

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 419**

51 Int. Cl.:

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: **31.10.2014** **PCT/IN2014/000695**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2015** **WO15063794**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2014** **E 14821300 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019** **EP 3062945**

54 Título: **Un procedimiento de preparación de nanopartículas metálicas**

30 Prioridad:

01.11.2013 IN 3245DE2013

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

01.07.2020

73 Titular/es:

**COUNCIL OF SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL
RESEARCH; AN INDIAN REG. BODY
INCORPORATED UNDER REG. OF SOCIETIES
ACT (ACT XXI OF 1860) (100.0%)**

**Rafi Marg
New Delhi 110 001, IN**

72 Inventor/es:

**VINOD AGARWAL, SANKALP;
SUNDER REDDY, SHYAM y
MARSHAL**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 770 419 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

Un procedimiento de preparación de nanopartículas metálicas

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento de una etapa para la preparación de nanopartículas metálicas a partir de cloruros e hidruros metálicos solubles en agua. En particular, la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de nanopartículas metálicas que son estables a temperatura ambiente en condiciones normales de almacenamiento durante más de 6 meses, conservan su naturaleza coloidal y dispersiva en condiciones de pH neutro, ácido (pH <7) y básico (pH >7) y que pueden mantener su estabilidad y su naturaleza coloidal a bajas (mientras estén congeladas) y altas temperaturas y presión.

Antecedentes y técnica anterior de la invención

Los desarrollos recientes en nanotecnologías se han centrado en el desarrollo de procedimientos para sintetizar nanoestructuras/partículas más pequeñas y funcionales que pueden tener mejores usos debido a características funcionales únicas asociadas con nano-tamaños/estructuras en las industrias tales como la biomédica, la química, la energética, la electrónica, etc. [O. V. Salata, Journal of Nanobiotechnology, 2004, 2, 3]. Para la mayoría de estas aplicaciones, las nanopartículas metálicas se han sintetizado mediante la reducción de sales metálicas en disolventes polares y no polares [Y. Li, S. Liu, T. Yao, Z. Sun, Z. Jiang, Y. Huang, H. Cheng, Y. Huang, Y. Jiang, Z. Xie, G. Pan, W. Yan, S. Wei, Dalton Trans., 2012, 41.]. Los usos de disolventes no polares son preferidos en muchas aplicaciones debido a su ventaja de conservar la actividad de los agentes reductores por más tiempo [N. Zheng, J. Fan, G.D. Stucky, J. Am. Chem. Soc., 2006, 128, 6550]. Jun y otros [B. H. Jun, D. H. Kim, K J Lee, patente de Estados Unidos número US7867316B2, 2011] describieron un procedimiento para fabricar nanopartículas metálicas en el cual los precursores metálicos se disolvieron en un disolvente no polar y la solución de la molécula protectora se preparó en un disolvente no polar. Los procedimientos usados requieren el calentamiento de estas soluciones desde 60 a 120 °C durante una hora para sintetizar nanopartículas de < 20 nm. Lee y Wan [C. L. Lee y C. C. Wan, patente de Estados Unidos número US6572673B2, 2003] desarrollaron un procedimiento para preparar nanopartículas metálicas que comprende el uso de sales metálicas reactivas y agentes reductores que tienen grupos aniónicos, grupos sulfato o sulfonato. En este procedimiento el NaBH₄ se usó como agente reductor en agua con tensioactivos para lograr la síntesis con control de tamaño de nanopartículas metálicas. Yang y otros [Z. Yang, H Wang, Z Xu, patente de Estados Unidos número US7850933B2, 2010] describieron un procedimiento para la síntesis de nanopartículas a partir de una solución de cloruro metálico preparada en agua y que requirió calentamiento a 50-140 °C. McCormick y otros. [C.L. McCormick, Andrew B. Lowe, B. S. Sumerlin, patente de Estados Unidos número 8084558 B2, 2011] pudieron preparar nanopartículas de metales de transición funcionalizadas con tiol y, posteriormente, lograron la modificación de la superficie con copolímeros. Oh y otros [S.G. Oh, S.C. Yi, S. Shin, D.W. Kim, S.H. Jeong, patente de Estados Unidos número 6660058 B1, 2003] destacaron el uso de tensioactivos en soluciones, que tienen la propiedad intrínseca de adsorberse en las dos interfaces de fase diferente, para preparar nanopartículas de plata y de aleaciones de plata. Los procedimientos descritos anteriormente requieren el uso de disolventes orgánicos para la síntesis o son procedimientos de múltiples etapas para la síntesis de nanopartículas metálicas.

Puede hacerse referencia a la revista "Journal of Nanobiotechnology, 2004, 2, 3" de Salata, en la que los desarrollos recientes en nanotecnologías se han centrado en el desarrollo de procedimientos para la síntesis de nanoestructuras/partículas más pequeñas y funcionales que puedan tener mejores usos debido a características funcionales únicas asociadas con nano-tamaños/estructuras en las industrias tales como la biomédica, la química, la energética, la electrónica, etc.

Puede hacerse referencia a la revista, Dalton Trans., 2012, 41, 11725-11730 de Li y otros en la que las nanopartículas metálicas se han sintetizado mediante la reducción de sales metálicas en disolventes polares y no polares.

Puede hacerse referencia a la revista "J. Am. Chem. Soc., 2006, 128, 6550" de Zheng y otros en la que se prefieren los usos de disolventes no polares en muchas aplicaciones debido a su ventaja de conservar la actividad de agentes reductores por más tiempo.

