

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 870**

51 Int. Cl.:

<b>C01B 33/18</b>	(2006.01)
<b>B82Y 30/00</b>	(2011.01)
<b>B82Y 40/00</b>	(2011.01)
<b>B82B 3/00</b>	(2006.01)
<b>C09K 11/02</b>	(2006.01)
<b>C09B 67/08</b>	(2006.01)
<b>C09B 69/00</b>	(2006.01)
<b>B01J 13/18</b>	(2006.01)
<b>C09K 11/06</b>	(2006.01)
<b>C09B 69/10</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2010 PCT/US2010/031294**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.10.2010 WO10121064**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2010 E 10765207 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 2419373**

54 Título: **Nanopartículas de sílice fluorescentes mejoradas a través de densificación de sílice**

30 Prioridad:

**15.04.2009 US 169637 P**  
**15.04.2009 US 169609 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.02.2019**

73 Titular/es:

**CORNELL UNIVERSITY (100.0%)**  
**Cornell Center For Technology Enterprise And**  
**Commercialization 395 Pine Tree Road Suite 310**  
**Ithaca, NY 14850, US**

72 Inventor/es:

**WIESNER, ULRICH, B.;**  
**HERZ, ERIK y**  
**OW, HOOISWENG**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 700 870 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**

Nanopartículas de sílice fluorescentes mejoradas a través de densificación de sílice

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en general a nanopartículas de sílice con propiedades mejoradas. Más particularmente, la presente invención se refiere a nanopartículas de sílice de núcleo-envuelta que tienen una envuelta de sílice densa que da como resultado propiedades mejoradas y a métodos de preparación de las mismas.

10

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

No hay productos fotoluminiscentes disponibles actualmente que proporcionen un nivel deseable de rendimiento cuántico y que tengan una composición química adecuada. Hay puntos cuánticos que tienen un alto rendimiento cuántico, pero son tóxicos en muchas aplicaciones biológicas debido a su contenido en metales pesados, incluso cuando están encapsulados en sílice.

15

## BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

20

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para producir nanopartículas de sílice de núcleo-envuelta con propiedades mejoradas tal como se definen en las reivindicaciones. Un núcleo se produce combinando un precursor de sílice o precursores de sílice y un precursor de sílice o precursores de sílice unidos covalentemente a un material que absorbe luz y/o material que emite luz (por ejemplo, materiales fluorescentes o fosforescentes) (precursor(es) de sílice funcionalizado(s)) en condiciones de hidrolización dando como resultado la formación de un núcleo de sílice. El material que absorbe luz y/o material que emite luz está unido covalentemente a la red de sílice del núcleo. Una envuelta que encapsula el núcleo se forma añadiendo precursor o precursores de sílice a una temperatura de al menos 50°C, en condiciones tales que no se observa formación de nuevas nanopartículas de sílice. En una realización, las nanopartículas de sílice de núcleo-envuelta presenta una densidad de al menos 1,4 g/cm<sup>3</sup>. En otra realización, el precursor de sílice es TEOS y/o TMOS.

25

30

En una realización, durante la formación de la envuelta de sílice los precursores de sílice se añaden en forma de al menos 10 alícuotas en serie de precursor de sílice a una temperatura de al menos 50°C a lo largo de un periodo de al menos 1 hora, en el que el tiempo entre adiciones de alícuotas consecutivas es de al menos 6 minutos.

35

En una realización, el núcleo de sílice tiene un diámetro de desde 1 hasta 300 nanómetros. En otra realización, la envuelta de sílice tiene un diámetro de desde 1 hasta 300 nanómetros. En otra realización, la nanopartícula de sílice de núcleo-envuelta tiene un diámetro de desde 1,1 hasta 1000 nanómetros.

40

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir nanopartículas de sílice de núcleo-envuelta con propiedades mejoradas. Un núcleo se produce combinando un precursor de sílice o precursores de sílice y precursor de sílice o precursores de sílice unidos covalentemente a un material que absorbe luz y/o material que emite luz (por ejemplo, materiales fluorescentes o fosforescentes) (precursor(es) de sílice funcionalizado(s)) en condiciones de hidrolización dando como resultado la formación de un núcleo de sílice. El material que absorbe luz y/o material que emite luz está unido covalentemente a la red de sílice del núcleo. La envuelta de sílice que encapsula el núcleo de sílice se forma añadiendo precursor o precursores de sílice a temperaturas por debajo de 50°C, en condiciones tales que no se observa formación de nuevas nanopartículas de sílice. Las nanopartículas de núcleo-envuelta se exponen entonces a una temperatura de 50 a 100°C a lo largo de un periodo de al menos 12 horas y/o a una presión de al menos 1,1 atmósferas. Las nanopartículas de sílice de núcleo-envuelta así tratadas presentan una densidad de al menos 1,4 g/cm<sup>3</sup>.

45

50

En una realización, durante la formación de la envuelta, los precursores se añaden en forma de alícuotas en serie a una temperatura de desde 20 hasta 23°C, en la que el tiempo entre la adición de alícuotas en serie consecutivas es de al menos 15 minutos. En una realización, las alícuotas en serie se añaden a lo largo de un periodo de al menos seis horas. En una realización, el número de alícuotas en serie es de al menos 23.

55

En una realización, la presente invención proporciona nanopartículas de sílice de núcleo-envuelta preparadas según los métodos dados a conocer en el presente documento.

60

En otro aspecto, la presente invención proporciona nanopartículas de núcleo-envuelta tal como se definen en las reivindicaciones que tienen un núcleo de sílice y un material que emite luz (por ejemplo, un material fluorescente o fosforescente) y/o un material que absorbe luz, en las que el material que emite luz y/o material que absorbe luz está unido covalentemente a la red de sílice del núcleo. La dimensión más larga del núcleo es de desde 5 hasta 500 nm. La envuelta comprende sílice. La dimensión más larga de la nanopartícula de núcleo-envuelta es de desde 5 hasta 500 nm. La densidad de la nanopartícula de núcleo-envuelta es de al menos 1,4 g/cm<sup>3</sup>.

65

En una realización, la densidad de la nanopartícula de núcleo-envuelta puede ser de desde 1,4 hasta 2,1 g/cm<sup>3</sup>. En otra realización, el material de luz puede ser un colorante fluorescente (por ejemplo, ADS832WS e isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC)) o un nanocrystal semiconductor.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Una imagen SEM de nanopartículas de núcleo de ADS832WS, izquierda; partículas de envuelta normal, centro; y partículas de envuelta densificada, derecha.

10 Figura 2. Representación gráfica de diámetros hidrodinámicos de partículas de ADS832WS de núcleo, de envuelta y de envuelta densificada obtenidos por medio de dispersión de luz dinámica.

Figura 3. Representación gráfica del tiempo frente a la razón de absorción del pico de 836 a 760 nm para núcleos, partículas de envuelta normal y de envuelta densificada.

15 Figura 4. Espectros de absorción de partículas de núcleo de ADS832WS en agua y mezclas de agua y disolvente de etanol.

20 Figura 5. Un ejemplo de un gráfico que puede usarse para calcular la conversión de la razón entre los picos a 836 nm y 760 nm con respecto al porcentaje de agua con el que están rodeados los colorantes dentro de las partículas.

Figura 6. Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia frente a la longitud de onda para colorante TRITC libre, núcleos, partículas de envuelta normal y partículas de envuelta densificada.

25 Figura 7. Un ejemplo de cálculo de la densidad de una nanopartícula de núcleo-envuelta.

Figura 8. Una representación esquemática de una realización alternativa de las nanopartículas de núcleo-envuelta.

30 Figura 9: Un gráfico de la razón de pico frente al tiempo para nanopartículas de sílice normales, densificadas y densificadas a presión que contienen ADS832WS.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

35 La presente invención proporciona nanopartículas de sílice de núcleo-envuelta y un método de preparación de las mismas. Las nanopartículas de núcleo-envuelta de la presente invención comprenden un núcleo y una envuelta. El núcleo comprende sílice y un material que absorbe luz y/o fotoluminiscente (que emite luz).

