

# ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102010901896599A1

Publication Date

20120606

Applicant

FONDAZIONE ISTITUTO ITALIANO DI TECNOLOGIA

Title

PROCEDIMENTO DI SINTESI DI NANOPARTICELLE D'ORO STELLATE  
AVENTI DIMENSIONI E RAMIFICAZIONI CONTROLLATE E  
NANOPARTICELLE D'ORO STELLATE COSÌ OTTENUTE

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale dal titolo:

"Procedimento di sintesi di nanoparticelle d'oro stellate aventi dimensioni e ramificazioni controllate e nanoparticelle d'oro stellate così ottenute"

Di: FONDAZIONE ISTITUTO ITALIANO DI TECNOLOGIA,  
nazionalità italiana, Via Morego 30, 16163 Genova  
(Italia)

Inventori designati: MAIORANO, Gabriele; RIZZELLO, Loris; SANGARU, Shiv Shankar; CINGOLANI, Roberto; POMPA, Pier Paolo.

Depositata il: 6 Dicembre 2010

\* \* \*

DESCRIZIONE

La presente invenzione si riferisce ad un procedimento di sintesi di nanoparticelle d'oro stellate ("branched gold nanoparticles") secondo il preambolo della rivendicazione indipendente 1 ed alle nanoparticelle d'oro stellate così ottenute.

Negli ultimi vent'anni sono stati sintetizzati e fabbricati molti nuovi nanomateriali aventi interessanti proprietà e sono state proposte e sviluppate svariate nuove applicazioni di tali materiali. Tuttavia, per potere utilizzare commercialmente le nuove applicazioni, è necessario

mettere a punto protocollli di sintesi e fabbricazione che permettano di produrre i nanomateriali con una qualità sempre elevata.

I procedimenti di sintesi di nanoparticelle finora disponibili, che sono stati messi a punto come procedimenti di laboratorio, non consentono di ottenere nanoparticelle di purezza elevata aventi un'accettabile monodispersione e con la possibilità di regolarne a piacere caratteristiche e proprietà. Alcune nanoparticelle di metalli sono state sintetizzate con un buon controllo delle dimensioni e della forma, ivi incluse forme sferiche, a bastoncino, cubiche, triangolari, poligonali, etc. Recentemente, sono stati pubblicati in letteratura alcuni protocollli di sintesi di nanoparticelle stellate ("branched nanoparticles") caratterizzate da una buona monodispersione.

Tali nanoparticelle, che sono conosciute anche come nanostelle, nanofiori, nanoricci, etc. o più in generale particelle nano-rugose, sono state dimostrate essere buoni candidati per la spettroscopia Raman amplificata da superfici ("SERS"). Esse possono anche essere potenzialmente adatte per molte altre applicazioni in cui siano richieste nanoparticelle aventi proprietà di

assorbimento della radiazione elettromagnetica in un intervallo più ampio di lunghezze d'onda oppure in cui siano richieste proprietà di assorbimento della radiazione elettromagnetica che siano sensibili a qualsiasi variazione che possa aver luogo nella o sulla nanoparticella.

Qui di seguito sono brevemente riassunte alcune delle procedure finora descritte nella tecnica nota per la sintesi delle nanoparticelle stellate sopra menzionate.

La domanda di brevetto US 2008/0266555 A1 descrive un procedimento di sintesi di nanoparticelle stellate in cui ad una soluzione di nanoparticelle d'oro sferiche di dimensioni minori precedentemente sintetizzate (denominata "soluzione di semi ("seeds") di nanoparticelle") viene aggiunta una miscela di accrescimento consistente in ioni cloroaurato, bromuro di cetiltrimetilammonio ed acido ascorbico in particolari proporzioni, che determina un accrescimento delle ramificazioni ("branching"). Questo approccio di sintesi è denominato "accrescimento di nanoparticelle mediato da semi". Modificando la proporzione fra i semi di nanoparticelle e la soluzione di accrescimento, si

ottengono nanoparticelle di altre forme.

Kumar P.S. et al. (Nanotechnology 2008, 19, 015606) descrivono la sintesi di nanoparticelle stellate mediante accrescimento mediato da semi, mescolando una soluzione etanolica di semi di nanoparticelle sferiche di oro del diametro di 15 nm rivestite con polivinilpirrolidone (PVP) in una soluzione di dimetilformamide mescolata con PVP e una soluzione acquosa di acido cloroaurico.

Xie J et al. (ACS Nano, 2008, 2, 2473-2480) hanno dimostrato che nanoparticelle stellate di dimensioni differenti possono essere sintetizzate in un unico passaggio facendo reagire una soluzione di acido cloroaurico con differenti concentrazioni di acido 4-(2-idrossietil)-1-piperazinetansolfonico (HEPES) in soluzione acquosa. In questa via di sintesi, l'HEPES agisce sia come agente riducente sia come agente di *capping* ed agente che dirige la forma di tali nanostrutture. Non vi è la possibilità di regolare finemente la taglia finale delle nanoparticelle stellate di oro colloidale ottenute. E' solo descritto che, con una proporzione crescente di HEPES rispetto agli ioni oro, le dimensioni delle nanoparticelle stellate diminuiscono.

Zhao L et al. (J. Phys. Chem. C 2009, 113, 16645-16651) hanno dimostrato la sintesi di nanoparticelle d'oro stellate utilizzando un altro approccio di accrescimento mediato da semi, in cui semi di nanoparticelle d'oro, ottenuti attraverso riduzione dello ione aurato tramite citrato di sodio, sono fatti crescere in una soluzione consistente di acido cloroaurico, idrossido di sodio e idrossilammina. E' mostrato che incrementando il pH della soluzione di accrescimento, la ramificazione ("branching") può essere controllata in qualche misura.

Wang W et al. (J. Phys. Chem. C 2008, 112, 16348-16353) hanno dimostrato, mediante un processo in un singolo passaggio, che nanoparticelle stellate possono essere sintetizzate tramite reazione di acido cloroaurico con acido ascorbico in presenza di chitosano. Hanno inoltre dimostrato che l'entità della ramificazione sulla superficie dipende dalla concentrazione di chitosano.

