nanoesferas de oro estabilizadas con CTAB de 51 nm de diámetro mediante un método de crecimiento de semillas previamente descrito en la bibliografía^[30] de la siguiente manera: se hizo una solución de siembra preparando una solución acuosa (20 ml) que contenía HAuCl₄ (2,5 × 10⁻⁴ M) y citrato de sodio (2,5 × 10⁻⁴ M). Aunque la mezcla se agitó vigorosamente, se añadió una solución de NaBH₄ (600 µl, 0,1 M), observando un rápido cambio de color a rojo que indica la formación de las partículas de oro. Las semillas se dejaron en agitación a la atmósfera durante 1 h para permitir la descomposición del NaBH₄. A continuación, se preparó una solución de crecimiento disolviendo CTAB (de Mercks, 100 ml, 0,1 M) y yoduro de potasio (0,3 mg/gramo de CTAB) en agua Milli-Q, seguido de la adición de HAuCl₄ (510 µl, 0,103 M) y ácido ascórbico (735 µl, 0,1 M). Después de cada adición, las botellas fueron sacudidas vigorosamente. Se añadieron 187 µl de semillas y la solución se agitó vigorosamente de nuevo. El matraz se dejó sin perturbaciones a 28 °C durante 48 h. Después de este tiempo, se observa una pequeña cantidad de partículas de oro como sedimento en el fondo del matraz. Dado que las partículas por debajo de 100 nm son estables en solución, este precipitado debe estar compuesto de estructuras Au más grandes procedentes de semillas con una estructura cristalográfica diferente. El sobrenadante se recoge cuidadosamente y el precipitado se descarta para garantizar la monodispersidad de las partículas. La segunda etapa implica el recubrimiento con O-[2-(3-mercaptopropionilamino)etil]-O-metilpoli (etilenglicol) (PEG-SH, Pm 5000), la transferencia de etanol y el revestimiento de sílice. Para ello, se centrifugaron 100 ml de las esferas de Au sintetizadas ([Au] = 0,25 mM, [CTAB] = 0,1 M) durante 20 min (6000 rpm), el precipitado se redispersó con una solución de CTAB ([CTAB] = 0,5 mM) para limpiar lo más posible el CTAB sin comprometer la estabilidad coloidal de las partículas. Este proceso se repitió 3 veces para finalmente redispersar en un volumen final de 50 ml para obtener [CTAB] ~0,5 mM y [Au] ~0,5 mM. A continuación, se preparó una solución madre del PEG-SH y se sonicó durante 15 minutos (10⁻³ M, en H₂O), se añadieron 89,8 µl de esta solución a las partículas de CTAB estabilizadas con Au (50 ml) con una fuerte agitación magnética durante 30 min (para asegurar la adecuada funcionalización del Au). La cantidad añadida de PEG-SH se calculó en 1,8 moléculas nm⁻². Las partículas modificadas con PEG se centrifugaron dos veces para eliminar el exceso de PEG-SH y se redispersaron en etanol (50 ml), en la segunda centrifugación las partículas se redispersaron en una solución (50 ml) ajustando las siguientes concentraciones finales: [Au] = 0,5 mM, [H₂O] = 10,55 M, [NH₃] = 0,2 M y [EtOH] = 13,39 M. La tercera etapa es la codificación de las nanopartículas, se preparó una solución madre de la molécula activa con SERS (10⁻² M, en EtOH) y se añadieron 74,8 µl de esta solución a las partículas de Au funcionalizadas con PEG-SH (50 ml) con fuerte agitación magnética durante 2 h. La cantidad añadida de moléculas activas con SERS se calculó en 15 moléculas nm⁻². Finalmente, se añadió TEOS (13,20 µl), se agitó enérgicamente la solución y se dejó sin perturbaciones a temperatura ambiente durante 14 h. Para concentrar la solución (10⁻³ M) para realizar las mediciones de SERS, 2 ml de esta solución se centrifugaron

nuevamente (2 x 6000 rpm, 20 min) y se redispersaron en agua, después de la etapa de centrifugación final todo se resuspendió en un volumen final de 1 ml.

Ejemplo 7

Caracterización: Se aplicaron la espectroscopía UV-VIS (PerkinElmer, Lambda 19) y la microscopía electrónica de transmisión (TEM, LEO 922 EFTEM operando a 80 kV) para caracterizar la respuesta óptica, la estructura y el tamaño de las nanopartículas durante el proceso de codificación. Los espectros SERS se recogieron en geometría de retrodispersión con un sistema Renishaw Invia Reflex equipado con un detector 2D-CCD y un microscopio confocal Leica. El espectrógrafo utilizó una rejilla de alta resolución (1200 g cm^{-1}) con óptica de filtro de paso de banda adicional. La excitación de la muestra se llevó a cabo con una línea de láser de diodo de 785 nm, con tiempos de adquisición de 10^{-1} s (dependiendo de la saturación de intensidad Raman) y la potencia en la muestra de aproximadamente 300 mW, utilizando el accesorio StreamLine de Renishaw. El láser se centró en la muestra con un objetivo de 30x que proporciona una resolución espacial de aprox. 1 μm .

Resultados y discusión de ejemplos

La descripción esquemática del protocolo universal para la fabricación de partículas codificadas se ilustra en la Figura 1. El proceso se puede dividir en cuatro etapas diferentes; 1) Síntesis de nanopartículas; 2) funcionalización con MUA; 3) codificación SERS; y 4) recubrimiento con sílice. Como material plasmónico inicial, se seleccionaron nanopartículas de oro cubiertas con citrato de aprox. 50 nm de diámetro (ver Figura 6), ya que la mayoría de las investigaciones publicadas en el campo de las partículas codificadas con SERS se llevan a cabo en nanopartículas de oro esféricas. Sin embargo, el protocolo se puede extender a otras geometrías y materiales (es decir, plata). Debido a la baja estabilidad de las soluciones coloidales tras la funcionalización con el código Raman, se requiere una etapa de estabilización antes de la codificación. Se eligió el MUA como agente estabilizante porque se une covalentemente a la superficie de oro a través del grupo tiol, a la vez que proporciona estabilidad a las partículas tanto con la cadena alifática larga (estérica) como con el grupo carboxílico final (electrostático). Por otro lado, debido a su naturaleza alifática, su sección transversal de SERS es casi despreciable en comparación con la de los compuestos aromáticos. (Figura 7).^[20] No obstante, la presencia de un grupo tiol implica que el MUA debe añadirse en la proporción adecuada para evitar la formación de una monocapa compacta que pueda pasivar la superficie metálica evitando la retención de los códigos SERS y con extremo cuidado para evitar la adsorción heterogénea de la molécula por algunos de los coloides de la solución. Por lo tanto, en una segunda etapa, se añadió MUA rápidamente con agitación vigorosa a pH básico para producir nanopartículas de oro funcionalizadas con MUA (Au@MUA). Para maximizar la eficiencia final de SERS de las NP codificadas, el recubrimiento superficial del MUA se redujo tanto como fue posible para proporcionar el máximo acceso a la superficie del metal a la vez que se preservaba la estabilidad coloidal general cuando se exponía a un exceso del código SERS. La adición del código se representa como la tercera etapa (Figura 1) Entre todas las moléculas codificantes investigadas, se observó que la 2-mercaptopiridina (MPy) inducía la agregación coloidal más rápida tras la adición a las nanopartículas de oro cubiertas solo con citrato. Por esta razón, la optimización del protocolo se realizó usando esta molécula (es decir, el peor escenario de estabilidad coloidal).