40 Algunas características únicas de la presente invención incluyen, pero no se limitan a: i.) las nanopartículas de núcleo-envuelta pueden prepararse con una envuelta densificada mediante la aplicación de calor a la reacción o bien durante la síntesis inicial o bien tras la síntesis inicial; ii.) las nanopartículas de núcleo-envuelta o bien pueden estar formadas en su totalidad a temperaturas por encima de la temperatura ambiente, los núcleos pueden estar formados a temperaturas elevadas o las envueltas pueden estar formadas a temperaturas elevadas; iii.) las nanopartículas de sílice o partes (por ejemplo, núcleo y envuelta) de las mismas tienen una alta densidad y baja porosidad, y, por tanto, se espera que el paso de disolventes a través de la matriz de sílice y los poros en la misma disminuya, lo que a su vez da como resultado propiedades fotofísicas potenciadas, incluyendo el brillo de la fluorescencia de partículas; y iv.) las nanopartículas de núcleo-envuelta pueden incorporar moléculas o materiales inorgánicos que absorben luz, fluorescen, fosforescen o una combinación de los mismos.

50 El núcleo de la nanopartícula de núcleo-envuelta comprende sílice y un material fotoluminiscente (que emite luz) y/o un material que absorbe luz. En una realización, el núcleo se sintetiza independientemente usando química de sol-gel conocida, por ejemplo, mediante la hidrólisis de un precursor o precursores de sílice. Los precursores de sílice están presentes como mezcla de un precursor de sílice y un precursor de sílice conjugado, por ejemplo, unido mediante un enlace covalente, a un material que absorbe luz y/o fotoluminiscente (que emite luz) (denominado en el presente documento "precursor de sílice conjugado"). La hidrólisis puede llevarse a cabo en condiciones alcalinas (básicas) o ácidas. Por ejemplo, la hidrólisis puede llevarse a cabo mediante la adición de hidróxido de amonio a la mezcla que comprende precursor de sílice y precursor de sílice conjugado.

60 Los precursores de sílice son compuestos que en condiciones de hidrólisis pueden formar sílice. Los ejemplos de precursores de sílice incluyen, pero no se limitan a, organosilanos tales como, por ejemplo, tetraetoxisilano (TEOS), tetrametoxisilano (TMOS) y similares.

65 El precursor de sílice usado para formar el precursor de sílice conjugado tiene un grupo o grupos funcionales que pueden reaccionar con el material absorbente y/o fotoluminiscente (que emite luz) para formar un enlace o enlaces covalentes, véase por ejemplo la solicitud de patente estadounidense n.º 10/536.569 o Choi *et al.* JOURNAL OF BIOMEDICAL OPTICS 12(6), 064007 o van Blaaderen *et al.* LANGMUIR, 1992, 8, 2921-2931. Los ejemplos de tales

precursores de sílice incluyen, pero no se limitan a, isocianatopropiltrióxosilano (ICPTS), aminopropiltrimetoxisilano (APTS), mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTS), y similares.

5 En una realización, un organosilano (precursor de sílice conjugado) usado para formar el núcleo tiene la fórmula  
 10 general  $R_{(4-n)}SiX_n$ , en la que X es un grupo hidrolizable tal como etoxi, metoxi o 2-metoxi-etoxi; R puede ser un grupo  
 orgánico monovalente de desde 1 hasta 12 átomos de carbono que puede contener opcionalmente un grupo  
 orgánico funcional tal como, por ejemplo, mercapto, epoxi, acrililo, metacrililo y amino y similares; y n es un número  
 15 entero de desde 0 hasta 4. El precursor de sílice conjugado a un compuesto fluorescente se condensa  
 conjuntamente con precursores de sílice tales como, por ejemplo, TEOS y TMOS, para formar el núcleo  
 fluorescente. Un silano usado para formar la envuelta de sílice tiene n igual a 4. También se conoce el uso de mono-  
 , bis- y tris-alcoxisilanos funcionales para el acoplamiento y la modificación de grupos funcionales correactivos o  
 superficies hidroxifuncionales, incluyendo superficies de vidrio, véase Kirk-Othmer, Encyclopedia of Chemical  
 Technology, vol. 20, 3ª Ed., J. Wiley, N.Y. Aunque sin querer restringirse a ninguna teoría particular, se considera  
 20 que el acoplamiento surge como resultado de la hidrólisis de los grupos alcoxisilano a grupos silano y como  
 resultado de la condensación con grupos hidroxilo de la superficie, véase E. Pluedemann, Silane Coupling Agents,  
 Plenum Press, N.Y. 1982. Procesos para sintetizar nanopartículas de núcleo-envuelta usando procesos de Stoeber  
 modificados pueden encontrarse en las solicitudes de patente estadounidense n.ºs 10/306.614 y 10/536.569.

20 El material que absorbe luz o que emite luz puede ser materiales orgánicos, materiales inorgánicos, o una  
 combinación de los mismos. Los materiales que absorben luz son, por ejemplo, colorantes o pigmentos  
 absorbentes orgánicos. Los materiales que emiten luz son, por ejemplo, fluoróforos/colorantes orgánicos o  
 nanocristales semiconductores.

25 Los ejemplos de materiales fotoluminiscentes incluyen, pero no se limitan a, materiales fluorescentes y  
 fosforescentes. Las nanopartículas pueden incorporar materiales que responden de manera fluorescente y/o  
 fosforescentes conocidos tales como, por ejemplo, colorantes, pigmentos, o combinaciones de los mismos. Se  
 conocen una amplia variedad de colorantes fluorescentes que reaccionan químicamente adecuados, véase por  
 ejemplo MOLECULAR PROBES HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS, 6ª  
 30 ed., R. P. Haugland, ed. (1996). Un fluoróforo típico es, por ejemplo, un compuesto aromático o heteroaromático  
 fluorescente tal como es un pireno, un antraceno, un naftaleno, una acridina, un estilbeno, un indol o bencindol, un  
 oxazol o benzoxazol, un tiazol o benzotiazol, un 4-amino-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD), una cianina, una  
 carbocianina, un carboestirilo, una porfirina, un salicilato, un antranilato, un azuleno, un perileno, una piridina, una  
 quinolina, una cumarina (incluyendo hidroxicumarinas y aminocumarinas y derivados fluorados de las mismas), y  
 35 compuestos similares, véanse por ejemplo las patentes estadounidenses n.ºs 5.830.912; 4.774.339; 5.187.288;  
 5.248.782; 5.274.113; 5.433.896; 4.810.636; y 4.812.409. Pueden usarse materiales fluorescentes con emisión en el  
 intervalo de, por ejemplo, 300 a 900 nm.

40 La razón de sílice con respecto a materiales que emiten luz y/o que absorben luz está en el intervalo de 1:50 a  
 1:2000 (razón en masa de material con respecto a sílice tal como se determina mediante la masa total de colorante y  
 la masa total de partículas tras la reacción que forma las nanopartículas), incluyendo todas las razones entremedias.  
 Algunas razones representativas incluyen 1:100, 1:200, 1:300, 1:400, 1:500, 1:1000 y 1:1500.