Zou X et al. (Nanotechnology 2006, 17 4758-4764), impiegando un metodo di crescita mediata da semi, hanno dimostrato la sintesi di nanoparticelle d'oro stellate in vari passaggi. In primo luogo, ad una soluzione acquosa con diverse quantità di

nanoparticelle d'oro con diametro di 2,5 nm (semi), idrossilammina solfato e trisodio citrato, è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione acquosa di acido cloroaurico. Le nanoparticelle ottenute con questo primo passaggio sono poi state impiegate come semi ed il processo di reazione è stato ripetuto in maniera simile. Questo processo è stato ripetuto quattro volte per ottenere in ciascun passaggio nanoparticelle stellate di dimensioni differenti.

Tuttavia, i procedimenti noti per la sintesi di nanoparticelle d'oro stellate, inclusi i procedimenti basati sulla crescita mediata da semi sopra menzionati, presentano lo svantaggio di non permettere di ottenere nanoparticelle stellate con una soddisfacente monodispersione, o di non dimostrare la possibilità di controllare le proprietà di assorbimento ottico della nanoparticelle in un intervallo più ampio di lunghezze d'onda, o di non dimostrare la possibilità di regolare contemporaneamente le dimensioni e l'entità della ramificazione con un singolo processo di sintesi.

Molti dei metodi di sintesi della tecnica nota dipendono inoltre dall'uso di bromuro di

cetiltrimetilammonio (CTAB) od altro agente di *capping*, come tensioattivo che si lega irreversibilmente alla superficie delle nanoparticelle. Ciò le rende inadatte per le applicazioni che richiedono che le particelle subiscano ulteriori modificazioni superficiali con molecole aventi gruppi funzionali desiderati. Tali particelle ricoperte da tensioattivi sono inoltre inadatte per le applicazioni biologiche, poiché gli agenti di *capping* possono risultare citotossici.

Scopo della presente invenzione è quindi quello di mettere a disposizione un procedimento di sintesi di nanoparticelle d'oro stellate che superi gli inconvenienti e le limitazioni della tecnica nota.

In particolare, uno scopo della presente invenzione è quello di mettere a disposizione un procedimento di sintesi di nanoparticelle d'oro stellate mediante il quale sia possibile controllare simultaneamente le dimensioni e l'entità della ramificazione delle nanoparticelle sintetizzate.

Un ulteriore scopo è quello di mettere a disposizione un procedimento di sintesi di nanoparticelle d'oro stellate che consenta di

ottenere nanoparticelle aventi una monodispersione soddisfacente.

Ancora un altro scopo è quello di mettere a disposizione un procedimento di sintesi di nanoparticelle d'oro stellate che consenta di controllare con estrema precisione le proprietà ottiche delle nanoparticelle ottenute, in un'ampia regione dello spettro UV-visibile e del vicino infrarosso.

Ancora un altro scopo è quello di mettere a disposizione un procedimento di sintesi di nanoparticelle d'oro stellate che consenta di ottenere nanoparticelle la cui superficie sia idonea ad essere successivamente modificata con gruppi funzionali desiderati tramite i convenzionali metodi di scambio dei ligandi.

Ancora un altro scopo è quello di mettere a disposizione un procedimento di sintesi di nanoparticelle d'oro stellate che non preveda l'uso di agenti di *capping* citotossici, quali CTAB, molecole tioliche organiche od altri.

Ancora un altro scopo è quello di mettere a disposizione un procedimento di sintesi di nanoparticelle d'oro stellate che consenta di ottenere nanoparticelle idonee ad essere rivestite

con un guscio di ossido di metallo, quale ad esempio silice o altri materiali, per ulteriori applicazioni quali MEF (*Metal Enhanced Fluorescence*) o MEC (*Metal Enhanced Chemiluminescence*), in cui è necessaria una certa distanza fra il fluoroforo e la superficie della nanoparticella.

Ancora un altro scopo è quello di mettere a disposizione un procedimento di sintesi di nanoparticelle d'oro stellate che consenta di ottenere nanoparticelle idonee all'impiego, rivestite o meno da altri materiali, per applicazioni basate sul fenomeno SERS (*Surface Enhanced Raman Scattering*).

Ancora un altro scopo è quello di mettere a disposizione un procedimento di sintesi di nanoparticelle d'oro stellate che consenta di ottenere nanoparticelle con assorbimento ottico finemente regolato in determinate regioni dello spettro per il trattamento terapeutico di patologie neoplastiche attraverso effetto fototermico.

Questo e altri scopi sono raggiunti secondo la presente invenzione grazie ad un procedimento di sintesi di nanoparticelle d'oro stellate mediante accrescimento mediato da semi, caratterizzato dal

fatto di comprendere i passaggi di:

- a) provvedere una soluzione acquosa di semi sferici di nanoparticelle d'oro; e
- b) sottoporre i semi sferici di nanoparticelle d'oro ad un trattamento di accrescimento, caratterizzato dal fatto che comprende:

b<sub>1</sub>) trattare la soluzione acquosa di semi sferici di nanoparticelle d'oro con una soluzione acquosa comprendente idrossilammina o un suo sale quale agente riducente ed acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico (HEPES) quale agente che dirige la forma dell'accrescimento; e

b<sub>2</sub>) aggiungere una soluzione acquosa di ioni aurato, preferibilmente acido cloroaurico (HAuCl<sub>4</sub>), ottenendo in tal modo nanoparticelle d'oro stellate per accrescimento controllato di una ramificazione sulla superficie dei semi sferici di nanoparticelle d'oro.

Il procedimento dell'invenzione differisce dalla tecnica anteriore sopra citata, in particolare da quanto descritto in Xie J et al., 2008, per il fatto che l'HEPES agisce esclusivamente come agente che dirige la forma dell'accrescimento e non come agente riducente. La reazione prevede infatti l'impiego di un differente

e separato agente riducente, vale a dire idrossilammina. L'idrossilammina è impiegata come tale o in forma salificata, come ad esempio, ma senza limitazione, idrossilammina cloridrato, idrossilammina solfato, o simili.

Forme di realizzazione preferite del procedimento di sintesi dell'invenzione formano oggetto delle rivendicazioni dipendenti, il cui contenuto forma parte integrante della presente descrizione.

Ulteriori caratteristiche e vantaggi della presente invenzione risulteranno dalla descrizione dettagliata e dagli esempi che seguono contenenti riferimenti alle annesse figure, il cui contenuto è qui di seguito illustrato.

