

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 008 029**

51 Int. Cl.:

G01N 21/00	(2006.01)
B01J 13/00	(2006.01)
B82Y 10/00	(2011.01)
B82Y 20/00	(2011.01)
B82Y 40/00	(2011.01)
G01N 21/65	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.07.2020 PCT/EP2020/069684**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2021 WO21009090**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2020 E 20739677 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2024 EP 3999834**

54 Título: **Método de fabricación de etiquetas de espectroscopia Raman potenciada en superficie**

30 Prioridad:

15.07.2019 US 201962874158 P
16.08.2019 EP 19192040
18.03.2020 EP 20163879

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.03.2025

73 Titular/es:

SICPA HOLDING SA (100.00%)
Avenue de Florissant 41
1008 Prilly, CH

72 Inventor/es:

PIOTTI, MARCELO EDUARDO;
SCHEFFLER, RAYMOND H. y
KOWALSKI, MARK

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 3 008 029 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

Método de fabricación de etiquetas de espectroscopia Raman potenciada en superficie

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de los métodos de fabricación de etiquetas de espectroscopia Raman potenciada en superficie (SERS). El método de fabricación de acuerdo con la presente invención es reproducible y versátil y permite la producción de una manera conveniente de grandes cantidades de etiquetas SERS caracterizadas por una distribución de tamaños estrecha y una alta proporción de agregados de bajo número. Las etiquetas SERS fabricadas mediante el método de fabricación inventivo descrito en el presente documento proporcionan respuestas SERS de conjunto aumentadas.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las etiquetas de espectroscopia Raman potenciada en superficie (SERS) han demostrado ser útiles para una variedad de aplicaciones, incluido el etiquetado de productos con fines de identificación y autenticación, y el cribado multiplexado de alto rendimiento en tecnología de micromatrices, diagnóstico y bioimagenología. Las etiquetas SERS son agregados de nanopartículas que presentan una superficie plasmónica y que tienen moléculas indicadoras activas en Raman adsorbidas en su superficie. Las nanopartículas que presentan una superficie plasmónica son responsables de la generación del campo eléctrico requerido para la amplificación Raman, mientras que la molécula indicadora activa en Raman proporciona la huella vibracional única de la etiqueta SERS. Normalmente, los agregados presentan una capa de recubrimiento externa que a) aísla la etiqueta SERS del medio externo, por lo tanto, que impide que las moléculas indicadoras activas en Raman se filtren fuera de la etiqueta SERS y que protege la etiqueta SERS de contaminaciones del medio externo que pueden dar lugar a ruido vibracional, b) aumenta la estabilidad coloidal de la etiqueta SERS, y c) proporciona una superficie conveniente para una mayor funcionalización química. Hasta la fecha, se han empleado polímeros y sílice como capas de recubrimiento externas.

Debido a la fuerte dependencia de las propiedades plasmónicas de los estados de agregación de nanopartículas, la producción de etiquetas SERS con una alta población de agregados de bajo número es muy deseable para obtener respuestas SERS de conjunto aumentadas. Se produjeron etiquetas SERS con una alta población de agregados de bajo número a través de técnicas de clasificación post-sintética, o a través de procesos sintéticos de agregación controlada.

Por ejemplo, el fraccionamiento de flujo de campo aplicado a una mezcla que contiene nanopartículas individuales y agregados de nanopartículas de dímeros a octámeros dio como resultado la producción de una fracción enriquecida con etiquetas SERS de dímeros (10 %), trímeros (21 %) y tetrámeros (13 %), pero que, sin embargo, contenía un alto porcentaje de nanopartículas individuales (52 %) (*J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 10903-10910). Una mezcla que contenía nanopartículas individuales y agregados de dímeros a dodecámeros se enriqueció en etiquetas SERS de dímeros (52 %) y trímeros (32 %) mediante el uso de un método de clasificación centrífuga post-sintética en un medio de gradiente de densidad de alta viscosidad, tal como un medio de gradiente de densidad de iodixanol acuoso (US9802818B2). Además de consumir mucho tiempo y dinero, las técnicas de clasificación post-sintética requieren el uso de condiciones severas (por ejemplo, reactivos de alta viscosidad) que conducen a la desestabilización de las etiquetas SERS sin recubrimiento. Por tanto, las técnicas de clasificación post-sintética son compatibles solo con etiquetas SERS recubiertas de sílice o polímero. Por lo tanto, los procesos sintéticos de agregación controlada son de gran ventaja para la producción de etiquetas SERS con una distribución de tamaños estrecha y una alta relación de agregados de bajo número.

La agregación asistida por soporte sólido permitió la producción de etiquetas SERS con una distribución de tamaños estrecha. Ruan *et al.* (*Adv. Optical Mater.* **2014**, 2, 65 - 73) describieron la síntesis de etiquetas SERS asimétricas de núcleos satélites que tienen un número de 18 ± 2 satélites de nanoesferas de Au de un diámetro medio de 24 nm por núcleo de nanoesferas de Au de un diámetro medio de 180 nm. La síntesis implica la adsorción de núcleos de nanopartículas de Au estabilizados con bromuro de cetiltrimetilamonio en un portaobjetos de vidrio recubierto de óxido de indio y estaño o una oblea de silicio, seguido de la inmersión del soporte sólido funcionalizado en una solución de 4-aminotiofenol en agua/acetonitrilo para adsorber la molécula indicadora activa en Raman en la superficie de las nanopartículas de Au, y la posterior inmersión durante 1 hora en una suspensión de nanopartículas de Au con un diámetro medio de 24 nm. El estado de agregación de las etiquetas SERS se puede controlar controlando el tiempo de inmersión del soporte sólido funcionalizado en la suspensión de satélites de nanopartículas de Au y/o disminuyendo la concentración de satélites de nanopartículas de Au en dicha suspensión. El método descrito por Ruan *et al.* se basa en el uso de tensioactivo de bromuro de cetiltrimetilamonio para estabilizar el coloide de Au, lo que disminuye significativamente la superficie disponible para la adsorción de la molécula indicadora activa en Raman en el núcleo de la nanopartícula de Au y, por lo tanto, la intensidad de la señal SERS proporcionada por las etiquetas SERS. Para unir los satélites de nanopartículas de Au al núcleo de nanopartículas de Au, el método

de agregación emplea moléculas indicadoras activas en Raman que presentan dos funcionalidades con afinidad por la superficie de Au. Así, el método es aplicable solo para la producción de etiquetas SERS que tienen moléculas indicadoras activas en Raman que presentan dos funcionalidades con afinidad por la superficie de Au, lo que representa una gran limitación en términos de moléculas indicadoras activas en Raman que se utilizarán como huella de la etiqueta SERS. Asimismo, dicho método implica tiempos de reacción prolongados y no es adecuado para la producción conveniente de grandes cantidades de etiquetas SERS.

Otro método de ensamblaje asistido por soporte sólido de etiquetas SERS de distribución de tamaños estrecha se describió por Yoon *et al.* (*ACS Nano* **2012**, 8, 7199 - 7208). El método se basa en la propensión a la desorción dependiente del tamaño de las nanopartículas de Au adsorbidas en portaobjetos de vidrio con funcionalidad amino y en el uso de alcanoditioles para unir los satélites de nanopartículas de Au al núcleo de la nanopartícula de Au. Se produjeron etiquetas SERS que tenían 13 ± 3 satélites de nanopartículas de Au de 13 nm de diámetro medio por núcleo de nanopartículas de Au de 51 nm de diámetro medio. El método desarrollado por Yoon *et al.* parece permitir la incorporación de cualquier molécula indicadora activa en Raman en la etiqueta SERS. Sin embargo, dicho método presenta limitaciones en términos de tamaños de nanopartícula de Au que se pueden utilizar y de superficie en el núcleo de la nanopartículas de Au accesible a las moléculas indicadoras activas en Raman. Asimismo, el método requiere tiempos de reacción prolongados y no es adecuado para la producción conveniente de grandes cantidades de etiquetas SERS. El documento US 2008/118986 A1 divulga un método de fabricación de etiquetas SERS que comprende las etapas de proporcionar un coloide de nanopartículas SERS secundarias; proporcionar un coloide de nanopartículas SERS primarias que comprende una molécula indicadora; combinar dichos coloides y agregar dichas nanopartículas. Las nanopartículas son nanopartículas de oro, plata, cobre y aluminio. Las nanopartículas se dispersan en un disolvente acuoso.

Por tanto, permanece una necesidad de métodos reproducibles, rentables y versátiles de fabricación de etiquetas SERS, que permitan la producción de una manera conveniente de grandes cantidades de etiquetas SERS caracterizadas por una distribución de tamaños estrecha y una alta proporción de agregados de bajo número. Las etiquetas SERS con una alta población de agregados de bajo número son muy deseables para obtener respuestas SERS de conjunto aumentadas.

SUMARIO DE LA INVENCION

En consecuencia, el objeto de la presente invención es proporcionar un método versátil, rentable y reproducible de fabricación de etiquetas SERS que permite la producción de una manera conveniente de grandes cantidades de etiquetas SERS caracterizadas por una distribución de tamaños estrecha y una alta proporción de agregados de bajo número. Esto se logra mediante un método de fabricación de etiquetas de espectroscopía Raman potenciada en superficie (SERS), preferentemente etiquetas SERS para su uso como elemento de seguridad, que comprende las etapas de:

a) proporción de un primer coloide que consiste esencialmente en nanopartículas que tienen una superficie plasmónica y sustancialmente del mismo tamaño dispersas en un disolvente acuoso, y un agente estabilizante adsorbido en la superficie de dichas nanopartículas, y que tiene un valor de potencial ζ menor o igual a -25 mV;

b) proporción de un segundo coloide que consiste esencialmente en nanopartículas que tienen una superficie plasmónica y sustancialmente del mismo tamaño dispersas en un disolvente acuoso, las moléculas indicadoras activas en Raman adsorbidas en la superficie de dichas nanopartículas, y un agente estabilizante adsorbido en la superficie de dichas nanopartículas, y que tienen un valor de potencial ζ menor o igual a -25 mV;

c) combinación del primer coloide con el segundo coloide de modo que la relación entre el número de nanopartículas del primer coloide y el número de nanopartículas del segundo coloide sea de entre aproximadamente 25:1 y aproximadamente 1:1, preferentemente, de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 1:1, más preferentemente de 4:1 a aproximadamente 3:1 para proporcionar un tercer coloide;

d) inducción de la agregación de las nanopartículas mediante cualquiera de las etapas **d1)** – **d2)** o una combinación de las mismas:

d1) mezcla del tercer coloide obtenido en la etapa **c)** a un pH comprendido entre aproximadamente 2,2 y el valor de pH más bajo en el que las moléculas indicadoras activas en Raman tienen una carga eléctrica neta de entre 0 y 0,3;

d2) adición de una solución salina, preferentemente una solución salina inorgánica, al tercer coloide obtenido en la etapa **c)**; y

e) detención de la agregación.

Preferentemente, la etapa **b)** en el método reivindicado y descrito en el presente documento comprende las

siguientes etapas realizadas en el orden **b1)** a **b3)**:

- b1)** proporción de un coloide que consiste esencialmente en nanopartículas que tienen una superficie plasmónica y sustancialmente del mismo tamaño dispersas en un disolvente acuoso, y un agente estabilizante adsorbido en la superficie de dichas nanopartículas, y que tiene un valor de potencial ζ menor o igual a -25 mV;
- b2)** ajuste del pH del coloide al valor de pH más bajo en el que las moléculas indicadoras activas en Raman que se adsorberán en la superficie de las nanopartículas no llevan carga eléctrica neta mientras se mantiene el valor de potencial ζ menor o igual a -25 mV, preferentemente inferior a -40 mV; y
- b3)** adición de una solución de las moléculas indicadoras activas en Raman en un disolvente al coloide obtenido en la etapa **b2)** manteniendo el valor de potencial ζ menor o igual a -25 mV.

En una realización preferida adicional, las etapas **c)** y **d)** se llevan a cabo simultáneamente en un sistema de flujo continuo. En una realización preferida adicional, el tamaño de las nanopartículas en el primer coloide es diferente del tamaño de las nanopartículas en el segundo coloide.

Como se ilustra en los ejemplos **E1** - **E14**, el método reivindicado en el presente documento permite la integración de una variedad de moléculas indicadoras activas en Raman en la etiqueta SERS y no se limita a la combinación de tamaños específicos de nanopartículas, permitiendo también la síntesis de etiquetas SERS que comprenden nanopartículas que tienen el mismo tamaño que el confirmado, por ejemplo, por los ejemplos **E1** - **E8**, y **E12** - **E14**. Adicionalmente, el método de fabricación reivindicado y descrito en el presente documento proporciona etiquetas SERS con una distribución de tamaños estrecha como se ilustra, por ejemplo, por la **Figura 3a** y la **Figura 3b** y una alta proporción de agregados de bajo número como se ilustra, por ejemplo, por la **Figura 3a** y la **Figura 3b** y tiene un tiempo de reacción significativamente más corto en comparación con los métodos conocidos en la bibliografía.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1a** representa esquemáticamente un método de fabricación de etiquetas SERS de acuerdo con la presente invención. El método de fabricación incluye combinar un segundo coloide (120a) que consiste esencialmente en nanopartículas con una superficie plasmónica y sustancialmente del mismo tamaño (121a) dispersas en un disolvente acuoso (no mostrado), en donde las nanopartículas han adsorbido en su superficie moléculas indicadoras activas en Raman (122a) y un agente estabilizante (no mostrado) con un primer coloide que consiste esencialmente en nanopartículas con una superficie plasmónica y sustancialmente del mismo tamaño (130a) dispersas en un disolvente acuoso (no mostrado), en donde las nanopartículas han adsorbido en su superficie un agente estabilizante (no mostrado), e induciendo la agregación de las nanopartículas para proporcionar etiquetas SERS (140a).

La **Figura 1b** representa esquemáticamente una realización del método de fabricación de etiquetas SERS de acuerdo con la presente invención. En este método de fabricación específico, un reactor de flujo continuo que comprende dos tanques presurizados (111b, 112b), una unión en T (113b) y un depósito colector (114b), en donde cada uno de los dos tanques presurizados (111b, 112b) está conectado a través de un tubo a la unión en T (113b), que a su vez se conecta a través de un tubo al depósito colector (114b). El método de fabricación incluye combinar y mezclar simultáneamente a un pH comprendido entre aproximadamente 2,2 y el valor de pH más bajo en el que las moléculas indicadoras activas en Raman tienen una carga eléctrica neta de entre 0 y 0,3 en el tubo que conecta la unión en T (113b) al depósito colector (114b) del reactor de flujo continuo, un primer coloide proporcionado por el tanque presurizado (112b) y que consiste esencialmente en nanopartículas con una superficie plasmónica y sustancialmente del mismo tamaño (130b) dispersas en un disolvente acuoso (no mostrado), en donde dichas nanopartículas han adsorbido en su superficie un agente estabilizante (no mostrado), con un segundo coloide (120b) proporcionado por el tanque presurizado (111b) y que consiste esencialmente en nanopartículas con una superficie plasmónica y sustancialmente del mismo tamaño (121b) dispersas en un disolvente acuoso (no mostrado), en donde dichas nanopartículas han adsorbido en su superficie moléculas indicadoras activas en Raman (122b) y un agente estabilizante (no mostrado). La mezcla a un pH comprendido entre aproximadamente 2,2 y el valor de pH más bajo en el que las moléculas indicadoras activas en Raman tienen una carga eléctrica neta de entre 0 y 0,3 induce la agregación de nanopartículas. La etapa de agregación se detiene en el depósito colector (114b), proporcionando así las etiquetas SERS diana (140b).

La **Figura 1c** representa esquemáticamente una realización del método de fabricación de etiquetas SERS de acuerdo con la presente invención. En este método de fabricación específico, un reactor de flujo continuo comprende tres tanques presurizados (111c, 112c, 150c), una unión en T (113c) y un depósito colector (114c). Cada uno de los dos tanques presurizados (111c, 112c) está conectado a través de un tubo a la unión en T (113c), que a su vez se conecta a través de un tubo al depósito colector (114c). El método de fabricación incluye combinar y mezclar simultáneamente a un pH comprendido entre aproximadamente 2,2 y el valor de pH más bajo en el que las moléculas indicadoras activas en Raman tienen una carga eléctrica neta de entre 0 y 0,3 en el tubo que conecta la unión en T (113c) al depósito colector (114c) del reactor de

flujo continuo, un primer coloide proporcionado por el tanque presurizado (112c) y que consiste esencialmente en nanopartículas con una superficie plasmónica y sustancialmente del mismo tamaño (130c) dispersas en un disolvente acuoso (no mostrado), en donde las nanopartículas han adsorbido en su superficie un agente estabilizante (no mostrado), con un segundo coloide (120c) proporcionado por el tanque presurizado (111c) y que consiste esencialmente en nanopartículas con una superficie plasmónica y sustancialmente del mismo tamaño (121c) dispersas en un disolvente acuoso (no mostrado), en donde dichas nanopartículas han adsorbido en su superficie moléculas indicadoras activas en Raman (122c) y un agente estabilizante (no mostrado). La mezcla a un pH comprendido entre aproximadamente 2,2 y el valor de pH más bajo en el que las moléculas indicadoras activas en Raman tienen una carga eléctrica neta de entre 0 y 0,3 induce la agregación de nanopartículas. La etapa de agregación se detiene introduciendo agua almacenada en el tanque presurizado (150c) en el tubo que conduce al depósito colector (114c) para diluir el coloide, mediante la introducción de una solución básica almacenada en el tanque presurizado (150c) en el tubo que conduce al depósito colector (114c), mediante la introducción de un polímero almacenado en el tanque presurizado (150c) en el tubo que conduce al depósito colector (114c), o mediante la introducción de un precursor de material dieléctrico almacenado en el tanque presurizado (150c) en el tubo que conduce al depósito colector (114c), proporcionando así las etiquetas SERS diana (140c).

