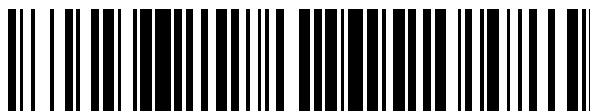


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 230**

51 Int. Cl.:

A61K 33/24 (2009.01)

B22F 1/00 (2006.01)

B22F 9/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2017** **PCT/FR2017/050131**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.07.2017** **WO17125695**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2017** **E 17706280 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019** **EP 3405304**

54 Título: **Nanopartículas de oro y procedimiento ecológico de preparación**

30 Prioridad:

22.01.2016 FR 1650520

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

27.05.2020

73 Titular/es:

TORSKAL (100.0%)
2 rue Maxime Rivière
97490 Sainte-Clotilde, FR

72 Inventor/es:

MOREL, ANNE-LAURE

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 763 230 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 oro y procedimiento ecológico de preparación

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nanopartículas de oro y a sus aplicaciones médicas y cosméticas. La presente invención se refiere igualmente a un procedimiento ecológico de preparación de dichas nanopartículas a partir de extractos de plantas y de una solución acuosa de sales de oro

10 Las nanopartículas que se pueden obtener mediante el procedimiento de la invención se pueden usar en diversas aplicaciones, particularmente en medicina o cosmética, por ejemplo, como catalizador, sensor, marcador para microscopía electrónica, terapia génica, vector de un principio activo, diagnóstico, radioterapia, terapia por hipertermia, formación de imágenes...

15 **Estado de la técnica**

Las nanopartículas se usan cada vez más en la medicina y en la cosmética. Estas pueden ser de naturaleza metálica o no metálica y tienen un tamaño no superior a unos centenares de nanómetros. La naturaleza de las nanopartículas les confiere propiedades características.

25 Las nanopartículas de oro son objeto de un gran interés en la nanomedicina. Tienen la ventaja de poseer una resonancia de plasmones de superficie única que las hace particularmente interesantes en medicina (diagnóstico, terapia, investigación...). Además, no se oxidan, son inertes y biocompatibles. Las nanopartículas de oro también se pueden acoplar a moléculas biológicas tales como anticuerpos, péptidos u otras, incluso a moléculas inorgánicas.

30 Convencionalmente, las nanopartículas metálicas se sintetizaban mediante procedimientos químicos cuyos reactivos o productos de reacción podían ser tóxicos. Por lo general, el agente reductor usado era el citrato (Turkevich, 1951). Estos procedimientos requerían lavados de las nanopartículas para intentar eliminar los agentes tóxicos. Estas nanopartículas, debido a su procedimiento de síntesis, podían conllevar problemas de estabilidad, de reactividad, de biocompatibilidad, o incluso podían llegar a ser inadecuadas para la conjugación con biomoléculas, ya que los reactivos de síntesis producían una inactivación de la biomolécula.

35 Ha sido necesario desarrollar nuevos procedimientos de síntesis, más respetuosos con el medio ambiente y que mejoran la biocompatibilidad, la estabilidad y la reactividad de las nanopartículas de oro.

Así, en el estado de la técnica se conocen procedimientos respetuosos con el medio ambiente que usan extractos de plantas para reducir las sales de oro.

40 La solicitud de patente WO2005/095031 describe un procedimiento para la síntesis de nanopartículas mono- y bimetalicas de tamaños y formas diferentes, mediante reacción de las sales metálicas con extractos reductores de diferentes partes de plantas a una temperatura comprendida entre 15 °C y 100 °C. Las plantas en esta solicitud de patente son, por ejemplo, variedades de canela, de limón, de jazmín, de camomila, de rosa...

45 La patente US8333994 describe nanopartículas de oro biocompatibles estabilizadas con extractos de plantas ricos en polifenoles o ricos en flavonoides o compuestos reactivos fitoquímicos. El procedimiento es respetuoso con el medio ambiente. En esta patente, se mezcla una solución acuosa que contiene sales de oro con los extractos de plantas ricos en polifenoles o ricos en flavonoides. La solución de sales de oro se mezcla, por ejemplo, con té negro, cúrcuma o canela.

50 Kumar *et al.* (2009, *J Chem Technol Biotechnol*) describen un procedimiento ecológico de preparación de nanopartículas de oro biocompatibles y estables que comprende la preparación de al menos un extracto de una planta rico en flavonoides y la mezcla posterior de al menos uno de dichos extractos de una planta con una solución acuosa de al menos una sal de oro. Las plantas de las que proceden los extractos ricos en flavonoides son, por ejemplo, el geranio, la citronela, la canela, el aloe vera...

55 **Inconvenientes de la técnica anterior**

60 Los procedimientos que requieren productos químicos presentan el inconveniente de no ser respetuosos con el medio ambiente y las nanopartículas de oro obtenidas pueden presentar problemas de estabilidad, reactividad, toxicidad o biocompatibilidad, en particular durante las inyecciones posteriores de las mismas en el organismo debido a una disociación de las moléculas (tóxicas) que las estabilizan en solución. Estas moléculas, por tanto, pueden ser las responsables de los efectos secundarios observados.

65 Los procedimientos del estado de la técnica que utilizan extractos de plantas llevan mayoritariamente a la generación de partículas de oro esféricas inestables en solución acuosa. Es conocido que la forma de las nanopartículas influye directamente sobre la capacidad de las nanopartículas para alcanzar el microentorno de los

tumores y, por tanto, sobre la eficacia del tratamiento (Stylianopoulos *et al.*). El tamaño y la forma de las nanopartículas se ven influidos por la composición de antioxidantes de los extractos de plantas. Tres factores determinan el tamaño y la forma de las nanopartículas: el poder reductor de los polifenoles, su concentración en el extracto y la naturaleza o la concentración de los agentes estabilizantes (Elia *et al.*, 2014). Muy a menudo los procedimientos de extracción ecológicos conducen a una acumulación de agentes polifenólicos de naturalezas diferentes (ácidos fenólicos, catequina, epicatequina, antocianos flavonoides, taninos, etc.) que no permiten la estabilización a largo plazo de las nanopartículas en solución (Krishnaswamy *et al.*, 2014).

A fin de aumentar la eficacia de estas nanopartículas, tanto desde el punto de vista de su capacidad para alcanzar las células diana como para mejorar su eficacia, es primordial encontrar procedimientos respetuosos con el medio ambiente que permitan obtener nanopartículas de oro monodispersadas, estables, más eficaces para generar hipertermia, biocompatibles y cuya forma sea controlada y uniforme.

Solución proporcionada por la invención

La presente invención se propone subsanar los inconvenientes de la técnica anterior mediante un procedimiento ecológico de preparación de nanopartículas de oro biocompatibles y estables que consiste en reducir sales metálicas usando al menos un extracto de una planta rico en flavonoides, en particular un extracto de *Hubertia ambavilla* o de *Hypericum lanceolatum*. Las nanopartículas de oro así obtenidas presentan propiedades mejoradas con respecto a las de las nanopartículas de la técnica anterior.

Descripción detallada de la invención

Un primer objeto de la invención se refiere a un procedimiento ecológico de preparación de nanopartículas de oro biocompatibles y estables que comprende:

- a. La preparación de al menos un extracto de una planta rico en flavonoides
- b. La mezcla de al menos uno de dichos extractos de una planta con una solución acuosa de al menos una sal de oro,

caracterizado por que el extracto de una planta rico en flavonoides es un extracto de *Hubertia ambavilla* o de *Hypericum lanceolatum*.

La *Hubertia ambavilla* es una especie endémica de la Isla de la Reunión y de la Isla Mauricio. Este pequeño arbusto es particularmente abundante en Reunión donde se encuentra principalmente a una altitud de entre 1000 y 2000 m. Esta planta se usa en la medicina tradicional de Reunión en tisana para tratar la gastroenteritis en lactantes o en decocción para tratar problemas cutáneos (miliaria, eccema, quemaduras, pruritos, llagas, inflamaciones...). Esta planta tiene también propiedades contra la úlcera de estómago y propiedades antiviricas contra el herpes y el virus de la poliomielitis.

La *Hypericum lanceolatum* es una especie de hierba de San Juan arborescente originaria de la Isla de la Reunión. Es conocida también con el nombre de flor amarilla. Se encuentra igualmente en África, de Guinea Ecuatorial a Tanzania. El aceite esencial de las flores de esta planta se usa en fitoterapia. Esta planta se emplea en la medicina tradicional de Reunión en forma de tisana para aliviar los ardores de estómago, contra las afecciones urinarias, para aliviar y regular las reglas dolorosas e, incluso, contra la fiebre. Se han demostrado sus propiedades antirradicalarias y antioxidantes.

De acuerdo con modos alternativos de realización de la invención, el extracto de una planta rico en flavonoides puede ser un extracto total crudo de dicha planta o un tótum de flavonoides de dicha planta, específicamente:

- un extracto total crudo de *Hubertia ambavilla*.
- un extracto total crudo de *Hypericum lanceolatum*.
- un tótum de flavonoides de *Hubertia ambavilla*.
- un tótum de flavonoides de *Hypericum lanceolatum*.

Ventajosamente, el extracto de una planta comprende flavonoides seleccionados entre rutina, quercitina, hiperósido e isoquercitina o una combinación de al menos dos de ellos.

De acuerdo con un modo de realización particular, el extracto de plantas comprende rutina y quercitina. Ventajosamente, el extracto de una planta que comprende rutina y quercitina es un tótum de flavonoides. El tótum de flavonoides que comprende rutina y quercitina es un tótum de flavonoides extraído de *Hypericum lanceolatum*.

De acuerdo con otro modo de realización, el extracto de plantas comprende hiperósido e isoquercitina. Ventajosamente, el extracto de una planta que comprende hiperósido e isoquercitina es un tótum de flavonoides. El tótum de flavonoides que comprende hiperósido e isoquercitina es un tótum de flavonoides extraído de *Hubertia ambavilla*.

Ventajosamente, la relación molar de flavonoides con respecto a las sales de oro es de 21 cuando el procedimiento de preparación de nanopartículas de oro de acuerdo con la invención consiste en mezclar la solución de sales de oro con un tótum de flavonoides extraído de *Hubertia ambavilla* o de *Hypericum lanceolatum*.

5 En un modo de realización preferente, el extracto de una planta rico en flavonoides usado en el procedimiento de preparación de nanopartículas de oro es un extracto crudo de *Hubertia ambavilla* o de *Hypericum lanceolatum*.

