

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 398**

51 Int. Cl.:

**B32B 5/16** (2006.01)

**G01N 33/553** (2006.01)

**C09K 11/02** (2006.01)

**H01L 33/00** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.11.2003 PCT/US2003/037963**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.09.2004 WO04074504**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2003 E 03815995 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019 EP 1572445**

54 Título: **Nanopartículas fluorescentes a base de sílice**

30 Prioridad:

**26.11.2002 US 306614**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.04.2019**

73 Titular/es:

**CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC.**  
**(20.0%)**  
**395 Pine Tree Road, Suite 310**  
**Ithaca, NY 14850, US;**  
**WIESNER, ULRICH B. (20.0%);**  
**OW, HOOISWENG (20.0%);**  
**LARSON, DANIEL E. (20.0%) y**  
**WEBB, WATT W. (20.0%)**

72 Inventor/es:

**WIESNER, ULRICH;**  
**OW, HOOISWENG;**  
**LARSON, DANIEL, R. y**  
**WEBB, WATT, W.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 709 398 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 fluorescentes a base de sílice

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere de forma general a nanopartículas fluorescentes y, más específicamente, a nanopartículas fluorescentes a base de sílice de menos de 30 nm con colorantes orgánicos unidos covalentemente.

**Antecedentes de la invención**

10 Las nanopartículas fluorescentes son enormemente prometedoras como indicadores y fuentes de fotones en aplicaciones biotecnológicas e informáticas, como tratamiento de imágenes biológicas, tecnología de sensores, micromatrices y computación óptica. Dichas aplicaciones requieren nanopartículas brillantes, monodispersas, de un tamaño controlado que pueden conjugarse específicamente con macropartículas biológicas o disponerse en estructuras de un orden superior.

15 En los últimos años han surgido dos enfoques generales para la síntesis de nanopartículas hidrosolubles, altamente fluorescentes, para su uso en una serie de aplicaciones biológicas y analíticas exigentes. En el primer enfoque, el material de nanopartículas es fluorescente en sí (como puedan ser nanocristales semiconductores o nanocristales metálicos). En el segundo, las nanopartículas fluorescentes se basan en la incorporación de moléculas de colorante orgánico. Dada la inmensa diversidad de moléculas de colorantes orgánicos y la exquisita sensibilidad de estas moléculas colorantes a su entorno local, éste último enfoque abre la posibilidad de desarrollar nanopartículas con un amplio abanico de características de fluorescencia controladas con precisión.

20 Sobre la base del trabajo de Stöber y col., se han sintetizado nanopartículas de sílice con un colorante integrado en una serie de tamaños, colores y arquitecturas. En todos los informes anteriores sobre propiedades fotofísicas, se observa que se desactiva el colorante que está unido covalentemente dentro de la partícula de sílice en comparación con el colorante libre. Sin embargo, en el caso de microgeles poli(organosiloxano) en los que el colorante no está unido covalentemente y está cargado por difusión, se observa un ligero aumento de la eficiencia de fluorescente. Para otros materiales, como por ejemplo microesferas de poliestireno, la eficiencia cuántica del colorante integrado es la misma o está por debajo que la del colorante libre. La desactivación de la fluorescencia se suele atribuir a la transferencia de energía entre partículas o el decaimiento no radiativo en la matriz de sílice. Es probable que ambas rutas estén influidas por el entorno del colorante local dentro de la partícula, lo cual indica que un control de precisión de la arquitectura dentro de la partícula podría mejorar la desactivación o incluso conllevar una potenciación de la fluorescencia.

30 Sigue existiendo la necesidad de nanopartículas altamente fluorescentes de menos de 30 nm con colorantes orgánicos unidos covalentemente.

**Sumario de la invención**

La invención se refiere a una clase de nanopartículas de sílice en la que la arquitectura dentro de la partícula de sílice tiene destacados efectos controlados sobre las propiedades radiativas del colorante constituyente.

35 La invención proporciona un procedimiento de síntesis de una nanopartícula núcleo-cubierta monodispersa fluorescente que comprende conjugar covalentemente isotiocianato de tetrametil rodamina con 3-aminopropiltriétoxosilano y condensar la mezcla para formar un núcleo que contiene colorante, seguido de la adición de ortosilicato de tetraetilo para formar una red de sílice alrededor del material del núcleo, teniendo la nanopartícula un diámetro de menos de 30 nm.

40 Las propiedades radiativas de la nanopartícula dependen de la (composición) química del núcleo y la presencia de la cubierta de sílice. En un aspecto de la invención, la arquitectura de núcleo-cubierta proporciona una potenciación de la eficiencia cuántica de fluorescencia. La invención proporciona de forma general el control de las propiedades fotofísicas de las moléculas de colorante encapsuladas dentro de las partículas de sílice con tamaños de hasta 30 nm y más bajos. Dicho control se satisface a través de cambios en la química de sílice y la arquitectura de partículas a escala de un tamaño nanométrico y tiene como resultado una significativa potenciación de brillo en comparación con el colorante libre. En otro aspecto de la invención, la arquitectura núcleo-cubierta proporciona la capacidad de controlar las propiedades de foto-estabilidad de la nanopartícula.

45 El aumento de la eficiencia cuántica que proporciona la invención se debe tanto a un aumento de la tasa radiativa como a una disminución de la tasa no radiativa, siendo éste último efecto el más variable entre arquitecturas. Los cambios en la tasa no radiativa se correlacionan perfectamente con las diferencias en la movilidad rotacional del colorante dentro de la partícula.

50 La nanopartícula monodispersa fluorescente incluye una arquitectura núcleo-cubierta, en la que el núcleo comprende un núcleo compacto rodeado de una cubierta de sílice. Alternativamente, la nanopartícula monodispersa fluorescente incluye una arquitectura núcleo-cubierta, en la que el núcleo comprende un núcleo expandido rodeado de una cubierta de sílice. En otra alternativa más aún, la nanopartícula monodispersa fluorescente incluye una

55

arquitectura de núcleo-cubierta en la que el núcleo comprende una partícula homogénea con colorantes integrados escasamente dentro rodeado por una cubierta de sílice. En otra alternativa más, la nanopartícula homogénea monodispersa fluorescente no está rodeada por una cubierta de sílice.

5 El procedimiento para fabricar una nanopartícula monodispersa fluorescente con una arquitectura de núcleo compacto comprende mezclar un compuesto fluorescente y un compuesto de órgano-silano para formar un precursor de colorante, mezclar el precursor de colorante resultante con una solución acuosa para formar un núcleo fluorescente compacto y mezclar el núcleo compacto resultante con un precursor de sílice para formar una cubierta de sílice sobre el núcleo compacto para proporcionar la nanopartícula monodispersa fluorescente.

10 Un procedimiento para fabricar una nanopartícula monodispersa fluorescente con una arquitectura de núcleo expandido que comprende mezclar un compuesto fluorescente y un compuesto de órgano-silano para formar un precursor de colorante, co-condensar el precursor de colorante resultante con un precursor de sílice para formar un núcleo fluorescente expandido y mezclar el núcleo expandido resultante con un precursor de sílice para formar una cubierta de sílice en el núcleo expandido para proporcionar la nanopartícula monodispersa fluorescente.

15 Un procedimiento para fabricar una nanopartícula homogénea monodispersa fluorescente que comprende mezclar un compuesto fluorescente y un compuesto de órgano-silano para formar un precursor de colorante y co-condensar el precursor de colorante resultante con un precursor de sílice para formar una nanopartícula monodispersa fluorescente homogénea.

Estos y otras características se exponen en la descripción de la invención a continuación.

#### **Breve descripción de los dibujos**

20 FIG. 1A-C ilustra esquemáticamente diferentes arquitecturas de nanopartículas de sílice diseñadas como nanopartícula de núcleo compacto-cubierta (1A), nanopartícula de núcleo expandido-cubierta (1B) y nanopartícula homogénea (1C). La cubierta de sílice en la arquitectura de núcleo compacto y expandido – cubierta comprende sílice sin ninguna molécula de colorante. La nanopartícula homogénea comprende un material compuesto de sílice y colorante en una matriz.

25 FIG. 2A-C ilustra la espectroscopia de correlación de fluorescencia de nanopartículas y productos de síntesis intermedios.

FIG. 2D-F ilustra los valores de brillo (recuento/partículas/segundo) para las etapas de síntesis de la arquitectura de núcleo compacto-cubierta, la arquitectura de núcleo expandido-cubierta y la arquitectura homogénea sobre la base del valor de excitación de 1,2 mW a 900 nm.