La **Figura 2a-c** ilustra la variación de la intensidad de la señal SERS con el tiempo de reacción de agregación: La **Figura 2a** muestra la variación de la intensidad de SERS con el tiempo de reacción de agregación para las etiquetas SERS fabricadas como se describe en el **Ejemplo E1**; La **Figura 2b** muestra la variación de la intensidad de SERS con el tiempo de reacción de agregación para las etiquetas SERS fabricadas como se describe en el **Ejemplo E14**; La **Figura 2c** muestra la variación de la intensidad de SERS con el tiempo de reacción de agregación para las etiquetas SERS fabricadas como se describe en el **Ejemplo E13**. El eje horizontal corresponde al tiempo de reacción de agregación en segundos y el eje vertical corresponde a la respuesta SERS con excitación de 785 nm. La intensidad de SERS indicada se midió con un tiempo de integración de 100 ms cada 1 segundo a la concentración de oro dada, y esta intensidad de señal se ha correlacionado con muestras diluidas a 12,5 µg de Au/ml y escaneadas en una integración de 1 segundo.

La **Figura 3a-b** presenta imágenes SEM tomadas de etiquetas SERS que contienen nanopartículas de diferentes tamaños fabricadas según los **Ejemplos E9 (Figura 3a)** y **10 (Figura 3b)**. Como lo confirman las imágenes SEM, las etiquetas SERS fabricadas de acuerdo con la presente invención enriquecidas en agregados de bajo número, tales como dímeros, trímeros y tetrámeros, y presentan una distribución de tamaños estrecha.

La **Figura 4** es un gráfico que ilustra el valor de potencial ζ del primer coloide **A2** (representado gráficamente como círculos sólidos) y segundos coloides **D2** (representado gráficamente como triángulos sólidos), **D5** (representado gráficamente como rombos sólidos) y **D6** (representado gráficamente como cuadrados sólidos), cuando dichos coloides se valoran con una solución acuosa de HCl 1 N o una solución acuosa de NaOH 1 N. El eje horizontal corresponde al valor de pH y el eje vertical corresponde al valor de potencial ζ (mV). Las condiciones en las que se observó la agregación (es decir, los coloides son inestables) están marcadas con un círculo. Como lo confirma la **Figura 4** una variedad de coloides caracterizados por un valor de potencial ζ inferior a -25 mV son estables. Dichos coloides se pueden utilizar como primer y segundo coloides, respectivamente en el método de fabricación de acuerdo con la presente invención.

La **Figura 5** ilustra el desarrollo de las intensidades de la señal SERS de los coloides que se agregan en un sistema de flujo. Cada medición se tomó en marcas de 1 metro a lo largo de una longitud de un tubo FEP transparente de 7 m de largo. Los datos representados por rombos conectados por una línea continua se tomaron en las etiquetas SERS producidas como se describe en el **Ejemplo E8**. Los datos representados por círculos conectados por una línea de puntos se tomaron en las etiquetas SERS producidas como se describe en el **Ejemplo E11**.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

Las siguientes definiciones han de usarse para interpretar el significado de los términos analizados en la descripción y citados en las reivindicaciones.

Tal como se utiliza en el presente documento, el artículo "*un/una*" indica tanto uno o una como más de uno o una y no necesariamente limita su sustantivo de referencia al singular.

Tal como se utiliza en el presente documento, se entiende que la expresión "*al menos*" define uno o más de uno, por ejemplo, uno o dos o tres.

La expresión "*que comprende*", como se utiliza en el presente documento, está destinada a ser no excluyente

y abierta. Por tanto, por ejemplo, una solución que comprende un compuesto A puede incluir otros compuestos además de A. Sin embargo, la expresión "*que comprende*" también cubre, como realización particular de la misma, los significados más restrictivos de "*que consiste esencialmente en*" y "*que consiste en*", de modo que, por ejemplo, "una solución que comprende A, B y, opcionalmente, C" también puede consistir (esencialmente) en A y B, o consiste (esencialmente) en A, B y C.

Cuando la presente descripción se refiere a realizaciones/características "*preferidas*", las combinaciones de estas realizaciones/características "*preferidas*" también se considerarán divulgadas siempre que esta combinación de realizaciones/características "*preferidas*" sea técnicamente significativa.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "*aproximadamente*" significa que la cantidad o el valor en cuestión pueden ser el valor específico designado o algún otro valor próximo. De manera general, el término "*aproximadamente*" que indica un determinado valor está destinado a indicar un intervalo dentro de $\pm 5\%$ del valor. Como ejemplo, la expresión "aproximadamente 100" indica un intervalo de 100 ± 5 , es decir, el intervalo de 95 a 105. Preferentemente, el intervalo indicado por el término "*aproximadamente*" indica un intervalo dentro de $\pm 3\%$ del valor, más preferentemente $\pm 1\%$. De manera general, cuando se usa el término "*aproximadamente*", cabe esperar que puedan obtenerse resultados o efectos similares de acuerdo con la invención dentro de un intervalo de $\pm 5\%$ del valor indicado.

Sorprendentemente, se descubrió que un método de fabricación de etiquetas de espectroscopía Raman potenciada en superficie (SERS), preferentemente etiquetas SERS para su uso como elemento de seguridad, que comprende las etapas de:

a) proporción de un primer coloide que consiste esencialmente en nanopartículas que tienen una superficie plasmónica y sustancialmente del mismo tamaño dispersas en un disolvente acuoso, y un agente estabilizante adsorbido en la superficie de dichas nanopartículas, y que tiene un valor de potencial ζ menor o igual a -25 mV;

b) proporción de un segundo coloide que consiste esencialmente en nanopartículas que tienen una superficie plasmónica y sustancialmente del mismo tamaño dispersas en un disolvente acuoso, las moléculas indicadoras activas en Raman adsorbidas en la superficie de dichas nanopartículas, y un agente estabilizante adsorbido en la superficie de dichas nanopartículas, y que tienen un valor de potencial ζ menor o igual a -25 mV;

c) combinación del primer coloide con el segundo coloide de modo que la relación entre el número de nanopartículas del primer coloide y el número de nanopartículas del segundo coloide sea de entre aproximadamente 25:1 y aproximadamente 1:1, preferentemente, de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 1:1, más preferentemente de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 3:1 para proporcionar un tercer coloide;

d) inducción de la agregación de las nanopartículas mediante cualquiera de las etapas **d1)** – **d2)** o una combinación de las mismas:

d1) mezcla del tercer coloide obtenido en la etapa **c)** a un pH comprendido entre aproximadamente 2,2 y el valor de pH más bajo en el que las moléculas indicadoras activas en Raman tienen una carga eléctrica neta de entre 0 y 0,3;

d2) adición de una solución salina, preferentemente una solución salina inorgánica, al tercer coloide obtenido en la etapa **c)**; y

e) detener la agregación;

proporciona de manera rentable y conveniente grandes cantidades de etiquetas SERS con una distribución de tamaños estrecha y una alta proporción de agregados de bajo número. El método no tiene ninguna limitación en términos de molécula indicadora activa en Raman para ser usada como huella de la etiqueta SERS o tamaño de las nanopartículas que tienen una superficie plasmónica contenida en el primer y segundo coloide, permitiendo así la fabricación de una variedad de etiquetas SERS.

Como es bien conocido por el experto en la materia y se utiliza en el presente documento, una etiqueta SERS comprende un agregado de nanopartículas que presentan una superficie plasmónica y moléculas indicadoras activas en Raman adsorbidas en la superficie de las nanopartículas. Las nanopartículas que presentan una superficie plasmónica son responsables de la generación del campo eléctrico requerido para la amplificación Raman, mientras que las moléculas indicadoras activas en Raman proporcionan la huella vibracional única de la etiqueta SERS. Una etiqueta SERS puede comprender además una capa de recubrimiento externa que aísla el agregado de nanopartículas que tiene adsorbidas en la superficie moléculas activas en Raman del medio externo. Por tanto, la capa de recubrimiento externa a) aísla la etiqueta SERS del medio externo, por lo tanto, evitando que las moléculas indicadoras activas en Raman se filtren fuera de la etiqueta SERS y protegiendo la etiqueta SERS de contaminaciones del medio externo que pueden dar lugar a picos falsos, b) aumenta la estabilidad coloidal de la etiqueta SERS, y c) proporciona una superficie conveniente para una mayor funcionalización química. Las capas de recubrimiento externas incluyen sílice y polímeros, como

poli(etilenoimina) (PEI), sal sódica de poli(estireno-alt-ácido maleico) (PSMA), poli(cloruro de dialildimetilamonio) (PDADMAC).

Debido a la señal SERS exhibida, las etiquetas SERS obtenidas a través del método de fabricación reivindicado y descrito en el presente documento es particularmente útil como elemento de seguridad para proteger documentos y artículos contra la reproducción ilegal y falsificada. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "*elemento de seguridad*" designa un elemento que puede incorporarse o aplicarse a un documento o artículo de seguridad con el fin de determinar su autenticidad y protegerlo contra la falsificación y la reproducción ilegal. El elemento de seguridad puede ser un indicio, imagen, patrón o elemento gráfico impreso, recubierto o pulverizado sobre un elemento o artículo de seguridad con una tinta, un barniz o una composición de recubrimiento que contiene las etiquetas SERS obtenidas a través del método de fabricación de acuerdo con la presente invención. De manera alternativa, las etiquetas SERS pueden funcionar como un elemento de seguridad cuando se integran en el sustrato de un documento de seguridad. Las expresiones "*documento de seguridad*" y "*artículo de seguridad*" se refieren a un documento o artículo que tiene un valor tal que lo hace potencialmente susceptible de intentos de falsificación o reproducción ilegal y que generalmente está protegido contra la falsificación o el fraude por una o más características de seguridad. La expresión "*artículo de seguridad*" como se usa en el presente documento abarca todos los artículos que deben estar protegidos contra la falsificación y/o reproducción ilegal con el fin de garantizar su contenido. Los ejemplos de documentos de seguridad incluyen, sin limitación, documentos de valor y artículos comerciales de valor. Los ejemplos típicos de documentos de valor incluyen, sin limitación, billetes de banco, escrituras, billetes, cheques, recibos, sellos fiscales, etiquetas de impuestos, acuerdos y similares, documentos de identidad, tales como pasaportes, carnés de identidad, visados, tarjetas bancarias, tarjetas de crédito, tarjetas de transacciones, documentos de acceso, billetes de entrada y similares. Los productos comerciales de valor abarcan el material de embalaje, en particular, para artículos cosméticos, artículos nutracéuticos, artículos farmacéuticos, alcoholes, artículos de tabaco, bebidas o productos alimenticios, artículos eléctricos/electrónicos, tejidos o joyas, es decir, artículos que estarán protegidos contra la falsificación y/o la reproducción ilegal con el fin de garantizar el contenido del envase, como, por ejemplo, fármacos auténticos. Los ejemplos de material de embalaje incluyen, entre otros, etiquetas, tales como etiquetas de marca de autenticación, etiquetas y sellos a prueba de manipulaciones.

Dentro del significado de la presente invención, el término "*nanopartícula*" se define como una sola partícula que tiene un tamaño correspondiente a la dimensión física máxima (por ejemplo: longitud, diámetro, etc.) en el intervalo de 20 ± 5 nm a 160 ± 5 nm, preferentemente de 40 ± 5 nm a 140 ± 5 nm. La nanopartícula usada en la presente invención tiene una superficie plasmónica, es decir, la nanopartícula tiene una superficie exterior capaz de potenciar la dispersión Raman de una molécula activa en Raman. La superficie exterior de la nanopartícula está hecha de cualquier material potenciador de SERS conocido. Preferentemente, el material potenciador de SERS se selecciona entre: oro (Au), plata (Ag), cobre (Cu), aluminio (Al), paladio (Pd), platino (Pt) o una mezcla o aleación de los mismos, y más preferentemente es oro (Au). La nanopartícula usada en la presente invención puede ser sólida o hueca, y preferentemente sólida. Una nanopartícula sólida puede estar hecha de un solo material, es decir, el material potenciador de SERS de la superficie exterior de la nanopartícula, o de más materiales, es decir, el o los materiales del núcleo de la nanopartícula pueden ser diferentes del material potenciador de SERS de la superficie exterior de la nanopartícula. Una nanopartícula hueca es una nanopartícula cuyo núcleo es un espacio vacío. La nanopartícula puede tener cualquier forma que se pueda producir. Preferentemente, la nanopartícula es una nanopartícula sólida de Au. Preferentemente, la nanopartícula tiene una forma seleccionada del grupo que consiste en una esfera, esferoide, barra, disco, prisma y cubo, más preferentemente seleccionada entre una esfera y un esferoide, e incluso más preferentemente la nanopartícula tiene forma de esferoide.

Tal como se utiliza en el presente documento, la redacción "*nanopartículas que tienen sustancialmente el mismo tamaño*" significa que dichas nanopartículas tienen un tamaño correspondiente a la dimensión física máxima (por ejemplo: longitud, diámetro, etc.) dentro de ± 20 nm, preferentemente dentro de ± 10 nm del tamaño medio determinado para dichas nanopartículas mediante métodos de microscopía electrónica, tales como microscopía electrónica de transmisión (TEM) o microscopía electrónica de barrido (SEM), o cuando corresponda mediante el método de *Haiss y colaboradores (Anal. Chem. 2007, 79, 4215-4221)*.

Las nanopartículas del primer coloide, segundo coloide y del coloide proporcionado en la etapa **b1**) se dispersan en un disolvente acuoso. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "*disolvente acuoso*" se refiere al agua y una mezcla de agua con uno o más disolventes miscibles en agua, en donde el disolvente miscible en agua se selecciona preferentemente de la lista que comprende: metanol, etanol, propanol, isopropanol, tetrahidrofurano, *N*-metil-2-pirrolidona (NMP), dimetilsulfóxido (DMSO), *N,N*-dimetilformamida (DMF), acetona y acetonitrilo.

El primer coloide proporcionado en la etapa **a**) del método de fabricación, el segundo coloide proporcionado en la etapa **b**) del método de fabricación, así como el coloide proporcionado en la etapa **b1**) del método de fabricación no contienen polímeros o tensioactivos con fines de estabilización. La estabilización de coloides con polímeros (por ejemplo: polivinilpirrolidona) o tensioactivos (por ejemplo, bromuro de cetiltrimetilamonio)

es bien conocida en la técnica. Sin embargo, a medida que se agregan polímeros y tensioactivos a los coloides antes de la adición de las moléculas indicadoras activas en Raman, reducen significativamente la superficie disponible en las nanopartículas para la adsorción de las moléculas indicadoras activas en Raman y aumentan el espacio entre las partículas coloides dentro de un agregado, lo que lleva a que las etiquetas SERS exhiban una menor intensidad de señales SERS. Para eludir este inconveniente, el primer coloide, el segundo coloide, así como el coloide proporcionado en la etapa **b1)** están libres de tensioactivos y polímeros.

El agente estabilizante adsorbido en la superficie de las nanopartículas del primer coloide, segundo coloide y del coloide proporcionado en la etapa **b1)** se selecciona preferentemente de ácidos carboxílicos, sales de ácido carboxílico, ácidos fosfóricos, sales de ácido fosfórico, ácido ascórbico, sales de ácido ascórbico y sus mezclas. Para evitar la competencia entre las moléculas indicadoras activas en Raman y el agente estabilizante durante la adsorción de las moléculas indicadoras activas en Raman en la superficie de las nanopartículas, preferentemente, el agente estabilizante no contiene grupos que presenten afinidad por materiales potenciadores de SERS, en particular oro. Ejemplos de tales grupos son los grupos que contienen nitrógeno, grupos que contienen azufre, grupos etinilo, grupos ciano y grupos isocianuro.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "*ácido carboxílico*" se refiere a un compuesto orgánico que contiene un grupo carboxilo ($C(=O)OH$) y abarca ácidos monocarboxílicos (es decir, compuestos orgánicos que contienen un solo grupo carboxilo), tales como ácido láctico y ácidos policarboxílicos (es decir, compuestos orgánicos que contienen dos o más grupos carboxilo), tal como ácido cítrico.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "*sal de ácido carboxílico*" se refiere a una sal de sodio o potasio de un ácido carboxílico.

Preferentemente, el agente estabilizante se selecciona entre ácidos carboxílicos, sales de ácido carboxílico, ácido ascórbico, sales de ácido ascórbico y sus mezclas. Incluso más preferentemente, el agente estabilizante se selecciona entre ácido cítrico, sales de ácido cítrico, ácido láctico, sales de ácido láctico, ácido ascórbico, sales de ácido ascórbico y sus mezclas. Las sales de ácido cítrico incluyen citrato de dihidrógeno monosódico, citrato de hidrógeno disódico, citrato trisódico, citrato de dihidrógeno monopotásico, citrato de hidrógeno dipotásico y citrato tripotásico. Las sales de ácido láctico incluyen lactato de sodio y lactato de potasio. Las sales de ácido ascórbico incluyen ascorbato de sodio y ascorbato de potasio. En la realización más preferida, el agente estabilizante se selecciona entre ácido cítrico, citrato de dihidrógeno monosódico, citrato de hidrógeno disódico, citrato trisódico, citrato de dihidrógeno monopotásico, citrato de hidrógeno dipotásico y citrato tripotásico, y mezclas de los mismos.