45 El diámetro de la nanopartícula de núcleo-envuelta puede ser, por ejemplo, de desde aproximadamente 1 hasta  
 aproximadamente 1.000 nanómetros, incluyendo todos los números enteros e intervalos de desde 1 hasta 1.000. En  
 diversas realizaciones, el diámetro de las nanopartículas de núcleo-envuelta es de 1 a 100 nm, de 1 a 50 nm y de 1  
 a 10 nm. En diversas realizaciones el diámetro del núcleo puede ser, por ejemplo, de desde aproximadamente 1  
 hasta aproximadamente 300 nanómetros, incluyendo todos los números enteros e intervalos entre 1 y 300, y desde  
 50 aproximadamente 2 hasta aproximadamente 200 nanómetros; y, el grosor de la envuelta de sílice puede ser, por  
 ejemplo, de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 300 nanómetros, incluyendo todos los números  
 enteros e intervalos entre 1 y 300, y de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 nanómetros. El grosor o  
 diámetro del núcleo con respecto al grosor de la envuelta de sílice puede estar en una razón de, por ejemplo, desde  
 aproximadamente 1:0,1 hasta aproximadamente 1:100.

55 La envuelta es un recubrimiento de sílice denso sobre el núcleo que puede cubrir, por ejemplo, desde  
 aproximadamente el 10 hasta aproximadamente el 100 por cien, incluyendo todos los números enteros entremedias,  
 del área superficial del núcleo. En una realización, la envuelta encapsula el núcleo. En una realización, la envuelta  
 se produce mediante la repetida adición e hidrólisis (en etapas diferenciadas) de precursor o precursores de sílice,  
 de modo que se forma sílice sobre el núcleo y se minimiza o se inhibe completamente la nucleación de nuevas  
 60 nanopartículas de sílice. Los ejemplos de precursores de envuelta de sílice incluyen, pero no se limitan a, los  
 descritos anteriormente para la formación del núcleo.

65 La envuelta de sílice tiene una densidad de al menos  $1,4 \text{ g/cm}^3$ . En realizaciones, la envuelta de sílice tiene una  
 densidad de desde  $1,4$  hasta  $2,1 \text{ g/cm}^3$ , incluyendo todos los valores a  $0,1$  entre  $1,4$  y  $2,1$ . Sin pretender restringirse  
 a ninguna teoría particular, se espera que la densidad aumentada de la envuelta de sílice dé como resultado una  
 mayor estabilidad de y una emisión de luz/absorción de luz aumentadas desde las nanopartículas de núcleo-  
 envuelta.

En una realización, las nanopartículas de núcleo-envuelta de la presente invención presentan absorción y/o emisión de radiación electromagnética que tiene una longitud de onda en el intervalo de 300 a 900 nm, incluyendo todos los números enteros e intervalos entremedias.

5 En una realización, las nanopartículas de núcleo-envuelta de la presente invención presentan una mejora en el brillo de emisión de al menos el 10%. En diversas realizaciones, la mejora de brillo es de desde el 5% hasta el 50%, incluyendo todos los números enteros entremedias.

10 En una realización, las nanopartículas de núcleo-envuelta presentan una fotoestabilidad aumentada. Sin pretender restringirse a ninguna teoría particular, se espera que la fotoestabilidad aumentada resulte de una disminución en la difusión de especies químicas a través de la envuelta de la nanopartícula debido al menos en parte a la densidad aumentada de la envuelta. En una realización, la fotoestabilidad está aumentada en al menos el 10%. En diversas realizaciones, la mejora de la fotoestabilidad es de desde el 5% hasta el 50%, incluyendo todos los números enteros entremedias.

15 Por brillo y fotoestabilidad aumentados quiere decirse que el brillo y/o la fotoestabilidad de las nanopartículas de núcleo-envuelta está aumentado en relación con las partículas de sustancialmente la misma composición preparadas mediante medios convencionales, tales como, por ejemplo, los descritos en la solicitud de patente estadounidense n.º 11/119.969 (partículas que se denominan puntos de Cornell).

20 La presente invención proporciona un método para producir nanopartículas de sílice de núcleo-envuelta con envueltas de sílice densas. En una realización, las etapas del método incluyen: a.) preparar un núcleo de sílice combinando un precursor de sílice o precursores de sílice y un material que emite luz, siendo el material fluorescente, fosforescente, y/o material que absorbe luz unidos covalentemente a un precursor de sílice o precursores de sílice modificados orgánicamente en condiciones tales que los precursores de sílice se hidrolizan dando como resultado la formación de un núcleo de sílice, y b.) formar una envuelta de sílice añadiendo secuencialmente alícuotas de precursor de sílice a temperatura elevada e hidrolizando el precursor de sílice. El material que absorbe luz, el material que emite luz y/o el material que refleja luz están unidos covalentemente a la red de sílice que comprende el núcleo. Por ejemplo, al menos 10 alícuotas en serie de precursor de sílice a una temperatura de al menos 50°C se añaden secuencialmente a los núcleos a lo largo de un periodo de entre 1 y 24 horas, y el tiempo entre adiciones de las alícuotas es de al menos 6 minutos. Las nanopartículas de sílice de núcleo-envuelta presentan un brillo y una estabilidad mejoradas en relación con las partículas conocidas en la técnica.

35 En una realización, los núcleos se preparan mediante la hidrólisis de la sílice y el/los precursor(es) de sílice conjugado(s) a las temperaturas descritas anteriormente para la formación de la envuelta de sílice, dando como resultado una densidad mejorada del núcleo.

40 En otra realización, las etapas del método incluyen: a.) preparar un núcleo de sílice combinando un precursor de sílice o precursores de sílice y un material que emite luz, siendo el material fluorescente, fosforescente, y/o material que absorbe luz unidos covalentemente a un precursor de sílice o precursores de sílice modificados orgánicamente en condiciones tales que los precursores de sílice se hidrolizan dando como resultado la formación de un núcleo de sílice, estando el material que emite luz y/o material que refleja luz secuestrado dentro de la sílice; b) formar una envuelta de sílice que encapsula el núcleo de sílice añadiendo secuencialmente alícuotas de precursor de sílice a temperatura ambiente e hidrolizando el precursor de sílice para formar una capa de sílice. El material que absorbe luz y/o material que emite luz está secuestrado dentro del núcleo. Las nanopartículas de sílice de núcleo-envuelta se someten entonces a condiciones (tal como, por ejemplo, temperatura y/o presión aumentadas) que dan como resultado un aumento en la densidad del núcleo de sílice y/o de la envuelta de sílice.

50 Los expertos habituales en la técnica entenderán que la cantidad de precursor(es) de sílice por alícuota depende de la escala de la reacción.

La temperatura a la que se forma la envuelta está, al menos en parte, limitada por el/los disolvente(s) usados para llevar a cabo la reacción. Usando un sistema de disolventes que comprende disolvente(s) con altos puntos de ebullición, tales como, por ejemplo, hasta 100°C, se espera que puedan formarse envueltas y/o núcleos con densidad aumentada (por ejemplo, aproximándose a 2 g/cc). En una realización, la temperatura de adición/hidrólisis es de 50°C a 100°C, incluyendo todos los números enteros e intervalos entremedias. Los expertos habituales en la técnica entenderán que la temperatura de adición/hidrólisis está limitada por el disolvente usado en la reacción y, por tanto, el punto de ebullición del disolvente dicta el límite superior para la temperatura de adición/hidrólisis. Si se usan disolventes con puntos de ebullición suficientemente altos en la reacción, la temperatura de adición/hidrólisis puede ser mayor y se espera que las nanopartículas de núcleo-envuelta resultantes presenten propiedades mejoradas (por ejemplo, brillo y/o densidad).

65 El intervalo de tiempo entre las etapas de adición/hidrólisis y/o temperatura de adición/hidrólisis se elige de tal manera que se minimice o elimine la nueva nucleación de nanopartículas de sílice puras. Es deseable que no se observe nucleación de nanopartículas de sílice puras.

Por ejemplo, al menos 23 alícuotas de precursor de sílice a una temperatura de 20 a 23°C (es decir, temperatura ambiente) se añaden secuencialmente a los núcleos a lo largo de un periodo de al menos 6 horas, y el tiempo entre adiciones de las alícuotas es de al menos 15 minutos. Las nanopartículas de sílice de núcleo-envuelta se someten entonces a una temperatura de 50°C a 100°C a lo largo de un periodo de al menos 12 horas y/o una presión de 1,1 o atmósferas superiores. Se espera que, usando suficiente presión, el sol-gel de sílice puede colapsar sobre sí mismo, creando así un núcleo y/o una envuelta con una densidad muy alta. La densidad de la envuelta de sílice tras exposición a la temperatura y/o presión aumentadas es de al menos 0,9 g/cm<sup>3</sup>.