30 FIG. 3 ilustra las curvas de espectroscopia de estado estacionario que demuestran la potenciación de la eficiencia cuántica conseguida con la arquitectura de núcleo-cubierta.

FIG. 3A-C ilustran la absorbancia y fluorescencia de la nanopartícula núcleo compacto -cubierta (3A), la nanopartícula de núcleo expandido-cubierta (3B) y la nanopartícula homogénea (3C). Los valores de absorbancia son unidades de densidad óptica. La fluorescencia se gradúa en función del colorante orgánico utilizado, TRITC.

35 FIG. 3D-F ilustran la comparación entre la absorbancia y la excitación para la nanopartícula de núcleo compacto-cubierta (3D), la nanopartícula de núcleo expandido-cubierta (3E) y la partícula homogénea (3F).

FIG. 4 ilustra la fluorescencia de nanopartículas resuelta en el tiempo.

40 FIG. 4A ilustra el decaimiento de la fluorescencia normalizado de una nanopartícula homogénea, una nanopartícula de núcleo expandido-cubierta, una nanopartícula de núcleo compacto-cubierta y el colorante TRITC.

FIG. 4B ilustra la anisotropía de fluorescencia de una nanopartícula de núcleo expandido-cubierta, una nanopartícula de núcleo compacto-cubierta, una nanopartícula homogénea y el colorante TRITC.

45 FIG. 4C ilustra la anisotropía de fluorescencia normalizada de las curvas de las nanopartículas presentadas en la FIG. 4B. En la Tabla II se compilan los valores de ajuste promedio para la vida de fluorescencia ( $\tau_f$ ) y vida rotacional ( $\theta$ ).

#### **Descripción detallada de la invención**

Las nanopartículas fluorescentes incluyen un núcleo que comprende un compuesto de silano fluorescente y una cubierta de sílice sobre el núcleo. El núcleo de la nanopartícula puede comprender por ejemplo el producto de reacción de un compuesto fluorescente reactivo y un compuesto de órgano-silano co-reactivo, y la cubierta puede comprender por ejemplo el producto de reacción de un compuesto que forma sílice. El compuesto que forma sílice puede producir por ejemplo una o más capas de sílice, como por ejemplo de 1 a aproximadamente 20 capas, y varias características de cubierta deseables, como el espesor de la capa de cubierta, la relación entre el espesor de la cubierta y el espesor o diámetro del núcleo, la cobertura superficial de la cubierta de sílice del núcleo, la porosidad y capacidad de transporte de la cubierta de sílice, y consideraciones similares.

55 La síntesis de las nanopartículas de núcleo-cubierta monodispersas fluorescentes se basa en un procedimiento en dos etapas. En primer lugar, se conjugan covalentemente las moléculas de colorante orgánico, isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC) con un precursor de sílice y se condensan para formar un núcleo rico en colorante. En segundo lugar, se agregan los monómeros de gel de sílice para formar una red de sílice más densa alrededor del

material de núcleo fluorescente, proporcionando protección contra las interacciones de disolvente que pueden ser perjudiciales para la fotoestabilidad. El hecho de formar primero un núcleo rico en colorante permite la incorporación de varias clases de fluoróforo que cubren todo el espectro de absorción y emisión UV-Vis.

5 La cantidad de reactivos utilizada en la síntesis de diferentes arquitecturas de núcleo-cubierta por lo que se refiere a la inserción del colorante, es decir, núcleo compacto, núcleo expandido y homogéneo, se ha mantenido idéntica para generar correlaciones de propiedades estructurales con precisión. Sin embargo, el orden en el que se hace reaccionar los reactivos que tiene como resultado en la formación de la arquitectura núcleo-cubierta varía. Por lo tanto, el entorno químico en torno a las moléculas de colorante en cada arquitectura es diferente con respecto a la densidad de matriz de sílice y la presencia de fracciones orgánicas que tiene efectos significativos en las propiedades fotofísicas de las partículas.

10 Para la síntesis de la nanopartículas núcleo compacto-cubierta, se agregó el precursor de colorante al vaso de reacción que contiene cantidades apropiadas de amoníaco, agua y disolvente y se dejó reaccionar durante toda la noche. Se sintetizó el precursor de colorante por reacción de adición entre TRITC y 3-aminopropiltriethoxisilano en una relación molar de 1:50, excluyendo la humedad. Una vez completada la síntesis del núcleo compacto rico en colorante, se agregó a continuación ortosilicato de tetraetilo (TEOS) para hacer crecer la cubierta de sílice que rodeaba el núcleo.

15 La síntesis de la nanopartícula de núcleo expandido-cubierta se completó co-condensando TEOS con el precursor de colorante mencionado y dejando reaccionar la mezcla durante toda la noche. Una vez completada la síntesis del núcleo expandido, se añadió TEOS adicional para hacer crecer la cubierta de sílice que rodeaba el núcleo.

20 Se completó la síntesis de las nanopartículas homogéneas por co-condensación de todos los reactivos, el precursor de colorante y TEOS, al mismo tiempo y dejando reaccionar la mezcla durante toda la noche.

25 Las curvas de FCS y los ajustes monoexponenciales presentados en la FIG. 2A-C ilustran el requerimiento de monodispersidad para cada una de las arquitecturas en una solución acuosa. La curva de FCS proporciona además dos parámetros independientes: el coeficiente de difusión y la concentración absoluta. El coeficiente de difusión se relaciona directamente con el radio hidrodinámico y la concentración absoluta permite cuantificar el brillo de las partículas.

30 En las FIG. 2A-C se muestran curvas de FCS para cada una de las nanopartículas y su producto intermedio correspondiente. Tal como se muestra en la FIG. 2A, el coeficiente de difusión del núcleo ( $D = 0,098 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ ) para la arquitectura de núcleo compacto-cubierta es aproximadamente la mitad del coeficiente de difusión del colorante TRITC libre ( $D = 0,21 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ ). La nanopartícula completa es aproximadamente diez veces más grande, tal como se muestra en la FIG. 2A ( $D = 0,014 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ ). En la FIG. 2B se muestra una relación similar entre el colorante TRITC libre, la arquitectura de núcleo expandido-cubierta y la nanopartícula completa. El coeficiente de difusión del núcleo en la arquitectura núcleo expandido-cubierta es  $0,075 \mu\text{m}^2/\text{ms}$  en comparación con el valor de coeficiente de difusión del colorante libre TRITC ( $D = 0,21 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ ). Para la nanopartícula homogénea, no hay ninguna estructura de núcleo intermedia, de modo que la FIG. 2C ilustra el coeficiente de difusión de la nanopartícula homogénea ( $D = 0,015 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ ) en relación con el colorante TRITC libre.

35 FIG. 2D-E ilustra el brillo de cada arquitectura y síntesis de productos intermedios. Para la síntesis que tiene lugar con un producto intermedio de núcleo, el núcleo siempre es más tenue que el colorante libre, a pesar del hecho de que se supone que hay múltiples colorantes presentes en el núcleo. El brillo de la nanopartícula completa siempre es significativamente mayor que el colorante libre y/o el producto intermedio del núcleo. Asimismo, el brillo varía para las diferentes arquitecturas a pesar de su mismo tamaño de partícula y sus mismas cantidades absolutas de materiales precursores.

40 Las nanopartículas fluorescentes de la invención incluyen un colorante orgánico, TRITC que demuestra efectos de potenciación de eficiencia cuántica en sus propiedades luminiscentes. Cuando se iluminan las nanopartículas fluorescentes de la invención con una fuente de energía primaria, tiene lugar una emisión de energía secundaria a una frecuencia que corresponde a la brecha de bandas del colorante orgánico utilizado en la nanopartícula.

45 El número de equivalentes TRITC por partícula puede determinarse a través de una combinación de FCS y mediciones de absorbancia, en las que se determina la concentración absoluta a partir del FCS y se mide la absorbancia relativa con respecto a TRITC en solución, tal como se muestra en la FIG. 3A-C. Se utilizaron soluciones diluidas (aproximadamente 50 nM) en la FIG. 3A-C de manera que pudiera medirse una muestra tanto por FCS como absorbancia. En la Tabla II, se muestra número de equivalentes de TRITC por partícula, calculado mediante el uso de un coeficiente de extinción de  $42.105 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 514,5 nm. De manera similar, las intensidades relativas de la fluorescencia de nanopartícula y absorbancia de nanopartícula proporcionan la potenciación de la eficiencia cuántica con respecto a TRITC libre, tal como se muestra en la Tabla II.