Ventajosamente, el método de fabricación reivindicado y descrito en el presente documento permite la integración de cualquier molécula indicadora activa en Raman en una etiqueta SERS. Las moléculas indicadoras activas en Raman preferidas incluyen moléculas completamente conjugadas que comprenden un grupo arilo sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre NR^1R^2 , $-SH$, $-\Xi$, $-\Xi N$ y $-N\equiv$, preferentemente de $-NR^1R^2$ y $-SH$, y/o un grupo heteroarilo que contiene N y/o un grupo heteroarilo que contiene S , en donde los restos R^1 y R^2 se seleccionan independientemente entre sí de $-H$ y alquilo, preferentemente entre $-H$ y alquilo C_1-C_4 .

Como sabe el experto en la materia de la química orgánica, una molécula completamente conjugada es una molécula que tiene un sistema de electrones conjugados que se extiende por toda la molécula. Un sistema de electrones conjugados es un sistema de orbitales p conectados con electrones deslocalizados.

Como bien sabe el experto en la materia "*un grupo arilo*" es un grupo derivado de un compuesto de hidrocarburo aromático monocíclico o policíclico mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo de carbono del anillo. Los ejemplos de grupos arilo incluyen sin limitación fenilo, naftilo, antraceno, fenantrilo y pirenilo.

Un compuesto heteroaromático que contiene S es un compuesto aromático que contiene un heteroátomo de azufre como parte del sistema π cíclico conjugado. Como parte del sistema π cíclico conjugado, el compuesto heteroaromático que contiene S puede contener además uno o más átomos de nitrógeno. Ejemplos de grupos heteroarilo que contienen S incluyen, sin limitación, tiofenilo, tiazolilo, isotiazolilo, tiadiazolilo, benzotiofenilo, benzotiazolilo, benzoisotiazolilo, benzotiadiazolilo, imidazotiazolilo e imidazotiadiazolilo.

Un compuesto heteroaromático que contiene N es un compuesto aromático que contiene al menos un heteroátomo de nitrógeno como parte del sistema π cíclico conjugado. Como parte del sistema π cíclico conjugado, el compuesto heteroaromático que contiene N puede contener además uno o más átomos de oxígeno. Ejemplos de grupos heteroarilo que contienen N incluyen, sin limitación, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, tetrazolilo, benzoimidazolilo, indazolilo, benzotriazolilo, piridinilo, pirimidinilo, piridazinilo, triazinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, diazanaftilo, quinalozinilo, cinolinilo, ftalazinilo, quinoxalinilo, purinilo, aza-fenantrilo,

diaza-fenantrilo, aza-antraceno, diaza-antraceno, aza-pirenilo, diazapyrenilo, oxazolilo, isoxazolilo, oxadiazolilo, benzoxazolilo, benzoisoxazolilo y benzoxadiazolilo.

Las moléculas indicadoras activas en Raman preferidas incluyen, pero sin restricción:

5

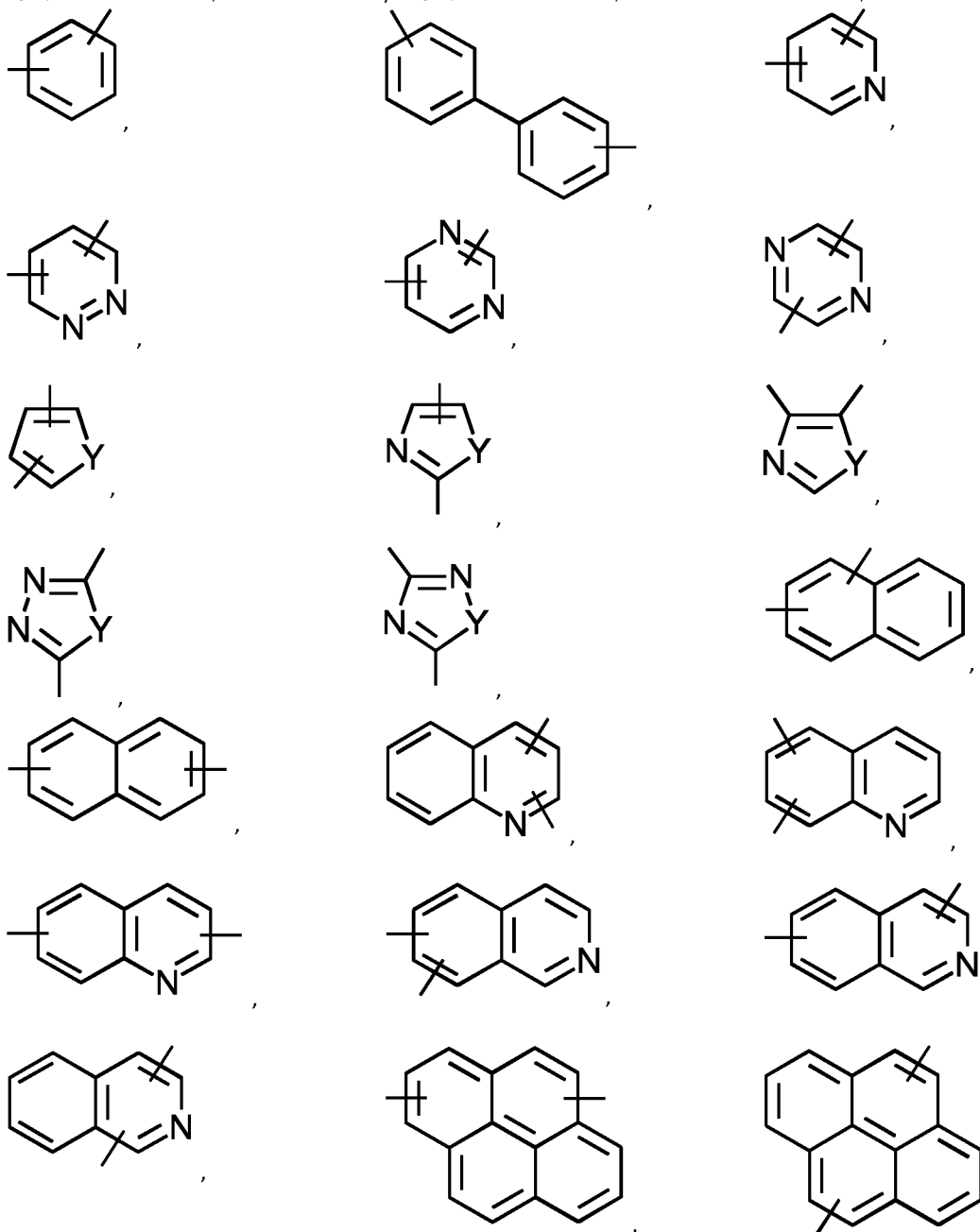
- un compuesto completamente conjugado que consiste en un grupo arilo sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre $-NR^1R^2$, $-SH$, $-E$, $-N=$ y $-N=$, preferentemente entre $-NR^1R^2$ y $-SH$, que está conectado directamente o a través de un enlazador $-L^1-$ a un grupo arilo sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de la lista que comprende un grupo amino ($-NH_2$), un grupo *N*-alquil amino, un grupo *N,N*-dialquil-amino, un grupo tiol, un grupo etinilo, un grupo ciano y un grupo isocianuro, un grupo heteroarilo que contiene *N*, o un grupo heteroarilo que contiene *S*, en donde

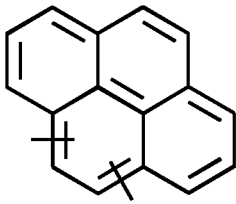
10

los sustituyentes R^1 y R^2 tienen los significados definidos en el presente documento;

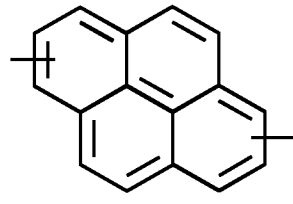
el enlazador $-L^1-$ se selecciona entre $-CR^8=CR^9-$, $-N=N-$, $-E-$, $-CR^{10}=CR^{11}-o-C_6H_4-$, $-CR^{10}=CR^{11}-m-C_6H_4-$, $-CR^{10}=CR^{11}-p-C_6H_4-$, $-CR^{10}=CR^{11}-o-C_6H_4-CR^{12}=CR^{13}-$, $-CR^{10}=CR^{11}-m-C_6H_4-CR^{12}=CR^{13}-$, $-CR^{10}=CR^{11}-p-C_6H_4-CR^{12}=CR^{13}-$, $-CR^{14}=N-N=CR^{15}-$,

15





y

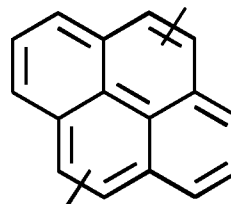
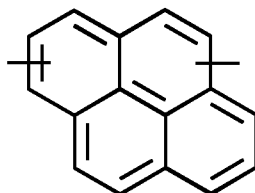
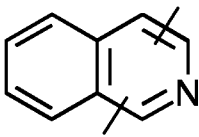
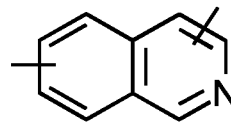
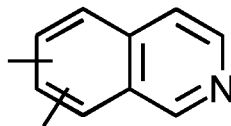
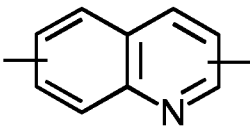
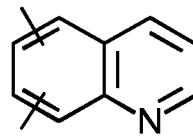
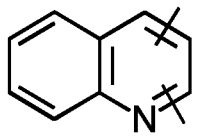
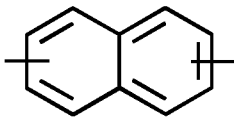
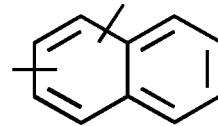
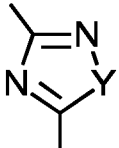
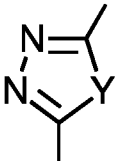
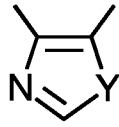
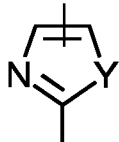
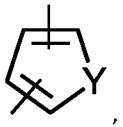
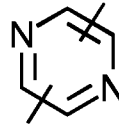
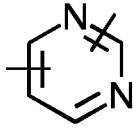
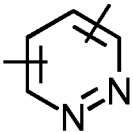
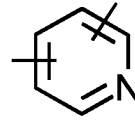
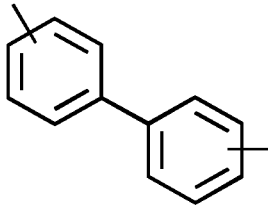
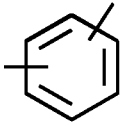


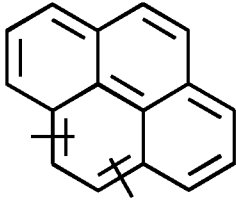
y

los sustituyentes $R^8 - R^{15}$ se seleccionan entre hidrógeno, alquilo, alcoxi, alquiltio, formilo, ciano, nitro, haluro, hidroxicarbonilo y alcocarbonilo;

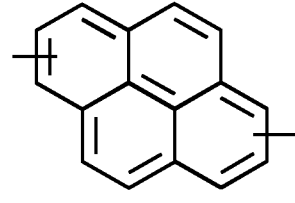
- 5 - un compuesto completamente conjugado que consta de un grupo heteroarilo que contiene N , que está conectado directamente o a través de un enlazador $-L^1-$ a un grupo heteroarilo que contiene N , o un grupo heteroarilo que contiene S , en donde

- 10 el enlazador $-L^1-$ se selecciona entre $-CR^8=CR^9-$, $-N=N-$, $-\equiv-$, $-CR^{10}=CR^{11}-o-C_6H_4-$, $-CR^{10}=CR^{11}-m-C_6H_4-$, $-CR^{10}=CR^{11}-p-C_6H_4-$, $-CR^{10}=CR^{11}-o-C_6H_4-CR^{12}=CR^{13}-$, $-CR^{10}=CR^{11}-m-C_6H_4-CR^{12}=CR^{13}-$, $-CR^{10}=CR^{11}-p-C_6H_4-CR^{12}=CR^{13}-$, $-CR^{14}=N-N=CR^{15}-$,





y

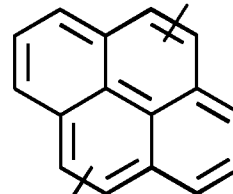
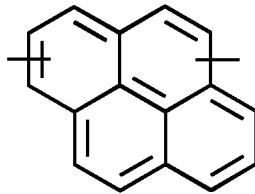
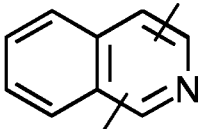
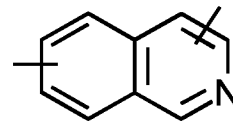
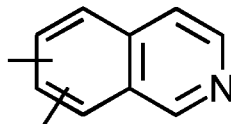
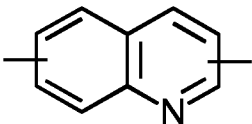
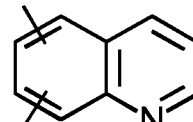
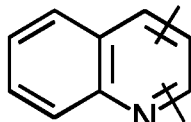
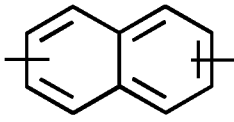
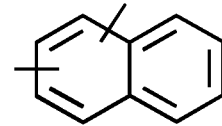
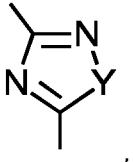
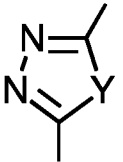
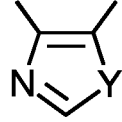
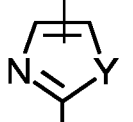
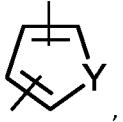
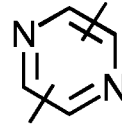
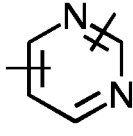
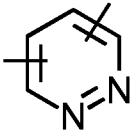
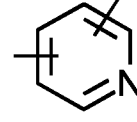
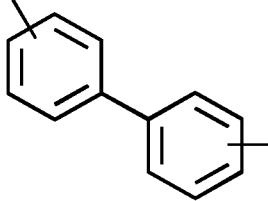
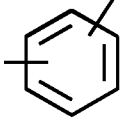


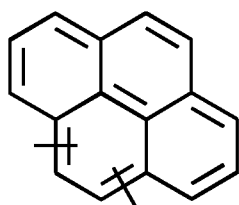
y

los sustituyentes $R^8 - R^{15}$ se seleccionan entre hidrógeno, alquilo, alcoxi, alquiltio, formilo, ciano, nitro, haluro, hidroxicarbonilo y alcóxicarbonilo;

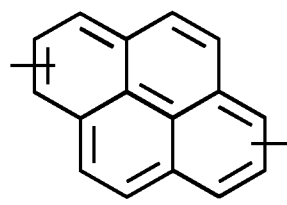
- 5 - un compuesto completamente conjugado que consiste en un grupo heteroarilo que contiene S, que está conectado directamente o a través de un enlazador $-L^1-$ a un grupo heteroarilo que contiene S, en donde

- 10 el enlazador $-L^1-$ se selecciona entre $-CR^8=CR^9-$, $-N=N-$, $-\equiv-$, $-CR^{10}=CR^{11}-o-C_6H_4-$, $-CR^{10}=CR^{11}-m-C_6H_4-$, $-CR^{10}=CR^{11}-p-C_6H_4-$, $-CR^{10}=CR^{11}-o-C_6H_4-CR^{12}=CR^{13}-$, $-CR^{10}=CR^{11}-m-C_6H_4-CR^{12}=CR^{13}-$, $-CR^{10}=CR^{11}-p-C_6H_4-CR^{12}=CR^{13}-$, $-CR^{14}=N-N=CR^{15}-$,





y



y los sustituyentes $R^8 - R^{15}$ se seleccionan entre hidrógeno, alquilo, alcoxi, alquiltio, formilo, ciano, nitro, haluro, hidroxicarbonilo y alcoxicarbonilo;

y

- 5 - un compuesto completamente conjugado que consiste en un grupo arilo sustituido por uno o más, preferentemente al menos dos, sustituyentes seleccionados entre $-NR^1R^2$, $-SH$, $-\equiv$, $-\equiv N$ y $-N\equiv$, preferentemente entre $-NR^1R^2$ y $-SH$, un grupo heteroarilo que contiene *N* opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre $-NR^3R^4$, $-SH$, $-\equiv$, $-\equiv N$ y $-N\equiv$, o un grupo heteroarilo que contiene *S* opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre $-NR^5R^6$, $-SH$, $-\equiv$, $-\equiv N$ y $-N\equiv$, conectado directamente a un átomo de hidrógeno, en donde los sustituyentes R^1 y R^2 tienen los significados definidos aquí y los sustituyentes $R^3 - R^6$ se seleccionan independientemente entre sí de $-H$ y alquilo, preferentemente entre $-H$ y alquilo C_1-C_4 .

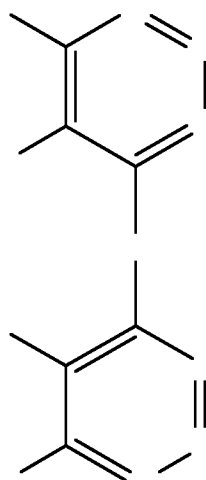
- 15 El grupo arilo sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre $-NR^1R^2$, $-SH$, $-\equiv$, $-\equiv N$ y $-N\equiv$, preferentemente entre $-NR^1R^2$ y $-SH$, puede contener uno o más sustituyentes adicionales seleccionados preferentemente entre: hidroxilo, alquilo, alcoxi, alquiltio, formilo, nitro, haluro, hidroxicarbonilo, alcoxicarbonilo y un grupo heteroarilo que contiene *O*, y más preferentemente seleccionado entre: alquilo, alcoxi, alquiltio, haluros y un grupo heteroarilo que contiene *O*.