Se ha informado que MUA ocupa un área de $0,22 \text{ nm}^2$, que corresponde a aproximadamente $4,5 \text{ moléculas nm}^{-2}$.^[21] Por lo tanto, los experimentos que disminuyen la cantidad de MUA se diseñaron entre $5,0$ y $0,1 \text{ moléculas nm}^{-2}$. Después de esperar a que la adsorción de MUA alcanzara su equilibrio termodinámico (30 min), se añadió MPy en un gran exceso ($15 \text{ moléculas nm}^{-2}$) para dar las nanopartículas Au@MUA/MPy correspondientes. La agregación del sistema coloidal se controló mediante espectroscopía UV-Vis-NIR (Figura 2A) comparando la absorción de las soluciones resultantes a 535 nm, asociada con nanopartículas Au@MUA aisladas y aquella a 750 nm, atribuida a las contribuciones plasmónicas de partículas interactuantes indicativas de agregación (Figura 2C) Al mismo tiempo, la SERS también se controló en las mismas muestras para estimar la cantidad de código adsorbido (Figura 2B) Entre $5-0,8 \text{ moléculas de MUA nm}^{-2}$ (régimen coloidal estable), los espectros de extinción de Au@MUA/MPy exhiben las LSPR características de las nanopartículas de oro esféricas aisladas en suspensión. Con $0,7 \text{ moléculas nm}^{-2}$, se observa la aparición de un hombro a aproximadamente 700 nm, lo que indica la formación significativa de agregados de nanopartículas. La disminución adicional de la cobertura de la superficie de MUA conduce a una perturbación dramática de la estabilidad coloidal al agregar MPy, como se revela claramente por la contribución plasmónica dominante a una longitud de onda más larga. Por lo tanto, el rango de estabilidad coloidal se identificó entre 5 a $0,8 \text{ moléculas de MUA nm}^{-2}$. Por el contrario, la intensidad de SERS del modo de respiración de anillo de la MPy a 1001 cm^{-1} (Figura 2D) indica la existencia de tres regímenes. El primero corresponde a la agregación de partículas (por debajo del rango de $0,8 \text{ moléculas de MUA nm}^{-2}$) y, como se esperaba, muestra un aumento notable de la intensidad debido al acoplamiento de plasmón no controlado (ver desviación estándar). El segundo, entre $1,4-0,8 \text{ moléculas de MUA nm}^{-2}$, revela una disminución progresiva en la intensidad SERS de MPy a medida que aumenta el contenido de MUA. En este régimen, un aumento en la cobertura de la superficie del MUA se refleja directamente en la disminución de la adsorción del código sobre la superficie del metal. En el tercer régimen, $1,6-5 \text{ moléculas de MUA nm}^{-2}$, la intensidad SERS permanece constante ya que el MUA forma una monocapa progresivamente completa y solo una cantidad fija de moléculas MPy se puede difundir sobre las superficies de las nanopartículas. Notablemente, para moléculas pequeñas como MPy, la intensidad de SERS nunca decae a cero. Esto se debe a que, a diferencia de la disposición cristalina de las películas densamente empaquetadas de alcanotioles en

superficies de oro,^[22] las repulsiones coulombicas entre los grupos carboxilicos negativos del MUA limitan las interacciones laterales de las cadenas de alquilo hidrófobas impidiendo la formación de un empaquetamiento molecular grueso en la superficie.^[23] Claramente, la accesibilidad a la superficie metálica en este régimen particular depende en gran medida de las propiedades químicas y geométricas del código SERS. Por ejemplo, para la concentración de MUA de 4 moléculas nm⁻² casi no se observan señales SERS para códigos moleculares grandes (ver Figura 8) Por lo tanto 0,8 moléculas nm⁻² fue identificada como la concentración óptima de MUA para la producción de nuestras nanopartículas de oro codificadas con SERS, previniendo la agregación y maximizando la señal de SERS.

Finalmente, para garantizar la estabilidad durante largos períodos de tiempo, proteger tanto el código Raman como el núcleo plasmónico, y generar una superficie externa legible funcionalizable, las nanopartículas Au@MUA-MPy se encapsularon en una matriz de sílice. El recubrimiento de sílice se realizó utilizando una modificación del método Stöber^[24] aprovechando la capacidad de los ligandos con ácido carboxílico terminal, tal como MUA, para inducir el crecimiento de la sílice.^[25] Para ello, se añadieron cantidades apropiadas de etanol y NH₄OH a la suspensión acuosa de Au@MUA/MPy para mantener el pH adecuado de la solución y proporcionar la relación molar EtOH/H₂O correcta (1,84) para el proceso Stöber. A continuación, se añadió TEOS para iniciar el crecimiento de la sílice. La solución se dejó reaccionar durante 14 h a temperatura ambiente antes de someterla a varios ciclos de lavado (Las Figuras 3B-D ilustran imágenes TEM características de nanopartículas Au@MUA/MPy@SiO₂). La Figura 3A recoge los espectros de extinción de la suspensión coloidal después de cada etapa de fabricación. Como se puede ver, el desplazamiento de las LSPR de las nanopartículas individuales refleja claramente los cambios en el índice de refracción asociado con cada etapa de funcionalización (Figura 3A, recuadro). En primer lugar, la deposición sub-monocapa de MUA induce cambios mínimos en el máximo de plasmón, luego el recubrimiento completo con MPy da como resultado un desplazamiento de aproximadamente 3 nm y, finalmente, el crecimiento de una capa gruesa de sílice es responsable del gran desplazamiento hasta 545 nm. Es importante destacar que los espectros de extinción no revelan ninguna ampliación significativa de la LSPR, lo que indica que las nanopartículas conservan su estabilidad coloidal durante todo el proceso sin formación apreciable de agregados. Hay que señalar que, independientemente del proceso de codificación SERS y de la estabilidad coloidal relacionada, los recubrimientos de sílice homogéneos solo pueden lograrse para una concentración de MUA superior a 0,7 moléculas nm⁻² (ver Figura 9).

El protocolo descrito se extendió con éxito a un gran conjunto de códigos diferentes, incluyendo moléculas pequeñas y colorantes aromáticos tiolados y no tiolados (fenotiazinas, rodaminas, oxazinas, triarilmetanos, tri- y tetrazoles, etc.), lo que demuestra la aplicabilidad universal de esta estrategia sintética. La Figura 4 muestra las firmas SERS y las imágenes TEM de 11 nanopartículas codificadas con SERS representativas, mientras que otros 20 códigos se describen en la información de respaldo (Figura 10). Hay que destacar, que el método sintético de una sola reacción se ha empleado con éxito en la fabricación de volúmenes más grandes de nanopartículas codificadas con SERS (en el régimen de litro, Figura 11) sin afectar a las características finales del sustrato, lo que demuestra claramente la escalabilidad del proceso.