50 Para las nanopartículas de núcleo compacto-cubierta y núcleo expandido-cubierta, el número de equivalentes de TRITC por partícula es indistinguible a 8,6. Sin embargo, la nanopartícula de núcleo expandido-cubierta presenta una potenciación de la eficiencia cuántica tres veces mayor que la del colorante TRITC libre, mientras que las nanopartículas de núcleo compacto-cubierta solamente una potenciación de la eficiencia cuántica dos veces mayor

en comparación con el colorante TRITC libre, tal como se muestra en la FIG. 3A, B y Tabla II. Se observó la máxima potenciación de la eficiencia cuántica con las nanopartículas homogéneas, que tienen un promedio de 2,3 equivalentes de TRITC por partícula, tal como se muestra en la FIG: 3C y en la Tabla II.

5 La capacidad para controlar las propiedades fotofísicas a través de la química y la arquitectura de la nanopartícula permite desarrollar la siguiente generación de sondas fluorescentes y estudiar las propiedades fluorescentes que podrían ser inaccesibles en solución.

10 En la FIG. 4A se muestra la vida de fluorescencia de las partículas. Cada vida, incluyendo TRIC libre, es multiexponencial y los valores de vida promedio se compilan en la Tabla III. La vida de TRITC ( $\tau_f = 2,1$  ns) está en buena consonancia con el valor de la bibliografía en agua. La vida aumenta desde el núcleo compacto-cubierta (1,8 ns) al núcleo expandido- cubierta (2,9 ns) a las partículas homogéneas (3,2 ns) (FIG. 4A). El núcleo compacto-cubierta tiene una vida que es inferior a la del colorante libre, si bien la contribución dominante a su vida es el componente rápido (FIG 4A). Simplemente desde estos datos de vida, se podría concluir que el colorante se desactiva dentro de la partícula de núcleo compacto-cubierta, pero las mediciones del estado estacionario indican lo contrario. La combinación de vida fluorescente y eficiencia cuántica permite una única determinación de las constantes de la tasa radiativa y no radiativa, que se presentan en la Tabla III en forma normalizada y absoluta. La potenciación de la tasa radiativa es constante a través de las diferentes arquitecturas y es 2,2 veces mayor que la de TRITC libre. Sin embargo, la tasa no radiativa varía a través de las arquitecturas desde un valor relativamente alto para las nanopartículas de núcleo compacto-cubierta a un valor de casi 3 veces menos para las partículas homogéneas.

20 La anisotropía rotacional de las partículas presenta también un comportamiento multiexponencial complicado (FIG 4.B, C), y los autores de la invención se restringen de momento a la constante de tiempo rotacional promedio (Tabla III,  $\theta$ ). Tal como sería de esperar, la rotación del colorante dentro de la partícula se obstaculizada por la matriz de sílice, lo cual conlleva tiempos de rotación más largos que los del colorante libre (FIG. 4B). De hecho, las curvas de anisotropía no decaen a cero en la escala temporal de la medición, en contraposición al control de cumarina (adviértase que existe también cierta anisotropía residual de TRITC libre). Sin embargo, sigue existiendo un destacado grado de movilidad rotacional, incluso dentro del núcleo fuertemente compactado de la nanopartícula. Las escalas de tiempo de la rotación son demasiado rápidas como para que haya una rotación global de toda a nanopartícula de 30 nm y demasiado lentas como para que haya despolarización debido a la transferencia de energía. Asimismo, la amplitud de la curva ( $r(0)$ ) está próxima a la amplitud teórica para anisotropía de dos fotones ( $r(0) = 0,57$ ), lo cual indica que no existe la rápida despolarización que se asocia normalmente con la transferencia de energía.

35 Por tanto, es probable que el decaimiento de la anisotropía se deba a la rotación obstaculizada de las moléculas de colorante dentro de la matriz de sílice. En la FIG. 4C se muestra anisotropía escalar para cada arquitectura. La nanopartícula de núcleo compacto-cubierta tiene la rotación más rápida, menos obstaculizada (FIG. 4C), seguida de la de la partícula de núcleo expandido-cubierta (FIG. 4C) y, finalmente, la nanopartícula homogénea (FIG. 4C). Este tiempo de rotación tiene una dependencia inversa monotónica sobre la constante de tasa no-radiativa (Tabla III), lo cual indica que la movilidad confinada en las nanopartículas de sílice es la responsable de la supresión del decaimiento no radiativo.

#### Materiales de síntesis de nanopartículas

40 Etanol absoluto (Aldrich), tetrahidrofurano (Aldrich), hidróxido de amonio (Fluka, 28 %), tetraetoxisilano (Aldrich, 98 %), 3-aminopropiltriethoxisilano (Aldrich, 99 %), 3-mercaptopropiltriethoxisilano (Gelest, 99 %), tetrametil rodamina-5-(y -6-)-isotiocianato \*isómeros mixtos\* (TRITC) (Molecular Probes, 88 %), meleimida Alexa Fluor® 488 C5 (Molecular Probes, 97 %), ácido carboxílico Alexa Fluor® 488 y éster succinimidilo (Molecular Probes,  $\geq 50$  %).

#### Preparación de nanopartículas de núcleo (siembra fluorescente) en general

45 Se midieron cantidades de agua, amoníaco y disolvente en cilindros graduados. Se llevó a cabo la síntesis de partículas con siembra fluorescente en matraces Erlenmeyer de 1 litro y se agitó con varillas magnéticas revestidas con TEFLON® a aproximadamente 600 rpm. Se agregaron agua desionizada y solución de amoníaco a etanol y se agitó. Se agregaron aproximadamente 2 ml del precursor de colorante reactivo en etanol o THF con un contenido de APTS aproximadamente 425 micromolar a cada vaso de reacción. Dependiendo de la arquitectura deseada, se agitó la mezcla resultante durante 1 a 12 horas a temperatura ambiente cubriendo el vaso de reacción con hoja de aluminio para reducir al mínimo la exposición a la luz para permitir una mezcla de partículas de siembra fluorescente. Se destilaron tetrahidrofurano (THF) y etanol absoluto (EtOH) bajo nitrógeno. Se llevaron a temperatura ambiente los colorantes orgánicos desde la temperatura de almacenamiento a aproximadamente -20 °C, y se colocaron en una caja de guantes.

55 Preparación de la cubierta de sílice sobre las partículas del núcleo (siembra fluorescente) en general

Se llevó a cabo la etapa de revestimiento y crecimiento de la cubierta de sílice en la mezcla de reacción de partículas de siembra fluorescente mencionada con la agregación regular de disolvente, como etanol, metanol o isopropanol, para evitar cambios drásticos en la concentración iónica de la solución al tiempo que se añadió

monómero tetraetoxisilosano de formación de sílice (TEOS). Esto evita la agregación de partículas durante la síntesis, que puede ampliar la distribución del tamaño de partículas.

Caracterización de nanopartículas de fluorescencia

5 Se caracterizaron el tamaño de partícula y la distribución del tamaño de partícula de las nanopartículas fluorescentes resultantes por microscopía electrónica de barrido (MEB) y espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS).

10 **Espectroscopia de correlación de fluorescencia** – Se llevaron a cabo todas las mediciones de FCS en un microscopio FCS a medida sobre la base de la excitación de dos fotones. El instrumento consiste en un oscilador Ti:zafiro con una anchura de pulso de ~ 100 fs y una frecuencia de repetición de 80 MHz bombeado por un láser de Argon ionizado (Spectra Physics, Palo Alto, CA). Se situó el haz con una caja de escaneo confocal MRC 600 de Bio-Rad (Hercules, CA) acoplada a un microscopio invertido Zeiss Axiovert 35. Se enfocó la luz de excitación con un objetivo de inmersión en agua Zeiss 63x C-Apochromat (N.A.=1.2) y se recogió la emisión a través del mismo objetivo. Se separó la fluorescencia de la excitación con un dichroico 670 DCLP y se pasó a través de un filtro de emisión HQ575/150 a un PMT de recuento de fotones GaAsP. Se autocorrelacionó digitalmente la fotocorriente resultante con un autocorrelacionador tau ALV 6010 múltiple. La función de autocorrelación  $G(\tau)$  se define como:

15 
$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(0)\delta F(\tau) \rangle}{\langle F(\tau) \rangle^2} \quad (1)$$

donde  $F(\tau)$  es la fluorescencia obtenida del volumen en el tiempo de retardo  $\tau$ , los paréntesis representan las medias del conjunto, y  $\delta F(\tau) = F(\tau) - \langle F(\tau) \rangle$ . La función de ajuste es la función patrón para difusión tridimensional de un componente:

20 
$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left( 1 + \frac{4D\tau}{w_{xy}^2} \right)^{-1} \left( 1 + \frac{4D\tau}{w_z^2} \right)^{-1/2} \quad (2)$$

25 donde  $w_{xy}$  y  $w_z$  son las dimensiones lateral y axial del volumen focal de dos fotones, respectivamente,  $N$  es el número de especies de difusión en el volumen focal;  $D$  es el coeficiente de difusión. Se llevaron a cabo todas las mediciones de FCS con una longitud de onda de excitación de 900 nm. A esta longitud de onda, se determinó que la dimensión lateral era 0,248 micrómetros y se determinó que la longitud axial era 0,640 micrómetros. Se determinó que la calibración de concentración desde las muestras patrón de verde de rodamina era 01,43 nm/partícula (es decir,  $N = 1$  corresponde a 1,43 nm).