La figura 1 mostra immagini rappresentative ottenute al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) di nanoparticelle d'oro stellate aventi diametro medio di circa 40 nm e caratterizzate da una differente entità di ramificazione. Tali nanoparticelle sono ottenute secondo il procedimento dell'invenzione, sintetizzando innanzitutto semi di circa 18 nm di diametro e poi riducendo su di essi altri ioni oro impiegando idrossilammina solfato come agente riducente in

presenza di differenti concentrazioni di HEPES. La figura 1A corrisponde ai semi di nanoparticelle d'oro fatti crescere con ioni oro e idrossilammina in assenza di HEPES, il che porta alla formazione di nanoparticelle d'oro sferiche di circa 40 nm di diametro. La figura 1B corrisponde ai semi di nanoparticelle d'oro fatti crescere con ioni oro e idrossilammina in presenza di HEPES 0,2 mM, il che porta alla formazione di nanoparticelle d'oro di circa 40 nm di diametro di forma irregolare, simili a nanostelle con ramificazione sottosviluppata. La figura 1C corrisponde ai semi di nanoparticelle d'oro fatti crescere con ioni oro e idrossilammina in presenza di HEPES 1 mM, il che porta alla formazione di nanoparticelle d'oro di circa 40 nm di diametro con forma irregolare, simili a nanostelle aventi ramificazioni/punte molto piccole. La figura 1D corrisponde ai semi di nanoparticelle d'oro fatti crescere con ioni oro e idrossilammina in presenza di HEPES 2,5 mM, il che porta alla formazione di nanoparticelle d'oro stellate con ramificazione piccola ma distinguibile. La figura 1E corrisponde ai semi di nanoparticelle d'oro fatti crescere con ioni oro e idrossilammina in presenza di HEPES 5 mM, il che

porta alla formazione di nanoparticelle d'oro stellate con ramificazione meglio distinguibile. La figura 1F corrisponde ai semi di nanoparticelle d'oro fatti crescere con ioni oro e idrossilammina in presenza di HEPES 25 mM, il che porta alla formazione di nanoparticelle d'oro stellate con ramificazione evidente.

La figura 2 mostra immagini rappresentative ottenute al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) di nanoparticelle d'oro con diametro medio di circa 60 nm con differente entità di ramificazione. Tali nanoparticelle sono ottenute secondo il procedimento dell'invenzione, sintetizzando innanzitutto semi di circa 40 nm di diametro (preparati come indicato con riferimento alla figura 1A) e poi riducendo su di essi la stessa quantità di ioni oro menzionata con riferimento alle figure 1A-F impiegando idrossilammina solfato come agente riducente in presenza di differenti concentrazioni di HEPES. La figura 2A corrisponde ai semi di nanoparticelle d'oro fatti crescere con ioni oro e idrossilammina in assenza di HEPES, il che porta alla formazione di nanoparticelle d'oro sferiche di circa 60 nm di diametro. La figura 2B corrisponde ai semi di nanoparticelle d'oro fatti

crescere con ioni oro e idrossilammina in presenza di HEPES 0,2 mM, il che porta alla formazione di nanoparticelle d'oro di circa 60 nm di diametro con superficie irregolare, simili a nanostelle con ramificazione sottosviluppata su una struttura portante sferica. La figura 2C corrisponde ai semi di nanoparticelle d'oro fatti crescere con ioni oro e idrossilammina in presenza di HEPES 1 mM, il che porta alla formazione di nanoparticelle d'oro di circa 60 nm di diametro con forma irregolare, simili a nanostelle aventi ramificazioni/punte molto piccole. La figura 2D corrisponde ai semi di nanoparticelle d'oro fatti crescere con ioni oro e idrossilammina in presenza di HEPES 2,5 mM. Il numero di siti di ramificazione e la lunghezza delle ramificazioni sono chiaramente aumentati. La figura 2E corrisponde ai semi di nanoparticelle d'oro fatti crescere con ioni oro e idrossilammina in presenza di HEPES 5 mM, il che porta alla formazione di nanoparticelle d'oro con ramificazione radiale ben distinguibile uniforme sull'intera superficie della nanoparticella. La figura 2F corrisponde ai semi di nanoparticelle d'oro fatti crescere con ioni oro e idrossilammina in presenza di HEPES 25 mM, il che porta alla

formazione di nanoparticelle d'oro stellate con evidente ramificazione lunga.

Confrontando le figure 2 (B-C-D-E-F) con le figure 1 (B-C-D-E-F), si vede che le nanoparticelle d'oro, pur avendo dimensioni differenti, presentando lo stesso pattern di incremento della nanostrutturazione, il che indica l'alta qualità del processo di sintesi.

La figura 3 mostra gli spettri di assorbimento nell'UV-visibile di nanoparticelle d'oro con A) diametro medio di circa 40 nm e B) diametro medio di circa 60 nm, con una differente entità di ramificazione, corrispondenti rispettivamente alle immagini TEM della figura 1 e della figura 2. Nella figura 3A i semi di nanoparticelle d'oro da 18 nm hanno un massimo di assorbimento intorno a circa 520 nm e il loro spettro è rappresentato dalla curva etichettata come "seed 20 nm". Dopo aver fatto crescere più oro sui semi, si osserva uno spostamento verso il rosso ("red shift") la cui entità dipende dal diametro medio delle nanoparticelle ottenute e dall'entità di ramificazione. La soluzione di nanoparticelle corrispondenti alla figura 1A, che sono state fatte crescere fino al diametro medio di 40 nm in assenza

di HEPES e quindi sono sferiche, ha un *red shift* minimo, con un massimo di assorbimento a 527 nm. Con la comparsa di ramificazione sottosviluppata durante la crescita (nanoparticelle corrispondenti alla figura 1B), il massimo di assorbimento della soluzione si sposta a circa 540 nm. Aumentando la quantità di HEPES durante la fase di accrescimento, l'entità della ramificazione aumenta ed il massimo di assorbimento della soluzione si sposta progressivamente verso il rosso: per le soluzioni di figura 1C, 1D, 1E e 1F, il massimo di assorbimento si sposta a circa 555 nm, 590 nm, 650 nm e 720 nm, rispettivamente. Lo stesso accade per le nanoparticelle di figura 2, che vengono fatte crescere a partire da semi di dimensioni maggiori. Nella figura 3B, la soluzione di semi di nanoparticelle d'oro di 40 nm ha un massimo di assorbimento a 527 nm, che è lo stesso della figura 3A. Facendo crescere ulteriormente questi semi in assenza di HEPES, fino a un diametro di 60 nm, il massimo di assorbimenti si sposta a 540 nm e corrisponde a quello delle nanoparticelle d'oro sferiche con diametro medio di 60 nm mostrate nella figura 2A. Le nanoparticelle d'oro stellate con ramificazione sottosviluppata corrispondenti alla

figura 2B hanno un massimo di assorbimento a 552 nm. Aggiungendo quantità crescenti di HEPES durante la fase di accrescimento, si ottengono nanoparticelle corrispondenti alle figure 2C, 2D, 2E e 2F, i cui massimi di assorbimento si spostano progressivamente a 580 nm, 610 nm, 665nm e 702 nm.