Con el fin de evaluar la eficiencia óptica de nuestro protocolo, comparamos las intensidades SERS proporcionadas por siete de nuestras nanopartículas codificadas con SERS con las producidas por sus contrapartes análogas fabricadas (en la medida de lo posible) con los procedimientos basados en polímeros más comunes utilizados en la bibliografía: enfoques PVP y PEG tiolado.^[19, 26] Ambas estrategias basadas en polímeros se basan en proporcionar la estabilidad requerida a las partículas de Au durante la etapa de codificación. Con este fin, se siguieron los protocolos descritos^[19, 26] y se optimizaron para alcanzar la señal SERS más alta posible. Cuando se usó PVP, se produjeron primero nanopartículas de Au estabilizadas con citrato y posteriormente se transfirieron a EtOH usando PVP. Antes de la adición del código, las partículas se lavaron exhaustivamente para eliminar lo máximo posible la PVP de la superficie de las partículas a la vez que se conservaba la estabilidad coloidal. Estos ciclos de lavado son críticos para maximizar la adsorción del código sobre la superficie metálica.

En el caso del PEG tiolado, se ha demostrado previamente que la capa polimérica obstaculiza significativamente la difusión de las moléculas sobre la superficie del metal.^[26] En consecuencia, debido al número muy limitado de moléculas de Raman capaces de unirse a las nanopartículas revestidas con PEG, el uso de las correspondientes partículas de Au@PEG@código se limita en gran medida a las condiciones de la resonancia Raman mejorada en la superficie (SERRS), cuando la excitación electrónica del tinte está en resonancia con el rayo láser.^[19,27] Idéntica limitación aparece si la etapa de codificación se realiza antes del recubrimiento con PEG (Au@código@PEG)^[28] porque, en este caso, salvo algunos casos afortunados de códigos Raman "estabilizadores de nanopartículas" como MBA, el número de moléculas por nm² que puede adsorberse sobre el metal sin perturbar la estabilidad coloidal es muy pequeño. Por lo tanto, primero tratamos de mejorar la accesibilidad del marcaje Raman a la superficie del metal (es decir, aumentando el número de moléculas de código por nanopartícula) reduciendo progresivamente la concentración de PEG-SH a partir de 4 moléculas nm⁻², como se describe en la bibliografía,^[19] hasta 0.2. Sin embargo, la agregación de nanopartículas ya se observa a una concentración de polímero inferior a 3,5 moléculas nm⁻² incluso antes de la adición del exceso de MPy (Figura 12). Además, no se registraron señales de SERS distinguibles tras la funcionalización de las nanopartículas de oro recubiertas con PEG con el exceso de MPy a menos que estuvieran en presencia de agregación coloidal (Figura 12). Descartada la posibilidad de aumentar la cobertura de la superficie de MPy al disminuir la concentración de PEG-SH, buscamos una estrategia diferente.^[26,27]

En este caso, se prepararon nanopartículas de Au estabilizadas con CTAB de tamaño similar en lugar de coloides recubiertos con citrato. La capa doble de tensioactivo ofrece una capa estabilizadora efectiva que evita la agregación de las nanopartículas cuando los coloides están expuestos a una menor cantidad de PEG (lo que corresponde a 1,8 moléculas nm^{-2} en nuestras condiciones experimentales optimizadas). Las nanopartículas estabilizadas con PEG/CTAB resultantes pueden someterse a, en primer lugar, varios ciclos de lavado para eliminar el exceso de tensioactivo y, en segundo lugar, al exceso de MPy en la etapa de codificación sin afectar a la estabilidad coloidal. Este protocolo optimizado nos permite sintetizar nanopartículas codificadas con SERS con una eficiencia de SERS mucho mayor, generalmente mayor que la observada con el enfoque de PVP, pero incluso significativamente menor que la proporcionada por el método basado en MUA. (Figura 5A y Figura 13). Además, es importante destacar que incluso cuando se optimiza, el enfoque combinado de CTAB/PEG conserva limitaciones y problemas intrínsecos, tales como la necesidad de ciclos múltiples de centrifugación, separación y resuspensión (que a menudo son críticos para la estabilidad coloidal y representan un obstáculo práctico para su producción a gran escala), el uso de grandes cantidades del CTAB altamente citotóxico,^[29] etc.

La Tabla 1 siguiente resume las intensidades de SERS obtenidas para los diferentes métodos sintéticos usando siete códigos Raman diferentes:

Tabla 1. Aumento de la accesibilidad superficial de la intensidad SERS para nanopartículas codificadas con MUA para cada código relacionado con PVP y PEG-SH respectivamente.

| | NBA | TB | 2MPy | 1NT | MBA | TH60 | 4NBT |
|--------|------|------|------|-----|------|------|------|
| PVP | 22,2 | 14,9 | 26,5 | 10 | 19,4 | 79 | 140 |
| PEG-SH | 3,6 | 3,8 | 2,7 | 3,1 | 7 | 2,9 | 2 |

Para todos los casos investigados, la intensidad de SERS alcanzada con el protocolo basado en MUA era entre 140 a 10 veces mayor que en el caso de PVP, y de 10 a 2 veces mayor que en el caso de PEG tiolado. Tales diferencias drásticas entre un marcaje Raman y otro pueden atribuirse a la diferente naturaleza química y tamaño molecular de los códigos que claramente afectan a su capacidad de difundirse a través de la capa polimérica externa y finalmente adsorberse sobre la superficie del metal.

Como se indicó previamente, la modificación de la química de la superficie de las nanopartículas por adsorción de los marcajes Raman normalmente da como resultado una disminución de la estabilidad coloidal en suspensión. Sin embargo, en muy pocos casos, la naturaleza química específica de la molécula de código todavía puede conservar dicha estabilidad actuando como un agente estabilizador. Este es el caso, por ejemplo, del ácido mercaptobenzoico (MBA). En cuanto al MUA, los grupos carboxílicos del MBA unidos a la superficie metálica están orientados hacia la solución a granel que proporciona, a pH básico, la repulsión electrostática necesaria para evitar la agregación de nanopartículas y, en la posterior etapa de recubrimiento con sílice, promueve el crecimiento de la sílice. Como resultado, esta nanopartícula codificada con SERS se puede sintetizar con una cobertura completa de MBA sin necesidad de agentes estabilizadores externos. Por lo tanto, evaluamos el rendimiento de SERS de nanopartículas codificadas con MBA producidas a través de nuestro método sintético con MUA con respecto a las mismas etiquetas SERS obtenidas con cobertura completa de MBA (es decir, moléculas de MUA cero nm^{-2} , máxima eficiencia de SERS). La Figura 5C muestra los espectros SERS correspondientes, así como los de las etiquetas SERS análogas sintetizadas mediante métodos con PVP y PEG-tiolado. Hay que destacar que, la funcionalización con MUA da como resultado una pérdida del 42 % con respecto a la eficacia máxima de la SERS, que es mucho menor que las observadas para los métodos de PVP (aproximadamente 97 % de reducción) y PEG tiolado (92 % de reducción).