**Fotoblanqueo** – Para los experimentos de fotoblanqueo, se iluminaron 30  $\mu$ l de muestra continuamente en una cubeta de cuarzo de longitud de trayectoria de 3 mm (Starna). La excitación fue la línea de láser de 514 nm desde un láser de argón con una potencia de 5 W y un tamaño de punto de 1,5 cm. Se prepararon las muestras con absorbancia similar a la longitud de onda de excitación de 514 nm.

30 Se recoge la fluorescencia en el ángulo derecho de la excitación a través de un filtro de emisión HQ605/90 y se registra con un PMT bialcalino (HC125-02, Hamamatsu).

A continuación se presentan los siguientes ejemplos con fines ilustrativos únicamente sin pretender limitar la invención.

**Ejemplo 1**

35 Tabla I. Radios hidrodinámicos de nanopartículas y núcleos de nanopartícula.

Nanopartícula	Radio del núcleo (nm) (SD)	Núcleo/radio de cubierta (nm) (SD)
Núcleo compacto/cubierta	2,2 (0,3)	15 (1,2)
Núcleo expandido/cubierta	2,9 (0,3)	17 (1,4)
Homogéneo	-	15 (1,1)

40 En la Tabla I se presentan los radios hidrodinámicos calculados a 21 °C. Cada curva de nanopartícula se ajusta a un solo coeficiente de difusión y los tamaños hidrodinámicos son iguales dentro del error de la medición ( $r = 15, 17$  nm). Para los productos intermedios de núcleo, el núcleo expandido es ligeramente mayor ( $r = 2,9$  nm) que el núcleo compacto ( $r = 2,2$  nm).

**Ejemplo 2**

Tabla II. Brillo de nanopartículas

Muestra	Equivalentes TRITC	Potenciación cuántica	Eficiencia	Factor de brillo	Recuento/partícula
TRITC	1,0	1,0		1,0	1,0
Núcleo compacto/cubierta	8,6	2,0		18,	14,
Núcleo expandido/cubierta.	8,7	3,1		27,	22
Homogéneo	2,3	3,3		7,5	6,0

5 La amplitud de la autocorrelación proporciona el número de especies de difusión y la tasa de recuento promedio es una medida de los fotones recogidos a partir del volumen focal ópticamente definido. A partir de estos datos, se puede obtener la tasa de recuento por molécula para cada especie de difusión, que es una medición directa del brillo de una sonda.

10 La potenciación global del brillo de la partícula con respecto al colorante libre es el producto del número de equivalentes TRITC dentro de la nanopartícula y la potenciación de la eficiencia cuántica relativa del colorante, tal como se muestra en la Tabla II, factor de brillo. Sin embargo, dada la incertidumbre de la determinación de los equivalentes TRITC, es necesario contar con una medición independiente adicional del brillo para comparar, como por ejemplo los recuentos por partícula medidos por FCS (Tabla II, recuento/partícula). El factor del brillo es similar a la determinación del brillo independiente de FCS (Tabla II, comparando las últimas dos columnas) y la tendencia para el brillo con respecto a las diferentes arquitecturas es la misma en ambos procedimientos.

15 El factor de brillo se sobreestima en consonancia con los valores medidos por FCS, posiblemente debido al error en la determinación de equivalentes.

La potenciación de la eficiencia cuántica puede deberse, en general, a un aumento de la tasa radiativa ( $k_r$ ), una disminución en la tasa no radiativa ( $k_{nr}$ ), o ambos. Las contribuciones relativas de estos factores están relacionadas con la vida de fluorescencia ( $\tau_f$ ) y la eficiencia cuántica ( $\phi$ ) por:

$$\tau_f = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (1)$$

$$\phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (2)$$

20

**Ejemplo 3**

Tabla III. Parámetros resueltos en el tiempo para nanopartículas de sílice

Muestra	<vida> ns	$\phi$	$k_r$ ns <sup>-1</sup>	$k_r$ (normalizado)	$k_{nr}$ ns <sup>-1</sup>	$k_{nr}$ (normalizado)	< $\theta$ > ns
TRITC	2,1	0,15	0,072	1,0	0,41	1,0	0,21
Núcleo compacto-cubierta	1,8	0,30	0,17	2,3	0,39	0,95	0,40
Núcleo expandido-cubierta	2,9	0,47	0,16	2,2	0,18	0,45	3,2
Homogéneo	3,2	0,50	0,16	2,2	0,16	0,39	6,7

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de síntesis de una nanopartícula de núcleo-cubierta monodispersa fluorescente que comprende conjugar covalentemente isotiocianato de tetrametil rodamina con 3-aminopropiltrietoxisilano en una relación molar de 1:50 y condensar la mezcla para formar un núcleo rico en colorante, seguido de la adición de ortosilicato de tetraetilo para formar una red de sílice alrededor del material de núcleo, teniendo la nanopartícula un diámetro de menos de aproximadamente 30 nm.
- 5