- 20 Los grupos heteroarilo que contienen *N* y el grupo heteroarilo que contiene *S* puede contener uno o más sustituyentes adicionales seleccionados preferentemente entre: amino, *N*-alquilamino, *N,N*-dialquil-amino, tiol, hidroxilo, alquilo, alcoxi, alquiltio, formilo, ciano, isocianuro, etinilo, nitro, haluro, hidroxicarbonilo, alcoxicarbonilo y un grupo heteroarilo que contiene *O*, preferentemente entre alquilo, alcoxi, alquiltio, haluros y un grupo heteroarilo que contiene *O*.

25

Ejemplos de grupos heteroarilo que contienen *O* incluyen, pero sin restricción, furanilo, benzofuranilo, isobenzofuranilo, oxazolilo, isoxazolilo, benzoxazolilo y oxadiazolilo.

Un compuesto indicador activo en Raman preferido es un compuesto de fórmula general (I),

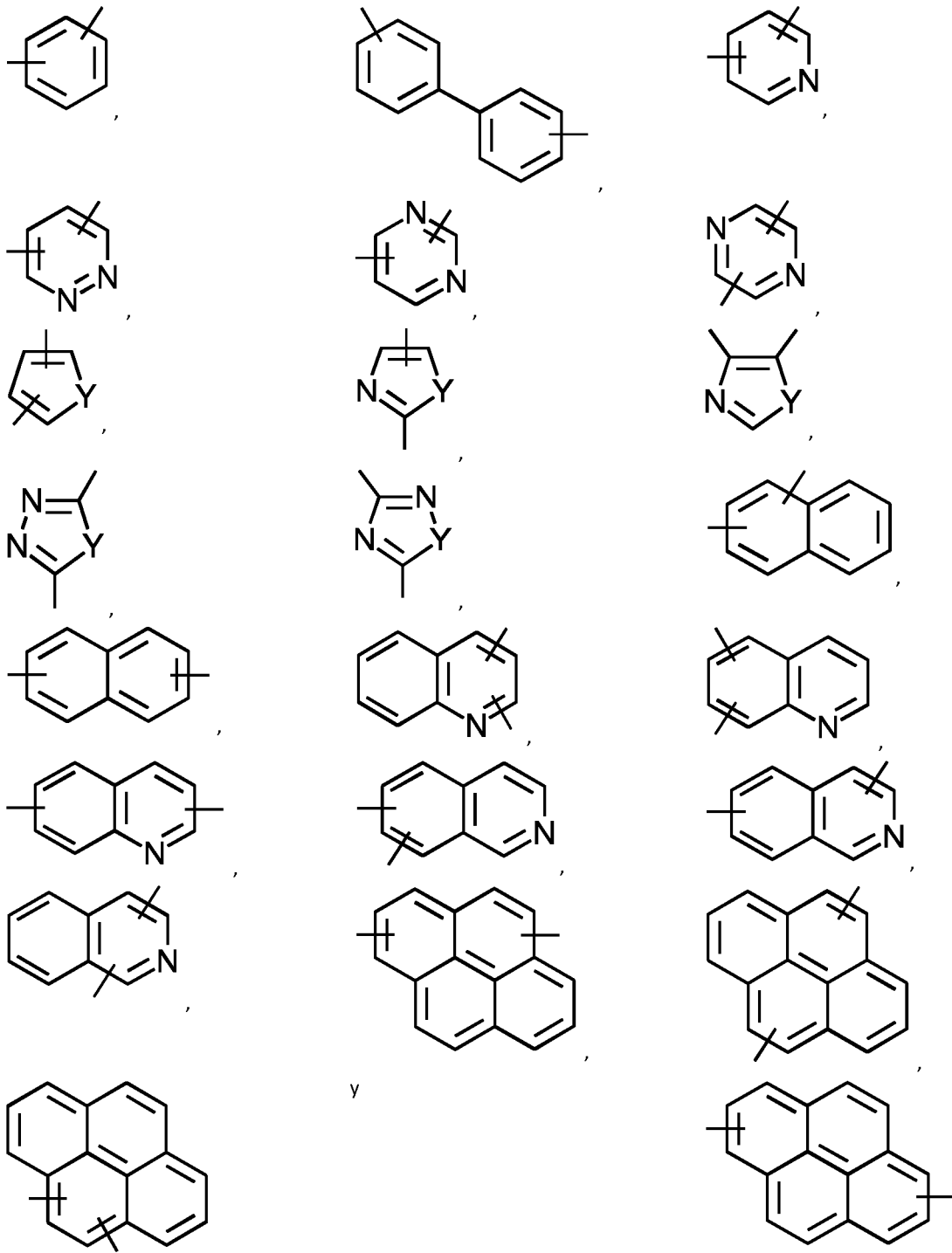


30

en donde

- 35 A^1 , B^1 y C^1 se seleccionan independientemente entre sí entre *N*, CR^{16} y CR^{17} , con la condición de que solo uno de A^1 , B^1 y C^1 sea *N*;
 A^2 , B^2 y C^2 se seleccionan independientemente entre sí entre *N*, CR^{18} y CR^{19} , con la condición de que solo uno de A^2 , B^2 y C^2 sea *N*;
 E^1 , D^1 , E^2 , D^2 , R^{16} , R^{17} , R^{18} y R^{19} se seleccionan independientemente entre sí entre: hidrógeno, amino, *N*-alquilamino, *N,N*-dialquil-amino, tiol, hidroxilo, alquilo, alcoxi, alquiltio, formilo, ciano, isocianuro, alquino, nitro, haluro, hidroxicarbonilo, alcoxicarbonilo y un grupo heteroarilo que contiene *O*, preferentemente entre hidrógeno, alquilo, alcoxi, alquiltio, haluros y un grupo heteroarilo que contienen *O*; y

X es un enlace sencillo o un enlazador $-L^2-$ seleccionado entre $-CR^8=CR^9-$, $-N=N-$, $-\equiv-$, $-CR^{10}=CR^{11}-o-C_6H_4-$, $-CR^{10}=CR^{11}-m-C_6H_4-$, $-CR^{10}=CR^{11}-p-C_6H_4-$, $-CR^{10}=CR^{11}-o-C_6H_4-$, $-CR^{12}=CR^{13}-$, $-CR^{10}=CR^{11}-m-C_6H_4-CR^{12}=CR^{13}-$, $-CR^{10}=CR^{11}-p-C_6H_4-CR^{12}=CR^{13}-$, $-CR^{14}=N-N=CR^{15}-$,



5 en donde $R^8 - R^{15}$ se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo, alcoxi, alquiltio, formilo, ciano, nitro, haluro, hidroxicarbonilo y alcóxicarbonilo.

Preferentemente, los restos A^1 y A^2 son N en la fórmula general (I). Más preferentemente, los restos A^1 y A^2 son N y los sustituyentes E^1 , D^1 , E^2 , D^2 , R^{16} , R^{17} , R^{18} y R^{19} son hidrógeno en la fórmula general (I).

10

Las moléculas indicadoras activas en Raman incluyen, sin limitación: 2-mercaptopiridina; bencenotiol; ácido mercaptobenzoico; 4-nitrobencenotiol; 3,4-diclorobencenotiol; 3-fluorotiofenol; 4-fluorotiofenol; 3-5-bis(trifluorometil)bencenotiol; 4-mercaptofenol; bifenil-4-tiol, 7-mercapto-4-metilcumarina, 1-(4-hidroxifenil)-1H-

tetrazol-5-tiol, 2-fluorotiofenol, 2-naftalenotiol, 4-(((3-mercapto-5-(2-metoxifenil)-4H-1,2,4-triazol-4-il)imino)metil)fenol, (2-trifluorometil) bencenotiol, 4-aminotiofenol, 1-naftalenotiol, 1,1',4,1''-terfenil-4-tiol, bifeníl-4,4'-ditiol, ácido tiosalicílico, 4-(((3-mercapto-5-(2-piridinil)-4H-1,2,4-triazol-4-il)imino)metil)-1,2-bencenodiol, 4-(((3-mercapto-5-(2-piridinil)-4H-1,2,4-triazol-4-il)imino)metil)benzoico, 2,3,4,6-tetrafluorobencenotiol, (5-(4-metoxifenil)-1,3,4-oxidazol-2-tiol), (*E*)-1,2-di(piridin-4-il)eteno, 5-(piridin-4-il)-1,3,4-oxadiazol-2-tiol y 1,4-bis((*E*)-2-(piridin-4-il)vinil)benceno.

El primer coloide proporcionado en la etapa **a)** se caracteriza por un valor de potencial ζ menor o igual a -25 mV. El segundo coloide proporcionado en la etapa **b)** se caracteriza por un valor de potencial ζ menor o igual a -25 mV.

Tal como se utiliza en el presente documento, el valor de potencial ζ de un coloide se refiere al valor de potencial ζ medido para dicho coloide a una concentración de 0,05 mg de material de nanopartículas/ml con un Malvern Zetasizer Nano-ZS con 1 ml de celdas capilares plegadas. Si se requiere, a saber, para coloides que tienen una concentración superior a 0,05 mg de material de nanopartículas/ml, el coloide se diluye con agua desionizada para alcanzar la concentración de 0,05 mg de material de nanopartículas/ml antes de la medición del potencial ζ .

Preferentemente, la concentración del material de nanopartículas (mg/ml) en el primer coloide y en el segundo coloide es inferior a 0,66 mg/ml, y más preferentemente está comprendida entre aproximadamente 0,05 mg/ml y aproximadamente 0,30 mg/ml, por ejemplo, 0,05 mg/ml, 0,10 mg/ml, 0,15 mg/ml, 0,20 mg/ml, 0,25 mg/ml y 0,30 mg/ml.

Después de la combinación del primer coloide con el segundo coloide, por ejemplo, mediante la simple adición del segundo coloide al primer coloide, de modo que la relación entre el número de nanopartículas del primer coloide y el número de nanopartículas del segundo coloide sea de entre aproximadamente 25:1 y aproximadamente 1:1, preferentemente, de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 1:1, más preferentemente de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 3:1, se induce la agregación de nanopartículas. La agregación descrita en el presente documento consiste en la agregación selectiva de las nanopartículas del segundo coloide con las nanopartículas del primer coloide, es decir, no hay agregación de las nanopartículas del primer coloide con las nanopartículas del primer coloide, y no hay agregación o es insignificante de las nanopartículas del segundo coloide con las nanopartículas del segundo coloide.

La agregación de nanopartículas es inducida por cualquiera de las etapas **d1)** – **d2)** o una combinación de las mismas:

d1) mezcla del tercer coloide obtenido en la etapa **c)** a un pH comprendido entre aproximadamente 2,2 y el valor de pH más bajo en el que las moléculas indicadoras activas en Raman tienen una carga eléctrica neta de entre 0 y 0,3;

d2) adición de una solución salina, preferentemente una solución salina inorgánica, al tercer coloide obtenido en la etapa **c)**.

En una realización preferida, la inducción de la agregación de nanopartículas comprende la etapa **d1)**, es decir, mezcla del tercer coloide obtenido en la etapa **c)** a un pH comprendido entre aproximadamente 2,2 y el valor de pH más bajo en el que las moléculas indicadoras activas en Raman tienen una carga eléctrica neta de entre 0 y 0,3. La carga eléctrica neta de una molécula indicadora activa en Raman y el valor de pH correspondiente a dicha carga eléctrica neta se pueden predecir a través de herramientas en línea como Chemicalize.com (Chemicalize. ChemAxon. <http://chemicalize.com/#/calculation>). A un pH comprendido entre aproximadamente 2,2 y el valor de pH más bajo en el que las moléculas indicadoras activas en Raman tienen una carga eléctrica neta de entre 0 y 0,3, se produce la agregación selectiva de las nanopartículas del primer coloide con las nanopartículas del segundo coloide.

De manera alternativa, la inducción de la agregación de nanopartículas comprende la etapa **d2)**, a saber, la adición de una solución salina, preferentemente una solución salina inorgánica, al tercer coloide obtenido en la etapa **c)**. La agregación de nanopartículas inducida por sales es un método bien conocido para inducir la agregación de nanopartículas para el experto en la materia de la química coloidal (*ChemPhysChem* 2018, 19, 24 - 28). Ejemplos de sales inorgánicas que se utilizarán en la etapa **d2)** del método de fabricación como una solución, tal como una solución acuosa, incluyen, pero sin restricción: fluoruro de sodio, cloruro de sodio, bromuro de sodio, yoduro de sodio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio y mezclas de los mismos.

Un método de fabricación preferido de acuerdo con la presente invención comprende las etapas de:

a) proporción de un primer coloide que consiste esencialmente en nanopartículas que tienen una superficie plasmónica y sustancialmente del mismo tamaño dispersas en un disolvente acuoso, y un agente estabilizante adsorbido en la superficie de dichas nanopartículas, y que tiene un valor de potencial ζ menor o igual a -25 mV;

b) proporción de un segundo coloide que consiste esencialmente en nanopartículas que tienen una superficie plasmónica y sustancialmente del mismo tamaño dispersas en un disolvente acuoso, una molécula indicadora activa en Raman de fórmula general (I) adsorbida en la superficie de dichas nanopartículas, y un agente estabilizante adsorbido en la superficie de dichas nanopartículas, y que tiene un valor de potencial ζ menor o igual a -25 mV;

c) combinación del primer coloide con el segundo coloide de modo que la relación entre el número de nanopartículas del primer coloide y el número de nanopartículas del segundo coloide sea de entre aproximadamente 25:1 y aproximadamente 1:1, preferentemente, de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 1:1, más preferentemente de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 3:1 para proporcionar un tercer coloide;

d) inducción de la agregación de las nanopartículas mediante cualquiera de las etapas **d1)** – **d2)** o una combinación de las mismas:

d1) mezcla del tercer coloide obtenido en la etapa **c)** a un pH comprendido entre aproximadamente 2,2 y aproximadamente 6,1, preferentemente entre aproximadamente 2,6 y aproximadamente 5,7;

d2) adición de una solución salina, preferentemente una solución salina inorgánica, al tercer coloide obtenido en la etapa **c)**; y

e) detención de la agregación.

Preferentemente, en el método de fabricación que se describe en el presente documento, la etapa **b)** comprende las siguientes etapas realizadas en el orden **b1)** a **b3)**:

b1) proporción de un coloide que comprende nanopartículas que tienen una superficie plasmónica y sustancialmente del mismo tamaño dispersas en un disolvente acuoso, y un agente estabilizante adsorbido en la superficie de dichas nanopartículas, y que tiene un valor de potencial ζ menor o igual a -25 mV;

b2) ajuste del pH del coloide a un valor más alto que el valor de pH más bajo en el que las moléculas indicadoras activas en Raman que se van a adsorber en la superficie de las nanopartículas no llevan carga eléctrica neta mientras se mantiene el valor de potencial ζ menor o igual a -25 mV, preferentemente inferior a -40 mV; y

b3) adición de una solución de las moléculas activas en Raman en un disolvente al coloide obtenido en la etapa **b2)** manteniendo el valor de potencial ζ menor o igual a -25 mV.

El coloide proporcionado en la etapa **b1)** del método de fabricación reivindicado en el presente documento consiste esencialmente en nanopartículas que tienen una superficie plasmónica y sustancialmente del mismo tamaño dispersas en un disolvente acuoso, y un agente estabilizante adsorbido sobre la superficie de dichas nanopartículas. El primer coloide proporcionado en la etapa **a)** del método de fabricación reivindicado en el presente documento consiste esencialmente en nanopartículas que tienen una superficie plasmónica y sustancialmente del mismo tamaño dispersas en un disolvente acuoso, y un agente estabilizante adsorbido sobre la superficie de dichas nanopartículas. El segundo coloide proporcionado en la etapa **b)** del método de fabricación reivindicado en el presente documento consiste esencialmente en nanopartículas que tienen una superficie plasmónica y sustancialmente del mismo tamaño dispersas en un disolvente acuoso, las moléculas indicadoras activas en Raman adsorbidas en la superficie de dichas nanopartículas, y un agente estabilizante adsorbido en la superficie de dichas nanopartículas. Por tanto, las nanopartículas del primer coloide y las nanopartículas del segundo coloide no presentan en su superficie moléculas u organismos que permitan la interacción específica a través de un mecanismo de llave y cerradura entre las nanopartículas del primer coloide y las nanopartículas del segundo coloide. Los ejemplos de dichas moléculas incluyen anticuerpos, proteínas, antígenos, cadenas de ADN complementarias y cadenas de ARN complementarias. Ejemplos de tales organismos incluyen bacterias, virus y esporas. Por tanto, el primer coloide, el segundo coloide, así como el coloide proporcionado en la etapa **b1)** además de estar libres de tensioactivos y polímeros, también están libres de moléculas como anticuerpos, proteínas, antígenos, cadenas de ADN complementarias y cadenas de ARN complementarias y organismos, tales como bacterias, virus y esporas.

En la etapa **b2)** del método de fabricación de acuerdo con la presente invención, el pH del coloide se ajusta a un valor más alto que el valor de pH más bajo en el que las moléculas indicadoras activas en Raman que se adsorberán en la superficie de las nanopartículas no tienen carga eléctrica neta, mientras se mantiene el valor de potencial ζ menor o igual a -25 mV, preferentemente inferior a -40 mV. La carga eléctrica neta de una molécula indicadora activa en Raman y el valor de pH correspondiente a dicha carga eléctrica neta se pueden predecir a través de herramientas en línea como Chemicalize.com (Chemicalize. ChemAxon. <http://chemicalize.com/#/calculation>).

Preferentemente, en la etapa **b2)**, el pH del coloide se ajusta entre aproximadamente 8,2 y aproximadamente 12,1, mientras se mantiene el valor de potencial ζ menor o igual a -25 mV, preferentemente inferior a -40 mV. En una realización más preferida, el pH del coloide se ajusta en la etapa **b2)** a un valor de aproximadamente 11,0.