Puede hacerse referencia a la patente de Estados Unidos número "US7867316B2, 2011" de Jun y otros en la que un procedimiento para la fabricación de nanopartículas metálicas es aquel en el que los precursores metálicos se disolvieron en un disolvente no polar y la solución de la molécula de recubrimiento se preparó en disolvente no polar. Los procedimientos usados requieren el calentamiento de estas soluciones desde 60 a 120 °C durante una hora para sintetizar nanopartículas de < 20 nm.

Puede hacerse referencia a la patente de Estados Unidos número "US6572673B2, 2003" de Lee y Wen en la que un procedimiento para preparar nanopartículas metálicas comprende el uso de sales metálicas reactivas y agentes reductores que tienen grupos aniónicos, grupos sulfato o sulfonato. En este procedimiento el NaBH₄ se usó como agente reductor en agua con tensioactivos para lograr la síntesis con control de tamaño de nanopartículas metálicas.

Puede hacerse referencia a la patente de Estados Unidos número "US7850933B2, 2010" de Yang y otros en la que se describe el procedimiento para la síntesis de nanopartículas a partir de una solución de cloruro metálico preparada en agua y que requiere el calentamiento a 50-140 °C.

5 Puede hacerse referencia a la patente de Estados Unidos número, "8084558 B2, 2011" de McCormick y otros en la que se prepararon nanopartículas metálicas de transición funcionalizadas con tiol y posteriormente se logró la modificación de la superficie con copolímeros.

Puede hacerse referencia a la patente de Estados Unidos número, "6660058 B1, 2003" de Oh y otros en la que se describe el uso de tensioactivos en soluciones, que tienen la propiedad intrínseca de adsorberse en las dos interfaces de fase diferente, para preparar nanopartículas de plata y de aleaciones de plata.

10 En los procedimientos con disolventes no polares pueden lograrse nanopartículas altamente monodispersas, debido a la reducción controlada de precursores metálicos mediante el uso de productos químicos reductores. Esto hace que el disolvente no polar sea deseable en la mayoría de los procedimientos usados para la síntesis de nanopartículas metálicas. A pesar de varias ventajas, estos procedimientos para la síntesis de nanopartículas requieren múltiples etapas para controlar el tamaño de las nanopartículas y lograr una mayor estabilidad. En
15 segundo lugar, el uso de la mayoría de los disolventes no polares no es deseable por su rentabilidad y sus efectos adversos sobre el medio ambiente.

Puede ser deseable desarrollar procedimientos para la síntesis rápida y rentable de nanopartículas metálicas en disolventes polares. Sin embargo, no existen muchos informes y procedimientos que describan específicamente la
20 función de los productos químicos reductores en estos disolventes en los que puede utilizarse el fuerte poder reductor de estos en el agua para la reducción de sales metálicas. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar procedimientos para la síntesis de nanopartículas metálicas a temperatura ambiente.

Objetivos de la invención

El objetivo principal de la presente invención es proporcionar un procedimiento de una sola etapa para la
25 preparación de nanopartículas metálicas a partir de cloruros e hidruros metálicos solubles en agua, mediante el uso de LiBH_4 como un agente reductor, de acuerdo con la reivindicación 1.

Todavía otro objeto de la presente invención es desarrollar procedimientos para la preparación de varios tamaños de nanopartículas metálicas (2-5 nm) a partir de cloruros e hidruros metálicos solubles en agua.

Aún otro objeto de la presente invención es desarrollar un procedimiento en el cual las nanopartículas metálicas sintetizadas serán de naturaleza altamente coloidal y dispersiva y tendrán una estabilidad más prolongada a
30 temperatura ambiente.

También se divulga un procedimiento para probar la estabilidad de estas nanopartículas metálicas en diferentes entornos físicos, químicos y biológicos, que pueden mantener su naturaleza coloidal y dispersiva a diferentes pH que varían de 3 a 12.

Aún otro objeto de la presente invención es desarrollar un procedimiento para fabricar nanopartículas metálicas que
35 deberían mantener su naturaleza coloidal a alta temperatura (probado a temperatura (25 a 35 °C) y ~120 °C y presión ambiente (presión atmosférica y 6,8 kg (15 lbs)).

Aún otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para la síntesis de tamaño de partícula ultra pequeño (~ 2 nm) que puede proporcionar una mayor relación de superficie con respecto a área para diferentes aplicaciones.

40 Aún otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento simple de una sola etapa para la síntesis de partículas metálicas que supere las complicaciones de otros procedimientos tediosos y engorrosos.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** es una vista en perspectiva de las imágenes ópticas de una suspensión coloidal de nanopartículas de oro a varias concentraciones molares de LiBH_4 (0,02 mM, 0,04 mM, 0,08 mM, 0,17 mM, 0,33 mM, 0,66 mM,
45 1,32 mM, 2,64 mM, 5,28 mM, 8 mM y 10,56 mM) en una solución acuosa de AuCl_3 a temperatura ambiente [25 °C]. En la presente invención el tamaño de partícula puede controlarse variando la concentración de agente reductor. Esto es evidente a partir del gradiente de color en la suspensión coloidal como se muestra en la figura 1.

La **Figura 2** es una vista en perspectiva de los espectros UV-vis de una suspensión coloidal de nanopartículas de oro sintetizadas a varias concentraciones molares de LiBH_4 (0,08 mM, 0,17 mM, 0,33 mM, 0,66 mM, 1,32 mM,
50 2,64 mM, 5,28 mM, 8 mM) en una solución acuosa de AuCl_3 a temperatura ambiente [25 °C].