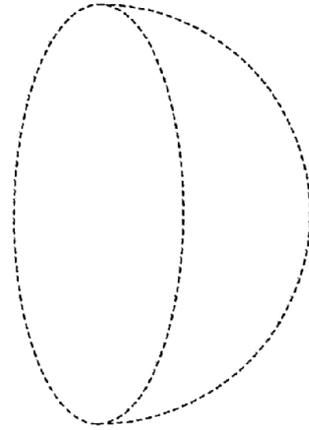


Fig. 1C

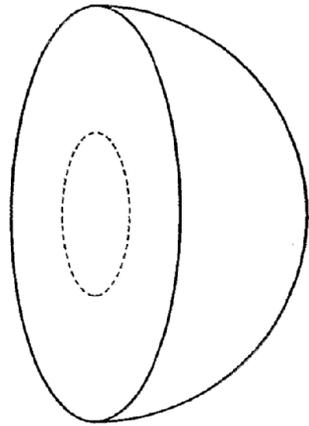


Fig. 1B

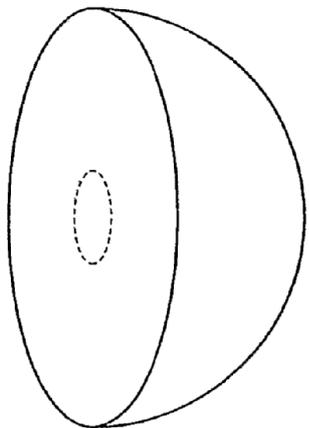
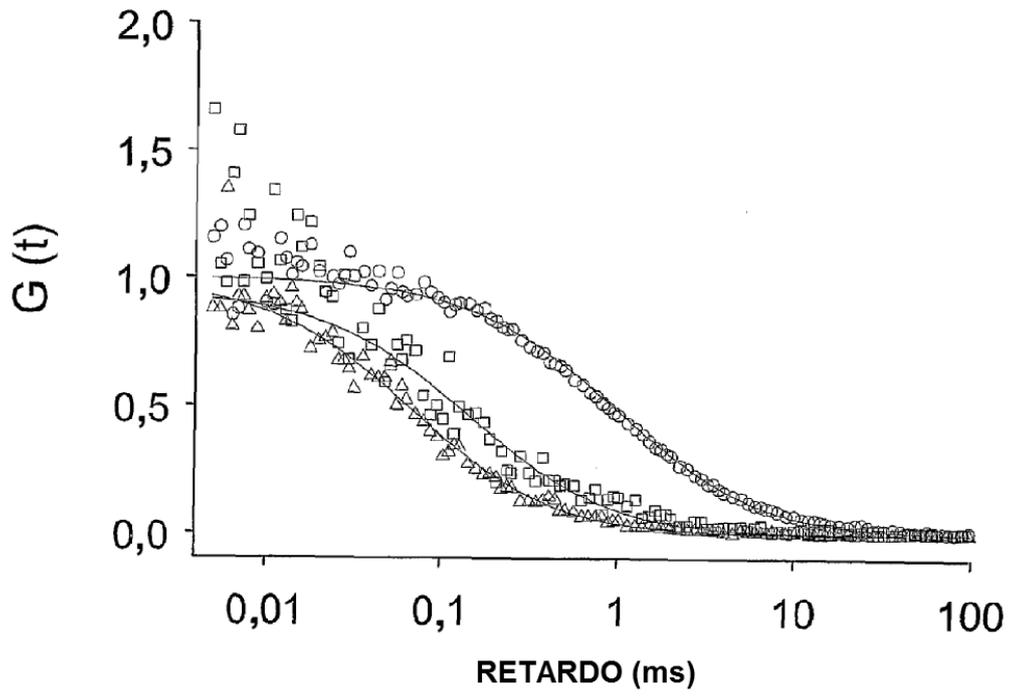
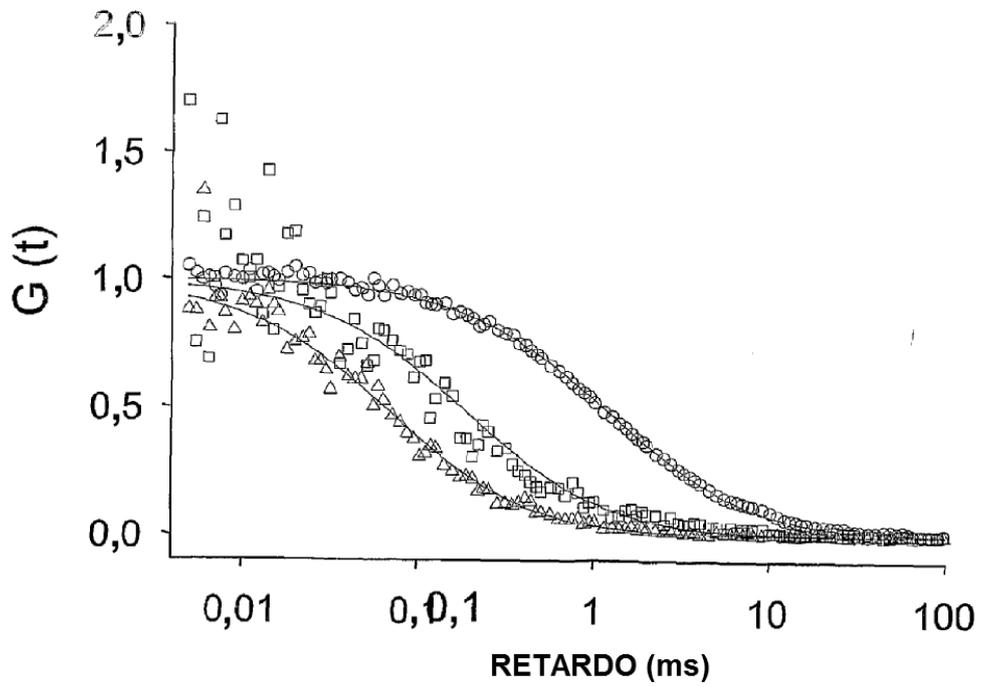