En la etapa **b3)** de acuerdo con la presente invención, se añade una solución de molécula indicadora activa en Raman en un disolvente al coloide obtenido en la etapa **b2)** manteniendo el valor de potencial ζ menor o igual a -25 mV. El disolvente usado para preparar la solución de la molécula indicadora activa en Raman incluye cualquier disolvente acuoso y cualquier disolvente orgánico adecuado para disolver la molécula indicadora activa en Raman. Los ejemplos de disolventes orgánicos incluyen, pero sin limitación, alcoholes, preferentemente seleccionado de metanol, etanol, propanol e isopropanol, tetrahidrofurano, *N*-metil-2-pirrolidona (NMP), dimetilsulfóxido (DMSO), *N,N*-dimetilformamida (DMF), acetona y acetonitrilo. Los disolventes acuosos incluyen, pero sin limitación, agua y mezclas de agua y disolventes miscibles en agua, tal como metanol, etanol, propanol, isopropanol, tetrahidrofurano, *N*-metil-2-pirrolidona (NMP), dimetilsulfóxido (DMSO), *N,N*-dimetilformamida (DMF), acetona y acetonitrilo.

Un método de fabricación preferido de acuerdo con la presente invención comprende las etapas de:

a) proporción de un primer coloide que consiste esencialmente en nanopartículas que tienen una superficie plasmónica y sustancialmente del mismo tamaño dispersas en un disolvente acuoso, y un agente estabilizante adsorbido en la superficie de dichas nanopartículas, y que tiene un valor de potencial ζ menor o igual a -25 mV;

b) proporción de un segundo coloide que consiste esencialmente en nanopartículas que tienen una superficie plasmónica y sustancialmente del mismo tamaño dispersas en un disolvente acuoso, una molécula indicadora activa en Raman de fórmula general (I) adsorbida en la superficie de dichas nanopartículas, y un agente estabilizante adsorbido en la superficie de dichas nanopartículas, y que tiene un valor de potencial ζ menor o igual a -25 mV;

c) combinación del primer coloide con el segundo coloide de modo que la relación entre el número de nanopartículas del primer coloide y el número de nanopartículas del segundo coloide sea de entre aproximadamente 25:1 y aproximadamente 1:1, preferentemente, de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 1:1, más preferentemente de 4:1 a aproximadamente 3:1 para proporcionar un tercer coloide;

d) inducción de la agregación de las nanopartículas mediante cualquiera de las etapas **d1)** – **d2)** o una combinación de las mismas:

d1) mezcla del tercer coloide obtenido en la etapa **c)** a un pH comprendido entre aproximadamente 2,2 y aproximadamente 6,1, preferentemente entre aproximadamente 2,6 y aproximadamente 5,7;

d2) adición de una solución salina, preferentemente una solución salina inorgánica, al tercer coloide obtenido en la etapa **c)**; y

e) detención de la agregación,

en donde la etapa **b)** comprende las siguientes etapas realizadas en el orden **b1)** a **b3)**:

b1) proporción de un coloide que consiste esencialmente en nanopartículas que tienen una superficie plasmónica y sustancialmente del mismo tamaño dispersas en un disolvente acuoso, y un agente estabilizante adsorbido en la superficie de dichas nanopartículas, y que tiene un valor de potencial ζ menor o igual a -25 mV;

b2) ajuste del pH del coloide a un valor comprendido entre aproximadamente 8,0 y aproximadamente 12,1, preferentemente entre aproximadamente 8,2 y 12,1, mientras se mantiene el valor de potencial ζ menor o igual a -25 mV, preferentemente inferior a -40 mV; y

b3) adición de una solución de una molécula indicadora activa en Raman de fórmula general (I) en un disolvente al coloide obtenido en la etapa **b2)** manteniendo el valor de potencial ζ menor o igual a -25 mV.

Los inventores encontraron que la intensidad de la señal de las etiquetas SERS fabricadas de acuerdo con la presente invención se puede incrementar aún más asegurando que una sub-monocapa o una monocapa de moléculas indicadoras activas en Raman se adsorba en la superficie de las nanopartículas contenidas por el segundo coloide. Por tanto, una realización preferida adicional de acuerdo con la presente invención está dirigida a un método de fabricación de etiquetas SERS como se reivindica en el presente documento, en donde las nanopartículas del segundo coloide han absorbido en su superficie una sub-monocapa o monocapa de moléculas indicadoras activas en Raman. Tal como se utiliza en el presente documento, una monocapa de moléculas indicadoras activas en Raman adsorbidas en la superficie de las nanopartículas del segundo coloide se refiere a una capa gruesa de una molécula indicadora activa en Raman adsorbida en la superficie de dichas nanopartículas. Tal como se utiliza en el presente documento, una sub-monocapa de moléculas indicadoras activas en Raman se refiere a una monocapa incompleta de moléculas indicadoras activas en Raman. Para asegurar que una sub-monocapa o monocapa de moléculas indicadoras activas en Raman se adsorba en la superficie de las nanopartículas del segundo coloide, la cantidad de moléculas indicadoras activas en Raman agregadas en la etapa **b3)** al coloide obtenido en la etapa **b2)** tiene que ser calculada por métodos bien conocidos por el experto dependiendo de la forma y tamaño de las nanopartículas del segundo coloide.

El método de fabricación reivindicado en el presente documento también permite la preparación de etiquetas SERS que comprenden una mezcla de diferentes moléculas indicadoras activas en Raman, es decir, una mezcla de dos o más moléculas indicadoras activas en Raman diferentes. Esto es particularmente ventajoso porque permite el acceso a una variedad de etiquetas SERS, en donde cada una de dichas etiquetas SERS se caracteriza por una señal SERS única, mediante la combinación de un número limitado de diferentes moléculas indicadoras activas en Raman en diferentes proporciones. Para lograr tales etiquetas SERS, las nanopartículas del segundo coloide proporcionadas en la etapa **b)** se preparan para que hayan absorbido en su superficie una mezcla de diferentes moléculas indicadoras activas en Raman (es decir, una mezcla de dos o más moléculas indicadoras activas en Raman diferentes). Dicho segundo coloide se puede preparar utilizando en la etapa **b3)** del método de fabricación una solución de moléculas activas en Raman en un disolvente que comprende dos o más moléculas indicadoras activas en Raman diferentes o mediante la realización de una etapa sucesiva **b3)** del método de fabricación y utilizando cada vez una solución diferente que contiene una molécula indicadora activa en Raman diferente. Por tanto, una realización adicional de acuerdo con la presente invención está dirigida a un método de fabricación, en donde en la etapa **b3)** la solución de las moléculas indicadoras activas en Raman en un disolvente comprende una mezcla de dos o más moléculas indicadoras activas en Raman diferentes. Otra realización adicional de acuerdo con la presente invención está dirigida a un método de fabricación, en donde la etapa **b3)** se realiza sucesivamente n veces con $n \geq 2$, utilizando cada vez una solución que contiene una molécula indicadora activa en Raman, que es estructuralmente diferente de las moléculas indicadoras activas en Raman usadas en las soluciones $n-1$ restantes usadas en las etapas $n-1$ restantes. Tal como se utiliza en el presente documento, diferentes moléculas indicadoras activas en Raman se refieren a moléculas indicadoras activas en Raman que tienen una estructura química diferente y proporcionan un espectro SERS diferente.

Para aumentar aún más la población de agregados de bajo número y, por lo tanto, la intensidad de la señal SERS proporcionada por las etiquetas SERS fabricadas mediante el método de fabricación reivindicado en el presente documento, se prefiere que en la etapa **c)** la relación entre el número de nanopartículas del primer coloide y el número de nanopartículas del segundo coloide sea de entre aproximadamente 5:1 y aproximadamente 1:1, preferentemente, de entre aproximadamente 4:1 y aproximadamente 3:1. Como lo confirma, por ejemplo, el **ejemplo 10** y la **Figura 3b**, una relación entre el número de nanopartículas del primer coloide y el número de nanopartículas del segundo coloide de entre aproximadamente 5:1 y aproximadamente 1:1 permite el acceso a etiquetas SERS con una alta población de agregados de bajo número, tales como dímeros, trímeros y tetrámeros.

Para inducir la agregación por el método descrito en la etapa **d1)** se requiere mezclar el tercer coloide obtenido en la etapa **c)** a un pH comprendido entre aproximadamente 2,2 y el valor de pH más bajo en el que las moléculas indicadoras activas en Raman tienen una carga eléctrica neta de entre 0 y 0,3, que para una molécula indicadora activa en Raman de fórmula general **(I)** tiene un pH comprendido entre aproximadamente 2,2 y aproximadamente 6,1, preferentemente entre aproximadamente 2,6 y aproximadamente 5,7. Esto se puede lograr mediante la adición de una solución ácida al tercer coloide obtenido en la etapa **c)**, o mediante el ajuste del pH del primer coloide para que el coloide obtenido en la etapa **d1)** tenga el valor de pH requerido.

Así, una realización de acuerdo con la presente invención se dirige a un método de fabricación en donde la etapa **d1)** comprende además la adición de una solución ácida al tercer coloide obtenido en la etapa **c)** mientras se mezcla de modo que el pH del coloide resultante esté comprendido entre aproximadamente 2,2 y el valor de pH más bajo en el que las moléculas indicadoras activas en Raman tienen una carga eléctrica neta de entre 0 y 0,3, que en el caso de una molécula indicadora activa en Raman de fórmula general **(I)** tiene un pH comprendido entre aproximadamente 2,2 y aproximadamente 6,1, preferentemente entre aproximadamente 2,6 y aproximadamente 5,7. Las soluciones ácidas adecuadas incluyen, pero sin limitación, ácido acético, ácido clorhídrico y ácido nítrico.

Para evitar una etapa de fabricación adicional, es conveniente ajustar el valor de pH del primer coloide para que el coloide obtenido en la etapa **d1)** tenga un pH comprendido entre aproximadamente 2,2 y el valor de pH más bajo en el que las moléculas indicadoras activas en Raman tengan una carga eléctrica neta de entre 0 y 0,3, que en el caso de una molécula indicadora activa en Raman de fórmula general **(I)** tiene un pH comprendido entre aproximadamente 2,2 y aproximadamente 6,1, preferentemente entre aproximadamente 2,6 y aproximadamente 5,7.

El método de fabricación reivindicado en este documento incluye también la etapa **e)** detención de la agregación. Preferentemente, la etapa **e)** comprende cualquiera de las siguientes etapas **e1)** - **e4)**:

e1) ajuste del pH del coloide obtenido en la etapa **d)** a un valor superior al valor de pH más bajo en el que las moléculas indicadoras activas en Raman que se adsorberán en la superficie de las nanopartículas no tienen carga eléctrica neta;

e2) dilución del coloide obtenido en la etapa **d)** con agua, preferentemente para que la concentración de nanopartículas en el coloide sea inferior a $6 \cdot 10^9$ nanopartículas/ml;

e3) adición de un polímero al coloide obtenido en la etapa **d)**;

e4) adición de un precursor de material dieléctrico al coloide obtenido en la etapa **d)**.

5 En el método de fabricación inventivo reivindicado en el presente documento, la agregación se puede detener mediante cualquiera de los métodos **e1)** - **e4)**.

10 Ajuste del pH del coloide obtenido en la etapa **d)** a un valor superior al valor de pH más bajo en el que las moléculas indicadoras activas en Raman que se van a adsorber en la superficie de las nanopartículas no llevan carga eléctrica neta como se describe en la etapa **e1)**, da como resultado un aumento de las repulsiones electrostáticas entre los agregados de nanopartículas, conduciendo a la parada del proceso de agregación. La carga eléctrica neta de una molécula indicadora activa en Raman y el valor de pH correspondiente a dicha carga eléctrica neta se pueden predecir a través de herramientas en línea como Chemicalize.com (Chemicalize. ChemAxon. <http://chemicalize.com/#/calculation>).

15 La adición de un polímero al coloide obtenido en la etapa **d)** como se describe en la etapa **e3)** da como resultado el aumento de las repulsiones estéricas entre los agregados de nanopartículas y conduce a la detención del proceso de agregación. Ventajosamente, el polímero usado en la etapa **e3)** no influye en la señal SERS exhibida por la etiqueta SERS. Los polímeros adecuados incluyen, pero sin limitación, polivinilpirrolidona y polietilenglicol.

20 La adición de un precursor de material dieléctrico al coloide obtenido en la etapa **d)** como se describe en la etapa **e4)** da como resultado la encapsulación de los agregados de nanopartículas con al menos una capa de material dieléctrico, lo que estabiliza las etiquetas SERS y da como resultado implícitamente la detención del proceso de agregación. Preferentemente, el precursor de material dieléctrico es un precursor de sílice. Los precursores de sílice incluyen, pero sin limitación, soluciones de tetraetil ortosilicato y 3-aminopropiltrimetoxisilano en etanol, soluciones de ortosilicato de tetraetilo y (3-mercaptopropil)trimetoxisilano en etanol, soluciones de silicato de sodio en agua y soluciones de (3-mercaptopropil)trimetoxisilano en agua.

30 De manera alternativa, el proceso de agregación se puede detener diluyendo el coloide obtenido en la etapa **d)** con agua. Preferentemente, la agregación se detiene diluyendo el coloide obtenido en la etapa **d)** con agua para alcanzar una concentración de material de nanopartículas [$\mu\text{g/ml}$] menor o igual a $12,5 \mu\text{g/ml}$ (véase, por ejemplo: **E1 – E8, E11 – E14**). De manera alternativa, la agregación se detiene diluyendo el coloide obtenido en la etapa **d)** con agua para alcanzar una concentración de nanopartículas por debajo de 6×10^9 nanopartículas/ml.

35 Otra realización preferida de la presente invención está dirigida a un método de fabricación de etiquetas SERS, en donde la etapa **e)** consiste esencialmente en la etapa **e3)** y el método de fabricación comprende además la dilución del coloide obtenido en la etapa **e3)** con agua y/o recubrimiento de las etiquetas SERS con un material dieléctrico.

40 En una realización preferida adicional, las etapas **c)** y **d)** del método de fabricación reivindicado en el presente documento se llevan a cabo simultáneamente en un sistema de flujo continuo. En este método de fabricación específico, se utiliza un reactor de flujo continuo. Dicho reactor de flujo continuo se representa esquemáticamente en las **Figura 1b** y **Figura 1c** y comprende dos tanques presurizados (111b, 112b, 111c, 112c) conectados a través de un tubo a una unión en T (113b, 113c) y un depósito colector (114b, 114c). El segundo coloide se almacena en el tanque presurizado (111b, 111c), mientras que el primer coloide se almacena en el tanque presurizado (112b, 112c). Se utiliza un recipiente abierto a la atmósfera (114b, 114c) para recoger las etiquetas SERS y, opcionalmente, para detener la agregación (114c). Un tubo que conecta cada uno de los tanques presurizados (111b, 112b, 111c, 112c) a la unión en T (113b, 113c) se utiliza para el transporte de coloides. Otro tubo que conecta la unión en T (113b, 113c) al recipiente de recogida (114b, 114c) se utiliza para realizar la agregación. Los agregados de nanopartículas obtenidos a través de las agregaciones se recogen en el recipiente de recogida (114b), donde se detiene la agregación.

55 Cuando las etapas **c)** y **d)** del método de fabricación se llevan a cabo simultáneamente en un sistema de flujo continuo, se prefiere además que la etapa **e)** también se lleve a cabo en un sistema de flujo continuo.

60 Como se ha mencionado anteriormente, las nanopartículas usadas en el método de fabricación de las etiquetas SERS pueden tener cualquier forma que se pueda producir, tal como una esfera, esferoide, barra, disco, prisma y cubo. Preferentemente, la forma de las nanopartículas que tienen una superficie plasmónica usada en el método de fabricación inventivo reivindicado en el presente documento se selecciona entre una esfera y un esferoide. Incluso más preferentemente, dichas nanopartículas tienen forma de esferoide.

65 En una realización preferida, las nanopartículas del primer coloide y las nanopartículas del segundo coloide tienen el mismo tamaño. Convenientemente, para dicho método de fabricación de etiquetas SERS, el coloide usado para la preparación del segundo coloide (es decir, el coloide proporcionado en la etapa **b1)**) es el primer coloide.

En una realización alternativa, el tamaño de las nanopartículas del primer coloide es diferente del tamaño de las nanopartículas del segundo coloide. Por ejemplo, el tamaño de las nanopartículas en el primer coloide puede ser menor que el tamaño de las nanopartículas en el segundo coloide, lo que da como resultado que las etiquetas SERS tengan estructuras similares a las etiquetas SERS representadas por la **Figura 3a**, o el tamaño de las nanopartículas en el primer coloide puede ser mayor que el tamaño de las nanopartículas en el segundo coloide, lo que da como resultado que las etiquetas SERS tengan estructuras similares a las etiquetas SERS representadas por la **Figura 3b**.

El método de fabricación reivindicado en el presente documento se realiza preferentemente con coloides, en donde la superficie plasmónica de las nanopartículas en el primer coloide y/o la superficie plasmónica de las nanopartículas en el segundo coloide está hecha de oro, más preferentemente con coloides que comprenden nanopartículas de oro sólido, e incluso más preferentemente con coloides de oro estabilizados con citrato.

15 EJEMPLOS

La presente invención se describe ahora con más detalle con respecto a los siguientes ejemplos no limitantes.