Conclusiones experimentales de los ejemplos

En resumen, en la presente memoria describimos un protocolo sintético económico y escalable, universal, reproducible independientemente de la marca química y los lotes, de una sola reacción, para la fabricación de nanopartículas codificadas con SERS. Este método se basa en la funcionalización de nanopartículas plasmónicas con una submonocapa de ácido mercaptoundecanoico que proporciona una alta estabilidad coloidal durante el proceso de codificación al tiempo que permite que los marcajes Raman se difundan fácilmente sobre el metal. Además, en una etapa posterior, los grupos carboxílicos del MUA también actúan como sitios funcionales que promueven el crecimiento de la sílice en la cubierta externa de las nanopartículas. Esta estrategia sintética ha demostrado ser aplicable con éxito a todos los códigos Raman probados (31 códigos) y escalable hasta dos litros sin afectar a las propiedades finales de las estructuras codificadas. Por último, la eficiencia de SERS de las nanopartículas codificadas fabricadas de este modo ha demostrado ser de 2 a 140 veces mayor que las etiquetas SERS correspondientes preparadas mediante los métodos comunes basados en polímeros (PVP y PEG tiolado).

REFERENCIAS

[1] a) A. Doerr, Nat Meth 2007, 4, 381; b) H. Fenniri, R. Alvarez-Puebla, Nat. Chem. Biol. 2007, 3, 247.

- [2] R. Wilson, A. R. Cossins, D. G. Spiller, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006, 45, 6104.
- [3] a) Y. Zhao, X. Zhao, J. Hu, M. Xu, W. Zhao, L. Sun, C. Zhu, H. Xu, Z. Gu, *Adv. Mater.* 2009, 21, 569; b) L. Rodriguez-Lorenzo, L. Fabris, R. A. Alvarez-Puebla, *Anal. Chim. Acta* 2012, 745, 10; c) F. Zheng, Y. Cheng, J. Wang, J. Lu, B. Zhang, Y. Zhao, Z. Gu, *Adv. Mater.* 2014, n/a.
- 5 [4] G. Shtengel, J. A. Galbraith, C. G. Galbraith, J. Lippincott-Schwartz, J. M. Gillette, S. Manley, R. Sougrat, C. M. Waterman, P. Kanchanawong, M. W. Davidson, R. D. Fetter, H. F. Hess, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2009, 106, 3125.
- 10 [5] a) K. Braeckmans, S. C. De Smedt, M. Leblans, R. Pauwels, J. Demeester, *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2002, 1, 447; b) K. Braeckmans, S. C. De Smedt, *Nat. Mater.* 2010, 9, 697; c) K. Braeckmans, S. C. De Smedt, C. Roelant, M. Leblans, R. Pauwels, J. Demeester, *Nat. Mater.* 2003, 2, 169; d) K. D. Bake, D. R. Walt, *Ann. Rev. Anal. Chem.* 2008, 1, 515; e) W. E. Doering, M. E. Piotti, M. J. Natan, R. G. Freeman, *Adv. Mater.* 2007, 19, 3100; f) R. G. Freeman, P. A. Raju, S. M. Norton, I. D. Walton, P. C. Smith, L. He, M. J. Natan, M. Y. Sha, S. G. Penn, *Method Mol. Biol.* 2005, 303, 73; g) S. R. Nicewarner-Pena, R. G. Freeman, B. D. Reiss, L. He, D. J. Pena, I. D. Walton, R. Cromer, C. D. Keating, M. J. Natan, *Science* 2001, 294, 137; h) M. Y. Sha, I. D. Walton, S. M. Norton, M. Taylor, M. Yamanaka, M. J. Natan, C. Xu, S. Drmanac, S. Huang, A. Borchering, R. Drmanac, S. G. Penn, *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, 384, 658.
- 15 [6] a) F. Cunin, T. A. Schmedake, J. R. Link, Y. Y. Li, J. Koh, S. N. Bhatia, M. J. Sailor, *Nat Mater* 2002, 1, 39; b) N. H. Finkel, X. Lou, C. Wang, L. He, *Anal. Chem.* 2004, 76, 352 A; c) D. C. Pregibon, M. Toner, P. S. Doyle, *Science* 2007, 315, 1393.
- 20 [7] A. R. Vaino, K. D. Janda, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2000, 97, 7692.
- 25 [8] H. Fenniri, L. Ding, A. E. Ribbe, Y. Zyrianov, *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 8151.
- [9] a) M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos, *Science* 1998, 281, 2013; b) J. Ruez, D. R. Blais, Y. Zhang, R. A. Alvarez-Puebla, J. P. Bravo-Vasquez, J. P. Pezacki, H. Fenniri, *Langmuir* 2007, 23, 6482; c) J. Lee, P. W. Bisso, R. L. Srinivas, J. J. Kim, A. J. Swiston, P. S. Doyle, *Nat. Mater.* 2014, 13, 524.
- 30 [10] M. Sanles-Sobrido, W. Exner, L. Rodriguez-Lorenzo, B. Rodriguez-Gonzalez, M. A. Correa-Duarte, R. A. Alvarez-Puebla, L. M. Liz-Marzan, *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 2699.
- 35 [11] G. Goddard, L. O. Brown, R. Habbersett, C. I. Brady, J. C. Martin, S. W. Graves, J. P. Freyer, S. K. Doorn, *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 6081.
- [12] a) M. Howarth, W. Liu, S. Puthenveetil, Y. Zheng, L. F. Marshall, M. M. Schmidt, K. D. Wittrup, M. G. Bawendi, A. Y. Ting, *Nat. Meth.* 2008, 5, 397; b) X. Qian, X.-H. Peng, D. O. Ansari, Q. Yin-Goen, G. Z. Chen, D. M. Shin, L. Yang, A. N. Young, M. D. Wang, S. Nie, *Nat Biotech* 2008, 26, 83; c) A. Serge, N. Bertaux, H. Rigneault, D. Marguet, *Nat. Meth.* 2008, 5, 687.
- 40 [13] P. Rivera_Gil, C. Vazquez-Vazquez, V. Giannini, M. P. Callao, W. J. Parak, M. A. Correa-Duarte, R. A. Alvarez-Puebla, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 13694.
- 45 [14] a) J. Song, J. Zhou, H. Duan, *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 13458; b) N. Pazos-Perez, C. S. Wagner, J. M. Romo-Herrera, L. M. Liz-Marzán, F. J. Garcia de Abajo, A. Wittemann, A. Fery, R. A. Alvarez-Puebla, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 12688.
- 50 [15] a) A. Guerrero-Martínez, J. Perez-Juste, L. M. Liz-Marzán, *Adv. Mater.* 2010, 22, 1182; b) R. Jiang, B. Li, C. Fang, J. Wang, *Adv. Mater.* 2014, 26, 5274.
- [16] S. Liu, M.-Y. Han, *Chem. Asian J.* 2010, 5, 36.
- 55 [17] a) M. Alba, N. Pazos-Perez, B. Vaz, P. Formentin, M. Tebbe, M. A. Correa-Duarte, P. Granero, J. Ferré-Borrull, R. Alvarez, J. Pallares, A. Fery, A. R. de Lera, L. F. Marsal, R. A. Alvarez-Puebla, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 6459; b) R. A. Alvarez-Puebla, A. Agarwal, P. Manna, B. P. Khanal, P. Aldeanueva-Potel, E. Carbo-Argibay, N. Pazos-Pérez, L. Vigderman, E. R. Zubarev, N. A. Kotov, L. M. Liz-Marzán, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2011, 108, 8157.
- 60 [18] a) X. Su, J. Zhang, L. Sun, T. W. Koo, S. Chan, N. Sundararajan, M. Yamakawa, A. A. Berlin, *Nano Lett.* 2005, 5, 49; b) L. Sun, K.-B. Sung, C. Dentinger, B. Lutz, L. Nguyen, J. Zhang, H. Qin, M. Yamakawa, M. Cao, Y. Lu, A. J. Chmura, J. Zhu, X. Su, A. A. Berlin, S. Chan, B. Knudsen, *Nano Lett.* 2007, 7, 351.
- 65 [19] C. Fernández-López, C. Mateo-Mateo, R. A. Alvarez-Puebla, J. Perez-Juste, I. Pastoriza-Santos, L. M. Liz-Marzán, *Langmuir* 2009, 25, 13894.