In accordo con il *red shift* osservato in relazione al massimo di assorbimento, all'aumentare della ramificazione il colore delle soluzioni varia dal rosso fino al blu-porpora.

Come menzionato in precedenza, il procedimento di sintesi di nanoparticelle d'oro stellate secondo l'invenzione permette vantaggiosamente di controllare sia il diametro medio sia il livello di ramificazione sulla superficie, mantenendo una buona monodispersione.

Secondo una forma di realizzazione preferita, le nanoparticelle stellate sono sintetizzate con un procedimento comprendente una pluralità di passaggi di sintesi, il primo dei quali è la sintesi dei cosiddetti semi ("seeds"), sintesi che può essere realizzata tramite qualsiasi procedura nota a tale scopo. A titolo di esempio, i semi sono sintetizzati a partire da una soluzione acquosa di ioni oro, ad esempio sotto forma di acido

cloroaurico, che sono sottoposti a riduzione mediante ad esempio trisodio citrato a temperatura di ebollizione. In alternativa, è possibile prima mescolare la soluzione di acido cloroaurico con trisodio citrato a temperatura ambiente, aggiungendo poi una soluzione acquosa fredda di sodio boroidruro. Il prodotto di questo primo passaggio di sintesi è una soluzione acquosa di nanoparticelle d'oro di forma sferica e di piccolo diametro, chiamate appunto semi. Nei successivi passaggi di sintesi, una predeterminata quantità di soluzione di semi è miscelata con una soluzione acquosa di idrossilammina come tale, o in forma salificata (ad esempio idrossilammina solfato), e di HEPES. Il pH della soluzione è preferibilmente compreso fra 5,0 e 9,0, più preferibilmente è di circa 7,0. A tale soluzione è aggiunta goccia a goccia e sotto agitazione un'ulteriore quantità di soluzione di ioni oro, preferibilmente acido cloroaurico.

L'entità di ramificazione delle nanoparticelle stellate ottenute mediante il procedimento dell'invenzione è controllata variando la quantità di HEPES nella soluzione. In assenza di HEPES, le nanoparticelle crescono di dimensioni in maniera

uniforme in tutte le direzioni, senza la formazione di ramificazioni sulla loro superficie, e quindi crescono come nanoparticelle sferiche. In presenza di HEPES, si verifica invece una crescita non uniforme delle nanoparticelle, con la formazione di nanoparticelle stellate caratterizzate dalla presenza di una ramificazione ("branching"). Il diametro medio complessivo delle nanoparticelle ottenute è finemente controllato sia dalla quantità di semi di nanoparticelle di oro aggiunte nella soluzione di crescita, sia dalla quantità di ioni aurato aggiunti in tale soluzione. L'entità di ramificazione dipende invece dalla quantità di HEPES impiegato nella sintesi. In una forma di realizzazione preferita, l'HEPES è impiegato ad una concentrazione compresa fra 0,1 mM e 200 mM, preferibilmente compresa fra 0,2 mM e 25 mM. Le nanoparticelle stellate così ottenute hanno un diametro medio complessivo compreso fra 20 e 200 nm e una lunghezza media delle ramificazioni compresa fra 4 e 60 nm. In tale forma di realizzazione preferita, le nanoparticelle stellate ottenute hanno un'assorbanza massima nel campo dell'UV-visibile compresa fra 500 e 800 nm, preferibilmente compresa fra 520 e 740 nm, che dipende sia dalle

dimensioni complessive sia dall'entità di ramificazione.

Con il termine "ramificazione" ("branching") si intendono indicare le protuberanze presenti sulla superficie di una nanoparticella stellata come risultato dell'accrescimento non uniforme della nanoparticella stessa. E' stato osservato che ciascuna singola protuberanza può avere uno sviluppo sostanzialmente lineare oppure ramificato. Con il termine "entità di ramificazione" si intendono indicare sia il numero di siti di ramificazione sia la lunghezza media delle protuberanze, siano esse lineari e/o ramificate.

Grazie alle estremità appuntite delle ramificazioni, le nanoparticelle d'oro stellate ottenute con il procedimento della presente invenzione sono in grado di incrementare notevolmente il campo elettromagnetico che le circonda. Tale proprietà può essere vantaggiosamente utilizzata per applicazioni quali ad esempio la spettroscopia Raman amplificata da superfici (SERS) per la rivelazione di molecole bersaglio in tracce. L'incremento del campo elettromagnetico locale le rende inoltre idonee per applicazioni quali la fluorescenza la o

chemiluminescenza amplificata da metalli (MEF o MEC).

Un ulteriore vantaggio delle nanoparticelle d'oro stellate ottenute con il procedimento dell'invenzione è che esse non presentano in superficie forti ligandi o tensioattivi, quali ad esempio molecole organiche tioliche o CTAB, per cui possono essere facilmente modificate con idonei gruppi funzionali, ligandi o biomolecole, per applicazioni diagnostiche, di *drug delivery*, di bioconiugazione, etc., che richiedono la presenza di particolari funzionalità sulla superficie delle nanoparticelle, o addirittura per la formazione di strati autoassemblati sulle superfici alle quali le nanoparticelle d'oro sono in grado di legarsi.

Le nanoparticelle d'oro stellate ottenute con il procedimento dell'invenzione si prestano altresì ad essere rivestite con un guscio di ossido di metallo, quale ad esempio silice od altri ossidi di metalli, di spessore variabile, per ulteriori applicazioni quali ad esempio MEF (*Metal Enhanced Fluorescence*), in cui è essenziale che vi sia una certa distanza fra il fluoroforo e la superficie della nanoparticella.