10 El procedimiento de acuerdo con la invención es rápido. Los extractos de plantas y el tótum de flavonoides desempeñan también el papel de estabilizantes de las nanopartículas una vez formadas estas. Este comprende, por tanto, un número reducido de etapas. Después de obtener el extracto de una planta, el procedimiento se lleva a cabo en una etapa y en menos de un minuto. Este es mucho más rápido que los procedimientos químicos de la técnica anterior (Frens *et al.*, 1973, Zhao, 2013). A modo de ejemplo, la composición química de los extractos crudos de *Hubertia ambavilla* permanece muy estable pese a las variabilidades, asociadas a las estaciones, constatadas
15 generalmente en las otras especies florales (hiperósido/isoquercitina = 30). Los compuestos mayoritarios son pares de moléculas, con una relación estable, que participan así en la estabilización de las nanopartículas sin la adición de un agente estabilizante.

20 Las nanopartículas que se pueden obtener mediante el procedimiento de acuerdo con la invención tienen un diámetro comprendido entre 5 y 100 nm, ventajosamente entre 10 y 50 nm.

Se obtienen dos tipos de nanopartículas en función de la naturaleza del extracto de una planta usado en el procedimiento de preparación.

25 Las nanopartículas obtenidas mediante mezcla de un tótum de flavonoides de una planta con una solución acuosa de al menos una sal de oro son esféricas. Ventajosamente, estas nanopartículas esféricas tienen un diámetro de 15 nm.

30 Las nanopartículas obtenidas mediante mezcla de un extracto total crudo de una planta con una solución acuosa de al menos una sal de oro son anisótropas en forma de flor. Ventajosamente, estas nanopartículas en forma de flor tienen un diámetro de 40 a 80 nm.

Los dos tipos de nanopartículas obtenidas de acuerdo con el procedimiento de la invención tienen propiedades mejoradas con respecto a las nanopartículas descritas en el estado de la técnica.

35 Un segundo objeto de la invención se refiere a nanopartículas de oro anisótropas en forma de flor que comprenden una mezcla de oro y extracto crudo de *Hubertia ambavilla* o de *Hypericum lanceolatum*.

40 Esta forma particular "de flor" es inducida por la polimerización en solución de los polifenoles que son responsables al mismo tiempo de la reducción de las sales de oro, de la nucleación y el crecimiento de las nanopartículas en el espacio según los tres ejes x, y, z (es decir, en tres dimensiones) y de la estabilización de las mismas. Los inventores han demostrado que la cantidad de calor producida por estas nanopartículas en forma de flor, cuando se someten a una irradiación con infrarrojos, es superior a la de las nanopartículas esféricas descritas en la técnica anterior e, igualmente, a la de las nanopartículas esféricas producidas aplicando el procedimiento objeto de la
45 invención. Esta propiedad resulta sin duda de las interacciones electromagnéticas del haz incidente con los diferentes plasmones de superficie de la nanopartícula en forma de flor, lo que permite un aumento del calor liberado. Así, estas nanopartículas en forma de flor tienen una eficacia mayor para una misma dosis de radiación. Su mayor reactividad con respecto a las nanopartículas de la técnica anterior sugiere una mejor eficacia terapéutica. Estas nanopartículas son, además, estables y monodispersas. Su biodistribución también ha sido estudiada por los
50 inventores y los primeros resultados muestran que son capaces de acumularse en diferentes órganos, en particular en el hígado, el pulmón y el riñón.

Las nanopartículas en forma de flor de la invención, obtenidas mediante un procedimiento de química verde, presentan la ventaja de no contener ninguna traza de partículas tóxicas, al contrario que las nanopartículas descritas en la técnica anterior y obtenidas mediante un procedimiento químico.

55 Tal como se ha mencionado previamente, estas nanopartículas en forma de flor se obtienen mediante el procedimiento de acuerdo con la invención cuando el extracto de una planta es un extracto crudo de *Hubertia ambavilla* o de *Hypericum lanceolatum*.

60 Un tercer objeto de la invención se refiere al uso de las nanopartículas que se pueden obtener de acuerdo con el procedimiento de la invención en aplicaciones cosméticas, diagnósticas y terapéuticas.

65 Tal como se presenta en la parte experimental, las nanopartículas obtenidas mediante el procedimiento de la invención son particularmente reactivas, mediadores de hipertermia y presentan una biodistribución interesante para aplicaciones diagnósticas y terapéuticas.

En cosmética se pueden incluir en la formulación de productos cosméticos para la piel, el cabello y las uñas.

Asimismo, las nanopartículas que se pueden obtener mediante el procedimiento objeto de la invención son solubles en agua y son nanoteranósticas, es decir, pueden ser empleadas como agente diagnóstico y/o como agente terapéutico.

Las nanopartículas que se pueden obtener mediante el procedimiento de la invención están presentes en determinados tejidos que pueden desarrollar cánceres. Asimismo se pueden emplear al mismo tiempo en técnicas de formación de imágenes médicas o veterinarias y en técnicas de tratamiento médico o veterinario, por ejemplo, la hipertermia mediante fototerapia.

Ventajosamente, las células que serán la diana en estos métodos de formación de imágenes o de diagnóstico serán las células del hígado, del pulmón y del riñón.

Debido a sus propiedades, las nanopartículas que se pueden obtener mediante el procedimiento objeto de la invención están adaptadas particularmente al tratamiento del cáncer.

De forma general, las nanopartículas de oro son biocompatibles y poseen propiedades ópticas que permiten su uso en el campo médico (Jabeen F, *et al.*, 2014; Jiang Y., *et al.*, 2015; Shanmugam V., *et al.*, 2014). Ya se ha demostrado la posibilidad de usar las nanopartículas en la formación de imágenes *in vivo* con la ayuda de ultrasonidos (Arifin DR, *et al.*, 2011). Las nanopartículas también son útiles en el contexto de las terapias del cáncer por hipertermia mediante infrarrojos; el interés de este planteamiento reside en su aspecto poco invasivo y en la facilidad para su implementación (Song J. *et al.*, 2016).

Se han llevado a cabo ensayos para obtener nanopartículas nanoteranósticas que emplean la fototermia y la formación de imágenes; específicamente combinando conchas de oro con polímeros o, incluso, con ácido láctico (Ke H *et al.*, 2014). Actualmente, las nanopartículas de oro de cualquier forma y de cualquier tamaño se usan frecuentemente en terapia mediante hipertermia debido a su fotosensibilidad asociada a la resonancia plasmónica (Huang, X *et al.*, 2011). Esta propiedad se ha aprovechado en el tratamiento del cáncer. La aplicación de un láser sobre las nanopartículas localizadas sobre el sitio tumoral provoca un aumento del calor en la zona. Esto causa la desnaturalización de las proteínas y de las membranas celulares en el entorno inmediato de las nanopartículas, lo que induce la muerte de las células cancerosas (Shibu ES, *et al.*, 2013).

Los progresos del uso de las nanopartículas de oro en el tratamiento por hipertermia de los tejidos cancerosos están asociados a las capacidades del metal para absorber la radiación infrarroja y después, como respuesta en una segunda fase, emitir radiaciones infrarrojas. Para poner en práctica tal planteamiento terapéutico, conviene estudiar el entorno del tumor que se va a tratar para definir las radiaciones adecuadas y las temperaturas necesarias y aceptables. Recientemente, se han realizado trabajos en matemáticas para modelizar los efectos fototérmicos de las nanopartículas en las células y los tejidos (Nabil, M *et al.*, 2015; Peeters, S *et al.*, 2012). Las diferencias observadas en los intervalos de temperaturas en función de las nanopartículas consideradas han llevado a una modificación de la ecuación de Arrhenius (Li, D *et al.*, 2014; Clark, C.D. *et al.*, 2011). Esto permite seleccionar mejor los tamaños de las nanopartículas y las longitudes de onda de las radiaciones para provocar una hipertermia adecuada.

Las nanopartículas de acuerdo con la invención parecen particularmente adecuadas para el tratamiento del cáncer. Específicamente, estas nanopartículas de oro se obtienen mediante un procedimiento de síntesis denominado de "química verde" que no conlleva compuestos tóxicos. Además, las nanopartículas de oro obtenidas de acuerdo con el procedimiento objeto de la invención no presentan ninguna traza de productos tóxicos en su interior. Así, al contrario que otras nanopartículas, la inyección de estas nanopartículas no va acompañada de una inyección de productos tóxicos en el organismo, ni siquiera en trazas. Por esta razón son muy seguras.

A diferencia de los agentes nanoteranósticos actuales que no se dirigen específicamente a las dianas cancerosas, las nanopartículas de oro obtenidas de acuerdo con el procedimiento objeto de la invención se encuentran preferentemente en los pulmones, el hígado y los riñones, que son tejidos en los que son frecuentes los cánceres, particularmente el hígado. Además, estas se pueden funcionalizar con anticuerpos específicos de dianas antigénicas de los tejidos cancerosos de interés como ya se ha propuesto (Xu L. *et al.*, 2017). Se pueden funcionalizar también con moléculas no específicas de los tejidos diana pero que favorecen la dirección de las nanopartículas a dichos tejidos diana; ya que estas moléculas no específicas pueden ser particularmente moléculas que intervienen en el metabolismo particular de las células de dicho tejido diana.

Por último, las nanopartículas de oro obtenidas de acuerdo con el procedimiento objeto de la invención presentan un potencial hipertérmico elevado que es ventajoso por el hecho de que la dosis de radiación que se va a aplicar será proporcionalmente menos elevada.

Debido a todas estas propiedades, las nanopartículas de oro obtenidas de acuerdo con el procedimiento objeto de la invención son serios candidatos para aplicaciones antitumorales.

Así, en un modo de realización particular, la invención se refiere al uso de las nanopartículas que se pueden obtener mediante el procedimiento objeto de la invención para tratar el cáncer. Ventajosamente, los cánceres tratados con estas nanopartículas serán el cáncer de hígado, de pulmón y de riñón.

5 En otro modo de realización, las nanopartículas objeto de la invención se pueden funcionalizar con cualquier tipo de moléculas que permitan su dirección a un órgano, un tejido o un tipo de células específico, particularmente usando proteínas, en particular anticuerpos, polímeros o azúcares.

10 La presente invención se refiere igualmente a un método de diagnóstico y/o de tratamiento que comprende las etapas de:

- Administración de nanopartículas que se pueden obtener mediante el procedimiento objeto de la invención.
- Irradiación de las células o el tejido diana con una dosis adecuada de radiaciones electromagnéticas, por ejemplo de infrarrojos.
- Detección y/o destrucción de las células o el tejido irradiados que han incorporado dichas nanopartículas.

Ventajosamente, las células o el tejido diana son células cancerosas o un tejido canceroso.

20 Ventajosamente, las nanopartículas usadas en estos métodos son anisótropas, en forma de flor.

Las nanopartículas obtenidas mediante el procedimiento son monodispersas. Pueden ser administradas a una persona o a un animal, por ejemplo por vía oral o por vía intravenosa. Pueden estar marcadas o funcionalizadas para una mejor dirección de las mismas a las células o tejidos diana. Asimismo, pueden estar acopladas a técnicas que implican ondas electromagnéticas tales como TAC, IRM, SERS, RAMAN, para detectar y/o tratar y/o seguir la evolución de las diversas patologías, entre ellas diferentes tipos de cáncer.