20 Aspectos generales

Los siguientes reactivos se obtuvieron de los siguientes proveedores:

Trihidrato de cloroaurato de oro (> 99,9 %; N.º de CAS: 16961-25-4), borohidruro de sodio (99,99 %; N.º de CAS: 16940-66-2), citrato de sodio tribásico dihidrato (≥99,5 %; N.º de CAS: 6132-04-3), (*E*)-1,2-di(piridin-4-il)eteno (97 %; N.º de CAS: 13362-78-2), 5-(piridin-4-il)-1,3,4-oxadiazol-2-tiol (97 %; N.º de CAS: 15264-63-8), hidróxido de sodio (reactivo ACS, ≥97 %; N.º de CAS: 1310-73-2), clorhidrato de hidroxilamina (99,999 %; N.º de CAS: 5470-11-1), tereftalaldehído (ReagentPlus, 99 %, N.º de CAS: 623-27-8), 4-metilpiridina (99 %; N.º de CAS: 108-89-4), anhídrido acético (ReagentPlus, ≥99 %; N.º de CAS: 108-24-7), diclorometano (anhidro, 99,8 %; N.º de CAS: 75-09-2) y metanol (HPLC, ≥99,9 %; N.º de CAS: 67-56-1) se adquirieron de Sigma Aldrich. Ácido clorhídrico (grado de metales traza, 34-37 %; N.º de CAS: 7647-01-0) se adquirió de Fisher Scientific.

Los valores de potencial ζ se midieron usando un Malvern Zetasizer Nano-ZS con 1 ml de celdas capilares plegadas (DTS1060). Los espectros de absorción óptica se registraron en un espectrofotómetro Agilent 8453 y en un Perkin Elmer Lambda 650.

Se tomaron imágenes por microscopio electrónico de barrido (SEM) en un Hitachi S-4500.

Se obtuvieron espectros Raman de 785 nm en Ocean Optics QE 6500.

Las partículas coloidales de oro de 140 nm nominales se dimensionaron enviando una muestra a EAG Laboratories para obtener imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las imágenes se analizaron con el software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Se consideró que un lote era nominalmente de 140 nm, si el tamaño de partícula promedio en número estaba dentro de ±9 nm del diámetro nominal, en donde el tamaño de partícula promedio en número se determinó mediante la medición de 230 partículas individuales en micrografías TEM. La característica relacionada con el tamaño seleccionada para describir las partículas individuales fue el diámetro del "equivalente de círculo" (CE), que corresponde al diámetro de un círculo que tendría la misma área que una proyección ortográfica de la partícula.

El diámetro de las nanopartículas de oro d (nm) para los lotes de nanopartículas de 40, 60, 90 nm se calcularon mediante el método de *Haiss y colaboradores* (*Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4215-4221) usando la ecuación

$$d = \frac{\ln \frac{\lambda_{spr} - 512 \text{ nm}}{6,53}}{0,0216} \text{ nm}$$

donde λ_{spr} es la posición del pico de resonancia del plasmón superficial en el gráfico de extinción tomado de la muestra de coloide en un Perkin Elmer Lambda 650 UV Vis. Se consideró que un lote era nominalmente de 40 nm, 60 nm o 90 nm, si la posición del pico de resonancia del plasmón superficial se correlacionaba con un diámetro dentro de ±9 nm del diámetro nominal.

I. Preparación de solución madre de coloide de Au (S1 - S4).

Las soluciones madre de coloide de oro (S1 - S4) caracterizadas por el tamaño de las nanopartículas de Au (nm), las concentraciones de Au (mg/ml) y los valores de pH indicados en la Tabla 1 se fabricaron como se describe a continuación:

I.1 Preparación de una solución madre de coloide de oro de 40 nm (S1)

En un reactor de vidrio de 100 l completamente limpio y encamisado (ChemGlass), se enfriaron 79,5 l de agua de 17 MΩ a 3,5±0,5 °C. Se añadió trihidrato de cloroaurato de oro (100 g) como una solución al 20 % en peso en agua mientras se agitaba con un impulsor a 400 rpm. Se combinaron citrato de sodio tribásico dihidrato (174,3 g) como una solución al 30 % en peso en agua y clorhidrato de hidroxilamina (155,6 g) como una solución al 23,5 % en peso en agua y se añadieron al reactor. Después de 10 s, se inyectaron en el reactor 800 µl de borohidruro de sodio como una solución al 0,063 % en peso en hidróxido de sodio 0,01 N. Los reactivos se dejaron reaccionar durante 2 minutos y luego se drenaron en un tambor limpio para proporcionar una solución madre de coloide de Au de 40 nm (S1) con una concentración de oro de 0,25 mg de Au/ml y un valor de pH de aproximadamente 2,4.

I.2 Preparación de una solución madre de coloide de oro de 60 nm (S2)

En un reactor de vidrio de 100 l completamente limpio y encamisado (ChemGlass), se enfriaron 79,5 l de agua de 17 MΩ a 3,5±0,5 °C. Se añadió trihidrato de cloroaurato de oro (200 g) como una solución al 20 % en peso en agua mientras se agitaba con un impulsor a 400 rpm. Se combinaron citrato de sodio tribásico dihidrato (173,3 g) como una solución al 30 % en peso en agua y clorhidrato de hidroxilamina (217,1 g) como una solución al 17,5 % en peso en agua y se añadieron al reactor. Después de 10 s, se inyectaron en el reactor 800 µl de borohidruro de sodio como una solución al 0,052 % en peso en hidróxido de sodio 0,01 N. Los reactivos se dejaron reaccionar durante 2 minutos y luego se drenaron en un tambor limpio. El lote se diluyó con agua de 17 MΩ hasta 160 l para dar una solución madre de coloide de Au de 60 nm (S2) con una concentración de oro de 0,25 mg de Au/ml y un pH de aproximadamente 2,4.

I.3 Preparación de una solución madre de coloide de oro de 90 nm (S3)

En un reactor de vidrio de 100 l completamente limpio y encamisado (ChemGlass), se enfriaron 79,5 l de agua de 17 MΩ a 3,5±0,5 °C. Se añadió trihidrato de cloroaurato de oro (200 g) como una solución al 20 % en peso en agua mientras se agitaba con un impulsor a 400 rpm. Se combinaron citrato de sodio tribásico dihidrato (173,3 g) como una solución al 30 % en peso en agua y clorhidrato de hidroxilamina (217,1 g) como una solución al 17,5 % en peso en agua y se añadieron al reactor. Después de 10 s, se inyectaron en el reactor 900 µl de borohidruro de sodio como una solución al 0,01 % en peso en hidróxido de sodio 0,01 N. Los reactivos se dejaron reaccionar durante 2 minutos y luego se drenaron en un tambor limpio. El lote se diluyó con agua de 17 MΩ hasta 160 l para dar una solución madre de coloide de Au de 90 nm (S3) con una concentración de oro de 0,25 mg de Au/ml y un pH de aproximadamente 2,4.

I.4 Preparación de una solución madre de coloide de oro de 140 nm (S4)

En una jarra de vidrio de 2 l, se agitaron 1,5 l de agua de 17 MΩ a temperatura ambiente. Se añadió trihidrato de cloroaurato de oro (2,5 g) como una solución al 20 % en peso en agua mientras se agitaba. Se combinaron citrato de sodio tribásico dihidrato (15,37 g) como una solución al 30,7 % en peso en agua y clorhidrato de hidroxilamina (8,37 g) como una solución al 16,7 % en peso en agua y se añadieron al reactor. Después de 5 s, se inyectaron en el reactor 25 µl de borohidruro de sodio como una solución al 0,01 % en peso en hidróxido de sodio 0,01 N. La agitación adicional durante 15 minutos proporcionó una solución madre de coloide de Au de 140 nm (S4) con una concentración de oro de 0,25 mg de Au/ml y un pH de aproximadamente 2,4.

Tabla 1: Caracterización de las soluciones madre de coloide de Au (S1 - S4).

Solución madre coloidal de Au n.º:	Tamaño de nanopartículas de Au (nm)	Concentración de Au (mg/ml)	pH
S1	40	0,25	≈ 2,4
S2	60	0,25	≈ 2,4
S3	90	0,25	≈ 2,4
S4	140	0,25	≈ 2,4

II. Preparación de un primer coloide (A1 - A9) (etapa a) del método de fabricación)

Los primeros coloides (A1 - A9) se obtuvieron a partir de soluciones coloidales de Au S1, S2 y S4. En caso de ser necesario (por ejemplo: coloides de Au A1 y A7) las soluciones madre de coloide de Au se diluyeron con agua desionizada para obtener la concentración de Au (mg/ml) indicada en **Tabla 2**. Adicionalmente, en caso de ser necesario (por ejemplo: coloides de Au A3, A4, A5, A6, A8, A9), las soluciones madre de coloide de Au *per se* o después de la dilución se tratan con una solución acuosa 0,1 mM de NaOH o una solución acuosa 0,1 mM de HCl para ajustar el valor de pH de los primeros coloides al valor de pH indicado por la

Tabla 2.

Tabla 2: Caracterización de los primeros coloides (**A1 - A9**).

Solución madre coloidal de Au n.º:	Tamaño de nanopartículas de Au (nM)	Concentración de Au (mg/ml)	Valor de pH
A1	60	0,10	≈2,5
A2	60	0,25	≈2,4
A3	60	0,25	≈3,0
A4	60	0,25	≈1,7
A5	60	0,25	≈8,8
A6	60	0,25	≈4,2
A7	140	0,10	≈2,4
A8	40	0,25	≈4,2
A9	60	0,25	≈6,0

5 Solo los primeros coloides estables, es decir, los coloides en los que no se produce agregación, son adecuados para su uso en el método de fabricación de acuerdo con la presente invención. Los primeros coloides **A1 - A9** son estables, es decir, no se pudo identificar ninguna agregación de las nanopartículas de Au mediante la detección visual de un cambio de color de rosa a púrpura. Adicionalmente, como lo confirma la **Figura 4**, una variedad de coloides de Au caracterizados por un valor de potencial zeta menor o igual a -25 mV medido como se describe en el **artículo IV** a continuación son estables. Por lo tanto, dichos coloides de Au también son útiles como primeros coloides en el método de fabricación de acuerdo con la presente invención.

15 **III.** Preparación de un segundo coloide que contiene nanopartículas de Au y moléculas indicadoras activas en Raman adsorbidas en la superficie de nanopartículas de Au (**D1 - D11**) (etapa **b**) del método de fabricación)

20 Los coloides de Au (**B1 - B8**) caracterizados por las concentraciones de Au (mg/ml) y los valores de pH indicados en la **Tabla 3** se prepararon a partir de las soluciones madre coloidales de Au **S1 - S3**. La preparación implica, en caso de ser necesario (por ejemplo: coloides de Au **B1** y **B5**) la dilución de las soluciones madre de coloide de Au con agua desionizada para obtener la concentración de Au indicada (mg/ml), y el ajuste del valor de pH mediante la adición de una solución acuosa de NaOH 1 M a las soluciones madre de coloide de Au *per se* o después de la dilución.

25 **Tabla 3:** Caracterización de coloides de Au **B1 - B9**.

Coloide de Au n.º:	Tamaño de nanopartículas de Au (nM)	Concentración de Au (mg/ml)	Valor de pH
B1	60	0,10	≈11,2
B2	60	0,25	≈11,2
B3	60	0,25	≈9,8
B4	60	0,25	≈12,1
B5	90	0,10	≈11,0
B6	60	0,25	≈7,1
B7	60	0,25	≈5,1
B8	40	0,25	≈11,0
B9	60	0,25	≈8,2

La molécula indicadora activa en Raman 1,4-bis ((*E*)-2-(piridin-4-il)vinil)benzeno se sintetizó como se describe a continuación:

30 En un matraz de fondo redondo de 50 ml con una barra de agitación se cargó tereftalaldehído (3,44 g, 25,7 mmol), 4-metilpiridina (9,57 g, 103 mmol) y anhídrido acético (25 ml). La mezcla se calentó a reflujo hasta que no hubo más aldehído presente (4 h, comprobado por TLC). La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se inactivó vertiéndola en 100 ml de agua helada. La mezcla fría se neutralizó a pH 7 usando una solución acuosa 6 N de NaOH y el precipitado marrón resultante se filtró, se lavó con agua y se secó al aire. La extracción con diclorometano, seguido de concentración de disolvente a sequedad proporcionó el producto

35 bruto que se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida en gel de sílice (metanol/diclorometano: 5/95) para proporcionar 0,875 g de la molécula indicadora activa en Raman diana como un sólido amarillo (12 %).

El segundo coloide (**D1 - D11**) que contenía nanopartículas de Au que habían adsorbido en su superficie

- moléculas indicadoras activas en Raman se prepararon añadiendo un volumen de solución de molécula indicadora activa en Raman 0,1 mM en etanol a 20 ml de coloide de Au (**B1 - B5, B9**) o 3 l de coloide de Au (**B8**), seguido de agitación de la mezcla resultante durante 30 min (segundo coloide **D1 - D7, D9 - D11**)/1 h (segundo coloide **D8**) a temperatura ambiente. La **Tabla 4** proporciona un resumen de las moléculas indicadoras activas en Raman y los volúmenes de la solución de la molécula indicadora activa en Raman en etanol usada para la preparación del segundo coloide **D1 - D11**.

Tabla 4: Preparación de los segundos coloides **D1 - D11**.

Segundo coloide n°:	Coloide de Au de partida	Molécula indicadora activa en Raman	Volumen 0,1 mM de solución de molécula indicadora activa en Raman
D1	B1	(<i>E</i>)-1,2-di(piridin-4-il)eteno	300 μ l
D2	B2	(<i>E</i>)-1,2-di(piridin-4-il)eteno	750 μ l
D3	B3	(<i>E</i>)-1,2-di(piridin-4-il)eteno	750 μ l
D4	B4	(<i>E</i>)-1,2-di(piridin-4-il)eteno	750 μ l
D5	B2	5-(piridin-4-il)-1,3,4-oxadiazol-2-tiol	750 μ l
D6	B2	1,4-bis((<i>E</i>)-2-(piridin-4-il)vinil)benzeno	750 μ l
D7	B5	(<i>E</i>)-1,2-di(piridin-4-il)eteno	240 μ l
D8	B8	(<i>E</i>)-1,2-di(piridin-4-il)eteno	127,5 ml
D9	B9	(<i>E</i>)-1,2-di(piridin-4-il)eteno	750 μ l
D10	B1	1,4-bis((<i>E</i>)-2-(piridin-4-il)vinil)benzeno	300 μ l
D11	B1	5-(piridin-4-il)-1,3,4-oxadiazol-2-tiol	300 μ l

- 10 El tratamiento de 20 ml de coloides de Au **B6** y **B7** con un valor de pH inferior al valor de pH más bajo en el que (*E*)-1,2-di(piridin-4-il)eteno no lleva carga eléctrica neta como se predijo por Chemicalize.com con 750 μ l de una solución 0,1 mM de (*E*)-1,2-di(piridin-4-il)eteno en etanol, seguido de la agitación de la mezcla resultante durante 30 min a temperatura ambiente dio como resultado coloides inestables como se indica mediante la detección visual de un cambio de color de rosa a púrpura de la mezcla durante la agitación.
- 15 coloides inestables no se pueden usar en el método de fabricación de acuerdo con la presente invención. Para asegurar la estabilidad del segundo coloide, es decir, para evitar la agregación de las nanopartículas de Au contenidas en dicho coloide, es importante que durante la preparación y almacenamiento de dicho coloide, el valor de potencial ζ sea menor o igual a -25 mV y el valor de pH sea mayor que el valor de pH más bajo al que la molécula indicadora activa en Raman se adsorberá en las nanopartículas de Au no lleve carga eléctrica neta, en donde dicho valor se puede predecir, por ejemplo, con Chemicalize.com.
- 20 En este sentido, el valor de pH del coloide de Au (**B1 - B5, B8, B9**) usado para la preparación del segundo coloide se ajusta antes del tratamiento con la molécula indicadora activa en Raman a un valor superior al valor de pH más bajo en el que la molécula indicadora activa en Raman que se adsorberá en las nanopartículas de Au contenidas en el coloide de Au (**B1 - B5, B8, B9**) no lleve carga eléctrica neta, en donde dicho valor se puede predecir, por ejemplo, con Chemicalize.com.

30 **IV. Estabilidad del primer y segundo coloides.** Para ser adecuados para su uso en el método de fabricación de acuerdo con la presente invención que proporciona etiquetas SERS con una alta población de agregados de tamaño reducido, el primer y segundo coloides deben ser estables, es decir, durante la preparación y almacenamiento de dichos coloides, debe evitarse la agregación de nanopartículas de las nanopartículas. Esto puede garantizarse manteniendo el valor de potencial ζ de dichos coloides en un valor menor o igual a -25 mV. Como se muestra en la **Figura 4** y en la **Tabla 5**, se puede utilizar una variedad de coloides de Au como primer y segundo coloides en el método de fabricación de etiquetas SERS de acuerdo con la presente invención.

35 El potencial ζ del primer coloide **A2** y segundos coloides **D2, D5** y **D6** se midió en función del pH a una concentración de 0,05 mg de Au/ml a temperatura ambiente. Los resultados se indican en la **Tabla 5** y se representan gráficamente en la **Figura 4**.

40 Las mediciones del potencial ζ se realizaron en un Malvern Zetasizer Nano-ZS con 1 ml de celdas capilares plegadas. Las propiedades físicas del agua a 25 °C y oro se precargaron en el instrumento. El primer coloide **A2** y los segundos coloides **D2, D5** y **D6** se diluyeron cada uno con agua desionizada a una concentración de 0,05 mg de Au/ml.

45 Los valores de potencial ζ del primer coloide **A2** y del segundo coloide **D2, D5** y **D6** a aproximadamente el pH usado para la síntesis de etiquetas SERS de acuerdo con la invención se informan en la 2ª columna de la **Tabla 5**. Los valores de potencial ζ del primer coloide **A2** y del segundo coloide **D2, D5** y **D6** en el pH en el

que los coloides se vuelven inestables se informan en la 3ª columna de la **Tabla 5**. La inestabilidad del coloide se determinó mediante la detección visual de un cambio de color del coloide de rosa a púrpura.