Come menzionato in precedenza, la possibilità

di controllare sia il diametro medio complessivo sia l'entità delle ramificazioni tramite il procedimento di sintesi dell'invenzione, permette anche si regolare finemente le proprietà ottiche delle nanoparticelle d'oro stellate ottenute, ivi incluso il colore. Ciò rende le nanoparticelle d'oro stellate ottenute con il procedimento dell'invenzione particolarmente idonee all'impiego come agenti coloranti in specifici materiali opachi o trasparenti, oppure all'impiego in rivestimenti in cui non sarebbe appropriato l'utilizzo di coloranti organici o di complessi metallici.

Infine, il procedimento dell'invenzione può essere controllato in modo tale da risultare nella sintesi di nanoparticelle d'oro stellate aventi un elevato coefficiente di estinzione ed un ampio spettro di assorbimento nella regione del rosso e del vicino infrarosso, il che le rende ottimi candidati per l'impiego in trattamenti ipertermici di tessuti cancerosi (migliori dei "nanorod" d'oro) mediante l'impiego di irraggiamento laser locale per uccidere le cellule cancerose bersagliate da tali nanostrutture, attraverso tecniche di bioconiugazione specifica. Poiché le nanoparticelle d'oro stellate ottenute con il procedimento

dell'invenzione possono avere elevato coefficiente di estinzione ed ampio spettro di assorbimento nella regione del rosso e del vicino infrarosso, possono essere impiegati laser con una più ampia gamma di lunghezze d'onda per un efficiente effetto fototermico locale, ovvero intorno alle nanoparticelle.

Gli esempi che seguono sono forniti a titolo puramente illustrativo e non limitativo della portata dell'invenzione come definita dalle annesse rivendicazioni.

### **Esempi**

#### **Esempio 1 (nanoparticelle con elevata ramificazione, dimensioni piccole)**

Sono state sintetizzate nanoparticelle d'oro di circa 18 nm facendo prima bollire 150 ml di soluzione acquosa di  $\text{HAuCl}_4$  0,25 mM seguita dall'aggiunta di 2,6 ml di soluzione di trisodio citrato all'1%, poi la soluzione è stata lasciata bollire delicatamente per 30 minuti e infine è stata lentamente raffreddata. E' comparso un colore rosso vino. Queste nanoparticelle sono state usate come semi per l'ulteriore accrescimento con sviluppo di ramificazione ("branching"). A tale scopo, 0,8 ml della soluzione di semi da 18 nm sono

stati diluiti con la necessaria quantità di acqua e poi sono stati aggiunti 0,3 ml di NH<sub>2</sub>OH 40 mM e 0,75 ml di soluzione di HEPES 1 M (pH 7,0), per avere un volume finale di 25 ml. A questa soluzione sono stati aggiunti goccia a goccia 5 ml di soluzione acquosa di HAuCl<sub>4</sub> 1 mM, il che ha determinato un cambiamento del colore della soluzione e la formazione di nanoparticelle d'oro stellate di circa 40 nm di diametro aventi un massimo di assorbimento a circa 720 nm, come confermato mediante *Dynamic light scattering* (DLS), microscopia elettronica a trasmissione (TEM) e spettroscopia UV-Visibile.

**Esempio 2 (nanoparticelle con elevata ramificazione, dimensioni grandi)**

Sono state sintetizzate nanoparticelle d'oro di circa 18 nm come descritto nell'esempio 1.

Per incrementarne il diametro, circa 8 ml di soluzione di semi di 18 nm sono stati aggiunti ad una soluzione di accrescimento di 150 ml di acqua con 1 ml di idrossilammina solfato 40 mM e priva di molecole di HEPES. A questa soluzione sono stati aggiunti goccia a goccia 20 ml di soluzione di HAuCl<sub>4</sub> 1 mM, con agitazione vigorosa costante, il che ha portato all'accrescimento delle

nanoparticelle sino ad un diametro finale di circa 40 nm, ma senza la crescita di ramificazione (nanoparticelle sferiche). La soluzione di reazione è stata agitata per altri 30 minuti ed infine è stato aggiunto trisodio citrato ad una concentrazione finale di 1 mM, come debole agente stabilizzante della superficie di tali nanostrutture. Queste nanoparticelle sono state usate come semi per l'ulteriore accrescimento con lo sviluppo di ramificazione ("branching"). A tale scopo, la soluzione contenente i semi da 40 nm è stata concentrata mediante centrifugazione, in modo da utilizzare la stessa quantità di semi (nel volume finale) utilizzata per la sintesi dell'esempio 1. 0,8 ml di questa soluzione di semi da 40 nm sono stati diluiti con la necessaria quantità di acqua e poi sono stati aggiunti 0,3 ml di NH<sub>2</sub>OH 40 mM e 0,75 ml di soluzione 1 M di HEPES (pH 7,0), per avere un volume finale di 25 ml. A questa soluzione sono stati aggiunti goccia a goccia 5 ml di soluzione acquosa di HAuCl<sub>4</sub> 1 mM, portando ad un cambiamento di colore della soluzione ed alla formazione di nanoparticelle d'oro stellate di circa 60 nm di diametro aventi un massimo di assorbimento a circa 702 nm, come

confermato mediante DLS, TEM e spettroscopia UV-Visibile.

**Esempio 3 (nanoparticelle con ramificazione sottosviluppata e dimensioni piccole)**

Sono state sintetizzate nanoparticelle d'oro di circa 18 nm facendo prima bollire 150 ml di soluzione acquosa di  $\text{HAuCl}_4$  0,25 mM, seguita dall'aggiunta di 2,8 ml di soluzione all'1% di trisodio citrato, poi la soluzione è stata lasciata bollire delicatamente per 30 minuti e infine è stata lentamente raffreddata. E' comparso un colore rosso vino. Queste nanoparticelle sono state usate come semi per ottenere nanoparticelle stellate con ramificazione sottosviluppata. A tale scopo, 0,8 ml di soluzione di semi di 18 nm sono stati diluiti con la necessaria quantità di acqua, a cui è seguita l'aggiunta di 0,3 ml di  $\text{NH}_2\text{OH}$  40 mM e 6  $\mu\text{l}$  di soluzione di HEPES 1 M (pH 7,0), per ottenere un volume finale di 25 ml. A questa soluzione sono stati aggiunti goccia a goccia 5 ml di soluzione acquosa di  $\text{HAuCl}_4$  1 mM, portando ad un cambiamento di colore della soluzione ed alla formazione di nanoparticelle d'oro stellate di circa 40 nm di diametro con ramificazione poco sviluppata, aventi un massimo di assorbimento a circa 540 nm, come

confermato mediante DLS, TEM e spettroscopia UV-Visibile.