La presente invención se comprenderá mejor a la luz de los ejemplos que siguen.

30 Descripción de las figuras

La figura 1 presenta imágenes tomadas mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) de nanopartículas de oro obtenidas de acuerdo con el procedimiento de la invención a partir de sales de oro reducidas por un extracto total crudo de hojas de *Hubertia ambavilla*. Las nanopartículas obtenidas tienen un diámetro de 40 nm y son anisótropas en forma de flor. Estas son monodispersas.

La figura 2 presenta imágenes tomadas mediante microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas de oro obtenidas de acuerdo con el procedimiento de la invención a partir de sales de oro reducidas por un tótom de flores de *Hubertia ambavilla*. Las nanopartículas obtenidas tienen un diámetro de 15 nm y son esféricas. Estas son monodispersas.

La figura 3 presenta imágenes tomadas mediante microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas de oro obtenidas de acuerdo con el procedimiento de la invención a partir de sales de oro reducidas por un extracto total crudo de flores de *Hypericum lanceolatum*. Las nanopartículas obtenidas tienen un diámetro de 40 nm y son anisótropas en forma de flor. Estas son monodispersas.

La figura 4 presenta el espectro UV para las nanopartículas de oro obtenidas mediante el procedimiento de la invención.

La figura 5 presenta el escaneado de las nanopartículas de oro sintetizadas mediante el procedimiento de la invención.

La figura 6 presenta en (A) una imagen óptica (campo luminoso) de una lámina de vidrio con una nanopartícula coloidal depositada (determinados agregados absorbentes están marcados con círculos). El agregado indicado por una flecha en (A) y (B) se ha enfocado con la luz láser (9,5 mW/μm² para 5 s). En (B) se forma una microburbuja al nivel de las nanopartículas. Seguidamente, el láser se enfoca en la posición señalada como X (sin coloides); En este caso no se forma ninguna burbuja.

La figura 7 presenta los espectros Raman obtenidos durante el enfoque sobre un pequeño agregado de nanopartículas depositadas sobre vidrio y rodeadas de agua (λ_{exc} = 660 nm, P = 2 mW/μm², tiempo de integración de 5 s). Se representan en ordenadas (y) la intensidad en pulsos/min y en abscisas (x) el número de onda (cm⁻¹).

Las figuras 8 a 12 representan imágenes tomadas mediante MET de cortes de tejidos de ratón que había recibido nanopartículas de oro. Las nanopartículas aparecen en forma de puntos negros.

60 Figura 8: (A) hígado no tratado con las nanopartículas; (B) hígado tratado con las nanopartículas (17 mg; 24 h).

Figura 9: (A) hígado tratado con las nanopartículas (27 mg; 24 h); (B) hígado tratado con las nanopartículas (37 mg; 24 h).

65 Figura 10: (A) pulmón no tratado con las nanopartículas; (B) pulmón tratado con las nanopartículas (7 mg;

24 h).

Figura 11: (A) riñón tratado con las nanopartículas (7 mg; 24 h); (B) riñón tratado con las nanopartículas (27 mg; 24 h).

Figura 12: riñón tratado con las nanopartículas (37 mg; 24 h).

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de extractos de plantas de *Hubertia ambavilla* y de *Hypericum lanceolatum*.

Se usan dos especies de plantas en la presente invención. La primera es *Hubertia ambavilla*, que es un arbusto endémico de la Isla de la Reunión. La segunda es *Hypericum lanceolatum* que es una especie de hierba de San Juan arborescente originaria de la Isla de la Reunión. Estas dos plantas son particularmente ricas en flavonoides, entre ellos la rutina y la quercitina para la *Hypericum lanceolatum* y la isoquercitina y el hiperósido para la *Hubertia ambavilla*.

a) Preparación de un extracto total crudo de las plantas

Se lavan plantas recién recogidas con agua desionizada. Se mezclan 3 gramos con 50 ml de agua desionizada y después la mezcla se calienta a 60 °C durante 5 min, lo que permite liberar la materia biológica mediante lisis de las células vegetales. A continuación se enfría el sobrenadante a temperatura ambiente y después sobre hielo durante 10 minutos. El sobrenadante enfriado se filtra a continuación sobre un filtro con porosidad de grado 2.

Cuando el material de partida es la *Hubertia ambavilla*, el extracto obtenido es verde.

Cuando el material de partida es la *Hypericum lanceolatum*, el extracto obtenido es marrón.

No se usa ningún disolvente orgánico en esta preparación.

b) Aislamiento del tótum de flavonoides de las plantas

El método de extracción utilizado es un método de maceración en frío. Se machacan las plantas sobre un tamiz de poros con un diámetro de 10 mm y después se dejan macerar con agitación a 150 rpm durante 20 h a temperatura ambiente. Se añade una mezcla de agua y de etanol en cantidades iguales a la mezcla en una relación sólido/disolvente de 1:20 para obtener el mejor rendimiento posible de compuestos fenólicos (Cujic N *et al.*). Tras la extracción, los macerados se filtran, se secan a baja presión (temperatura máxima del baño: 45 °C, presión entre 5 y 15 MPa (50 y 150 bar) y después se liofilizan durante 48 h.

El rendimiento de extracción para *Hubertia ambavilla* en estas condiciones es aproximadamente de un 50 %.

Ejemplo 2: Preparación de nanopartículas de oro mediante mezcla de extractos de las plantas *Hubertia ambavilla* y *Hypericum lanceolatum*.

a) Preparación de nanopartículas de oro en forma de flor con los extractos totales crudos

Se someten a reflujo 50 ml de una solución acuosa de ácido cloroáurico (HAuCl₄) 1 mM con agitación vigorosa en un matraz de fondo redondo de dos bocas sobre el que está situado un condensador de reflujo protegido de la luz. Cuando aparecen gotitas finas sobre las paredes del matraz, se añaden muy rápidamente 20 ml de una solución acuosa de extractos totales crudos de las plantas. La solución se vuelve rápidamente de color azul medianoche en 1 minuto. El matraz se retira después del baño de aceite y la solución se mantiene con agitación vigorosa durante 15 minutos más. La solución se mantiene finalmente a 4 °C protegida de la luz.

El diámetro de las nanopartículas así obtenidas se mide tal como se describe en el párrafo c) que sigue.

Las nanopartículas obtenidas tienen un diámetro medido mediante MET de aproximadamente 40 nm.

b) Preparación de nanopartículas de oro esféricas con un tótum de flavonoides

Se someten a reflujo 4 ml de una solución acuosa de tótum de flavonoides con agitación vigorosa en un matraz de fondo redondo de dos bocas sobre el que está situado un condensador de reflujo protegido de la luz. Cuando aparecen gotitas finas sobre las paredes del matraz, se añaden muy rápidamente 4 ml de una solución acuosa de HAuCl₄. La solución se vuelve rápidamente de color rojo-marrón en 1 minuto. El matraz se retira después del baño de aceite y la solución se mantiene con agitación vigorosa durante 15 minutos más. La solución se mantiene finalmente a 4 °C protegida de la luz.

El diámetro de las nanopartículas así obtenidas se mide tal como se describe en el párrafo c) que sigue.

Las nanopartículas obtenidas tienen un diámetro medido mediante MET de aproximadamente 15 nm.

- 5 Una relación molar específica entre los reactivos permite obtener nanopartículas de oro esféricas. Esta relación es la siguiente:

$$n(\text{flavonoides})/n(\text{HAuCl}_4) = 21$$

c) Caracterización de las nanopartículas obtenidas en función del procedimiento de preparación

• Diámetro de las nanopartículas

a) El diámetro de las nanopartículas obtenidas de acuerdo con los procedimientos descritos en los párrafos a) y b) anteriores, se mide mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), mediante difracción de la luz (DLS) y mediante microscopía de fuerza atómica (AFM).

Para el análisis de MET, las imágenes de microscopía electrónica se han registrado en un microscopio JEOL JEM 1011 que funciona a una tensión de aceleración de 100 kV - carbono y secados a temperatura ambiente. Para el análisis de DLS, el tamaño y la distribución de las partículas se han registrado en un analizador de granulometría por DLS (Analizador de tamaño de partículas 90 Plus, Brookhaven Instruments Corporation). Para el análisis de AFM, las muestras se han caracterizado mediante un PicoScan II de Molecular Imaging con una extensión MAC para "modo de adquisición".

Las imágenes obtenidas en MET muestran dos tipos de partículas: partículas esféricas e individuales de 15 nm de diámetro obtenidas con los extractos de tótum de flavonoides y nanopartículas no esféricas, en forma de flor obtenidas con los extractos totales crudos de las plantas. Estas últimas partículas en forma de flores, obtenidas con el extracto total crudo de *Hubertia ambavilla* o *Hypericum lanceolatum*, tienen un diámetro comprendido entre 40 y 80 nm. Cabe señalar que están constituidas por partículas con un tamaño de 15 nm de diámetro, bien individualizadas. Las más pequeñas se sintetizan con el tótum de flavonoides.

Las diferencias observadas entre las dos síntesis hacen pensar que el extracto crudo está compuesto por polifenoles que se polimerizan de forma multidireccional en el espacio en solución a lo largo de la etapa de quelación lo que lleva a la estructura de flor.

Los datos obtenidos en DLS muestran dos grandes grupos de nanopartículas. El primer grupo está constituido por partículas individuales que se pueden polimerizar para formar el segundo grupo, dímeros en solución. Los resultados obtenidos en el DLS muestran un tamaño medio de partículas nanométricas superior al de las obtenidas con los métodos MET y AFM. Estas diferencias se dan habitualmente en la bibliografía (Elia, 2014). Esto es debido a la técnica de DLS que mide el volumen hidrodinámico considerando la cohorte de biomoléculas (polifenoles) que envuelve a las partículas.

El tratamiento de la imagen obtenida en AFM da un tamaño medio de las nanopartículas en forma de flor de aproximadamente 33 nm. Las nanopartículas individuales tienen un tamaño medio de aproximadamente 15 nm.

Los tamaños de las diferentes nanopartículas medidas por los diferentes métodos se resumen en la Tabla 1.

AuNP@EBHA = Nanopartículas de oro (AuNP) obtenidas usando un extracto crudo de *Hubertia ambavilla*.

AuNP@EBHL = AuNP obtenidas usando un extracto crudo de *Hypericum lanceolatum*.

AuNP@F2HA = AuNP obtenidas usando un tótum de flavonoides de *Hubertia ambavilla*.

Tabla 1: Tamaño de las nanopartículas de acuerdo con el método usado.