La **Figura 3** es una vista en perspectiva de las imágenes de dispersión de luz dinámica (DLS) y microscopía electrónica de transmisión (TEM) de nanopartículas de oro ultra pequeñas (~ 2 nm) sintetizadas a una concentración de 2,64 mM de LiBH_4 en una solución acuosa de AuCl_3 a temperatura ambiente [25°C].

La **Figura 4** es una vista en perspectiva de las imágenes ópticas de una suspensión coloidal de nanopartículas de oro sintetizadas a 2,64 mM de LiBH_4 disueltas en una solución acuosa de AuCl_3 a temperatura ambiente [25°C] y expuestas a varias soluciones tampón de pH [pH 3, 5, 7, 9, 10 y 10,6 de la solución coloidal]. La variación en el pH de la solución coloidal se logró como: tampón de citrato usado para la variación del pH de 3 a 5, el tampón de fosfato se usó para cambiar el pH de 5 a 8 y tampón de NaOH-HCl se usó para cambiar el pH de 9 a 10,6.

La **Figura 5** es una vista en perspectiva de las imágenes TEM de partículas de rutenio ultra pequeñas (~ 2 nm) sintetizadas a una concentración de 2,64 mM de LiBH_4 en solución de RuCl_3 .

La **Figura 6** es una vista en perspectiva de la funcionalización de las AuNP con 1-lisina, FITC, FITC y lisina. (I)- Fluorescencia de lisina (Ex/Em- 355/ $\sim$ 435), (a) Lisina, (b) LBH-AuNP-Lisina (AL) y (c) LBH-AuNP-FITC-Lisina (AFL). (II) - Fluorescencia de FITC (Ex/Em-488/520). (a) FITC, (b) AuNP-FITC y (c) AuNP-FITC-Lisina y recuadro que muestra los espectros de aumento de b & c. (III) - UV-Vis de (a) LBH-AuNP (b) LBH-AuNP-FITC (AF), (c) LBH-AuNP-Lisina (AL), (d) LBH-AuNP-FITC-Lisina (AFL) y recuadro que muestra la imagen de la solución de color coloidal correspondiente. (IV) Imagen TEM de la funcionalización correspondiente. Barra de escala de (a) 50 nm, (b),(c) y (d) 20 nm.

La **Figura 7** es una vista en perspectiva de la imagen óptica de las funcionalizaciones de AuNP en citrato. (a) AuNP, (b) AuNP-FITC, (c) AuNP-Lisina (precipitada), (d) AuNP-Lisina-FITC (precipitada).

Sumario de la invención

En consecuencia, la presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de nanopartículas metálicas que comprende las etapas de:

a) preparar una solución acuosa de sal metálica disolviendo la sal metálica en un disolvente polar, y en el que la sal metálica se selecciona del grupo que consiste en AuCl , AgCl , HAuCl , RuCl_3 , H_2PtCl_6 , PdCl_2 , CuCl_2 y PtCl_4 .

b) agitar y disolver LiBH_4 en la solución obtenida en la etapa (a) durante un período en el intervalo de 1 a 15 minutos a una temperatura en el intervalo de 25 a 35°C para obtener nanopartículas metálicas, y en el que la concentración molar de LiBH_4 varía de 0,17 mM a 10,56 mM.

Descripción detallada de la invención

Como se usa en la presente memoria, las nanopartículas metálicas se refieren tanto a nanopartículas ultra pequeñas, que tienen un diámetro promedio de ~ 2 nm, como a nanopartículas que se refieren a las partículas metálicas que tienen un diámetro promedio > 2 nm.

La presente invención proporciona un procedimiento simple y rápido para la producción de nanopartículas metálicas a partir del precursor metálico (hidruros y cloruros metálicos) en presencia de un agente reductor tal como el LiBH_4 . El procedimiento para la síntesis de nanopartículas metálicas puede describirse de la siguiente manera: las concentraciones molares apropiadas de cloruros/hidruros metálicos se disolvieron en un disolvente polar como el agua y se les dejó reaccionar con LiBH_4 sólido de manera controlada. Es un procedimiento muy único ya que en este solo se requiere una etapa, y la solución acuosa de cloruros/hidruros metálicos se usó para disolver el agente reductor para la formación instantánea de partículas metálicas. En este procedimiento, se produce la síntesis rápida porque el LiBH_4 se oxida rápidamente cuando entra en contacto con una solución acuosa de cloruros/hidruros metálicos.

La presente invención proporciona la preparación de nanopartículas metálicas con una serie de soluciones químicas reductoras tales como LiBH_4 que se prepararon disolviéndolas en una solución acuosa de cloruros/hidruros metálicos a temperatura ambiente. Este procedimiento de síntesis fácil se usó para controlar el tamaño de partícula al variar la concentración molar del producto químico reductor en la solución acuosa de cloruros/hidruros. Se ha observado que estas partículas metálicas son de naturaleza altamente coloidal y dispersiva y también son estables durante más de seis meses a temperatura ambiente [25 - 35°C].

La presente invención proporciona diferentes entornos físicos y químicos creados y se ha observado que estas partículas metálicas mantienen su naturaleza coloidal y dispersiva a diferentes pH (3, 5, 7, 9, 10, 10,6) que varían entre 3 y 12. Además, las partículas sintetizadas mediante el uso de la presente invención pueden tolerar una alta concentración de cloruro de sodio y pueden mantener su naturaleza coloidal a alta temperatura y presión.