Tabla 5: Mediciones de potencial ζ del primer y segundo coloides.

Coloide de Au n.º diluido a 0,05 mg de Au/ml [Concentración de Au]	Potencial ζ después de la dilución (pH después de la dilución)	Potencial ζ en el que el coloide de Au se vuelve inestable (pH al que el coloide de Au se vuelve inestable)
A2	-43 mV (a pH ≈ 2,5)	-17 mV (a pH ≈ 1,6)
D2	-44 mV (a pH ≈ 10)	-22 mV (a pH ≈ 6)
D5	-38 mV (a pH ≈ 10)	-16 mV (a pH ≈ 3,4)
D6	-36 mV (a pH ≈ 10)	-23 mV (a pH ≈ 7)

5

V. Combinación del primer coloide y segundo coloide, inducción de la agregación y detención de la agregación (etapas c), d) y e) del método de fabricación)

V.1 Etiquetas SERS que contienen nanopartículas de Au del mismo tamaño (Ejemplos E1 - E8, E12 – E14)

10

V.1.a Agregación por lotes (ejemplos E1 - E7, E12 – E14)

El segundo coloide (**D1 - D6, D9 - D11**, 20 ml) se vertió rápidamente en 80 ml del primer coloide (**A1 - A5, A9**) y la mezcla se agitó en un depósito de mezcla con una barra agitadora magnética. 30 segundos después de la combinación de coloides, se tomó una muestra de una alícuota de 125 µl y se diluyó a 1 ml con agua, deteniendo así la agregación. A esta dilución (12,5 µg de Au/ml correspondiente a aproximadamente $5,72 \cdot 10^9$ de nanopartículas de Au/ml) cesó la agregación, y la señal SERS se midió usando excitación láser de 785 nm y un espectrómetro QE65000 comprado a Ocean Optics Inc. ajustado a un tiempo de integración de un segundo. Los resultados de las mediciones de la señal SERS realizadas en las etiquetas SERS fabricadas como se describió anteriormente se representan en la **Tabla 6**.

15

20

Como lo confirman los ejemplos **E1 - E7**, y **E12 - E14** de acuerdo con el método inventivo reivindicado en el presente documento, y los ejemplos comparativos **C1 - C3**, la agregación selectiva de las partículas del primer coloide y las partículas del segundo coloide no ocurre a un valor de pH bajo como 1,8 y a valores de pH más altos que el valor de pH más bajo en el que las moléculas indicadoras activas en Raman tienen una carga eléctrica neta de entre 0 y 0,3, como se predijo por Chemicalize.com

25

Tabla 6: Intensidad de la señal SERS presentada por las etiquetas SERS de acuerdo con los Ejemplos E1 - E7, E12 y ejemplos comparativos C1 - C3.

Número de ejemplo	Primer coloide n.º:	Segundo coloide n.º:	Relación entre el número de nanopartículas del primer coloide y el número de nanopartículas del segundo coloide	pH de coloide obtenido mezclando el primer y segundo coloide	Intensidad de la señal SERS a 12,5 µg de Au/ml [cps ± 500]
E1	A1	D1	≈4:1	≈2,9	9385
E2	A2	D2	≈4:1	≈2,6	14321
E3	A3	D2	≈4:1	≈3,2	17091
E4	A2	D3	≈4:1	≈3,3	7248
E5	A3	D4	≈4:1	≈5,7	14598
E12	A2	D9	≈4:1	≈2,6	11109
C1	A4	D2	≈4:1	≈1,8	3270 (sin agregación)
C2	A9	D2	≈4:1	≈6,5	512 (sin agregación)
C3	A5	D2	≈4:1	≈9,9	373 (sin agregación)
E6	A2	D5	≈4:1	≈2,6	15617
E13	A1	D11	≈4:1	□2,9	13654
E7	A2	D6	≈4:1	≈2,6	28993
E14	A1	D10	≈4:1	□2,9	24196

30

V.1.b Agregación del sistema de flujo continuo (ejemplo E8)

Un esquema del reactor de flujo continuo usado en el método de fabricación de acuerdo con la presente invención se presenta en la **Figura 1b**. Un tanque presurizado (111b) contiene el segundo coloide y un segundo tanque presurizado (112b) contiene el primer coloide. Se utiliza un recipiente abierto a la atmósfera (114b) para recoger las etiquetas SERS y contiene una solución polimérica concentrada para detener la reacción de agregación. Para el transporte de coloides se utiliza etileno propileno transparente fluorado (FEP) de Cole Parmer® Scientific Experts con un diámetro interno nominal de 8 mm. Se utilizaron 30 cm de tubo FEP para conectar el tanque presurizado (111b) a la unión en T (113b). Se utilizaron 30 cm de tubo FEP para conectar el tanque presurizado (112b) a la unión en T (113b). Se utilizaron 7 m de tubo de FEP para conectar la unión en T (113b) al recipiente de recogida (114b). Esta sección de tubo entre la unión en T (113b) y el recipiente de recogida (114b) es la sección en la que se produce la agregación.

Los coloides **A8** (12 l) y **D8** (3 l) descritos anteriormente se colocaron en los tanques 112b y 111b, respectivamente. El tanque (111b) que contiene el segundo coloide (**D8**) se presurizó de manera que el caudal de coloide fuera de 0,66 l/min. El tanque (112b) que contiene el primer coloide (**A8**) se presurizó de manera que el caudal de coloide fuera de 2,65 l/min. Después de la combinación en la unión en T, el coloide combinado, caracterizado por una relación entre el número de nanopartículas del primer coloide **A8** y el número de nanopartículas del segundo coloide **D8** es de $\approx 4:1$, tiene un valor de pH de aproximadamente 4,8 y un caudal en el tubo de agregación de 3,31 l/min, dando una velocidad lineal de 1,1 m/s. Las mediciones de SERS se tomaron a través del tubo FEP transparente en marcas de 1 m a lo largo del tubo de agregación con una sonda acoplada con un cable de fibra óptica a un espectrómetro Ocean Optics QE65000 con excitación de 785 nm. El tiempo de integración se acortó de modo que la medición en el marcado al final del tubo fue igual al valor obtenido de una alícuota de 50 μ l que se muestreó en la abertura del tubo y se diluyó a 1 ml con agua (12,5 μ g de Au/ml), es decir, a una muestra en la que la agregación se detuvo mediante dilución con agua y se midió utilizando excitación láser de 785 nm y un espectrómetro Ocean Optics QE65000 ajustado a un tiempo de integración de un segundo. Los resultados de las mediciones de SERS se representan gráficamente en la **Figura 5** como rombos conectados por una línea continua. La intensidad de la señal SERS de la muestra tomada al final del tubo y medida a 12,5 μ g de Au/ml fue 11044 cuentas por segundo [± 500].

V.2 El primer coloide y el segundo coloide contienen nanopartículas de Au de diferentes tamaños (Ejemplos E9 - E11)**V.2.a Agregación por lotes (ejemplos E9 y E10)****Ejemplo E9**

Segundo coloide (**D7**, 30 ml) se vertió rápidamente en el primer coloide (**A1**, 55 ml) y la mezcla se agitó en el depósito de mezcla con una barra agitadora magnética. La relación entre el número de nanopartículas del primer coloide y el número de nanopartículas del segundo coloide es $\approx 6,3:1$. Después de 30 s de mezcla a un pH de aproximadamente 2,9, la agregación se detuvo mediante la adición de una solución polimérica, y los agregados resultantes se recubrieron adicionalmente con sílice siguiendo el método descrito en el documento US8497131B2 para proporcionar las etiquetas SERS diana. Se dejaron caer alícuotas de ~ 2 μ l de las etiquetas SERS sobre trozos de obleas de sílice y se secaron. La muestra fue fotografiada en un SEM de emisión de campo Hitachi S-4500 y se muestra en la **Figura 3a**. La señal SERS se midió usando excitación láser de 785 nm y un espectrómetro QE65000 comprado a Ocean Optics Inc. ajustado a un tiempo de integración de un segundo. La intensidad de la señal SERS medida a 12,5 μ g de Au/ml fue de 18377 cuentas por segundo [± 500].

Ejemplo E10

El segundo coloide (**D7**, 20 ml) se vertió rápidamente en el primer coloide (**A7**, 200 ml) y la mezcla se agitó en el depósito de mezcla con una barra agitadora magnética. La relación entre el número de nanopartículas del primer coloide y el número de nanopartículas del segundo coloide es $\approx 2,65:1$.

Después de 30 s de mezcla a un pH de aproximadamente 2,9, la agregación se detuvo mediante la adición de una solución polimérica, y los agregados resultantes se recubrieron con sílice siguiendo el método descrito en el documento US8497131B2 para proporcionar las etiquetas SERS diana. Se dejaron caer alícuotas de ~ 2 μ l de las etiquetas SERS sobre trozos de obleas de sílice y se secaron. La muestra fue fotografiada en un SEM de emisión de campo Hitachi S-4500 y se muestra en la **Figura 3b**.

V.2.b Agregación del sistema de flujo (Ejemplo E11)

Un esquema del reactor de flujo continuo usado en el método de fabricación de acuerdo con la presente

invencción se presenta en la **Figura 1b**. Un tanque presurizado (111b) contiene el segundo coloide y un segundo tanque presurizado (112b) contiene el primer coloide. Se utiliza un recipiente abierto a la atmósfera (depósito de recogida, 114b) para recoger las etiquetas SERS y detener la agregación. Para el transporte de coloides se utiliza etileno propileno fluorado (FEP) de Cole Parmer® Scientific Experts con un diámetro interno nominal de 8 mm. Se utilizaron 30 cm de tubo FEP transparente para conectar el tanque presurizado (111b) a la unión en T (113b). Se utilizaron 30 cm de tubo de FEP para conectar el tanque presurizado (112b) a la unión en T (113b). Se utilizaron 7 m de tubo de FEP para conectar la unión en T (113b) al recipiente de recogida (114b). Esta sección de tubo entre la unión en T (113b) y el recipiente de recogida (114b) es la sección en la que se produjo la agregación.

Los coloides **A6** (12 L) y **D8** (3 L) descritos anteriormente se colocan en los tanques 112b y 111b, respectivamente. El tanque (111b) que contiene el segundo coloide (**D8**) se presurizó de manera que el caudal de coloide fuera de 0,66 l/min. El tanque (112b) que contiene el primer coloide (**A6**) se presurizó de manera que el caudal de coloide activado fuera de 2,65 l/min. Después de la combinación en la unión en T, el coloide combinado, caracterizado por una relación entre el número de nanopartículas del primer coloide **A6** y el número de nanopartículas del segundo coloide **D8** es de $\approx 1,2:1$, tiene un pH de aproximadamente 4,8 y un caudal en el tubo de agregación de 3,31 l/min, dando una velocidad lineal de 1,1 m/s. Las mediciones de SERS se tomaron a través del tubo FEP transparente en marcas de 1 m a lo largo del tubo de agregación con una sonda acoplada con un cable de fibra óptica a un espectrómetro Ocean Optics QE65000 con excitación de 785 nm. El tiempo de integración se acortó de modo que la medición en el marcado al final del tubo fue igual al valor obtenido de una alícuota de 50 μ l que se muestreó en la abertura del tubo y se diluyó a 1 ml con agua (12,5 μ g de Au/ml) (etapa **e2**) y se midió utilizando excitación láser de 785 nm y un espectrómetro Ocean Optics QE65000 ajustado a un tiempo de integración de un segundo. Los resultados de estas mediciones se representan gráficamente en la **Figura 5** como círculos conectados por una línea de puntos. La intensidad de la señal SERS de la muestra tomada al final del tubo y medida a 12,5 μ g de Au/ml fue 28303 cuentas por segundo [± 500].

REIVINDICACIONES

1. Un método de fabricación de etiquetas de espectroscopia Raman potenciada en superficie (SERS) que comprende las etapas:
- 5
- a) proporción de un primer coloide que consiste esencialmente en nanopartículas que tienen una superficie plasmónica y sustancialmente del mismo tamaño dispersas en un disolvente acuoso, y un agente estabilizante adsorbido en la superficie de dichas nanopartículas, y que tiene un valor de potencial ζ menor o igual a -25 mV;
- 10 b) proporción de un segundo coloide que consiste esencialmente en nanopartículas que tienen una superficie plasmónica y sustancialmente del mismo tamaño dispersas en un disolvente acuoso, las moléculas indicadoras activas en Raman adsorbidas en la superficie de dichas nanopartículas, y un agente estabilizante adsorbido en la superficie de dichas nanopartículas, y que tienen un valor de potencial ζ menor o igual a -25 mV;
- 15 c) combinación del primer coloide con el segundo coloide de modo que la relación entre el número de nanopartículas del primer coloide y el número de nanopartículas del segundo coloide sea de entre 25:1 y 1:1, preferentemente de 5:1 a 1:1 para proporcionar un tercer coloide;
- d) inducción de la agregación de las nanopartículas mediante cualquiera de las etapas **d1)** – **d2)** o una combinación de las mismas:
- 20 **d1)** mezcla del tercer coloide obtenido en la etapa **c)** a un pH comprendido entre aproximadamente 2,2 y el valor de pH más bajo en el que las moléculas indicadoras activas en Raman tienen una carga eléctrica neta de entre 0 y 0,3;
- 25 **d2)** adición de una solución salina, preferentemente una solución salina inorgánica, al tercer coloide obtenido en la etapa **c)**; y
- e) detención de la agregación.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la etapa **b)** comprende las siguientes etapas realizadas en el orden **b1)** a **b3)**:
- 30 **b1)** proporción de un coloide que consiste esencialmente en nanopartículas que tienen una superficie plasmónica y sustancialmente del mismo tamaño dispersas en un disolvente acuoso, y un agente estabilizante adsorbido en la superficie de dichas nanopartículas, y que tiene un valor de potencial ζ menor o igual a -25 mV;
- 35 **b2)** ajuste del pH del coloide a un valor más alto que el valor de pH más bajo en el que las moléculas indicadoras activas en Raman que se van a adsorber en la superficie de las nanopartículas no llevan carga eléctrica neta mientras se mantiene el valor de potencial ζ menor o igual a -25 mV, preferentemente inferior a -40 mV; y
- 40 **b3)** adición de una solución de las moléculas indicadoras activas en Raman en un disolvente al coloide obtenido en la etapa **b2)** manteniendo el valor de potencial ζ menor o igual a -25 mV.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el agente estabilizante se selecciona entre ácidos carboxílicos, sales de ácido carboxílico, ácidos fosfóricos, sales de ácido fosfórico, ácido ascórbico, sales de ácido ascórbico y sus mezclas.
- 45
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las nanopartículas del segundo coloide han absorbido en su superficie una sub-monocapa o monocapa de moléculas indicadoras activas en Raman.
- 50
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde en la etapa **b3)** la solución de las moléculas indicadoras activas en Raman en un disolvente comprende una mezcla de dos o más moléculas indicadoras activas en Raman diferentes.
- 55
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde en la etapa **c)** la relación entre el número de nanopartículas del primer coloide y el número de nanopartículas del segundo coloide es de entre 4:1 y 3:1.
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la etapa **d1)** comprende además la adición de una solución ácida al tercer coloide obtenido en la etapa **c)** mientras se mezcla de modo que el valor de pH del coloide resultante esté comprendido entre 2,2 y el valor de pH más bajo en el que las moléculas indicadoras activas en Raman tienen una carga eléctrica neta de entre 0 y 0,3.
- 60
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el pH del primer coloide se ajusta de modo que el pH del tercer coloide obtenido en la etapa **d1)** esté comprendido entre 2,2 y el valor de pH más bajo en el que las moléculas indicadoras activas en Raman tienen una carga eléctrica
- 65

neta de entre 0 y 0,3.

- 5
9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la etapa **e)** comprende cualquiera de las siguientes etapas **e1)** - **e4)**:
- e1)** ajuste del pH del coloide obtenido en la etapa **d)** a un valor superior al valor de pH más bajo en el que las moléculas indicadoras activas en Raman que se adsorberán en la superficie de las nanopartículas no tienen carga eléctrica neta;
- 10 **e2)** dilución del coloide obtenido en la etapa **d)** con agua;
- e3)** adición de un polímero al coloide obtenido en la etapa **d)**;
- 10 **e4)** adición de un precursor de material dieléctrico al coloide obtenido en la etapa **d)**.
- 15
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la etapa **e)** consiste esencialmente en la etapa **e3)** y el método de fabricación comprende además la dilución del coloide obtenido en la etapa **e3)** con agua y/o recubrimiento de las etiquetas SERS con un material dieléctrico.
- 15
11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde las etapas **c)** y **d)** se llevan a cabo simultáneamente en un sistema de flujo continuo.
- 20
12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la etapa **e)** se lleva a cabo en un sistema de flujo continuo.
- 25
13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde las nanopartículas del primer coloide y las nanopartículas del segundo coloide tienen el mismo tamaño.
14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el tamaño de las nanopartículas del primer coloide es diferente del tamaño de las nanopartículas del segundo coloide.
- 30
15. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde la superficie plasmónica de las nanopartículas en el primer coloide y/o la superficie plasmónica de las nanopartículas en el segundo coloide está hecha de oro.