	AuNP@EBHA	AuNP@EBHL	AuNP@F2HA
AFM	Banda ancha: 550-590 nm $\lambda_{\text{maxSPR}} = 550 \text{ nm}$	Banda ancha: 500-900 nm $\lambda_{\text{maxSPR}} = 670 \text{ nm}$	Banda estrecha $\lambda_{\text{maxSPR}} = 530 \text{ nm}$
TEM	Forma de flor Tamaño: 30-80 nm	Forma de flor Tamaño: 30-80 nm	Esférica Tamaño: 10-15 nm
DLS	Tamaño promedio: 109,7 nm, Polidispersidad: 0,19	Tamaño promedio: 82,5 nm, Polidispersidad: 0,28	ND

• Formas de las nanopartículas

Las figuras 1 a 3 muestran que se han obtenido ciertamente nanopartículas de oro mediante el procedimiento de acuerdo con la invención. Además, cuando se usa un extracto total crudo de las plantas, las nanopartículas son anisótropas y en forma de flor, mientras que cuando se usa un tótom de flavonoides las nanopartículas de oro son esféricas y más pequeñas. Las nanopartículas obtenidas de acuerdo con este procedimiento son monodispersas.

Se han comparado los espectros UV de un extracto de *Hypericum lanceolatum*, de nanopartículas obtenidas por reacción de sales de oro con un extracto de *Hypericum lanceolatum* y de nanopartículas obtenidas mediante el procedimiento convencional de Turkevich. La figura 4 presenta los espectros obtenidos, en **a** con los extractos de *Hypericum lanceolatum*, en **b** con las nanopartículas preparadas mediante reacción con un extracto de *Hypericum lanceolatum* y en **c** con las nanopartículas preparadas mediante reacción de acuerdo con el procedimiento de Turkevich. En el espectro **b**, aparece una banda a 568 nm que confirma la presencia de nanopartículas de oro anisótropas en forma de flor.

• Contraste de las nanopartículas estudiadas por escáner

Se ha verificado mediante tomografía la factibilidad de la detección por escáner (TAC) de las nanopartículas obtenidas mediante el procedimiento de acuerdo con la invención. Para tal fin se han escaneado tres muestras mediante tomografía computarizada:

- Muestra n.º 1: una gota de nanopartículas de oro preparadas a partir de citratos de acuerdo con Turkevich.
- Muestra n.º 2: el sobrenadante (extracto de planta solo).
- Muestra n.º 3: una gota de nanopartículas de oro preparadas a partir de un extracto crudo de *Hypericum lanceolatum*.

El escáner muestra una gota de nanopartículas sintetizadas a partir de sales de oro y un extracto de *Hypericum lanceolatum* (muestra n.º 3). Tras la ultracentrifugación, las muestras n.º 2 y n.º 1 no presentan diferencias de contraste significativas. Por el contrario, la muestra n.º 3 presenta un depósito negro en el fondo del tubo de ultracentrifugación que presenta un fuerte contraste (Figura 5). El contraste radiológico a 80 kVp de esa muestra n.º 3 es de 621 UH, frente a solamente 25 para el sobrenadante (muestra n.º 2) para una concentración de 6 mg Au/kg, es decir, 15 veces inferior a la de Boote *et al.* (datos no mostrados).

Boote *et al.* demostraron que existía una relación lineal entre la concentración de nanopartículas de oro y el contraste radiológico (expresado en UH). En los ensayos que efectuaron *in vitro*, las nanopartículas de oro de 20 nm presentan un contraste radiológico de aproximadamente 10 UH a 80 kVp para una concentración de 90 mg Au/kg. Los experimentos realizados en ratones revelan una acumulación mayoritaria de las nanopartículas de oro en el hígado, con una variación del contraste de +22,3 UH (por mg de Au absorbido/ 1 cm³) a 80 kVp y de +26,7 UH (por mg de Au absorbido/ 1 cm³) a 140 kVp en los tejidos del hígado. Los datos del bazo demuestran una variación de valores UH de +9,7 UH (por mg de Au absorbido/ 1 cm³) a 80 kVp y de +10,1 UH (por mg de Au absorbido/ 1 cm³) a 140 kVp. Otro equipo (Chanda *et al.*) han mostrado un contraste radiológico de aproximadamente 45 UH a 80 kVp para una concentración de 0,016 M [Au] (es decir, de aproximadamente 1,54 g Au/kg).

La comparación de los resultados obtenidos por otros equipos (presentados más arriba) con los obtenidos con las nanopartículas de la invención muestran que el contraste radiológico conseguido con las nanopartículas obtenidas con el procedimiento objeto de la invención es claramente superior al que se ha descrito previamente. Por tanto, las nanopartículas de la invención son particularmente adecuadas para la formación de imágenes.

• Rendimiento de síntesis

Los rendimientos de síntesis de las nanopartículas de oro obtenidas mediante el procedimiento de la invención que emplea un extracto total crudo de una planta o un tótom de flavonoides de la misma planta se presentan en la siguiente tabla 2:

Tabla 2. Rendimiento de síntesis de nanopartículas de oro con los diferentes extractos de las plantas.

	<i>Hubertia ambavilla</i>	<i>Hypericum lanceolatum</i>
Extracto total crudo	5 g/l	2,5 g/l
Tótom de flavonoides	25 g/l	30 g/l

La síntesis con el extracto total crudo de *Hubertia ambavilla* presenta un mejor rendimiento que la síntesis con el extracto total crudo de *Hypericum lanceolatum*.

El rendimiento de síntesis de nanopartículas de oro es ligeramente superior con el tótom de flavonoides de

Hypericum lanceolatum que con el de *Hubertia ambavilla*.

Los rendimientos de síntesis de nanopartículas de oro son mayores con los tótum de flavonoides que con los extractos totales crudos.

Los rendimientos obtenidos con los tótum de flavonoides se han comparado con los rendimientos obtenidos con un solo flavonoide. El tótum de flavonoides de *Hubertia ambavilla* contiene principalmente hiperósido y un poco de isoquercitina. El empleo del tótum de flavonoides de *Hubertia ambavilla* en el procedimiento de acuerdo con la invención supone la obtención de nanopartículas de oro esféricas y estables. A la inversa, la reacción de sales de oro con la isoquercitina sola o con el hiperósido solo supone la síntesis de nanopartículas de oro no estables y un rendimiento de 20 g/l, inferior al rendimiento obtenido con el tótum de flavonoides. Por tanto, hay una acción sinérgica entre el hiperósido y la isoquercitina.

El tótum de flavonoides de *Hypericum lanceolatum* contiene principalmente rutina y un poco de quercitina. El empleo de este último en el procedimiento de acuerdo con la invención supone la obtención de nanopartículas de oro esféricas y estables. A la inversa, la reacción de sales de oro con la rutina sola o con la quercitina sola no permite la síntesis de nanopartículas de oro. Por tanto, hay una acción sinérgica entre la rutina y la quercitina.

Ejemplo 3: Estudio de la fototermia de las nanopartículas de oro *in vitro*

Se ha estudiado *in vitro* la capacidad de las nanopartículas para emitir calor bajo radiación infrarroja. Las AuNP empleadas en este experimento se han obtenido mediante mezcla con un tótum de flavonoides de *Hubertia ambavilla*.

Se sabe que las nanopartículas de oro presentan un gran potencial para el tratamiento de tumores por hipertermia. Su eficacia, sin embargo, dependerá de su tamaño, de su forma o del estado de su superficie.

Con el fin de evaluar la potencia de la radiación láser de la muestra alrededor de la resonancia plasmónica de las nanopartículas empleadas así como el tiempo de exposición requerido para alcanzar una temperatura suficiente para el tratamiento fototérmico de las células, se ha estudiado la generación de microburbujas mediante iluminación continua de las ondas. De acuerdo con Baffou *et al.* (*J. Phys. Chem. C* 2014, 118, 4890), la temperatura local requerida para iniciar la generación de burbujas es de aproximadamente 220 °C.

Resultados

Se visualizaron pequeños agregados de nanopartículas mediante microscopía óptica utilizando un objetivo de 80X, 0,75 AN. Las manchas negras más pequeñas observadas en campo claro pueden corresponder a agregados con un tamaño de aproximadamente 200 nm (figura 6A). No se pudieron localizar nanopartículas individuales debido al límite de difracción. Después de haber registrado una primera imagen óptica con un láser apagado, la luz láser (exc = 660 nm) se enfocó sobre el agregado durante un tiempo fijo. Se registró a continuación una segunda imagen óptica después de cortar la luz láser. Tal como muestra la Fig. 6B, se formó una microburbuja con una exposición de 5 s y una radiación de 9,5 mW/μm². Se repitió el mismo experimento 5 veces con otros agregados de tamaño similar que llevaba siempre a la formación de microburbujas para unas duraciones de exposición de entre 2 y 5 segundos con la misma radiación láser. Una radiación más elevada condujo a burbujas más grandes.

Se efectuaron también ensayos negativos: durante el enfoque de la luz láser lejos del agregado de nanopartículas, no se forma ninguna burbuja (posición X en la figura 6A). Las burbujas se generan a nivel de las NP y son debidas a la absorción plasmónica de las NP. Asimismo, la irradiación de agregados similares con 5 mW/μm² durante 30 segundos no produce microburbujas. El umbral de formación de las burbujas (T - 220 °C) está comprendido entre 5 y 9,5 mW/μm² de radiación láser. Puesto que el umbral se produce a alta temperatura, se podría suponer que la temperatura y, por tanto, la potencia necesaria para inducir la muerte celular, deberían ser menores. Para las medidas fototérmicas presentadas previamente en las células inmovilizadas, se ha seleccionado una radiación láser > 6 mW/μm². Se puede detectar una señal Raman débil (bandas anchas de carbono amorfo a -1300 y -1550 cm⁻¹) a partir de agregados de NP empleando 2 mW/μm² durante 5 s (Figura 7). La señal está presente siempre tras la formación de la burbuja (es decir, después del calentamiento) aunque con un fondo mucho menor.

La banda de plasmón de las nanopartículas de oro anisótropas de la invención se sitúa entre 600 y 700 nm, desplazada en más de 100 nm con respecto a las nanopartículas individuales en solución. Este desplazamiento puede ser el resultado de dos fenómenos. El primero corresponde al cambio de entorno durante la internalización de las nanopartículas. En ese caso, la nanopartícula puede cubrirse con proteínas u otras moléculas biológicas lo que conllevará un desplazamiento hacia el rojo de la resonancia plasmónica. El segundo fenómeno corresponde a la agregación de las nanopartículas en el medio celular lo que confirma las observaciones por microscopía en campo oscuro. Las resonancias plasmónicas de las nanopartículas se aproximan a las longitudes de onda de irradiación más elevadas (808 nm) consideradas de menor energía y, por tanto, menos destructivas para los organismos vivos.

Ejemplo 4: Estudio de la biodistribución *in vivo* de las nanopartículas de oro

Material y métodos

Modelos animales: Los ratones empleados en este protocolo experimental son ratones Swiss machos que pesan de 20 a 30 g y tienen una edad de 6 semanas procedentes de R. Janvier.