En otra realización, una disminución en la tasa de difusión de agua u otras moléculas a través de la sílice (por ejemplo, sílice formada usando química de sol-gel) que constituye la matriz de las nanopartículas puede conseguirse mediante métodos tales como, por ejemplo, aumentando la presión de reacción o un aumento postreacción en la temperatura y/o presión que promueve una formación de enlaces adicional dentro de la sílice y/o hibridando por calor las nanopartículas por medio de pulsos de láser de alta energía. Las partículas se comportan como las partículas de envuelta densificada do (véase la Figura 9, envuelta densificada 2º método), de modo que se esperaría que haya habido una disminución en la tasa de difusión de agua a través de la envuelta para conseguir tal comportamiento. En aún otra realización, una disminución en la tasa de difusión de agua u otras moléculas a través de la sílice que constituye la matriz de las partículas puede conseguirse mediante la incorporación de una capa hidrófoba o incompatible con el disolvente o repelente dentro o sobre la nanopartícula de sílice de núcleo-envuelta. Un ejemplo de esta realización se muestra en la Figura 8.

La presente invención proporciona, en una realización, nanopartículas de núcleo-envuelta de sílice fluorescentes que tienen una vida útil más larga y mejores propiedades fotofísicas, incluyendo, por ejemplo, estabilidad y brillo. Ambos de estos aspectos son deseables para muchas aplicaciones en las que la fotoestabilidad a lo largo de un periodo de tiempo más largo es importante.

Adicionalmente, la capacidad para adaptar la densidad de la envuelta de sílice o controlar de otro modo la difusión de moléculas a los colorantes hace que esta invención sea importante en aplicaciones de las nanopartículas de sílice de núcleo-envuelta que absorben luz y/o que emiten luz y/o que reflejan luz para la detección. Por ejemplo, las nanopartículas de núcleo-envuelta de la presente invención (por ejemplo, nanopartículas de núcleo-envuelta absorbedoras que contienen colorante ADS832WS) pueden usarse en una aplicación de sensor, tal como, por ejemplo, en aplicaciones de detección de agua o de humedad. Aplicaciones de sensor de nanopartículas de núcleo-envuelta se dan a conocer en la solicitud de patente estadounidense 11/119.969, incorporándose la divulgación de tales aplicaciones de sensor al presente documento mediante referencia.

Por ejemplo, cuando el colorante ADS832WS está en etanol su espectro de absorción tiene un fuerte pico a ~836 nm, tal como se muestra en la Figura 4. Cuando está en agua, su espectro de absorción se desplaza a ~760 nm, tal como se muestra en la Figura 4. Los cambios en el espectro son continuos por todo el rango de etanol a agua (las partículas se producen en una disolución de mayoría de etanol y, por tanto, probablemente capturan algo de etanol dentro de la estructura de las partículas a medida que están formándose) y así pueden usarse para calibrar las partículas en cuanto a su contenido en agua. Si las partículas se usan a la inversa, es decir, ya contienen agua y se ponen en un sistema rico en etanol o metanol, también pueden comportarse como un sensor de alcohol.

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar la presente invención. No pretenden ser limitativos de ninguna manera.

#### EJEMPLO 1

Síntesis/Caracterización de nanopartículas de núcleo-envuelta que contienen ADS832WS, materiales y métodos

**Materiales.** Para la síntesis de las nanopartículas de núcleo-envuelta se usaron los siguientes reactivos: etanol de Pharmo-AAPER, tetraetoxisilano (TEOS) de Fluka, hidróxido de amonio (NHOH al 28% en disolución acuosa) de Fisher Scientific, polvo de colorante ADS832WS de American Dye Source, dimetilsulfóxido (DMSO) de Sigma Aldrich y 3-isocianatopropiltriethoxisilano (ICPTS) de Gelest.

#### Síntesis de partículas

*I. Preparación del colorante.* El colorante ADS832WS se obtiene en forma en polvo debido a la facilidad de manipulación y almacenamiento. El polvo de colorante es disuelve usando DMSO para formar una disolución de colorante 4,5 mM.

*II. Conjugación del colorante.* Las moléculas de colorante disueltas se conjugan con un precursor de sílice. En esta reacción, se mezcla ICPTS con la disolución de colorante en una razón en masa de precursor con respecto a colorante de 50:1.

*III. Síntesis del núcleo.* En primer lugar, se añaden 15,58 M de etanol a un matraz y se agita. Entonces, se añaden  $1,66 \times 10^{-5}$  M de disolución de colorante ADS832WS conjugada a la mezcla, seguido por  $2,93 \times 10^{-4}$  M de  $\text{NH}_4\text{OH}$  y  $1,98 \times 10^{-4}$  M de TEOS. La mezcla resultante se agita durante 12 horas.

5 *IV. Adición de la envuelta.* La disolución que contiene los núcleos se divide en dos muestras más pequeñas de igual volumen. Para una muestra, se sintetiza una envuelta “normal” añadiendo  $5,14 \times 10^{-5}$  M de TEOS en 41 incrementos iguales a intervalos de 15 minutos a temperatura ambiente, usando un dispensador automático Eppendorf. Para la otra muestra, se sintetiza una envuelta “densificada” añadiendo  $7,65 \times 10^{-5}$  M de TEOS en 61 incrementos iguales a intervalos de 15 minutos en un baño de aceite de silicona fijado a  $50^\circ\text{C}$ .

10 Lo siguiente es un ejemplo de una reacción de síntesis de 100 ml. El polvo de colorante ADS832WS se disuelve en primer lugar mezclando 0,01882 g de polvo con 4,463 ml de DMSO. A partir de esta disolución de colorante, 400  $\mu\text{l}$  de disolución se conjugan con 22,5  $\mu\text{L}$  de ICPTS y se agita la mezcla durante 24 horas. Los núcleos se sintetizan mezclando 91,0 ml de etanol, 369  $\mu\text{L}$  de disolución de colorante conjugada, 4,082 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  acuoso y 4,425 ml de TEOS. La mezcla resultante se agita durante 12 horas.

15 La reacción de 100 ml se divide en dos muestras de 50 ml. Para una de las muestras, se sintetiza la envuelta normal añadiendo 574  $\mu\text{L}$  de TEOS en 41 incrementos de 14  $\mu\text{L}$  a intervalos de 15 min a temperatura ambiente. Para la otra muestra, se sintetiza la envuelta densificada añadiendo 854  $\mu\text{L}$  de TEOS en 61 incrementos de 14  $\mu\text{L}$  a intervalos de 20 15 min en un baño de aceite de silicona fijado a  $50^\circ\text{C}$ .

**Evaluación de las partículas físicas.** Se realizaron microscopía electrónica de barrido (SEM) y dispersión de luz dinámica para determinar el tamaño de partícula y la distribución de tamaño. La microscopía electrónica de barrido se realizó en un LEO 1550 FE-SEM con 1,0 kV de voltaje de aceleración para minimizar la degradación de la muestra durante la obtención de imágenes. Se dispersaron muestras dializadas diluidas en etanol (para promover el secado rápido) sobre una pieza de oblea de silicio y se permitió que secaran, entonces se secaron a vacío durante al menos 1 hora antes de la obtención de imágenes. Se diluyeron las partículas dializadas al menos 1:10 con etanol para mediciones de dispersión de luz dinámica en un instrumento Malvern Zetasizer Nano-ZS. Las imágenes SEM en la Figura 1 indican los tamaños de partícula y la dispersidad de partícula estrecha de una serie de núcleo, 25 partícula de envuelta normal y de envuelta densificada. El gráfico de porcentaje en número medio de la dispersión de luz dinámica en la Figura 2 indica los tamaños de núcleo, partícula de envuelta normal y envuelta densificada. Obsérvese que las partículas de envuelta normal y densificada se construyeron sobre los mismos núcleos que los mostrados, indicando que, para este ejemplo, el grosor de envuelta era de entre 3 y 7 nm (cuando se toman junto los datos de SEM y dispersión de luz dinámica data).