**Esempio 4 (nanoparticelle con ramificazione sottosviluppata e dimensioni grandi)**

Sono state sintetizzate nanoparticelle d'oro di circa 18 nm come descritto nell'esempio 3.

Per ottenere nanoparticelle d'oro stellate di dimensioni maggiori, i semi di circa 18 nm per prima cosa sono stati fatti crescere di diametro, senza la creazione di ramificazioni. A tale scopo, circa 8 ml di soluzione di semi di 18 nm sono stati aggiunti ad una soluzione di accrescimento di 150 ml di acqua, a cui è stato aggiunto circa 1 ml di idrossilammina solfato 40 mM. A questa soluzione sono stati aggiunti goccia a goccia 20 ml di soluzione di  $\text{HAuCl}_4$  1 mM, con agitazione vigorosa costante, il che ha portato all'accrescimento sferico delle nanoparticelle sino ad un diametro finale di circa 40 nm. La soluzione di reazione è stata agitata per altri 30 minuti ed infine è stato aggiunto trisodio citrato ad una concentrazione finale di 1 mM, come debole agente stabilizzante della superficie di tali nanostrutture. Queste nanoparticelle sono state usate come semi per l'ulteriore accrescimento di nanoparticelle

stellate con ramificazione sottosviluppata. Tuttavia, prima della fase di crescita, i semi da 40 nm sono stati concentrati mediante centrifugazione, per utilizzare la stessa quantità di semi (nel volume finale) impiegata nell'esempio 1. 0,8 ml di questa soluzione di semi da 40 nm sono stati diluiti nella quantità d'acqua necessaria, seguita dall'aggiunta di 0,3 ml di NH<sub>2</sub>OH 40 mM e 6 µl di soluzione di HEPES 1 M (pH 7,0), in modo da avere un volume finale di 25 ml. A questa soluzione sono stati aggiunti goccia a goccia 5 ml di soluzione acquosa di HAuCl<sub>4</sub> 1 mM, portando ad un cambiamento del colore ed alla formazione di nanoparticelle stellate con ramificazione sottosviluppata aventi un massimo di assorbimento di circa 550 nm, come confermato mediante DLS, TEM e spettroscopia UV-Visibile.

**Esempio 5 (nanoparticelle d'oro con ramificazione di entità intermedia e dimensioni piccole)**

Sono state sintetizzate nanoparticelle d'oro di circa 18 nm come descritto nell'esempio 3.

Queste nanoparticelle sono state utilizzate come semi per farle crescere ulteriormente di dimensioni e ottenere ramificazione di entità intermedia. 0,8 ml di questa soluzione di semi da

18 nm sono stati diluiti con la quantità necessaria di acqua, seguita dall'aggiunta di 0,3 ml di NH<sub>2</sub>OH 40 mM e 75 µl di soluzione di HEPES 1 M (pH 7,0), per avere un volume finale di 25 ml. A questa soluzione sono stati aggiunti goccia a goccia 5 ml di soluzione acquosa di HAuCl<sub>4</sub> 1 mM, portando ad un cambiamento del colore della soluzione ed alla formazione di nanoparticelle d'oro stellate da circa 40 nm di diametro con ramificazione intermedia ed aventi un massimo di assorbimento a circa 590, come confermato mediante DLS, TEM e spettroscopia UV-Visibile.

**Esempio 6 (nanoparticelle d'oro con ramificazione di entità intermedia e dimensioni grandi)**

Sono state sintetizzate nanoparticelle d'oro di circa 18 nm come descritto nell'esempio 3.

Per ottenere nanoparticelle d'oro di dimensioni maggiori e ramificazione intermedia, i semi da 18 nm sono per prima cosa stati fatti aumentare di diametro senza la creazione di ramificazione. A tale scopo, circa 8 ml di soluzione di semi da 18 nm sono stati aggiunti a 150 ml di acqua insieme a 1 ml di solfato di idrossilammina 40 mM. A questa soluzione, sono stati aggiunti goccia a goccia con costante

vigorosa agitazione 20 ml di soluzione 1 mM di HAuCl<sub>4</sub>, portando all'accrescimento delle dimensioni dei semi sino ad un diametro finale di circa 40 nm. La reazione è stata fatta continuare per altri 30 minuti con agitazione, ed infine è stata aggiunta una quantità di soluzione di trisodio citrato sufficiente per ottenere una concentrazione finale di 1 mM, come debole agente stabilizzante della superficie di tali nanostrutture.. Queste nanoparticelle sono state usate come semi per far crescere una ramificazione intermedia. In primo luogo, i semi da 40 nm sono stati concentrati mediante centrifugazione in modo tale da utilizzare la stessa quantità di semi (nel volume finale) utilizzata per la sintesi dell'esempio 1. 0,8 ml di questa soluzione di semi da 40 nm sono stati diluiti con la quantità d'acqua necessaria, seguita dall'aggiunta di 0,3 ml di NH<sub>2</sub>OH 40 mM e 75 µl di soluzione di HEPES 1 M (pH 7,0), in modo da avere un volume finale di 25 ml. A questa soluzione sono stati aggiunti goccia a goccia 5 ml di soluzione acquosa di HAuCl<sub>4</sub> 1 mM, portando ad un cambiamento del colore della soluzione ed alla formazione di nanoparticelle d'oro con entità intermedia di ramificazione e aventi un massimo di assorbimento

di circa 610 nm, come confermato mediante DLS, TEM  
e spettroscopia UV-Visibile.

## RIVENDICAZIONI

1. Procedimento di sintesi di nanoparticelle d'oro stellate ("gold branched nanoparticles") mediante accrescimento mediato da semi, comprendente i passaggi di:

- a) provvedere una soluzione acquosa di semi sferici di nanoparticelle d'oro; e
- b) sottoporre i semi sferici di nanoparticelle d'oro a un trattamento di accrescimento, caratterizzato dal fatto che comprende:

b<sub>1</sub>) trattare la soluzione acquosa di semi sferici di nanoparticelle d'oro con una soluzione acquosa comprendente idrossilammina o un suo sale quale agente riducente ed acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico (HEPES) quale agente che dirige la forma delle suddette nanoparticelle; e

b<sub>2</sub>) aggiungere una soluzione acquosa comprendente ioni aurato, ottenendo in tal modo nanoparticelle d'oro stellate mediante l'accrescimento controllato di ramificazioni ("branching") sulla superficie dei semi sferici di nanoparticelle d'oro.