La técnica usada en la presente invención implica combinaciones únicas de agentes reductores y precursores metálicos de adición en una solución acuosa. Este procedimiento puede producir nanopartículas metálicas ultrapequeñas instantáneas bien dispersas de un diámetro promedio de ~ 2 nm. Los mismos procedimientos en la

presente invención también pueden usarse para fabricar nanopartículas metálicas de diámetro promedio > 2 nm, cambiando la relación de la concentración molar del agente reductor y de la sal metálica. Puede lograrse un amplio intervalo de tamaño de partículas metálicas al seleccionar la proporción molar apropiada de agente reductor y cloruros/hidruros metálicos disueltos en solución acuosa.

- 5 Mediante el uso de la presente invención se lograron nanopartículas metálicas ultrapequeñas (diámetro medio de partículas ~ 2 nm). Estas partículas metálicas se usaron para unir varias moléculas orgánicas e inorgánicas.

La presente invención describe que la preparación de estas partículas en disolventes polares tal como la solución acuosa de partículas metálicas en la presente invención, tiene varias ventajas para sus aplicaciones en los nanofármacos, el suministro de fármacos, diagnóstico biomédico, obtención de imágenes celulares y compatibilidad con biomoléculas cuando los disolventes no polares no son deseables para su uso en varias condiciones fisiológicas.

En la presente invención se prepararon una serie de soluciones de diferentes concentraciones molares de LiBH_4 disolviéndolas en cloruro metálico que contenía agua Milli Q. La figura 1 muestra las imágenes ópticas representativas de una suspensión coloidal de nanopartículas de oro. A la concentración molar de LiBH_4 más baja, que se incrementó de 0,17 mM a 1,32 mM, la solución coloidal mostró un color azul claro, mientras que un aumento adicional en la concentración molar de esta de 2,64 mM a 10,56 mM mostró el color vino tinto de la suspensión coloidal de estas partículas.

La figura 2 muestra espectros UV-Vis representativos de una suspensión coloidal de nanopartículas de oro sintetizadas a diversas concentraciones molares de LiBH_4 (0,08 mM, 0,17 mM, 0,33 mM, 0,66 mM, 1,32 mM, 2,64 mM, 5,28 mM, 8 mM) a temperatura ambiente $[25^\circ\text{C}]$. Mediante el uso de la presente invención, los procedimientos desarrollados pueden controlar el tamaño de partícula al variar la concentración del agente reductor. Esto también puede ser evidente por el cambio de color en la suspensión coloidal como se muestra en la figura 1.

La presente invención también es única para la producción de nanopartículas metálicas ultrapequeñas que son difíciles en otros procedimientos. Se obtuvo información representativa para determinar el tamaño de nanopartículas de oro ultrapequeñas a partir de DLS y TEM como se muestra en la figura 3. Las partículas metálicas producidas mediante el uso de los procedimientos descritos en la presente invención son de naturaleza altamente coloidal y dispersiva. Estas partículas se dispersan en agua incluso después de seis meses mientras se almacenan a temperatura ambiente $[25\text{--}35^\circ\text{C}]$.

Mediante el uso de la presente invención, las partículas sintetizadas pueden mantener su naturaleza coloidal y dispersiva a diferentes pH (3, 5, 7, 9, 10, 10,6) que varían entre 3 y 12 y una imagen óptica representativa de la suspensión coloidal se muestra la figura 4. La producción de partículas metálicas por la presente invención puede usarse para preparar partículas altamente estables en diferentes tipos de entornos físicos, químicos y biológicos. Además, estas partículas metálicas pueden tolerar altas concentraciones de sodio y otros cloruros de metales alcalinos y pueden mantener su estabilidad coloidal a altas temperaturas (probado a temperatura y $\sim 120^\circ\text{C}$) y presión ambiente (presión atmosférica y 6,8 kg (15 libras)).

Mediante el uso de la presente invención, se logró una síntesis fácil a base de agua de un tamaño de partícula metálica ultra pequeño que tiene una mayor relación de superficie con respecto a área y se usó para la unión de diversas moléculas orgánicas e inorgánicas. El procedimiento usado en la presente invención puede extenderse al uso de otros agentes reductores como LiAlH_4 y otras alanidas de metales alcalinos, NaBH_4 y otros borohidruros de metales alcalinos, citrato, hidrazina, MBA, boratos de amina, ácido fosforoso, etc., en síntesis acuosa de partículas metálicas. Las partículas metálicas sintetizadas mediante los procedimientos usados en la presente invención pueden tolerar una mayor concentración de biomoléculas usadas para funcionalización. Estas partículas metálicas pueden ser mono y co-funcionalizadas por diferentes grupos funcionales de moléculas orgánicas e inorgánicas para producir nanopartículas de Janus.

El mismo procedimiento analizado en la presente invención fue capaz de producir otras partículas metálicas de tamaño ultra pequeño en solución acuosa. La figura 5 muestra una imagen TEM representativa de nanopartículas ultra pequeñas de rutenio.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan como ilustración solamente y no se pretende que limiten el ámbito de la presente invención.