- [20] a) P. J. G. Goulet, N. P. W. Pieczonka, R. F. Aroca, *Anal. Chem.* 2003, 75, 1918; b) P. J. G. Goulet, R. F. Aroca, *Anal. Chem.* 2007, 79, 2728.
- 5 [21] H. Hiramatsu, F. E. Osterloh, *Langmuir* 2003, 19, 7003.
- [22] M. A. Bryant, J. E. Pemberton, *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 8284.
- [23] a) L. Guerrini, I. Izquierdo-Lorenzo, J. V. Garcia-Ramos, C. Domingo, S. Sanchez-Cortes, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2009, 11, 7363; b) L. Guerrini, I. Izquierdo-Lorenzo, R. Rodriguez-Oliveros, J. A. Sanchez-Gil, S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, C. Domingo, *Plasmonics* 2010, 5, 273.
- 10 [24] W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, *J. Colloid Interface Sci.* 1968, 26, 62.
- [25] a) A. F. Wallace, J. J. DeYoreo, P. M. Dove, *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 5244; b) T. Chen, G. Chen, S. Xing, T. Wu, H. Chen, *Chem. Mater.* 2010, 22, 3826; c) C. Xue, X. Chen, S. J. Hurst, C. A. Mirkin, *Adv. Mater.* 2007, 19, 4071; d) Y. J. Wong, L. Zhu, W. S. Teo, Y. W. Tan, Y. Yang, C. Wang, H. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 11422; e) M. Rycenga, M. R. Langille, M. L. Personick, T. Ozel, C. A. Mirkin, *Nano Lett.* 2012, 12, 6218.
- 15 [26] L. Rodriguez-Lorenzo, Z. Krpetic, S. Barbosa, R. A. Alvarez-Puebla, L. M. Liz-Marzan, I. A. Prior, M. Brust, *Integ. Biol.* 2011, 3, 922.
- [27] P. Šimáková, J. Gautier, M. Procházka, K. Hervé-Aubert, I. Chourpa, *J. Phys. Chem. C* 2014, 118, 7690.
- 25 [28] X. M. Qian, X. H. Peng, D. O. Ansari, Q. Yin-Goen, G. Z. Chen, D. M. Shin, L. Yang, A. N. Young, M. D. Wang, S. M. Nie, *Nat. Biotechnol.* 2008, 26, 83.
- [29] C. J. Murphy, A. M. Gole, J. W. Stone, P. N. Sisco, A. M. Alkilany, E. C. Goldsmith, S. C. Baxter, *Acc. Chem. Res.* 2008, 41, 1721.
- 30 [30] N. Pazos-Perez, F. J. Garcia de Abajo, A. Fery, R. A. Alvarez-Puebla, *Langmuir* 2012, 28, 8909.

REIVINDICACIONES

1. Un método para sintetizar nanopartículas codificadas con SERS encapsuladas que comprende las siguientes etapas:
- a) proporcionar una suspensión acuosa de nanopartículas metálicas;
 - b) añadir ácido mercaptoundecanoico a la suspensión para producir nanopartículas estabilizadas con MUA sin formar una monocapa completa;
 - c) añadir una molécula con codificación SERS a la suspensión seleccionada de moléculas que tienen un grupo funcional con alta afinidad por las superficies metálicas como tioles, aminas o cianuros; y
 - d) encapsular las nanopartículas codificadas con SERS en una matriz de sílice.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la suspensión de nanopartículas metálicas es una suspensión de nanopartículas de oro, plata, cobre, aluminio, sus aleaciones consigo mismas o sus aleaciones con otros.
3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa b) se lleva a cabo añadiendo rápidamente y con agitación vigorosa una solución que contiene NH_4OH y MUA a la suspensión de nanopartículas metálicas.
4. El método de la reivindicación 1 a 3, en el que la suspensión de nanopartículas metálicas es una suspensión de nanopartículas de oro esféricas cubiertas con citrato que se produce añadiendo una solución acuosa de HAuCl_4 en una solución acuosa en ebullición de citrato de sodio con agitación vigorosa, y luego manteniendo el calentamiento y la agitación a niveles apropiados hasta que el disolvente se evapore al menos parcialmente.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa c) se lleva a cabo añadiendo una solución que contiene EtOH y NH_4OH a la suspensión de nanopartículas estabilizadas con MUA y después añadiendo a la misma una solución que contiene la molécula con codificación SERS seleccionada.
6. El método de la reivindicación 5, en el que la adición de la solución que contiene EtOH y NH_4OH a la suspensión de nanopartículas estabilizadas con MUA se lleva a cabo rápidamente y con agitación vigorosa.
7. El método de las reivindicaciones 5 o 6, en el que la solución que contiene la molécula con codificación SERS se añade a la suspensión de nanopartículas estabilizadas con MUA con fuerte agitación magnética y en un gran exceso de moléculas por nm^2 con respecto a las nanopartículas estabilizadas con MUA.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la molécula con codificación SERS se selecciona del grupo que consiste en: 2-mercaptopiridina; bencenotiol; ácido mercaptobenzoico; 4-nitrobencenotiol; 3,4-diclorobencenotiol, 3-fluorotiofenol; 4-fluorotiofenol; 3-5-bis(trifluorometil)bencenotiol; azul de metileno; azul Nilo A; rodamina 6G; azul de toluidina O, 2-feniletanotiol, 4-mercaptofenol, bifenil-4-tiol, 7-mercapto-4-metilcumarina, 4-hidroxifenil-1H-tetrazol-5-tiol, 2-fluorotiofenol, violeta cristal, 2-naftalenotiol, 4-(((3-mercapto-5-(2-metoxifenil)-4H-1,2,4-triazol-4-il)imino)metil)fenol, (2-trifluorometil)bencenotiol, 4-aminotiofenol, 1-naftalenotiol, 1,1',4,1"-terfenil-4-tiol, bifenil-4,4'-ditiol, ácido tiosalicílico, 4-(((3-mercapto-5-(2-piridinil)-4H-1,2,4-triazol-4-il)imino)metil)-1,2-bencenodiol, ácido 4-(((3-Mercapto-5-(2-piridinil)-4H-1,2,4-triazol-4-il)imino)metil)benzoico, 2,3,4,6-tetrafluorobencenotiol y (5-(4-metoxifenil)-1,3,4-oxidazol-2-tiol).
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la molécula con codificación SERS es 2-mercaptopiridina.
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la encapsulación de las nanopartículas codificadas con SERS en una matriz de sílice se lleva a cabo añadiendo a la dispersión de nanopartículas codificadas con SERS cantidades apropiadas de etanol y NH_4OH para proporcionar una relación molar $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ entre 0,2 y 5, y después añadiendo ortosilicato de tetraetilo para iniciar el crecimiento de la sílice.
11. El método de la reivindicación 10, en el que a continuación la solución se deja reaccionar entre 1 h y 24 h a temperatura ambiente y luego se somete a varios ciclos de lavado.