2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui il sale di idrossilammina è idrossilammina cloridrato o idrossilammina solfato.

3. Procedimento secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui la soluzione acquosa del passaggio b<sub>2</sub>) comprende un sale di oro quale ad esempio acido tetracloroaurico (HAuCl<sub>4</sub>).

4. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 3, in cui i semi sferici di nanoparticelle d'oro, prima di essere sottoposti al trattamento di accrescimento del passaggio b), sono fatti crescere di dimensioni mediante trattamento preventivo con una soluzione acquosa esente da HEPES di un agente riducente e successiva aggiunta di una soluzione acquosa di ioni aurato.

5. Procedimento secondo la rivendicazione 4, in cui l'agente riducente impiegato nel passaggio di trattamento preventivo è scelto dal gruppo che consiste di sodio citrato, idrossilammina o sale di idrossilammina.

6. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 5, in cui la concentrazione finale di HEPES nel passaggio b<sub>2</sub>) è compresa nell'intervallo di 0,1 mM a 200 mM, preferibilmente compresa nell'intervallo di 0,2 mM a 25 mM.

7. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 6, in cui i semi sferici di nanoparticelle che sono sottoposti al trattamento

di accrescimento del passaggio b), hanno diametro medio compreso nell'intervallo di 10 a 100 nm, preferibilmente compreso nell'intervallo di 15 a 60 nm.

8. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 7, in cui il pH della soluzione acquosa del passaggio b<sub>1</sub>) è compreso fra 5,0 e 9,0 preferibilmente è di circa 7,0.

9. Nanoparticelle d'oro stellate ottenibili mediante il procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 8.

10. Nanoparticelle d'oro stellate secondo la rivendicazione 9, aventi un diametro medio complessivo di nanoparticella compreso nell'intervallo di 20 a 200 nm e una lunghezza di ramificazione compresa nell'intervallo di 4 a 60 nm.

11. Nanoparticelle d'oro stellate secondo la rivendicazione 9 o 10, aventi un'assorbanza massima nel campo dell'UV-visibile compresa nell'intervallo di 500 a 800 nm, preferibilmente compresa nell'intervallo di 520 a 740 nm.

12. Uso di nanoparticelle d'oro stellate secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 9 a 11, nella spettroscopia Raman amplificata da superfici (SERS)

o nella fluorescenza o chemiluminescenza amplificata da metalli (MEF o MEC) o come additivo ottico per rivestimenti o materiali trasparenti od opachi.

13. Nanoparticelle d'oro stellate secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 9 a 11, per l'uso nella diagnosi o nel trattamento terapeutico di una patologia.

14. Nanoparticelle d'oro stellate secondo la rivendicazione 13, per l'uso nel trattamento terapeutico ipertermico di una patologia tumorale.

15. Sistema di veicolazione di farmaco comprendente nanoparticelle d'oro stellate secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 9 a 11.

CLAIMS

1. A method of synthesizing branched gold nanoparticles by seed-mediated growth, comprising the steps of:

a) providing an aqueous solution of gold nanoparticle spherical seeds; and

b) subjecting the gold nanoparticle spherical seeds to a growth treatment, characterized in that it comprises:

b<sub>1</sub>) treating the aqueous solution of gold nanoparticle spherical seeds with an aqueous solution comprising hydroxylamine or a salt thereof as a reducing agent and 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) as a nanoparticle shape-directing agent; and

b<sub>2</sub>) adding an aqueous solution comprising aurate ions, thereby obtaining branched gold nanoparticles by the controlled growth of branching on the surface of the gold nanoparticle spherical seeds.

2. The method according to claim 1, wherein the hydroxylamine salt is hydroxylamine hydrochloride or hydroxylamine sulfate.

3 The method according to claim 1 or 2, wherein the aqueous solution of step b<sub>2</sub>) comprises a gold

ion such as for example tetrachloroauric acid ( $\text{HAuCl}_4$ ).

4. The method according to any of claims 1 to 3, wherein the gold nanoparticle spherical seeds, before being subjected to the growing treatment of step b), are grown in size by a preventive treatment with an HEPES-free aqueous solution of a reducing agent and subsequent addition of an aqueous solution of aurate ions.

5. The method according to claim 4, wherein the reducing agent employed in the preventive treatment step is selected from the group consisting of sodium citrate, hydroxylamine or a salt thereof.

6. The method according to any of claims 1 to 5, wherein the final concentration of HEPES in step b<sub>2</sub>) is comprised within the range of 0.1 mM to 200 mM, preferably within the range of 0.2 mM to 25 mM.

7. The method according to any of claims 1 to 6, wherein the gold nanoparticle spherical seeds which are subjected to the growing step b), have an average diameter comprised within the range of 10 to 100 nm, preferably within the range of 15 to 60 nm.

8. The method according to any of claims 1 to 7, wherein the pH of the aqueous solution of step b<sub>1</sub>)

is comprised within 5.0 and 9.0, preferably it is of about 7.0.

9. Branched gold nanoparticles obtainable by the method according to any of claims 1 to 8.

10. Branched gold nanoparticles according to claim 9, having a total average particle diameter comprised within the range of from 20 to 200 nm and an average length of the branches comprised within the range of from 4 to 60 nm.

11. Branched gold nanoparticles according to claim 9 or 10, having an absorption maximum in the UV-Visible range comprised between 500 and 800 nm, preferably comprised between 520 and 740 nm.

12. Use of branched gold nanoparticles according to any of claims 9 to 11, in Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) or Metal-Enhanced Fluorescence (MEF) or Metal-Enhanced Chemiluminescence (MEC) or as an optical additive for transparent or opaque coatings or materials.

13. Branched gold nanoparticles according to any of claims 9 to 11, for use in the diagnosis or the therapeutic treatment of a disease.

14. Branched gold nanoparticles according to claim 13, for use in the hyperthermic therapeutic treatment of a tumor disease.