Ejemplo 1-2

Preparación de nanopartículas metálicas

Ejemplo 1

Se preparó 2 ml de una solución de AuCl_3 al 1 % (peso/volumen) en agua y se diluyó adicionalmente añadiendo 248 ml de agua. La solución anterior se usó para preparar una serie de soluciones de LiBH_4 con agitación vigorosa a temperatura ambiente [25 °C] para un intervalo de 0,02 mM, 0,04 mM, 0,08 mM, 0,17 mM, 0,33 mM, 0,66 mM, 1,32 mM, 2,64 mM, 5,28 mM, 8 mM y 10,56 mM de LiBH_4 en una solución de AuCl_3 preparada en agua Milli Q. En menos de 15 minutos de disolución de LiBH_4 en una solución de AuCl_3 , se observó la formación de nanopartículas de oro y las imágenes ópticas de la suspensión coloidal de nanopartículas de oro a varias concentraciones molares de LiBH_4 se muestran en la figura. 1.

Ejemplo 2

Se prepararon una serie de soluciones de LiBH_4 que variaban de 0,02 mM, 0,04 mM, 0,08 mM, 0,17 mM, 0,33 mM, 0,66 mM, 1,32 mM, 2,64 mM, 5,28 mM, 8 mM y 10,56 mM al disolver en 248 ml de agua. Para esto se añadió 2 ml de una solución de AuCl_3 al 1 % (p/v) preparada en agua con agitación vigorosa durante 5 minutos y se formaron nanopartículas coloidales. La reacción se completó en menos de 15 minutos que incluyó la preparación de la solución de LiBH_4 y la mezcla con AuCl_3 . Los cambios en las soluciones coloidales de color azul a rojo se observaron con una concentración de LiBH_4 que varió de 0,02 mM a 10,56 mM. No hubo diferencias observables en las propiedades ópticas de los AuNP preparados en el ejemplo 1 y el ejemplo 2.

Ejemplo 3

El procedimiento como se describe en los ejemplos 1 y 2 se usó para producir una solución acuosa coloidal bien dispersa de nanopartículas de rutenio ultrapequeñas (mediante el uso de una proporción de peso con respecto a volumen del 1 %) a temperatura ambiente [25 °C] en 2,65 mM de LiBH_4 .

Ejemplo 4-7

Estabilidad de las nanopartículas de oro

Ejemplo 4

Para cambiar el pH de la solución coloidal de AuNP, se añadieron 0,2 μl , 0,4 μl , 8 μl y 12 μl de NaOH 1N en 5 ml de las AuNP sintetizadas con 2,64 mM de LiBH_4 que dio como resultado un pH 8, pH 9, pH 10 y pH 10,8, respectivamente.

Para cambiar el pH de la solución coloidal de AuNP en un intervalo ácido, se añadieron 0,4 μl , 1 μl , 10 μl , 12 μl y 25 μl de NaOH 1N en 5 ml de las AuNP sintetizadas con 2,64 mM de LiBH_4 que dio como resultado un pH 7, pH 6, pH 5, pH 4 y pH 3, respectivamente.

La estabilidad de estas partículas se observó a estos valores de pH. No hubo diferencias observables en las propiedades ópticas de las AuNP según se preparó en el ejemplo 1 y el ejemplo 2.

Ejemplo 5

Se disolvieron 5 ml de suspensión coloidal de nanopartículas de oro sintetizadas a 2,64 mM de LiBH_4 en una solución acuosa de AuCl_3 a temperatura ambiente [25 °C] y expuestas a varias soluciones tampón de pH (entre 3 y 11). Se añadieron 5 ml de solución de AuNP en 5 ml de tampón de pH de citrato (pH variable de 3 a 5), 5 ml de tampón de pH de fosfato (5, 6 y 8) y 5 ml de tampón de pH de NaOH-HCl (de 9 a 10,6) y se demostró una suspensión coloidal estable (figura 1).

Ejemplo 6

Mediante el uso del procedimiento descrito en la presente invención, se preparó una solución acuosa coloidal altamente dispersa de partículas de oro que puede mantener su naturaleza coloidal a una alta temperatura (probado a ~120 °C) y presión (probado a ~ 6,8 kg (15 libras)). Se colocaron 5 ml de suspensión coloidal de nanopartículas de oro sintetizadas a 2,64 mM de LiBH_4 disueltos en una solución acuosa de AuCl_3 a temperatura ambiente [25 °C] en una Auto-clave que tiene una temperatura de 121,5 °C y 6,8 kg (15 libras) de presión durante 20 minutos. No hubo diferencias observables en las propiedades ópticas de las AuNP preparadas en el ejemplo 1 y el ejemplo 2.

Ejemplo 7

Se colocó 1 ml de una suspensión coloidal de nanopartículas de oro sintetizadas a 2,64 mM de LiBH_4 disuelta en una solución acuosa de AuCl_3 a temperatura ambiente [25 °C] a diferentes velocidades centrífugas (10.000, 20.000, 30.000 y 40.000 rpm) y estas partículas aún pueden mantener su naturaleza coloidal.

Funcionalización de las nanopartículas de oro.