35 **Mediciones de absorción.** Con el fin de cuantificar el efecto de la densificación de la envuelta sobre las propiedades fotofísicas de las partículas, se hicieron y se analizaron mediciones de absorción y fluorescencia. Para la absorción de las partículas en agua, se centrifuga 1 ml de muestra de partícula en una centrifuga Eppendorf 5415R a 13.200 rpm durante 10 minutos para concentrar las partículas en un sedimento. El sobrenadante se retira y se reemplaza por 1 ml de agua. La muestra se sonica entonces con un sonicador de sonda Sonics VibraCell durante 40 30 segundos para resuspender las partículas en agua. Esta disolución se mide entonces para determinar la absorción usando un espectrofotómetro Cary 5000 UV-Vis-NIR de Varian a intervalos de tiempo prefijados (intervalos de 2 minutos durante los primeros 20 minutos e intervalos de 20 minutos durante 12 horas).

45 **Mediciones de fluorescencia.** Se llevaron a cabo mediciones de fluorescencia en un nuevo conjunto de núcleos y partículas que encapsulan el colorante fluorescente isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC). Los núcleos y las partículas se sintetizan usando el mismo método que se mencionó anteriormente, incluyendo la adición de envueltas normales y densificadas. En este caso, el colorante se conjuga usando 3-aminopropiltrióxido de silano. Los conjuntos de partículas, junto con una muestra de colorante TRITC libre, se hacen coincidir para la absorción a la misma densidad 50 óptica para comparar exactamente su intensidad de fluorescencia. Estos conjuntos de partículas que se han hecho coincidir para la absorción y el colorante libre se excitan entonces con una lámpara de arco de xenón, longitud de onda seleccionada con una red de difracción para 550 nm y se tomó un espectro de fluorescencia de cada conjunto con un espectrofluorómetro Photon Technology International.

55 **Análisis de los datos.** Cada conjunto de los datos de absorción recogidos se corrige para el fondo de dispersión usando MATLAB ajustando cada fondo de dispersión con una suma de dos funciones de descomposición exponenciales (lo que da como resultado coeficientes de correlación de  $R > 0,99$ , y en comparación con una exponencial extendida no produce resultados estadísticamente diferentes). Para cada conjunto de datos se calcula una razón de la densidad óptica del pico primario a 836 nm y el pico secundario a 760 nm. Las razones se 60 representan gráficamente frente al tiempo que las partículas están expuestas a agua.

Los datos de fluorescencia obtenidos se representan gráficamente frente a la longitud de onda con los cuatro conjuntos de datos (colorante libre, núcleos, partículas de envuelta normal, partículas de envuelta densificada) en los mismos ejes para establecer una clara comparación.

65

**Resultados.** El resultado de estas mediciones y cálculos para los núcleos, las envueltas normales y densificadas se muestra en la Figura 3. Los resultados indican una fuerte protección mediante la matriz de sílice cuando se encapsulan los colorantes ADS832WS y una protección adicional mediante la envuelta normal. Añadir una envuelta densificada alrededor del mismo núcleo proporciona la mayor mejora en la protección. La protección puede manifestarse como, por ejemplo, una disminución en la difusión a través de la envuelta de sílice. Los datos de razón en la Figura 3 pueden convertirse en un porcentaje de agua que rodea al colorante usando los gráficos en la Figura 4 y la ecuación correspondiente del ajuste en la Figura 5.

Para las nanopartículas de sílice que contienen colorante TRITC, las muestras se hicieron coincidir para la absorción a la absorción pico de ~550 nm y se tomó la fluorescencia de las muestras que se hicieron coincidir para la absorción en condiciones idénticas. El gráfico de fluorescencia se muestra en la Figura 6. Las partículas de envuelta normal muestran un aumento marcado en el brillo con respecto a los núcleos y al colorante libre, mientras que las partículas de envuelta densificada muestran un aumento incluso mayor (mayor del 50%) en el brillo.

#### EJEMPLO 2

En este ejemplo, se aplican calor y presión tras la producción de la reacción de punto C (que produce una nanopartícula de sílice de núcleo-envuelta) en un aparato Parr-Bomb. En este ejemplo, no es necesaria sílice adicional para hacer crecer una envuelta densificada, sino más bien la disminución en la tasa de difusión de agua a través de la envuelta de sílice muestra que se consigue el mismo resultado aplicando calor o presión a una partícula preformada.

La densificación se consigue tomando 15 ml de nanopartículas de sílice fluorescentes ya preparadas en un Parr-Bomb de 20 ml, calentando hasta 60 grados Celsius y manteniendo la temperatura durante la noche. Esta temperatura aumentada eleva la presión interna (aproximadamente 1,125 atmósferas). Además, esta presión aumentada promueve la formación de enlaces adicionales dentro de la sílice, conduciendo a una mayor reticulación y una mayor densidad de partícula. La temperatura y la duración pueden variarse para controlar la densidad de las partículas. La Figura 9 muestra una comparación de partículas de envuelta normal, partículas de envuelta densificada y partículas de envuelta normal tras la síntesis procesada usando el método descrito anteriormente (envuelta densificada – 2º método en el gráfico). En este gráfico de datos preliminares, puede verse claramente que las partículas densificadas por presión se comportan de manera similar a las partículas de envuelta densificada, sin la necesidad de sílice adicional, solo la aplicación de ~12 horas de presión y temperatura elevadas.

#### EJEMPLO 2

Un ejemplo de los cálculos usados para determinar la densidad de las nanopartículas de núcleo-envuelta de la presente invención se muestra en la Figura 7. El intervalo para la densidad de envuelta de sílice resultante es de desde 2 hasta 2,5 g/cc. Basándose en Brinker's Sol Gel Science book página 583, en el que las densidades de gel de borosilicato (composición de sílice diferente) disminuyen hasta 0,9 g/cc, nuestras partículas (cuando se preparan suficientemente grandes) precipitan del agua, de modo que su densidad es mayor de 1 g/cc. El cálculo de ejemplo usa una densidad de partida de 1,1 g/cc, pero el intervalo viable va hasta 2 g/cc.

**REIVINDICACIONES**

1.- Un método para producir nanopartículas de sílice de núcleo-envuelta que comprende las etapas de:

- 5 a) preparar un núcleo de sílice combinando un precursor de sílice y un precursor de sílice unidos covalentemente a un material que absorbe luz y/o material fluorescente o fosforescente que emite luz, en condiciones tales que los precursores de sílice se hidrolizan dando como resultado la formación de un núcleo de sílice, en el que el material que emite luz y/o material que absorbe luz está unido covalentemente a la red de sílice del núcleo; y
- 10 b) formar una envuelta de sílice que encapsula el núcleo de sílice añadiendo un precursor de sílice a una temperatura de al menos 50°C, en condiciones tales que no se observa formación de nuevas nanopartículas de sílice;
- 15 en el que la envuelta se produce mediante la repetida adición e hidrólisis, en etapas diferenciadas, de precursor o precursores de sílice; y en el que las razones en masa de material que absorbe luz y/o material que emite luz con respecto a la masa de sílice es de desde 1:50 hasta 1:2000.

2.- El método según la reivindicación 1, en el que el precursor de sílice es TEOS y/o TMOS.