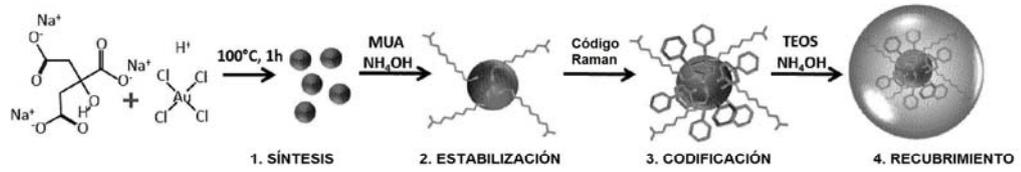


Figura 1

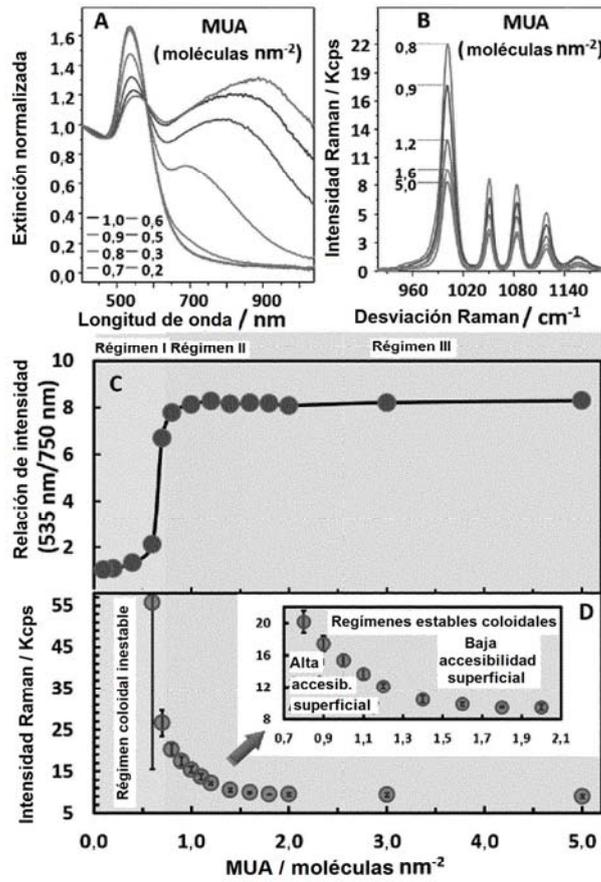


Figura 2

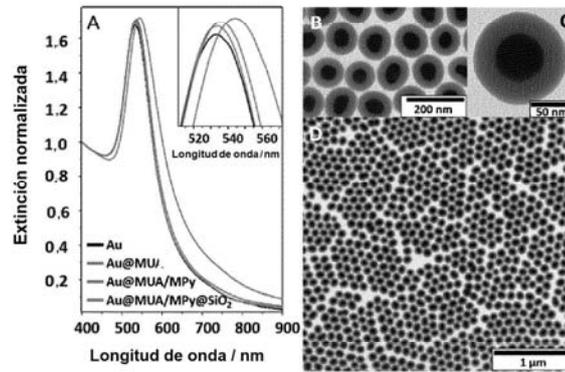


Figura 3

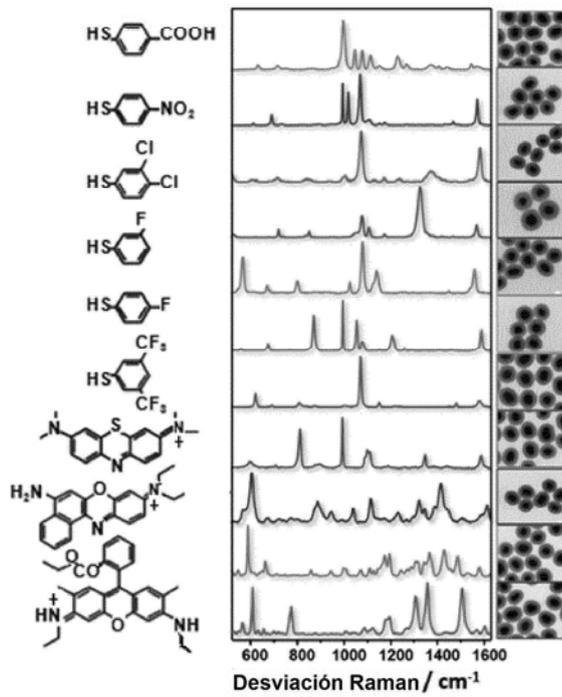


Figura 4

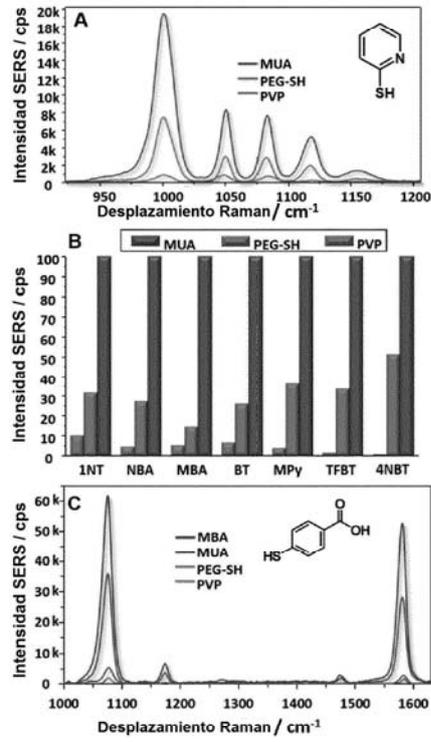


Figura 5

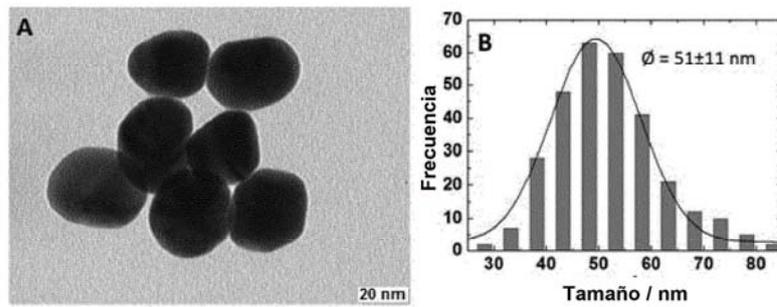