Ejemplo 8

Las suspensiones coloidales de nanopartículas de oro sintetizadas a 2,64 mM de LiBH_4 disueltas en una solución acuosa de AuCl_3 a temperatura ambiente, se usaron para la preparación de nanopartículas de AuNP LBH -FITC-Lisina (AFL NP) funcionalizadas con ligandos dobles y nanopartículas de AuNP LBH - FITC (AF), AuNP LBH -lisina (AL) monofuncionalizadas. Las AFL NP funcionalizadas con ligandos dobles se sintetizaron en dos etapas (a) A los 5 ml de 1,2 μM de solución de las AuNP, se añadieron 50 μl de solución de FITC 500 μM (disuelto en etanol al 95 %) con una concentración final de FITC 5 μM en las AuNP y se incubaron durante 30 minutos. minutos, después (b) A la solución (a), se añadieron 100 μl de 100 mM de lisina con una concentración final de lisina 2 mM en la solución de las AuNP y se incubaron durante 30 minutos. En ambas reacciones (a) y (b) se usaron concentraciones saturadas de FITC y lisina respectivamente. De manera similar, para la preparación de soluciones de AF y AL, 5 ml de solución de las AuNP 1,2 μM contienen una concentración final de FITC 5 μM y 2 mM de lisina respectivamente. Todas las reacciones se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y además la Figura 6 muestra el análisis espectrométrico de absorción y fluorescencia. En la técnica anterior [R.Shukla, V. Bansal, M. Chaudhary, A. Basu, R.R. Bhonde, M. Sastry, Langmuir 2005, 21, 10644-10654] la demostración exitosa de la cofuncionalización de lisina y FITC con las AuNP mostró una estabilidad limitada a una concentración más alta. Mientras tanto, las nanopartículas de oro en borohidruro de litio (LBH-AuNP) sintetizadas en la presente invención son de tamaño pequeño (<5 nm) y son altamente estables y pueden resistir una mayor concentración de cofuncionalizaciones con ligandos dobles (Lisina y FITC).

Ejemplo 9

Se usó una suspensión coloidal de nanopartículas de oro sintetizadas a 2,64 mM de LiBH_4 disuelta en una solución acuosa de AuCl_3 a temperatura ambiente [25 °C] para la preparación de funcionalizaciones con ligandos dobles en el ejemplo 8 y se usaron para cuantificar la estimación fluorométrica de colágeno. Se preparó una serie de concentraciones de colágeno en 2 ml de nanopartículas de AFL sintetizadas en el ejemplo 8 con una concentración final de 2 a 10 $\mu\text{g/ml}$ a partir de 100 g/ml de solución de colágeno de reserva. Para la estimación de colágeno en tiempo real, se extrajo colágeno de cola de rata y la concentración se ajustó a 1 mg/ml. La solución de colágeno AFL respectiva se incubó 12-14 horas a 4 °C. Las reacciones se analizaron y caracterizaron mediante espectrometría de fluorescencia y microscopía electrónica de transmisión.

Ventajas de la invención

Las principales ventajas de la presente invención son:

- El procedimiento descrito para la síntesis de partículas metálicas usado en la presente invención es un procedimiento rápido de una etapa en disolventes polares. Esto no requiere el uso de disolventes no polares que normalmente no son deseables debido a los efectos adversos sobre el medio ambiente.
- El procedimiento usado en la presente invención es un procedimiento rápido, simple y de una sola etapa para lograr un tamaño ultra pequeño de nanopartículas metálicas, que son difíciles de obtener en otros sistemas de disolventes no polares. Por ejemplo, la síntesis de nanopartículas de tamaño < 10 nm mediante el uso de disolvente no polar, que es un procedimiento tedioso y engorroso.
- Como estas partículas metálicas se sintetizaron en solución acuosa, esto proporciona una mayor flexibilidad en el uso de estas nanopartículas metálicas para una amplia gama de aplicaciones en medicina, diagnóstico, obtención de imágenes, etc., mientras que los disolventes no polares pueden no ser deseables.
- Un procedimiento para producir partículas metálicas, específicamente nanopartículas altamente coloidales y dispersivas preparadas a partir de cloruros e hidruros metálicos solubles en agua mediante el uso de un agente reductor LiBH_4 .
- La síntesis de una solución acuosa coloidal bien dispersa de partículas metálicas estables a diversas soluciones tampón de pH y su uso en entornos físicos, químicos y biológicos similares o modificados.
- La síntesis de las partículas metálicas que incluyen un tamaño ultra pequeño que pueden tolerar una alta concentración de cloruro de sodio y puede mantener su naturaleza coloidal a alta temperatura y uso de estas en entornos físicos, químicos y biológicos similares o modificados.
- La síntesis de las partículas metálicas que incluyen un tamaño ultra pequeño que pueden tolerar una mayor concentración de moléculas funcionales, incluidas las biomoléculas de diferente naturaleza funcional durante la funcionalización y la cofuncionalización con diferentes biomoléculas que tienen varios grupos funcionales y uso de estas en entornos físicos, químicos y biológicos similares o modificados.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de nanopartículas metálicas que comprende las etapas de:
 - a) preparar una solución acuosa de sal metálica disolviendo la sal metálica en un disolvente polar, y en el que la sal metálica se selecciona del grupo que consiste en AuCl₃, AgCl, HAuCl₄, RuCl₃, H₂PtCl₆, PdCl₂, CuCl₂ y PtCl₄.
 - b) agitar y disolver el LiBH₄ en la solución obtenida en la etapa (a) durante un período en el intervalo de 1 a 15 minutos a una temperatura en el intervalo de 25 a 35 °C para obtener nanopartículas metálicas, y en el que la concentración molar de LiBH₄ varía de 0,17 mM a 10,56 mM.
2. Un procedimiento de preparación de nanopartículas metálicas que comprende las etapas de:
 - a) preparar una solución acuosa de sal metálica disolviendo la sal metálica en un disolvente polar, y en el que la sal metálica se selecciona del grupo que consiste en AuCl₃, AgCl, HAuCl₄, RuCl₃, H₂PtCl₆, PdCl₂, CuCl₂ y PtCl₄.
 - b) preparar una solución de LiBH₄, en la que la concentración molar de LiBH₄ varía de 0,17 mM a 10,56 mM;
 - c) agitar la solución del agente reductor como se obtuvo en la etapa (b) con la solución obtenida en la etapa (a) durante un período en el intervalo de 1 a 15 minutos a una temperatura en el intervalo de 25 a 35 °C para obtener nanopartículas metálicas.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que las nanopartículas metálicas tienen un tamaño de partícula en el intervalo de 2-5 nm, según se determinó mediante microscopía electrónica de transmisión.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que las nanopartículas metálicas tienen un diámetro de partícula de 2 nm, según se determinó mediante microscopía electrónica de transmisión.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que las nanopartículas metálicas tienen un diámetro de partícula mayor de 2 nm, según se determinó mediante microscopía electrónica de transmisión.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la concentración molar de LiBH₄ varía de 0,17 mM a 1,32 mM.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la concentración molar de LiBH₄ varía de 2,64 mM a 10,56 mM.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que las nanopartículas metálicas resultantes son posteriormente mono o cofuncionalizadas por grupos funcionales de moléculas orgánicas e inorgánicas.