Síntesis de nanopartículas de oro: Las nanopartículas se sintetizaron por vía ecológica de acuerdo con los procedimientos de la presente invención y se caracterizaron mediante MET, DLS y AFM. Las nanopartículas de oro (AuNP) se inyectaron por vía intravenosa a los ratones a fin de efectuar el estudio de biodistribución. Todas las AUNP se administraron después de la centrifugación; estas se estabilizan en solución acuosa.

Descripción del protocolo experimental: Se efectúa una inyección de 200 µl de las diferentes soluciones por vía intravenosa. Para un ratón con un peso de aproximadamente 24 g, se administraron 200 µl.

Se inyectaron las soluciones siguientes de acuerdo con los protocolos ya descritos por Boote *et al.*, 2010 y Chanda *et al.*, 2014:

- NaCl (6 ratones)
- Producto 1 (AuNP@EBHL = AuNP obtenidas usando un extracto crudo de *Hypericum lanceolatum*)

Grupo A (6 ratones) = una inyección única de 7 mg/ml
Grupo B (6 ratones) = una inyección única de 2 mg/ml

- Producto 2 (AuNP@EBHA_A = AuNP obtenidas usando un extracto crudo de *Hubertia ambavilla*.)

Grupo A (6 ratones) = una inyección única de 7 mg/ml
Grupo B (6 ratones) = una inyección única de 2 mg/ml

- Producto 3 (AuNP@F2HA = AuNP obtenidas usando un tótum de flavonoides de *Hubertia ambavilla*)

Grupo A (6 ratones) = una inyección única de 7 mg/ml
Grupo B (6 ratones) = una inyección única de 2 mg/ml

Es decir, un total de 42 ratones.

A continuación se separan estos ratones en 2 grupos para cada concentración de cada producto.

El primer grupo se sacrificó al cabo de 6 h (3 ratones por producto y por concentración, es decir, un total de 27 ratones) y el segundo grupo se sacrificó al cabo de 24 h.

Por último, se extrajeron los diferentes órganos (hígado, cerebro, riñón, bazo, pulmón y corazón) a fin de estudiar la biodistribución de los diferentes productos.

Resultados

Tras la inyección de las AuNP por vía intravenosa, se analizaron los extractos de órganos mediante MET a fin de localizar las nanopartículas.

Se encontraron las nanopartículas acumuladas en los siguientes órganos: pulmones, riñones e hígado. Los resultados que corresponden a los ratones a los que se inyectó el producto 3 se ilustran en las figuras 8 a 12. Se obtiene una biodistribución similar con los productos 1 y 2 (datos no mostrados).

Estos resultados demuestran que la cantidad de AuNP encontradas en los diferentes órganos es proporcional a la cantidad administrada.

Referencias:

N. Cujic, K. Savikin, T. Jankovic, D. Pljevljakusic, G. Zdunic, S. Ibric, 2016. "Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique", *Food Chemistry*, 194, 135-142

T. Stylianopoulos, y R. K. Jain "Design considerations for nanotherapeutics in oncology." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 11(8): 1893-1907.

J.Turkevich, P. C. Stevenson y J. Hiller, Discusión. "A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold", *Faraday Soc.* 1951, 11, 55.

Jabeen F, Najam-ul-Haq M, Javeed R, Huck CW, Bonn GK. "Au-nanomaterials as a superior choice for near-

infrared photothermal therapy". *Molecules* (Basilea, Suiza). 2014; 19: 20580-93.

Jiang Y, Fei W, Cen X, Tang Y, Liang X. "Near-infrared Light Activatable Multimodal Gold Nanostructures Platform: An Emerging Paradigm for Cancer Therapy". *Current Cancer Drug Targets*. 2015; 15: 406-22.

Shanmugam V, Selvakumar S, Yeh CS. "Near-infrared light-responsive nanomaterials in cancer therapeutics". *Chemical Society Reviews*. 2014; 43: 6254-87.

Arifin DR, Long CM, Gilad AA, Alric C, Roux S, Tillement O, Link TW, Arepally A, Bulte JW. "Trimodal gadolinium-gold microcapsules containing pancreatic islet cells restore normoglycemia in diabetic mice and can be tracked by using US, CT, and positive-contrast MR imaging". *Radiology*. 2011; 260: 790-8.

Song J, Qu J, Swihart MT, Prasad PN. "Near-IR responsive nanostructures for nanobiophotonics: emerging impacts on nanomedicine". *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2016; 12: 771-88.

Ke H, Yue X, Wang J, Xing S, Zhang Q, Dai Z, Tian J, Wang S, Jin Y. "Gold nanoshelled liquid perfluorocarbon nanocapsules for combined dual modal ultrasound/CT imaging and photothermal therapy of cancer". *Small*. 2014; 10: 1220-7.

Huang, X.; El-Sayed, M.A. "Plasmonic photo-thermal therapy (PPTT). *Alex. J. Med.*, 2011, 47, 1-9.

Mackey, M.A.; Ali, M.R.K.; Austin, L.A.; Near, R.D.; El-Sayed, M.A. "The most effective gold nanorod size for plasmonic photothermal therapy: Theory and in vitro experiments". *J. Phys. Chem. B* 2014, 118, 1319-1326.

E. S. Shibu, M. Hamada, N. Murase, V. Biju, J. Photoch. Photobio. C 2013, 15, 53.

Nabil, M.; Decuzzi, P.; Zunino, P. "Modelling mass and heat transfer in nano-based cancer hyperthermia". *R. Soc. Open Sci.* 2015, 2, 150447

Peeters, S.; Kitz, M.; Preisser, S.; Wetterwald, A.; Rothen-Rutishauser, B.; Thalmann, G.N.; G.N.; Brandenberger, C.; Bailey, A.; Frenz, M. "Mechanisms of nanoparticle-mediated photomechanical cell damage". *Biomed. Opt. Express* 2012, 3, 435-446.

Li, D.; Wang, G.X.; He, Y.L.; Wu, W.J.; Chen, B. "A three-temperature model of selective photothermolysis for laser treatment of port wine stain containing large malformed blood vessels". *Appl. Therm. Eng.* 2014, 65, 308-321.

Clark, C.D.; Denton, M.L.; Thomas, R.J. "Mathematical model that describes the transition from thermal to photochemical damage in retinal pigment epithelial cell culture". *J. Biomed. Opt.* 2011, 16, 020504.

Xu L, Wan C, Du J, Li H, Liu X, Yang H, Li F., "Synthesis, characterization, and in vitro evaluation of targeted gold nanoshelled poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles carrying anti p53 antibody as a theranostic agent for ultrasound contrast imaging and photothermal therapy". *J Biomater Sci Polym Ed.* 3 de enero de 2017: 1-37.

Krishnaswamy, K., Vali, H., & Orsat, V. (2014). "Value-adding to grape waste: Green synthesis of gold nanoparticles". *Journal of Food Engineering*, 142, 210-220.

Elia, P., Zach, R., Hazan, S., Kolusheva, S., Porat, Z. E., & Zeiri, Y. (2014). "Green synthesis of gold nanoparticles using plant extracts as reducing agents". *International Journal of Nanomedicine*, 9, 4007.

Boote, E., Fent, G., Kattumuri, V., Casteel, S., Katti, K., Chanda, N., ... & Churchill, R. (2010). "Gold nanoparticle contrast in a phantom and juvenile swine: models for molecular imaging of human organs using x-ray computed tomography". *Academic Radiology*, 17(4), 410-417.

Chanda, N., Upendran, A., Boote, E. J., Zambre, A., Axiak, S., Selting, K., ... & Singh, J. (2014). "Gold nanoparticle based X-ray contrast agent for tumor imaging in mice and dog: a potential nanoplatform for computer tomography theranostics". *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 10(3), 383-392.

Frens, G. (1973) "Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions". *Nature*, 241(105), 20-22.

Turkevich, J., Stevenson, P. C., & Hillier, J. (1951). "A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold". *Discusiones Faraday Society*, 11, 55-75.

Zhao, P., Li, N., & Astruc, D. (2013). "State of the art in gold nanoparticle synthesis". *Coordination Chemistry Reviews*, 257(3), 638-665.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento ecológico de preparación de nanopartículas de oro biocompatibles y estables que comprende:

- a. La preparación de al menos un extracto de una planta rico en flavonoides
 - b. La mezcla de al menos uno de dichos extractos de una planta con una solución acuosa de al menos una sal de oro
- caracterizado por que** el extracto de una planta rico en flavonoides es un extracto de *Hubertia ambavilla* o de *Hypericum lanceolatum*.

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el extracto de una planta rico en flavonoides es un extracto total crudo de dicha planta o un tótum de flavonoides de dicha planta.

3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por que** el extracto de una planta comprende flavonoides seleccionados entre rutina, quercitina, hiperósido e isoquercitina o una combinación de al menos dos de ellos.

4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** las nanopartículas tienen un diámetro comprendido entre 5 y 100 nm, medido mediante microscopía electrónica de transmisión.

5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** las nanopartículas son esféricas, habiendo obtenido dichas nanopartículas esféricas mediante mezcla de un tótum de flavonoides de una planta con una solución acuosa de al menos una sal de oro.

6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado por que** las nanopartículas son anisótropas en forma de flor, habiendo obtenido dichas nanopartículas de oro en forma de flor mediante mezcla de un extracto total crudo de una planta con una solución acuosa de al menos una sal de oro.

7. Nanopartícula de oro anisótropa en forma de flor que comprende una mezcla de oro y un extracto crudo de *Hubertia ambavilla* o de *Hypericum lanceolatum*.

8. Nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 7 cuyo diámetro está comprendido entre 40 y 80 nm, cuando se mide mediante microscopía electrónica de transmisión.

9. Nanopartícula de acuerdo con una de las reivindicaciones 7 u 8, estando funcionalizada dicha nanopartícula con proteínas, en particular anticuerpos, polímeros o azúcares.

10. Nanopartícula de acuerdo con una de las reivindicaciones 7 a 9, o que se puede obtener mediante el procedimiento definido en una de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso como medicamento.

11. Nanopartículas de acuerdo con la reivindicación 10 para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 para tratar el cáncer.

12. Nanopartículas de acuerdo con la reivindicación 11 para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el cáncer que se va a tratar se selecciona entre el cáncer de hígado, el cáncer de pulmón y el cáncer de riñón.

13. Uso de una nanopartícula de acuerdo con una de las reivindicaciones 7 a 9, o que se puede obtener mediante el procedimiento definido en una de las reivindicaciones 1 a 6, como herramienta de diagnóstico o de formación de imágenes.

14. Composición diagnóstica y/o terapéutica que comprende nanopartículas de acuerdo con una de las reivindicaciones 7 a 9, o que se puede obtener mediante el procedimiento definido en una de las reivindicaciones 1 a 6.

15. Composición cosmética que comprende nanopartículas de acuerdo con una de las reivindicaciones 7 a 9, o que se puede obtener mediante el procedimiento definido en una de las reivindicaciones 1 a 6.