20 3.- El método según la reivindicación 1, en el que en la etapa b) los precursores de sílice se añaden en forma de al menos 10 alícuotas de precursor de sílice a una temperatura de al menos 50°C a lo largo de un periodo de al menos 1 hora, en el que el tiempo entre adición de las alícuotas es de al menos 6 minutos.

25 4.- El método según la reivindicación 1, en el que la etapa b) se lleva a cabo a una temperatura de desde 50 hasta 100°C.

5.- Un método para producir nanopartículas de sílice de núcleo-envuelta que comprende las etapas de:

- 30 a) preparar un núcleo de sílice combinando un precursor de sílice y un precursor de sílice unidos covalentemente a un material que absorbe luz y/o material fluorescente o fosforescente que emite luz en condiciones tales que los precursores de sílice se hidrolizan dando como resultado la formación de un núcleo de sílice, en el que el material que emite luz y/o material que absorbe luz está unido covalentemente a la red de sílice del núcleo;
- 35 b) formar una envuelta de sílice que encapsula el núcleo de sílice añadiendo un precursor de sílice a temperaturas por debajo de 50°C, en condiciones tales que no se observa formación de nuevas nanopartículas de sílice;
- 40 en el que la envuelta se produce mediante la repetida adición e hidrólisis, en etapas diferenciadas, de precursor o precursores de sílice; y
- 45 c) someter las nanopartículas de sílice de núcleo-envuelta de la etapa b) a una temperatura de 50 a 100°C a lo largo de un periodo de al menos 12 horas y/o una presión de al menos 1,1 atmósferas; en el que las razones en masa de material que absorbe luz y/o material que emite luz con respecto a masa de sílice es de desde 1:50 hasta 1:2000.

50 6.- El método según la reivindicación 5, en el que en la etapa b) los precursores de sílice se añaden en forma de al menos 23 alícuotas de precursor de sílice a una temperatura de desde 20 hasta 23°C a lo largo de un periodo de al menos 6 horas, en el que el tiempo entre adición de las alícuotas es de al menos 15 minutos.

7.- Una nanopartícula de núcleo-envuelta que comprende:

- 55 a) un núcleo que comprende sílice y un material fluorescente o fosforescente que emite luz y/o un material que absorbe luz, en el que el material que emite luz y/o que absorbe luz está unido covalentemente a la red de sílice del núcleo, y en el que la dimensión más larga del núcleo es de 5 a 500 nm; y
- 60 b) una envuelta que comprende sílice, en la que la dimensión más larga de la nanopartícula de núcleo-envuelta es de 5 a 500 nm,
- en el que la densidad de la nanopartícula de núcleo-envuelta es de al menos 1,4 g/cm<sup>3</sup>, y en el que la envuelta de sílice tiene una densidad de al menos 1,4 g/cm<sup>3</sup>.

8.- Un sensor que comprende una nanopartícula de núcleo-envuelta según la reivindicación 7.