Figura 1

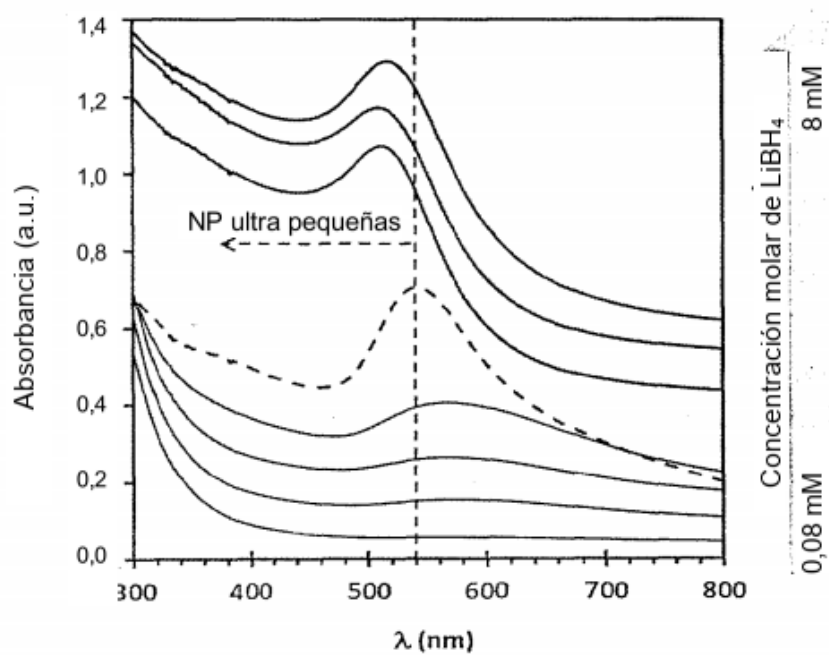


Figura 2

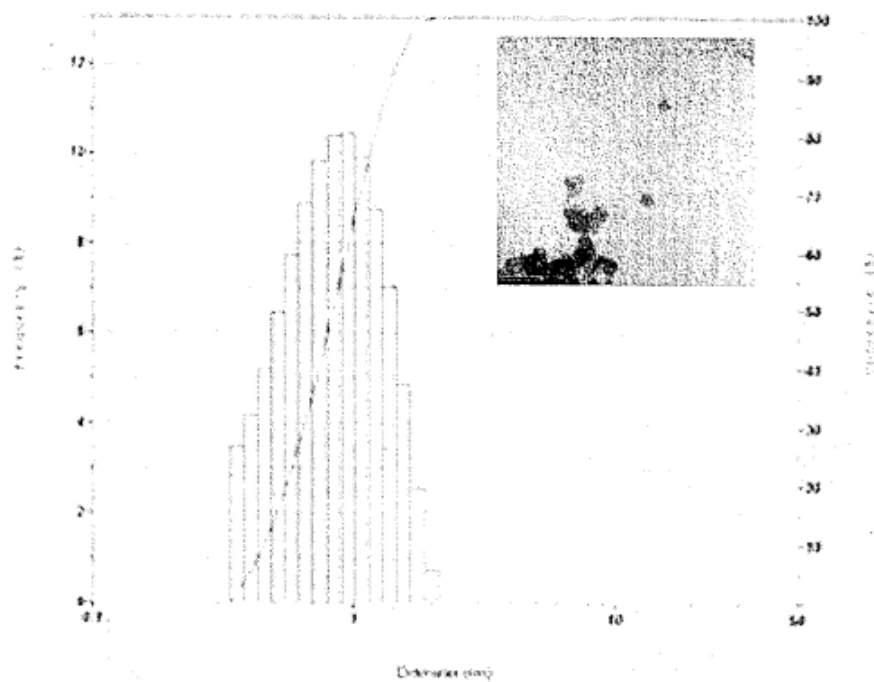


Figura 3

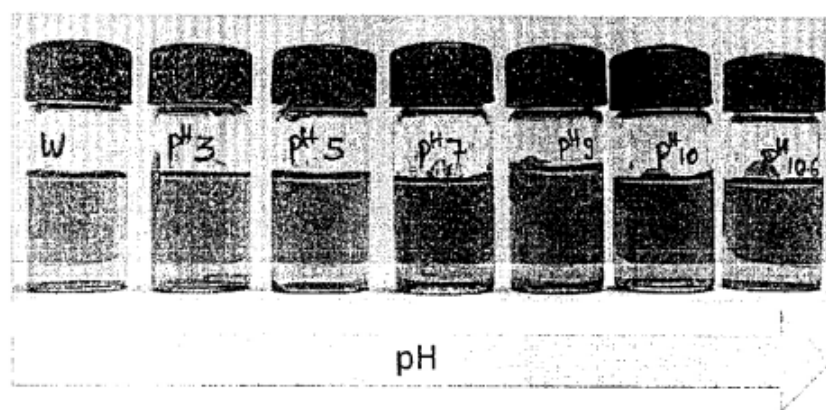