15. A drug delivery system, comprising branched gold nanoparticles according to any of claims 9 to 11.

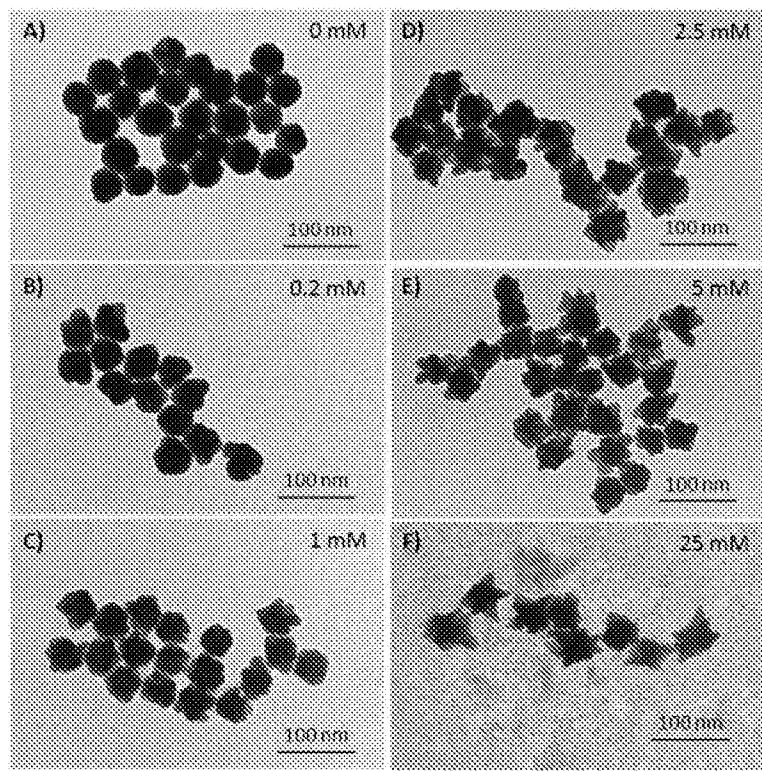


FIG. 1

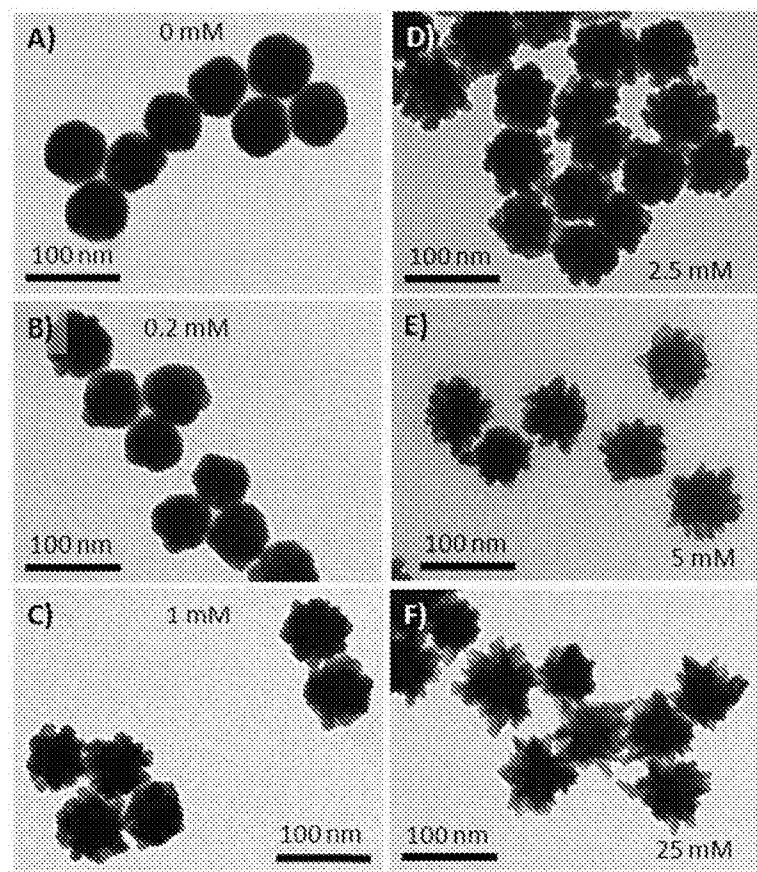


FIG. 2

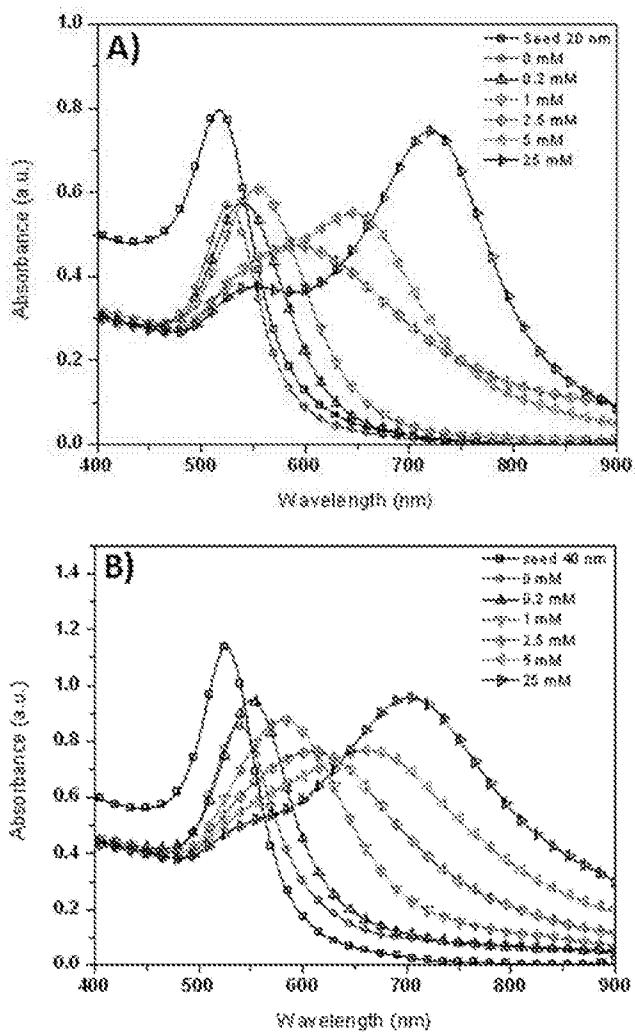


FIG. 3