65

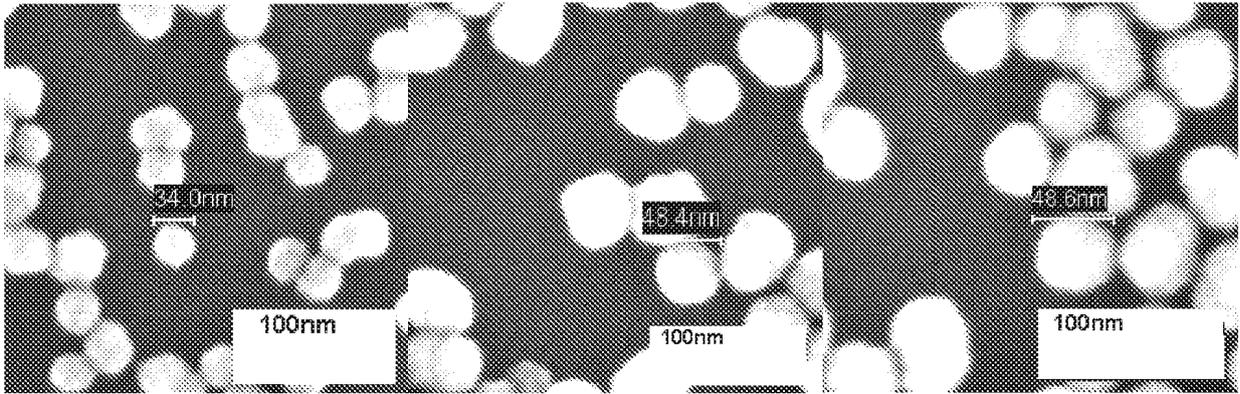


Figura 1

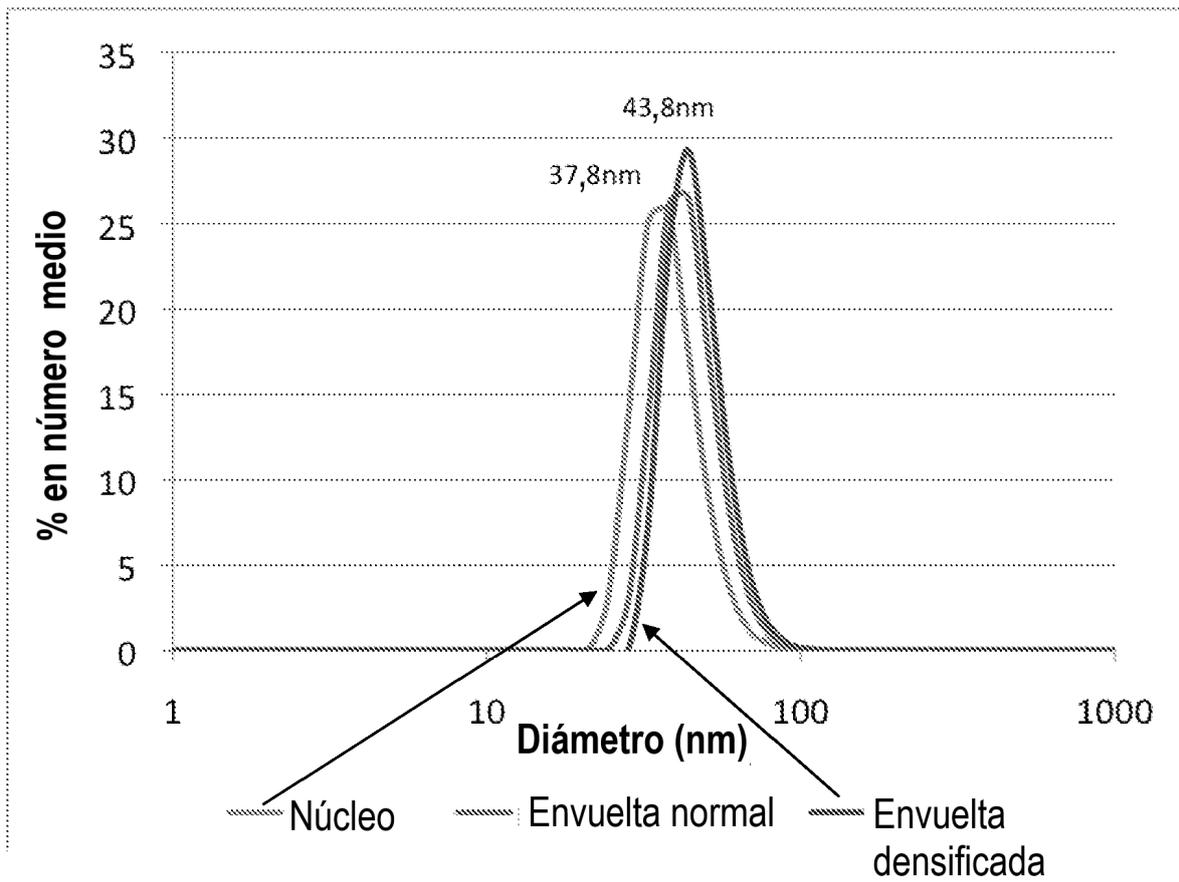


Figura 2

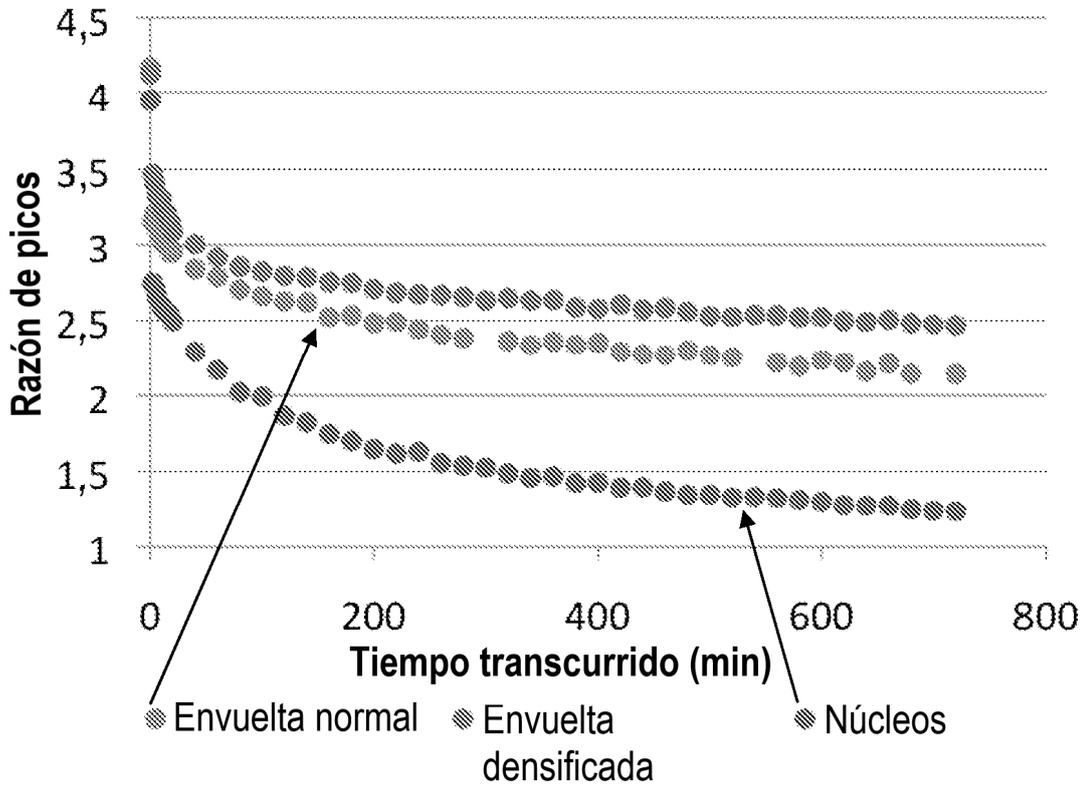


Figura 3

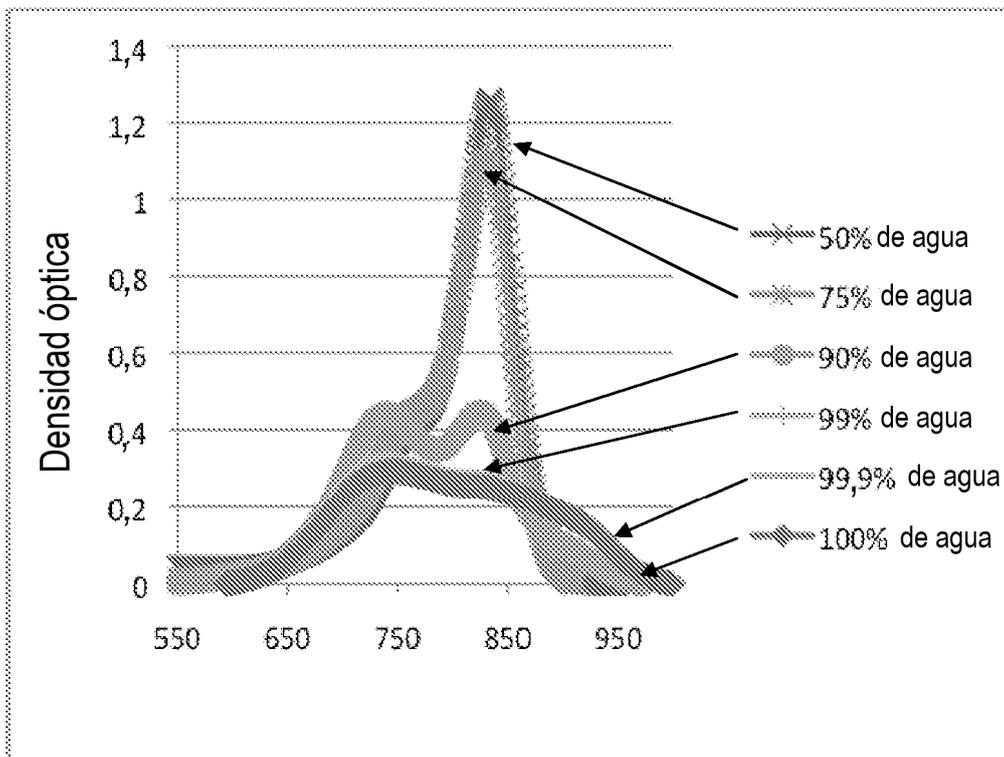


Figura 4

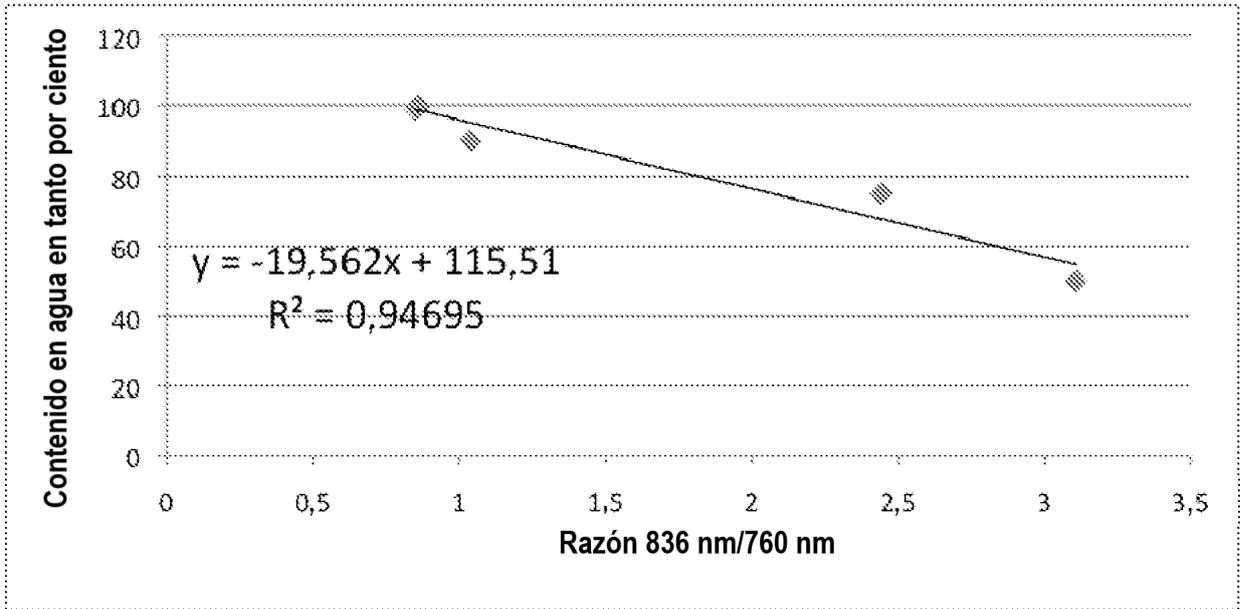


Figura 5

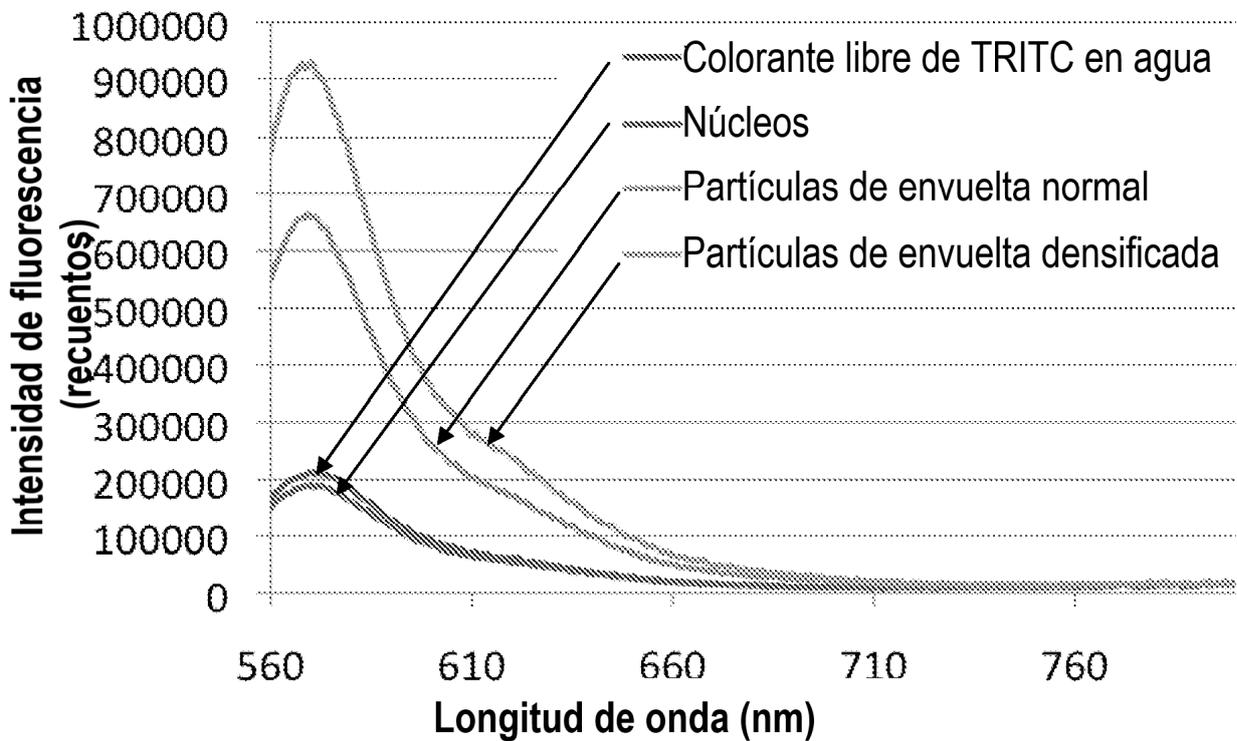


Figura 6

REACCIÓN CONVENCIONAL		REACCIÓN DENSIFICADA	
0,022975	ml de TEOS por ml de reacción	0,045475	ml de TEOS por ml de reacción
22,975	ml de TEOS por l de reacción	45,475	ml de TEOS por l de reacción
0,93	densidad de TEOS	0,93	densidad de TEOS
21,36675	gramos de TEOS por l de reacción	42,29175	gramos de TEOS por l de reacción