Figura 4

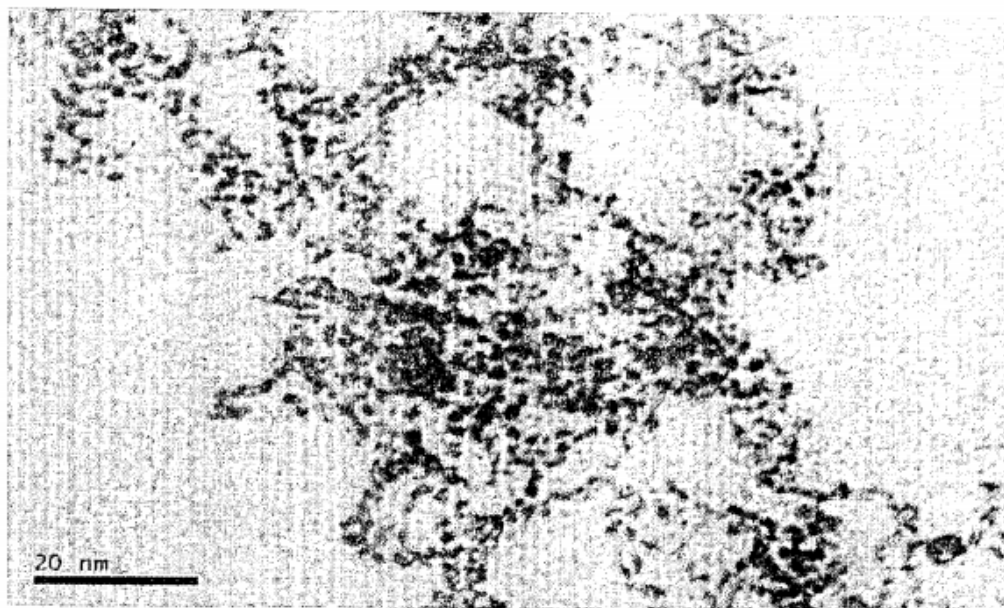


Figura 5

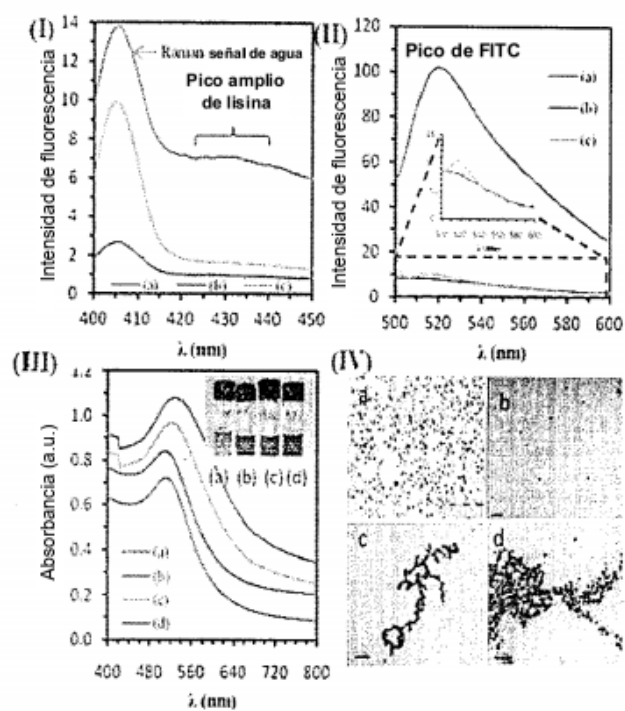


Figura 6

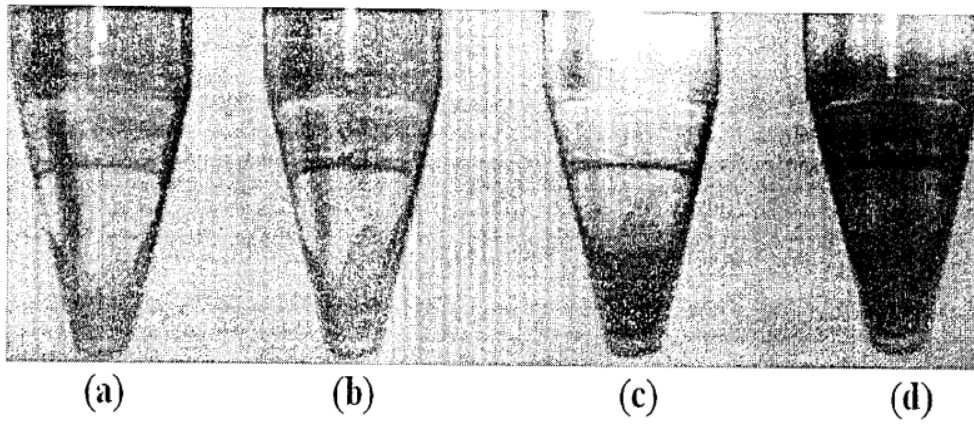


Figura 7