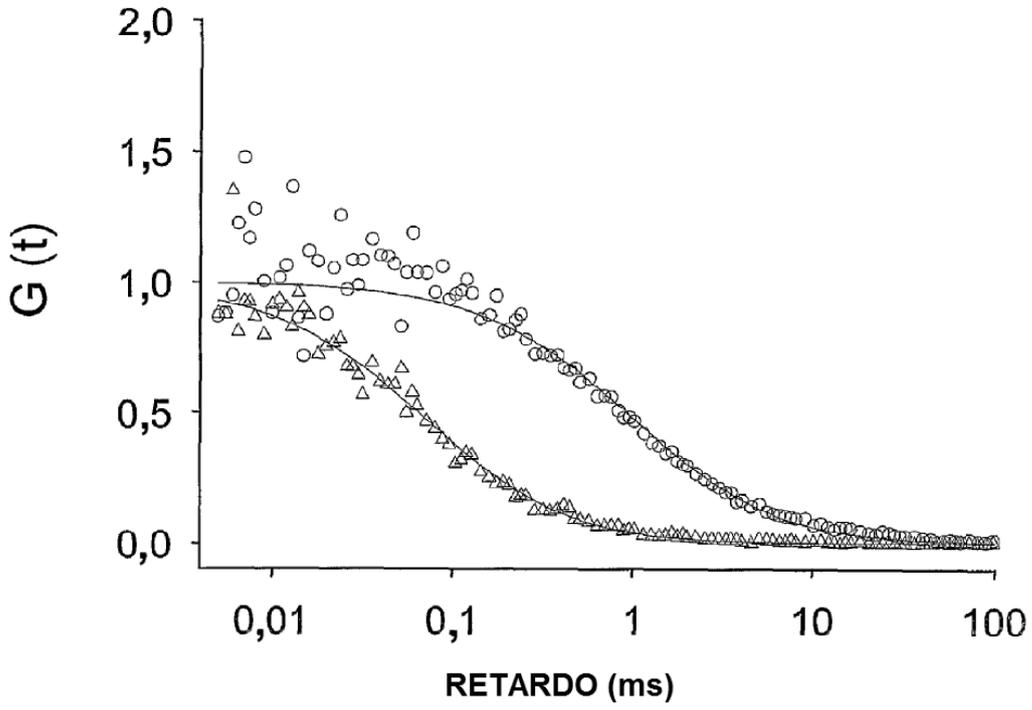
Fig. 1A



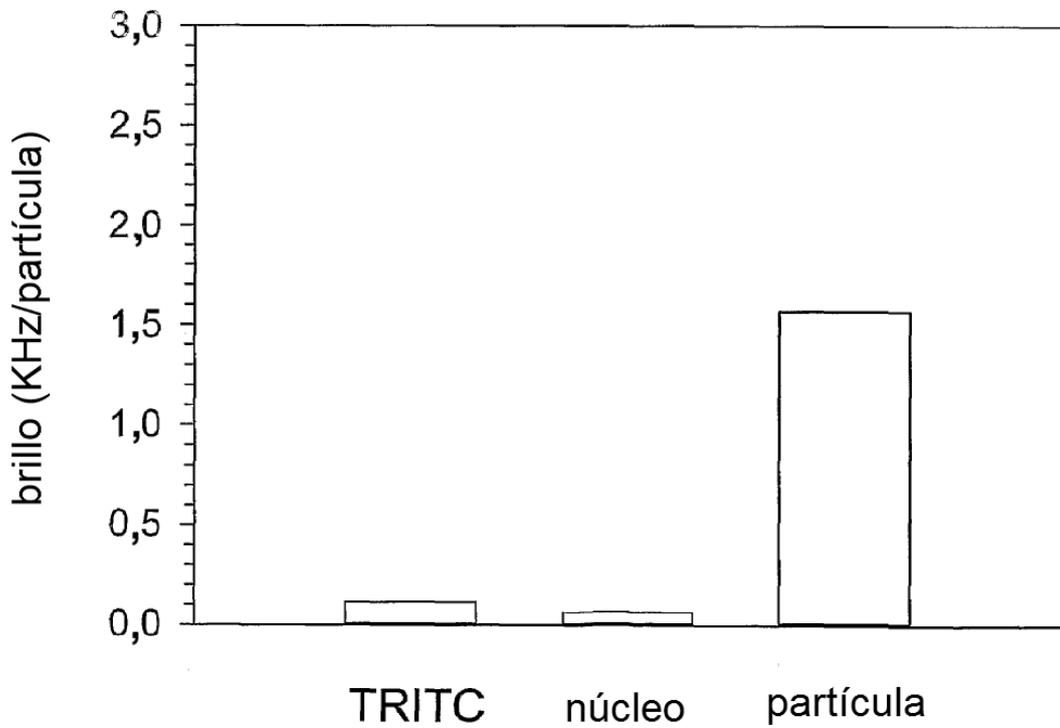
*Fig. 2A*



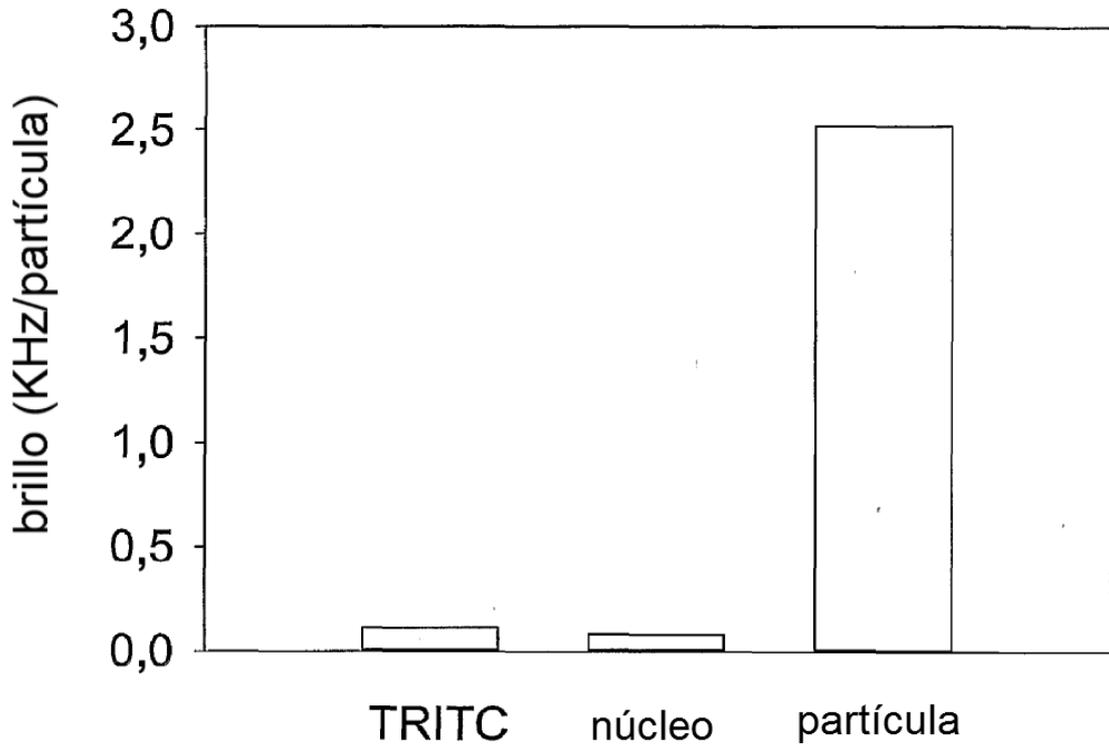
*Fig. 2B*



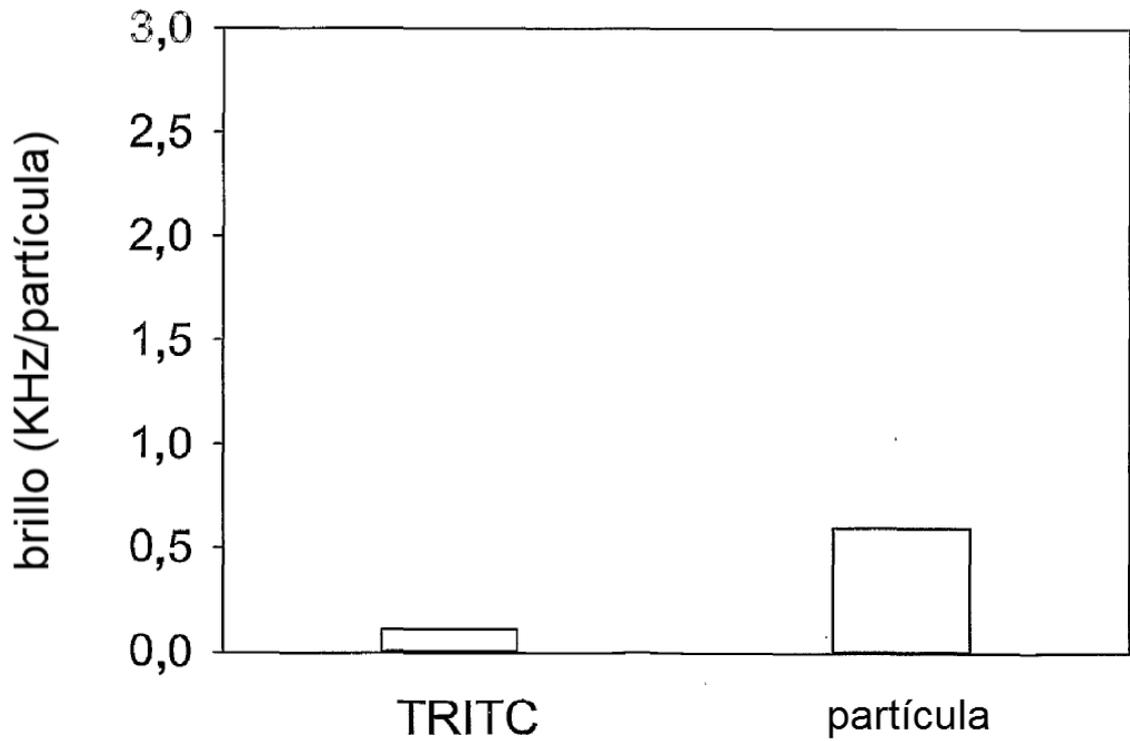
*Fig. 2C*



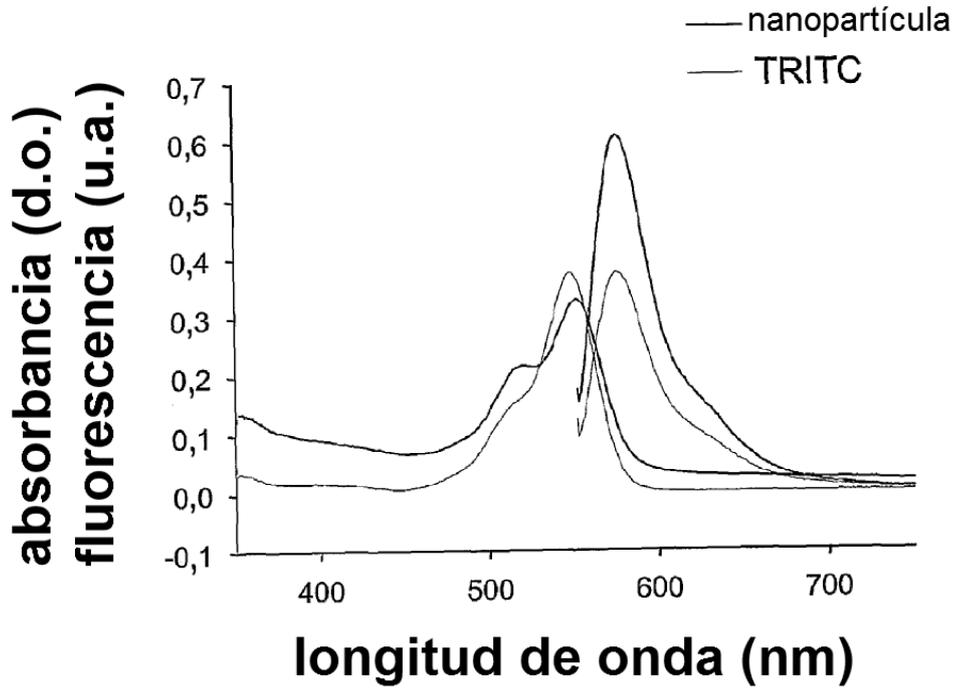