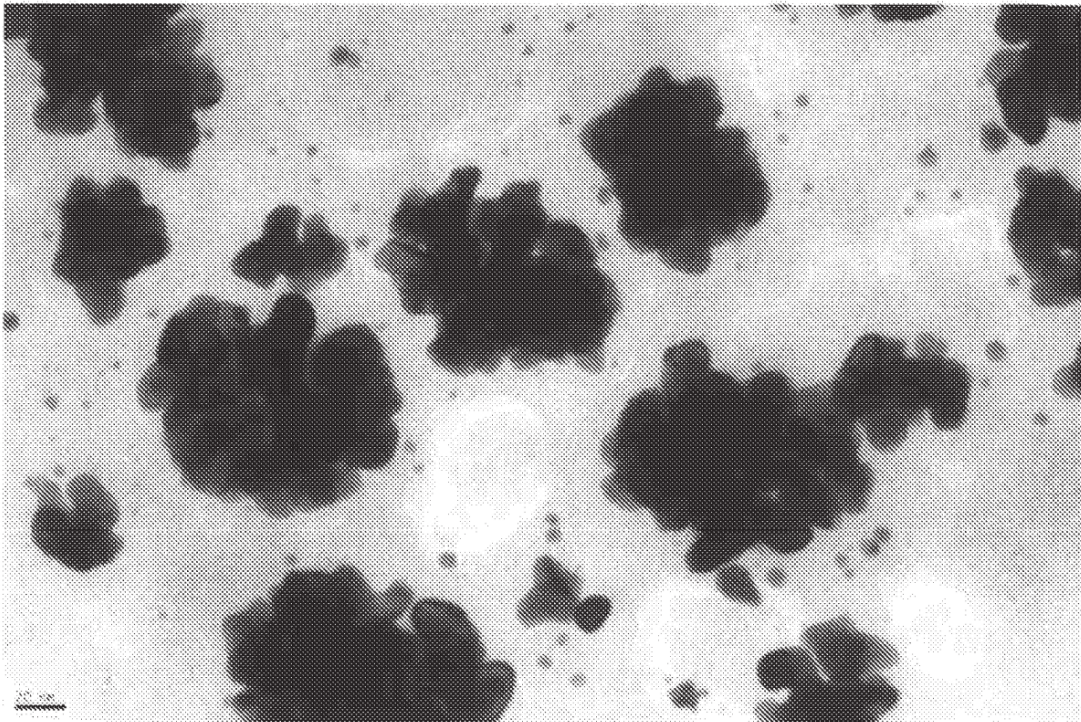


Figura 1

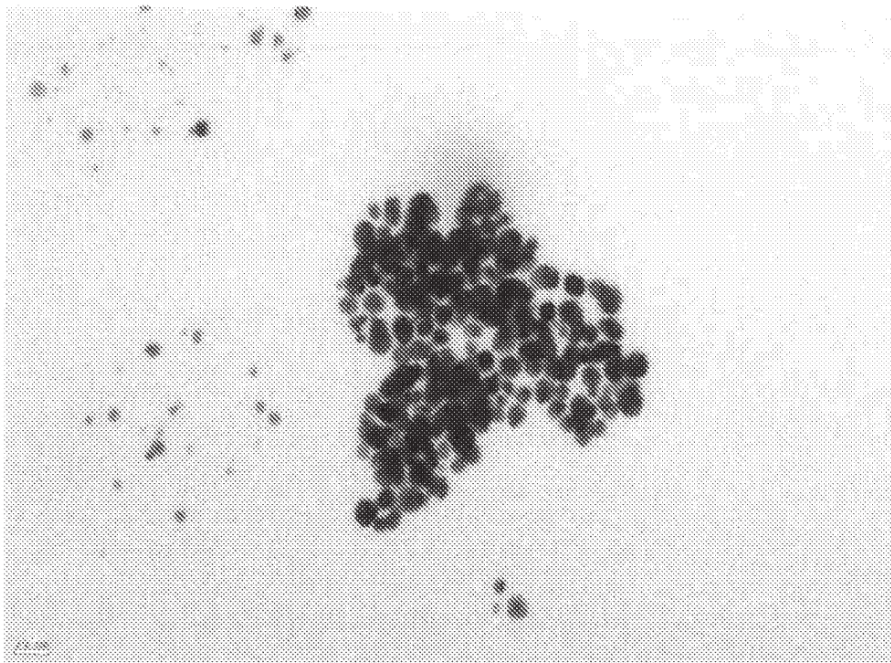


Figura 2

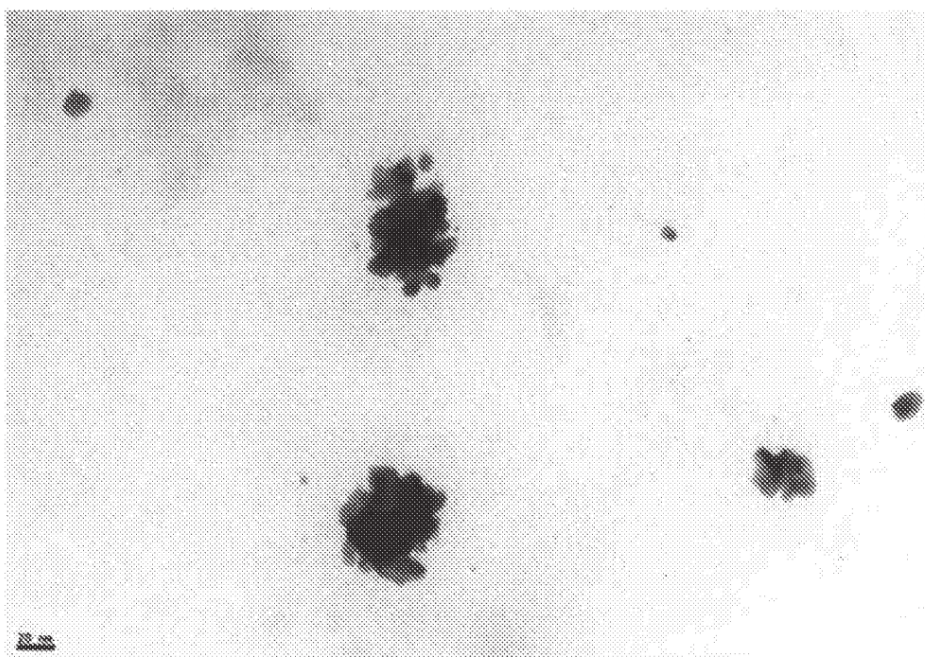


Figura 3

ESPECTRO UV VISIBLE

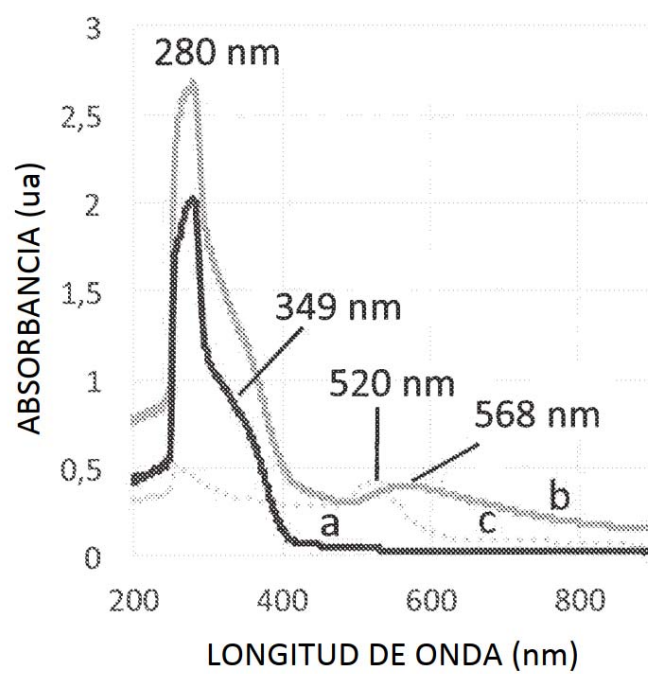


Figura 4

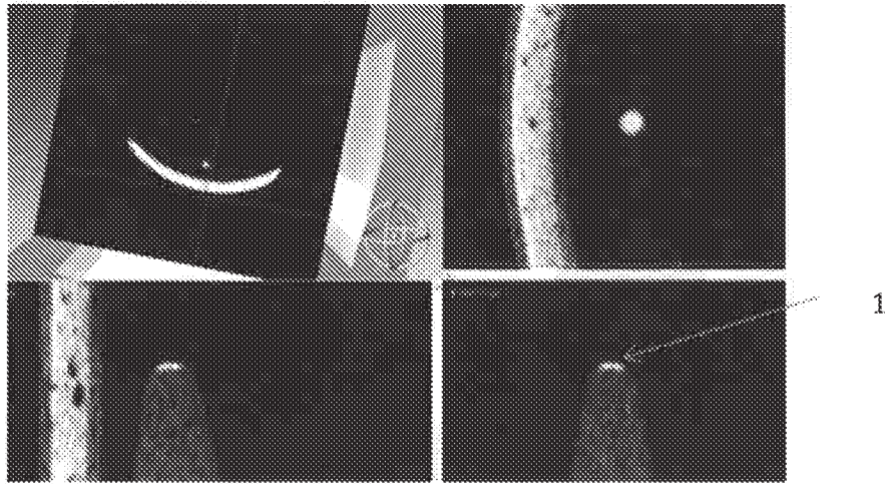


Figura 5