DIBUJOS

Fig. 1a

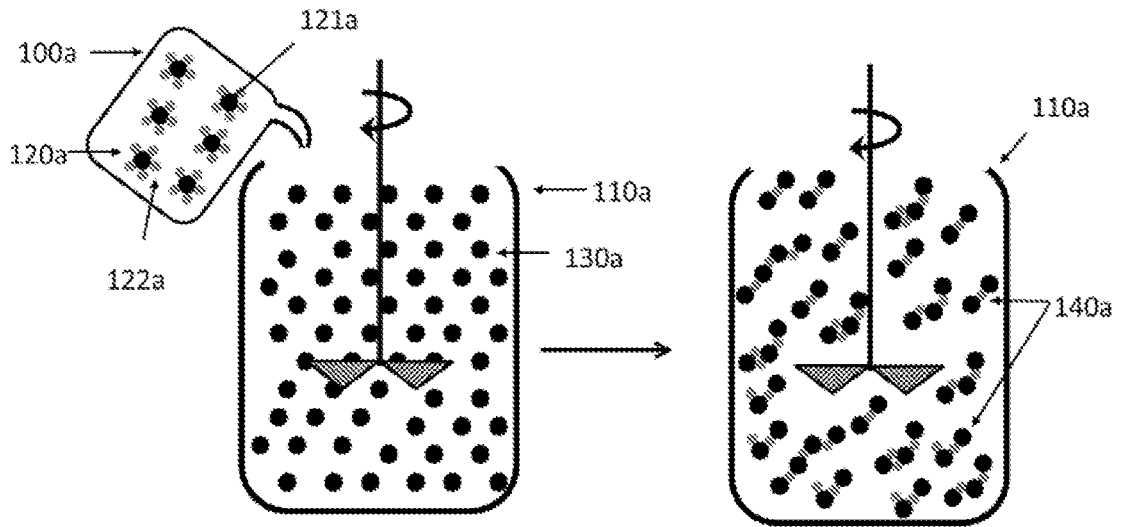


Fig. 1b

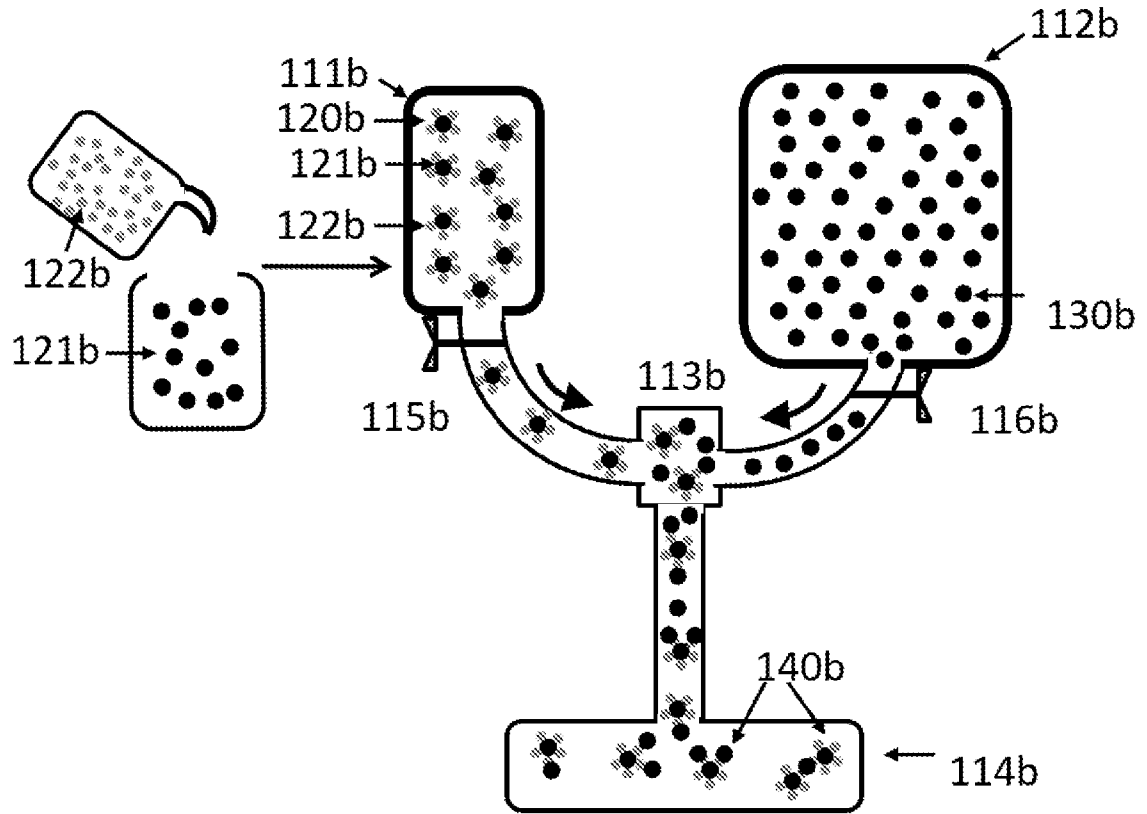


Fig. 1c

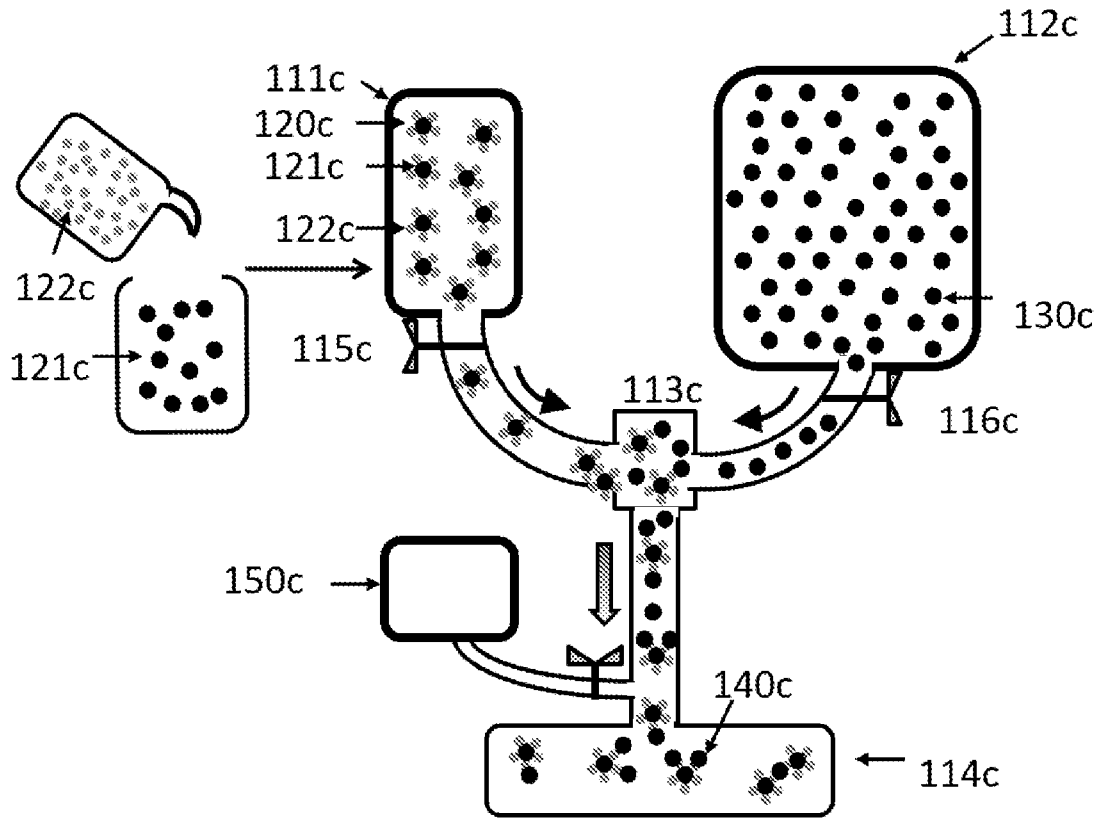


Fig. 2a

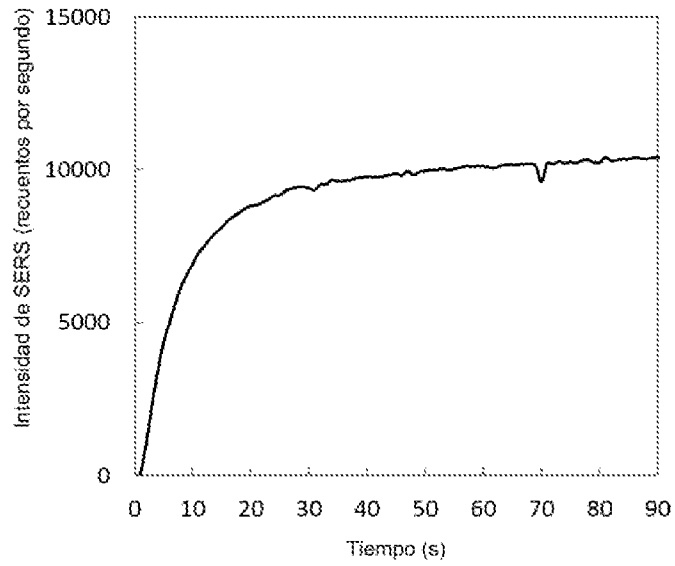


Fig. 2b

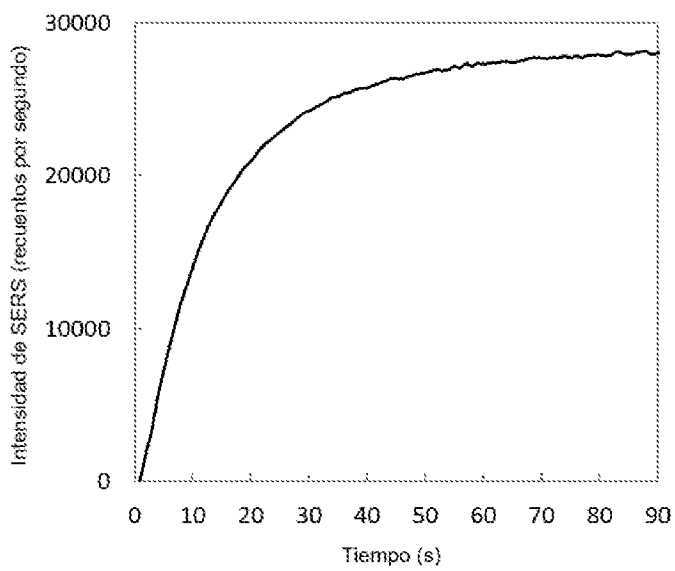


Fig. 2c

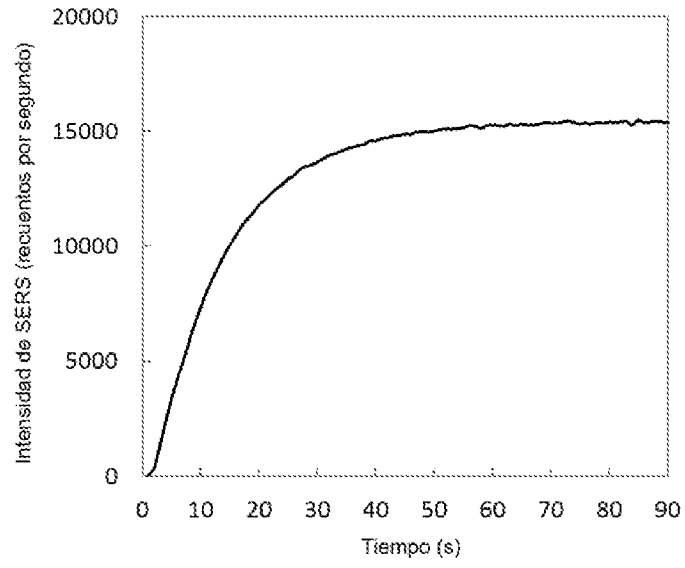


Fig. 3a

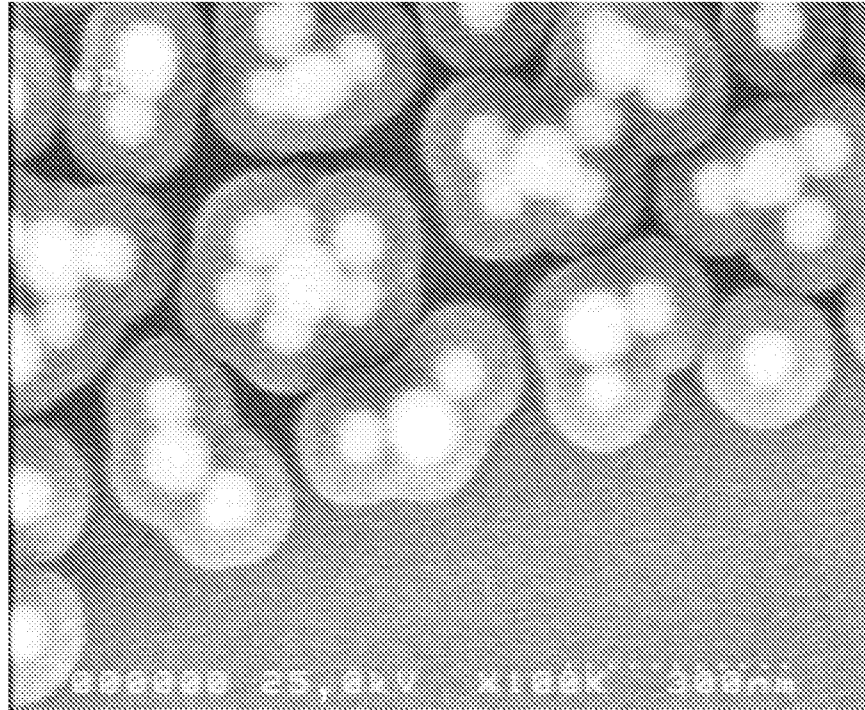


Fig.3b

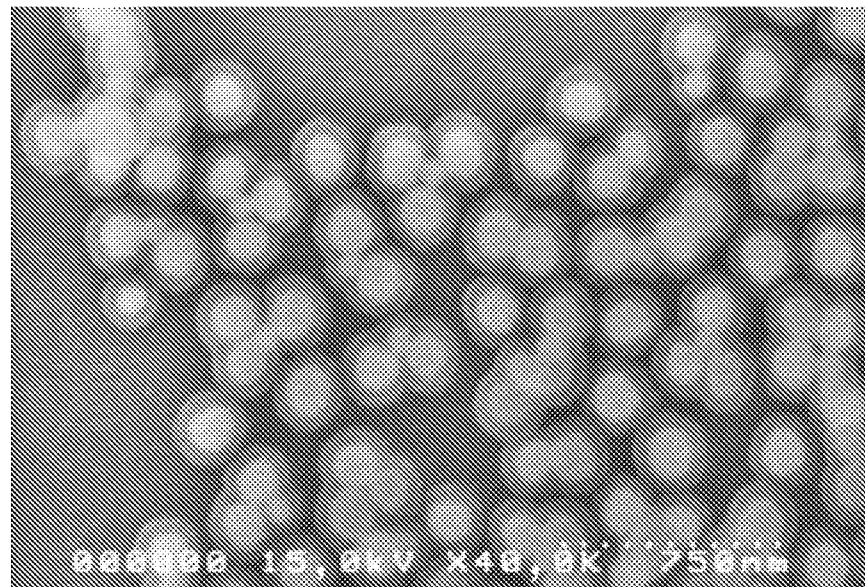


Fig. 4

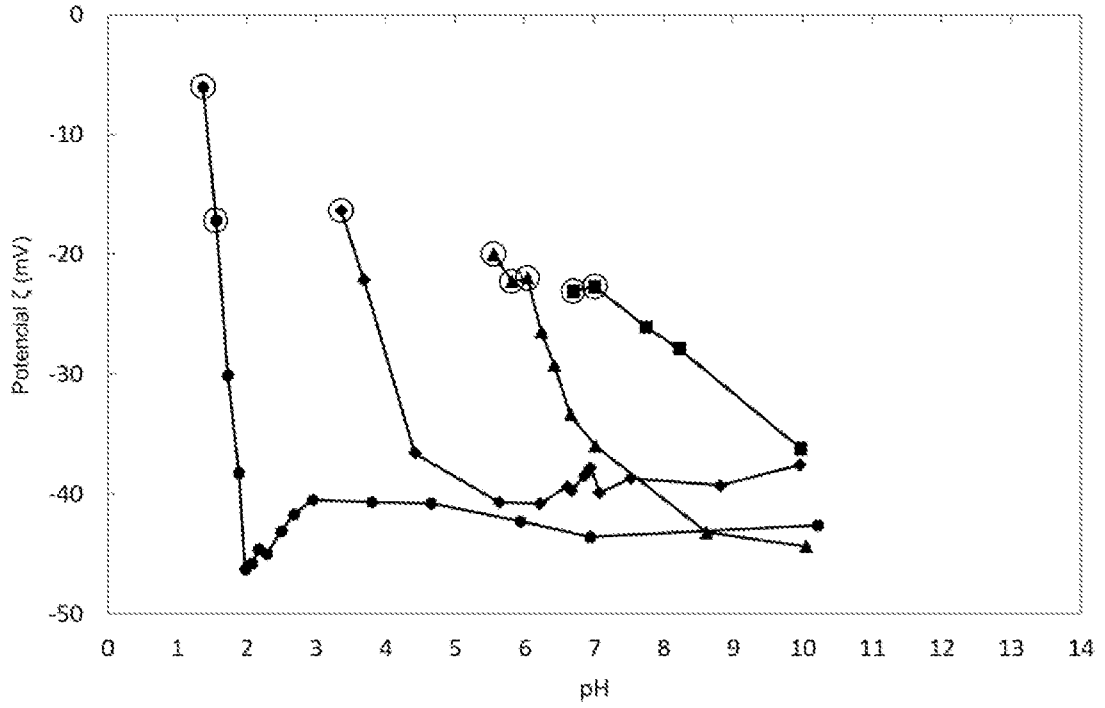


Fig. 5