*Fig. 2D*



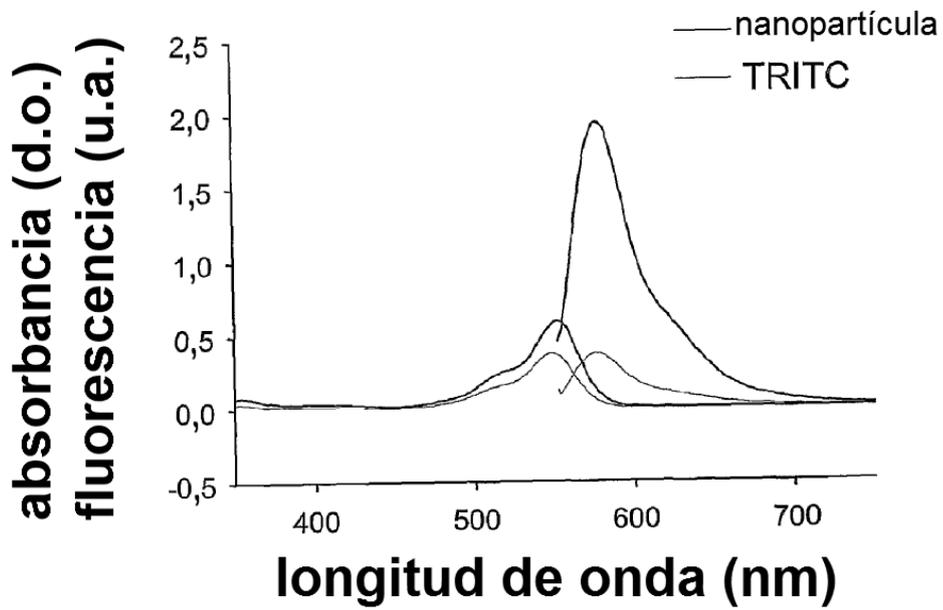
*Fig. 2E*



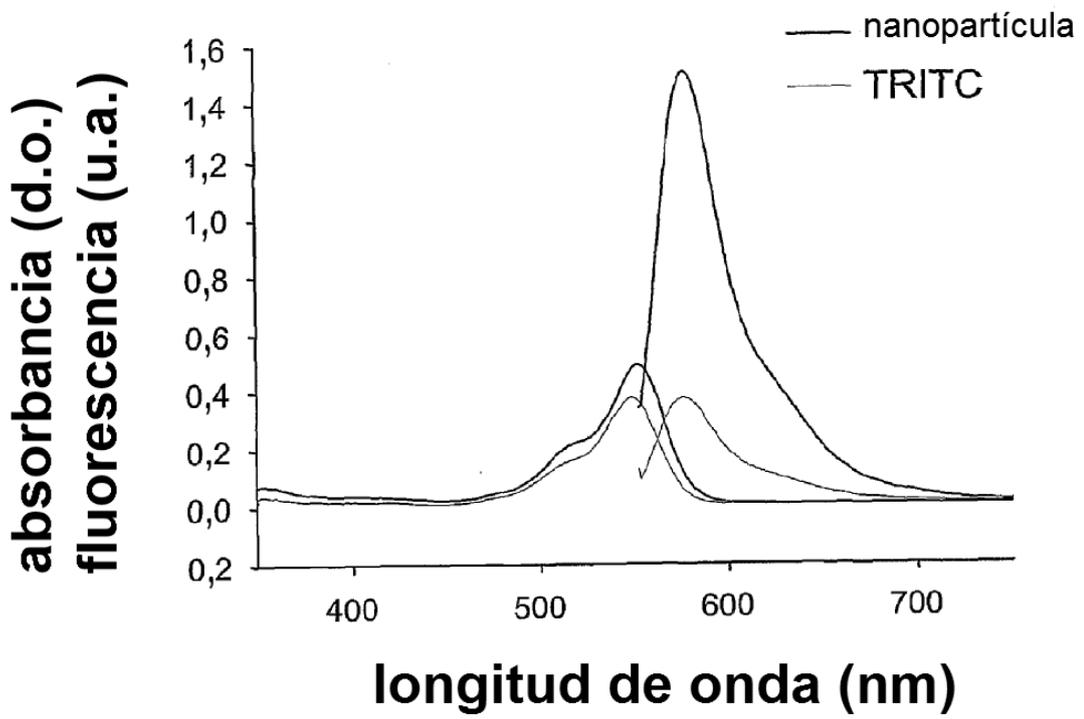
*Fig. 2F*



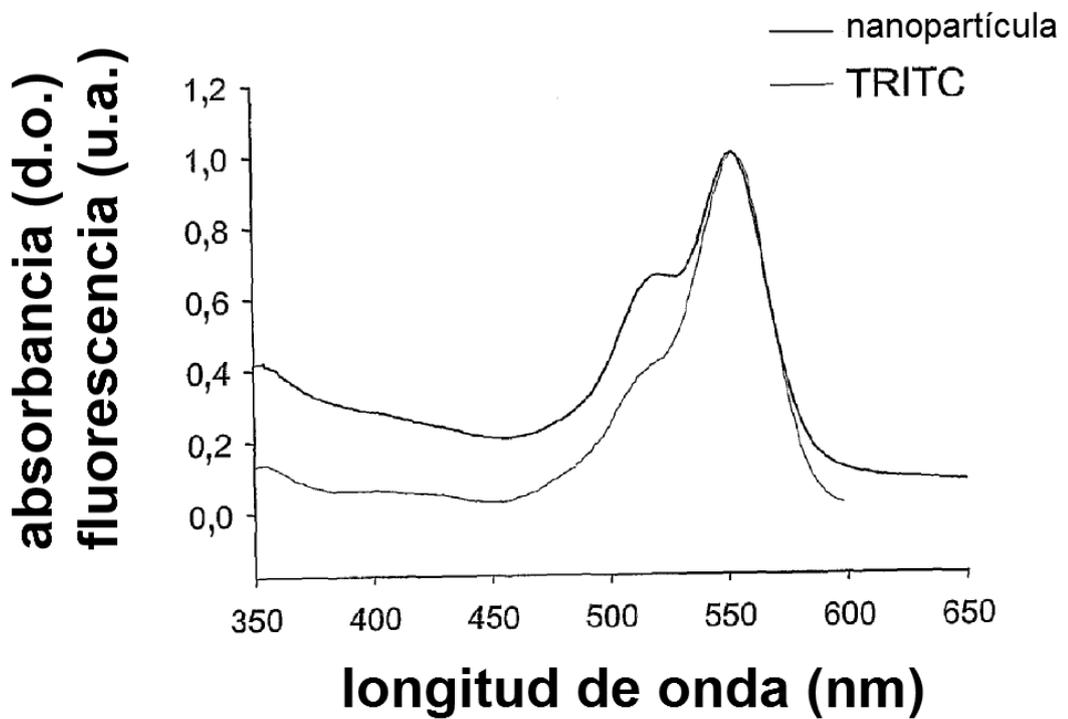
*Fig. 3A*



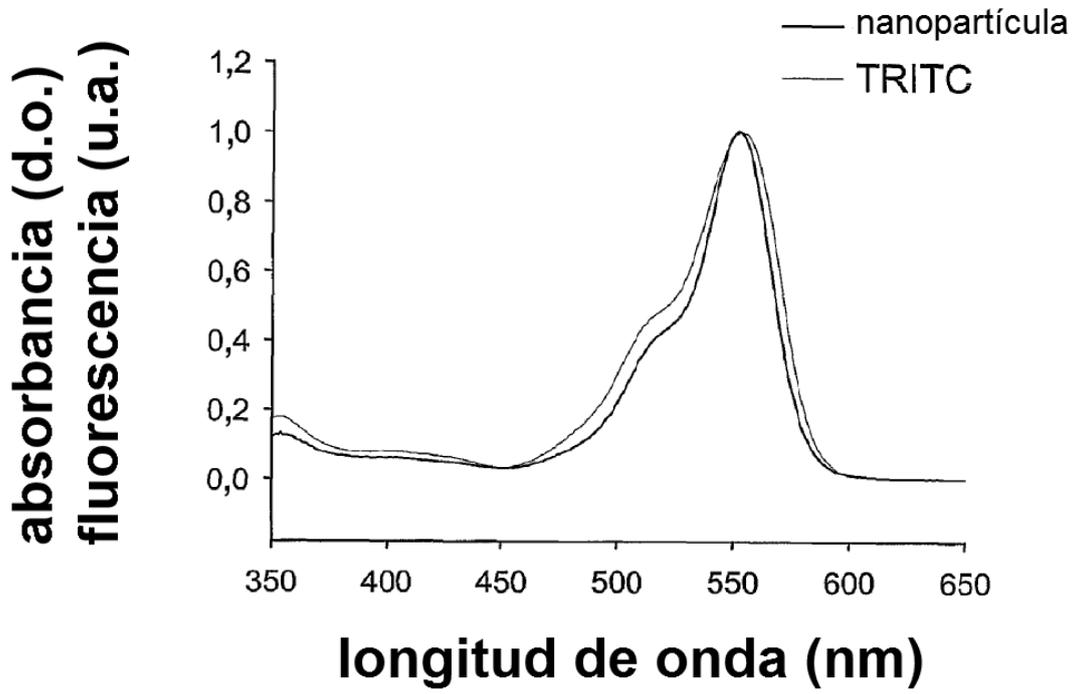
*Fig. 3B*