Figura 6

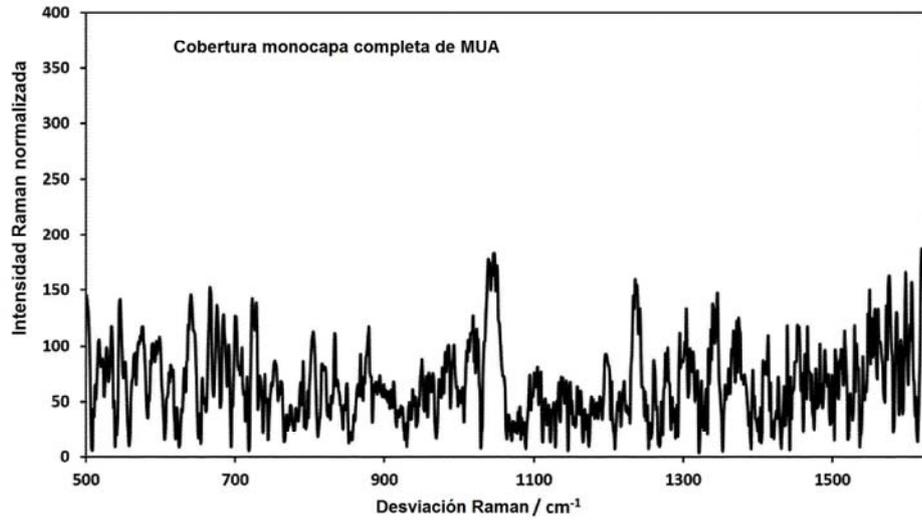


Figura 7

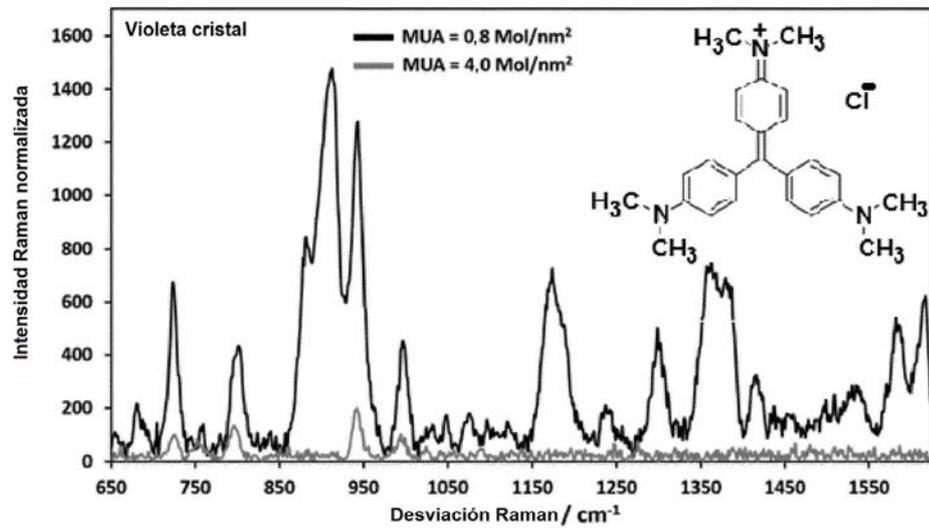


Figura 8

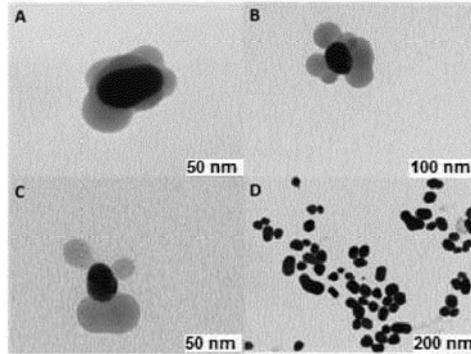


Figura 9

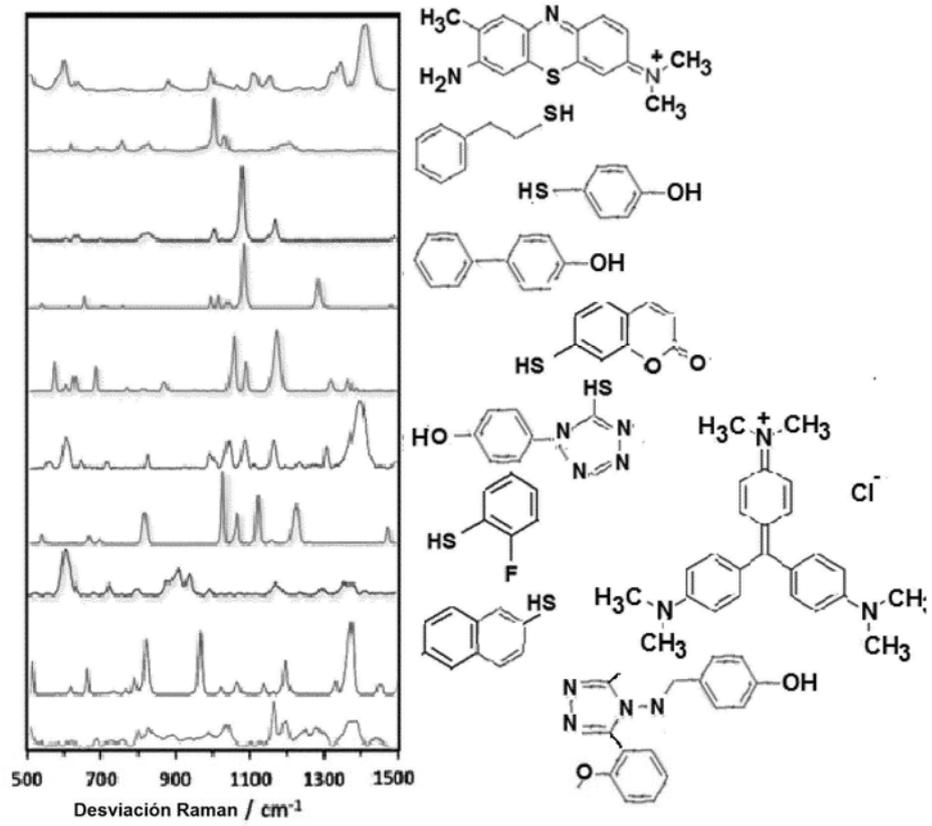


Figura10

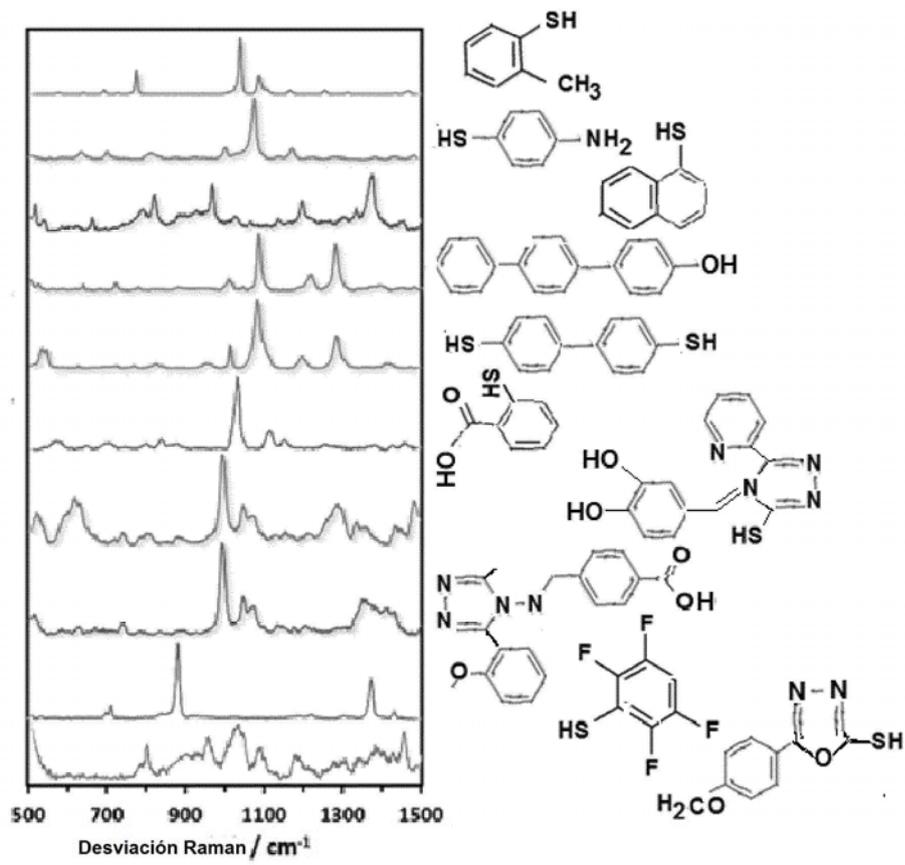


Figura 10 (continuación)