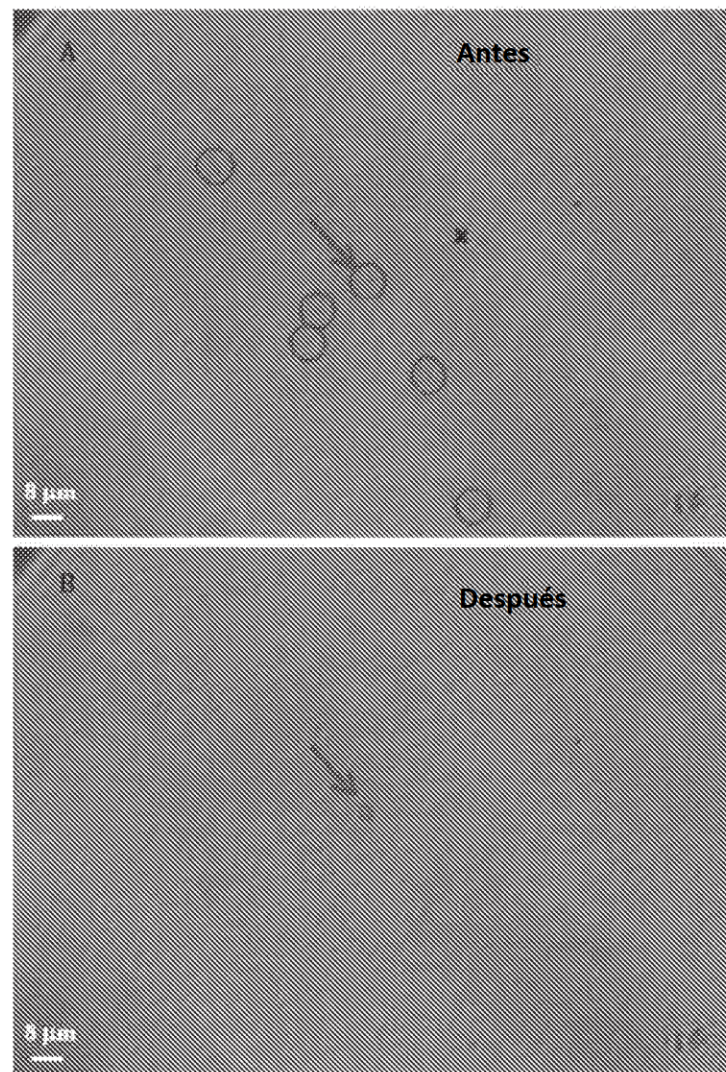


Figura 6

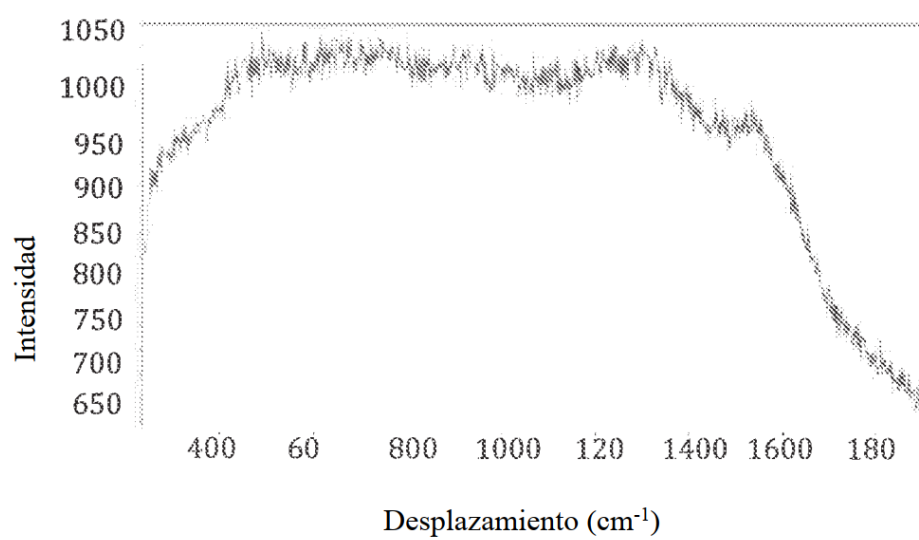
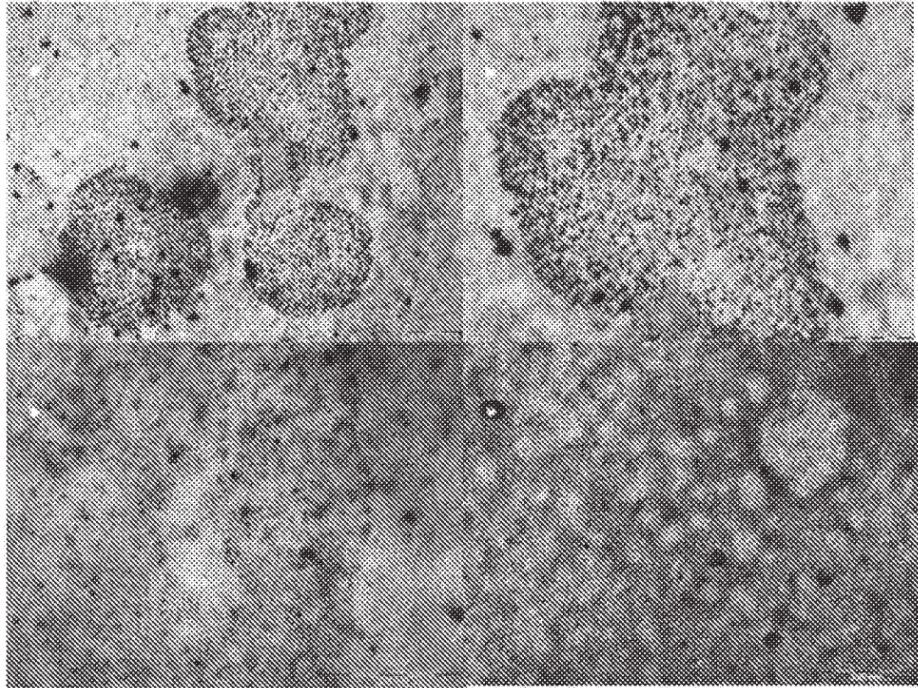


Figura 7

A



B

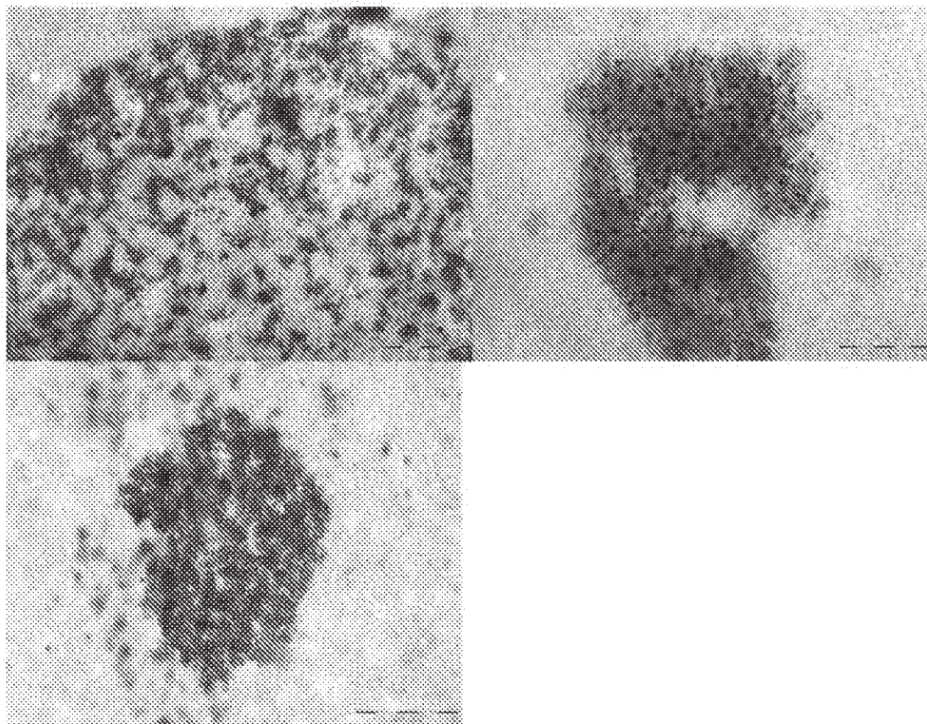


Figura 8

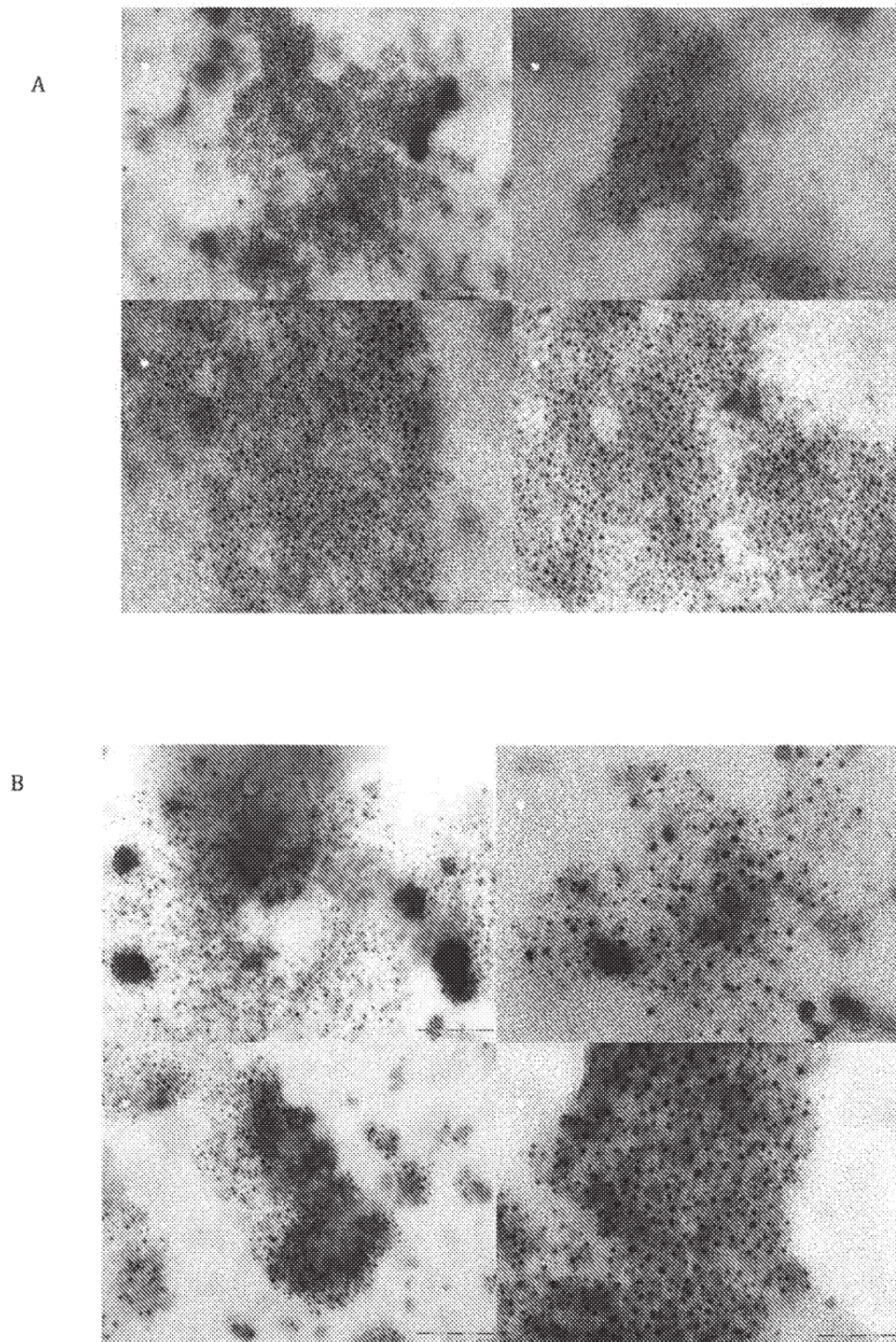
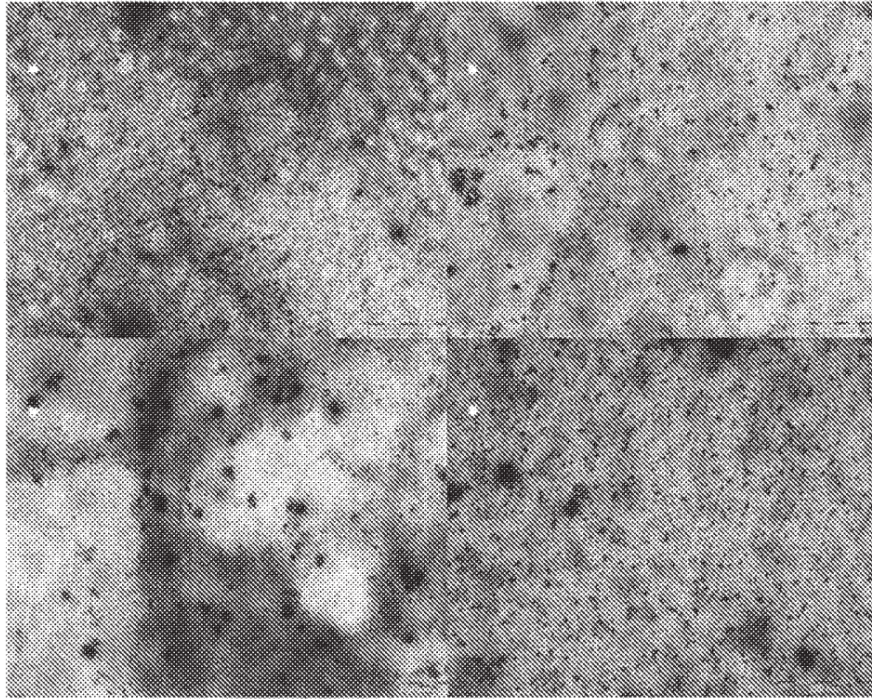