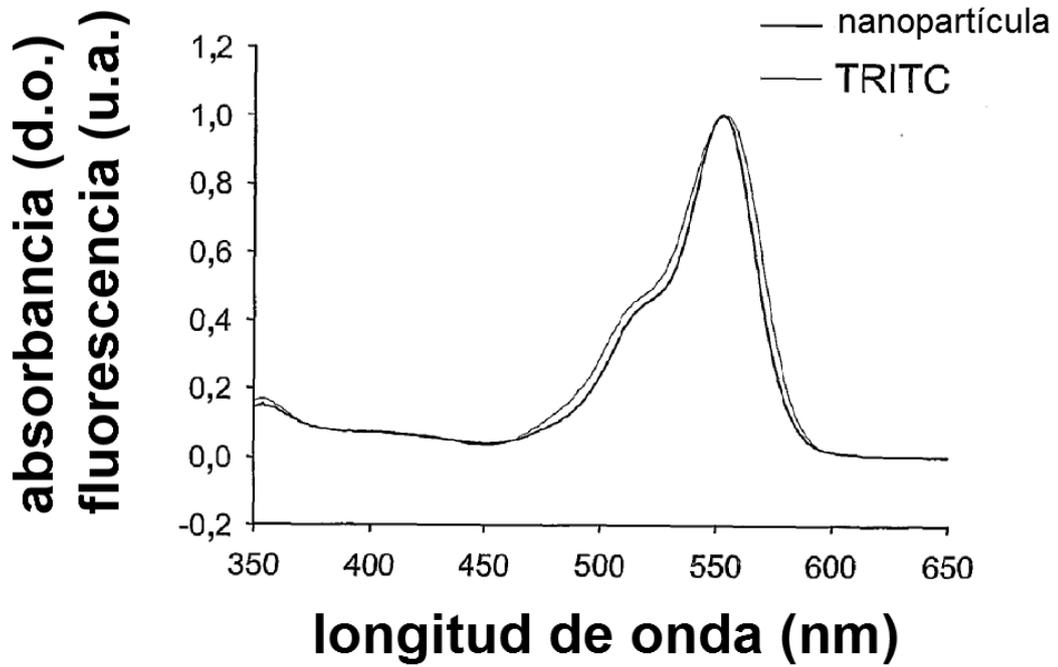
*Fig. 3C*



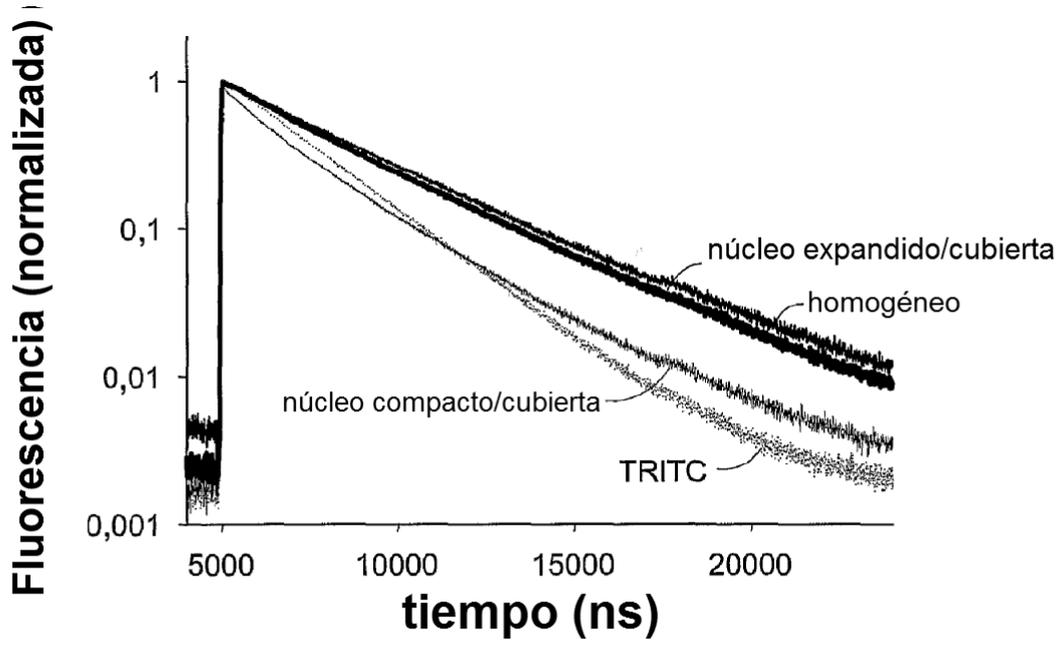
*Fig. 3D*



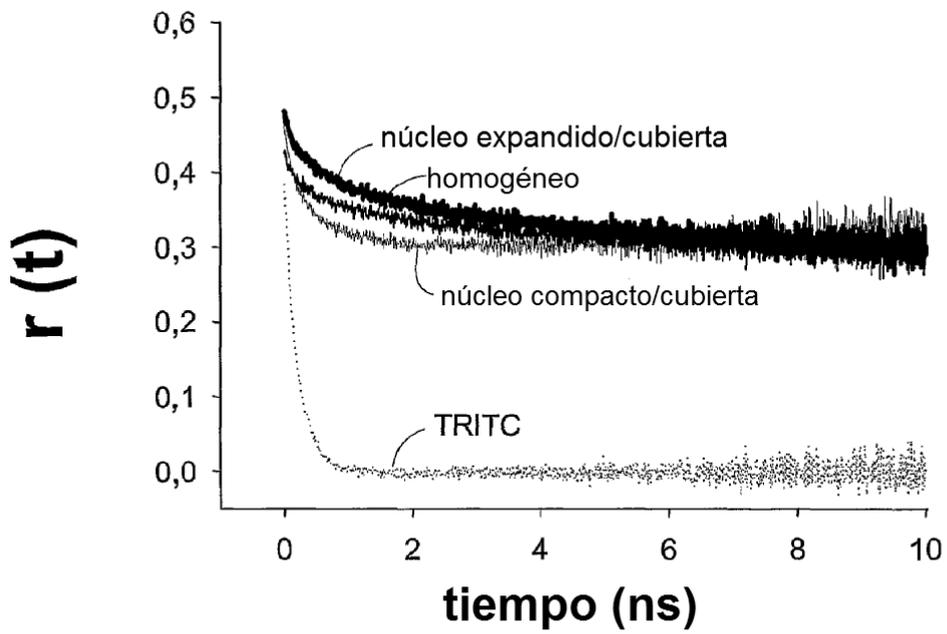
*Fig. 3E*



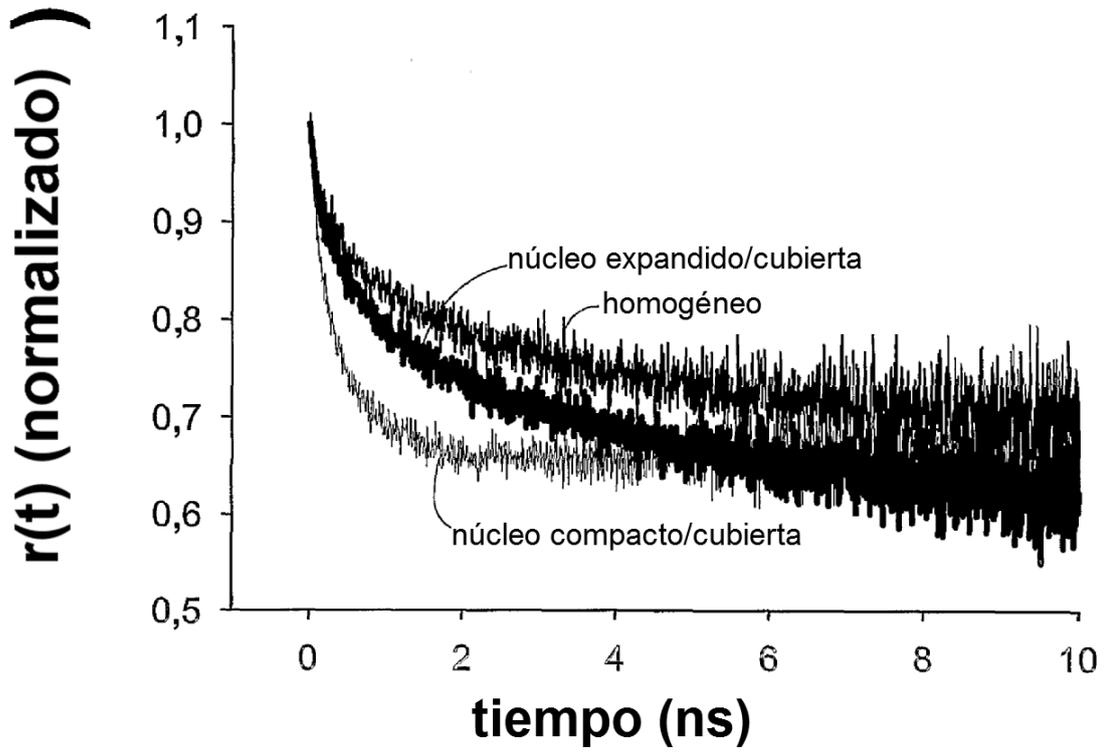
*Fig. 3F*



*Fig. 4A*



*Fig. 4B*



*Fig. 4C*