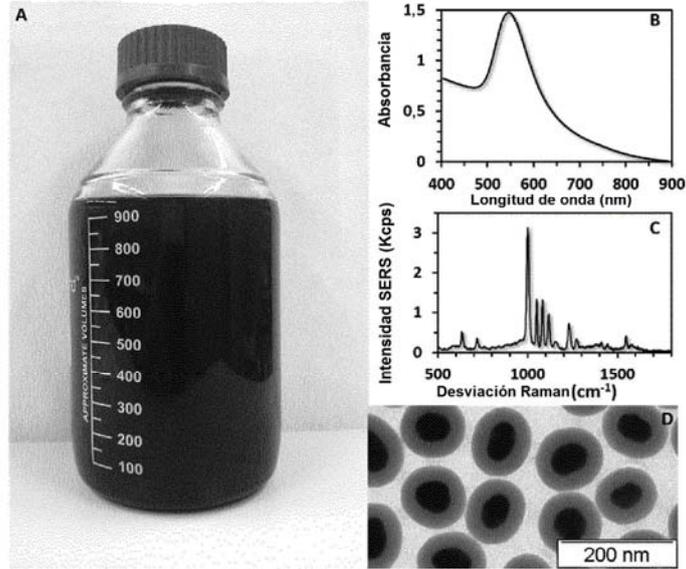


Figura 11

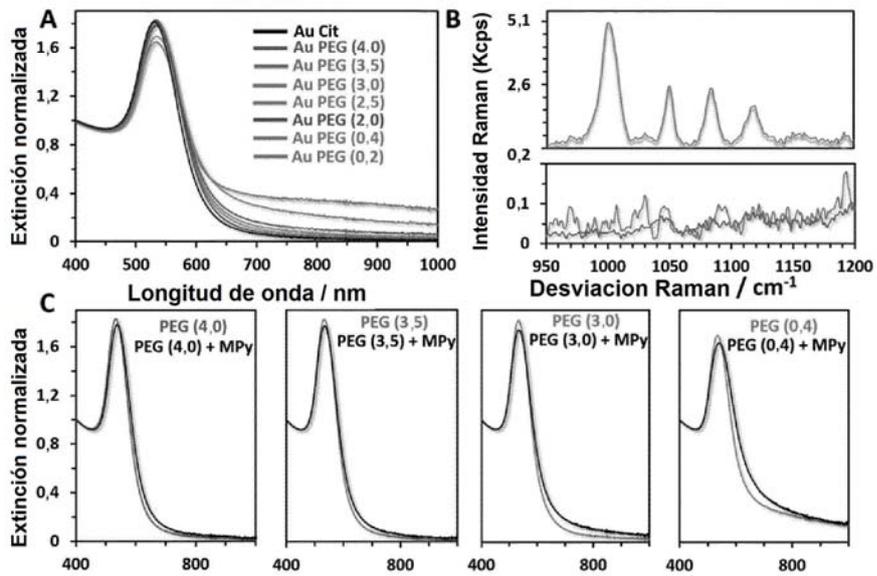


Figura 12

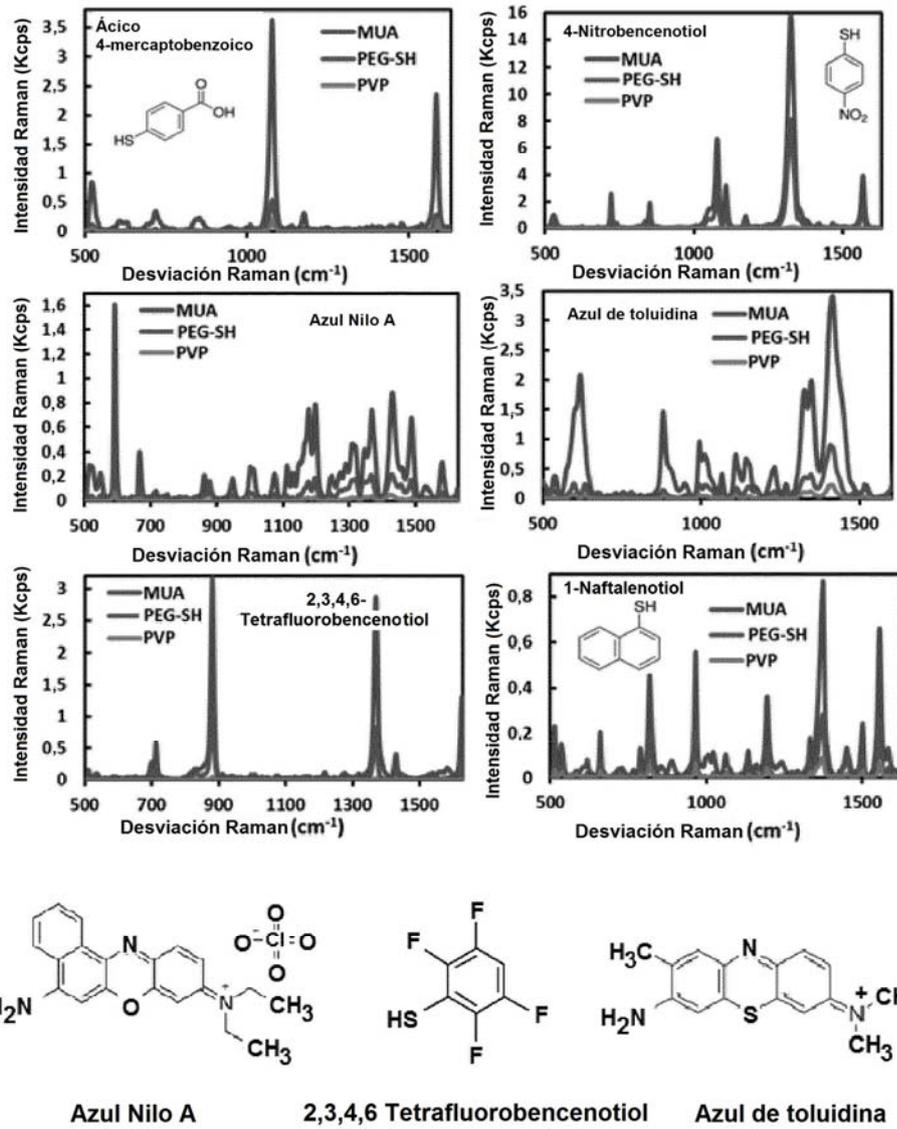


Figura 13