0,42121521	conversión de masa empírica		
		0,42121521	conversión de masa tal como se calcula para la reacción convencional
<b>9</b>	gramos de sílice producida por TEOS añadidos a 1 l (empírico)	<b>17,813928</b>	gramos de sílice producida por TEOS añadidos a 1 l asumiendo la misma conversión de masa
<b>1,1</b>	g/cc densidad asumida de la sílice	8,18181818	Asumir que CC permanece igual, así que la densidad aumenta
8,18181818	cc calculados totales de sílice	<b>2,1772579</b>	densidad de partículas densificadas estimada g/cc

Figura 7

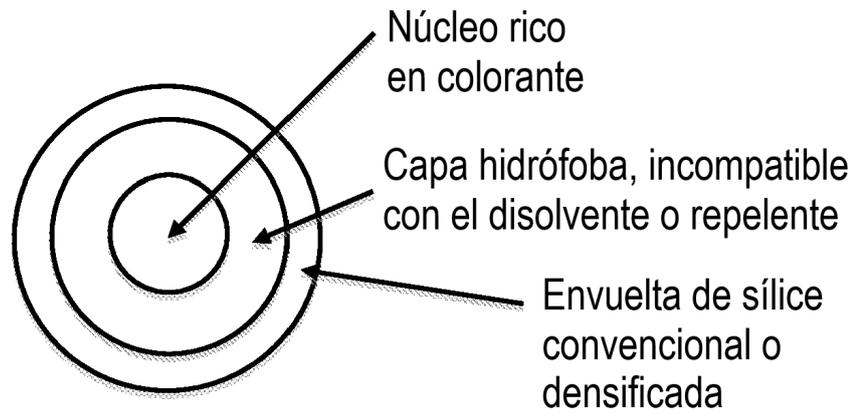


Figura 8

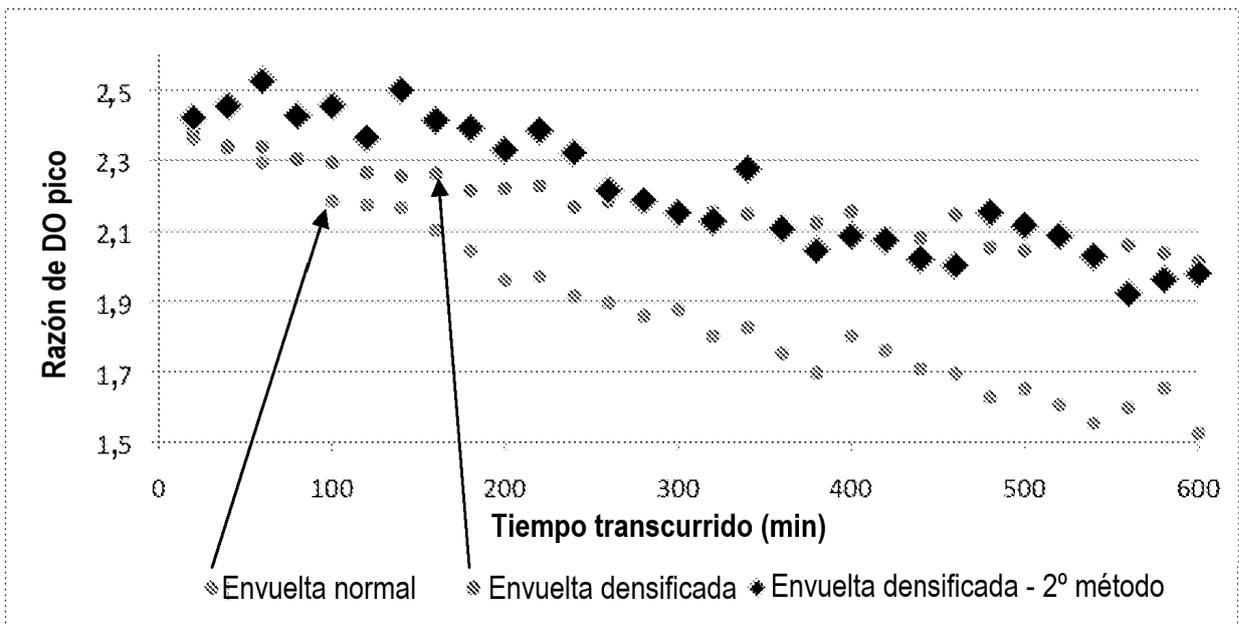


Figura 9