Figura 9

A



B

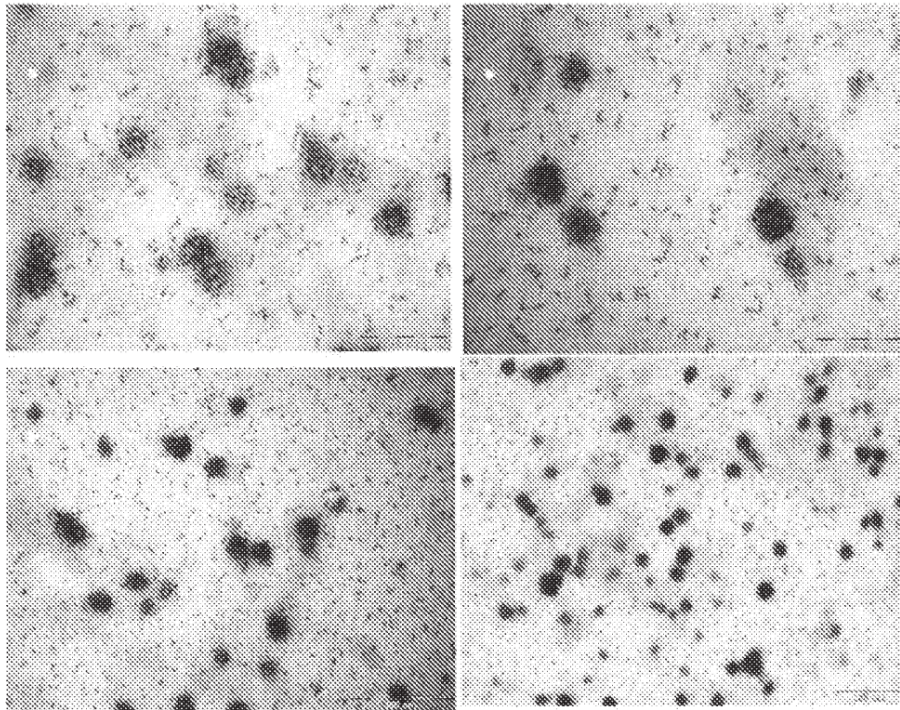


Figura 10

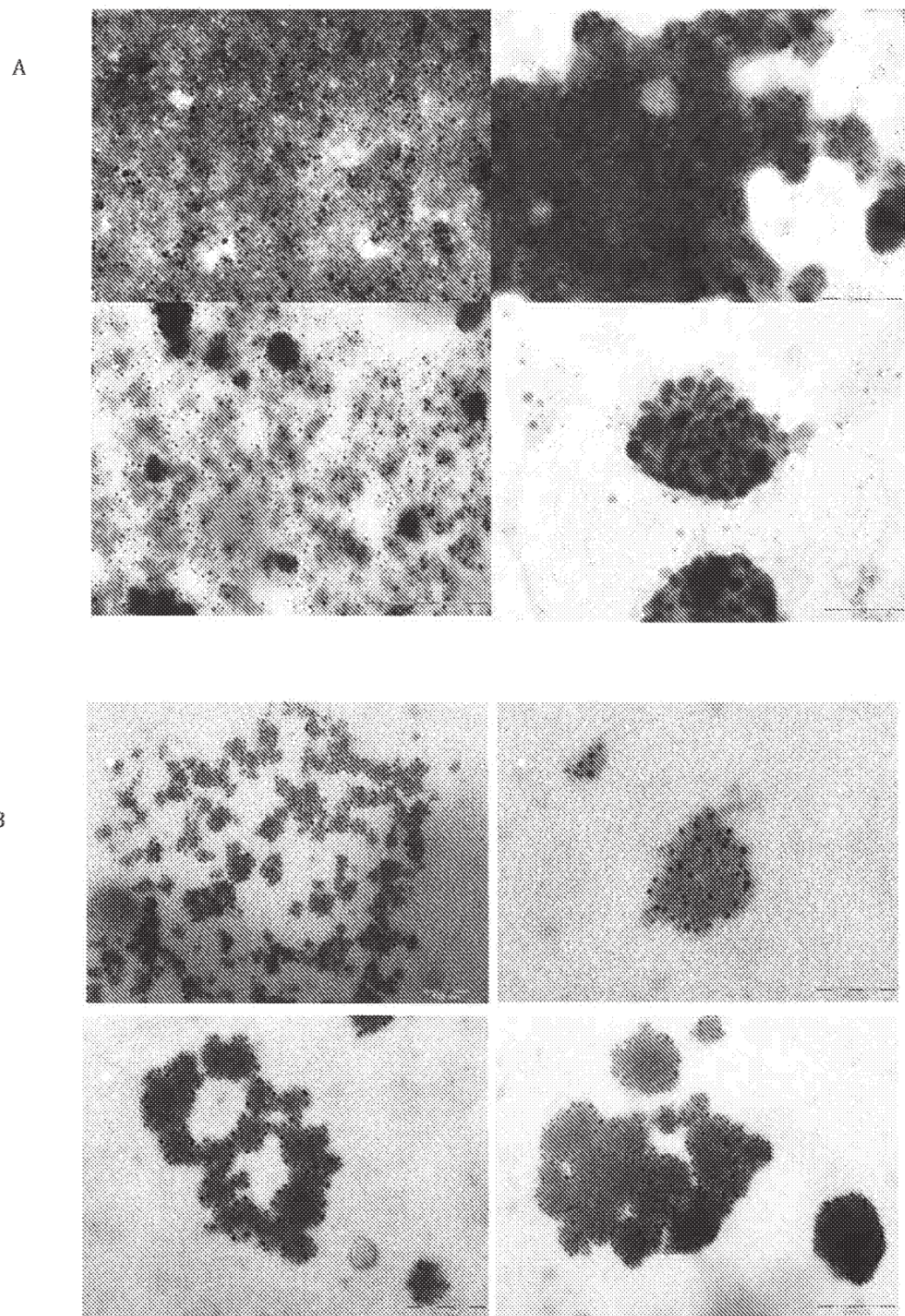


Figura 11

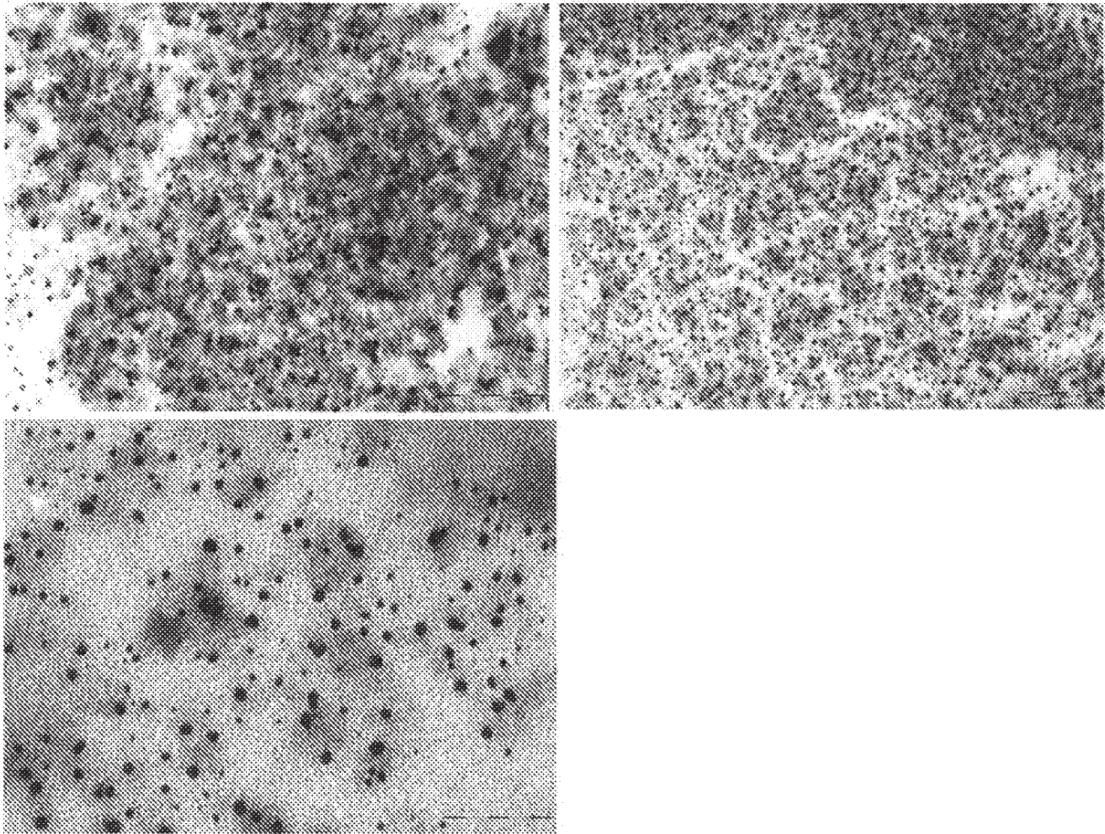


Figura 12