



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

**Máster Universitario en Investigación Química y
Química Industrial**

Javier Cisneros Sureda

Memoria del Trabajo Fin de Máster

**Preparación de conjugados de
sideróforos con nanopartículas
magnéticas y su posible aplicación en
la detección de patógenos**

**Directores: Socorro Castro García
Carlos Jiménez González**



CICA | CENTRO DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS AVANZADAS

Grupo de investigación Quimolmat

Julio de 2016

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	5
1. NANOPARTICULAS MAGNÉTICAS.....	6
2. SIDERÓFOROS.....	11
3. DETECCIÓN BACTERIANA	16
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	23
PARTE EXPERIMENTAL	27
1. METODOLOGÍA GENERAL.....	28
2. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA (Fe ₃ O ₄)	29
3. PREPARACIÓN DEL CONJUGADO MNP CON SÍLICE MESOPOROSA Y FERROXAMINA	29
4. PREPARACIÓN DEL CONJUGADO MNP Y FRAGMENTO CON GRUPO CATECOL.....	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
1. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MNP	36
2. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL CONJUGADO MNP CON SÍLICE MESOPOROSA Y FERROXAMINA	37
3. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL CONJUGADO MNP Y FRAGMENTO CON GRUPO CATECOL.....	45
CONCLUSIONES	53
BIBLIOGRAFÍA.....	57
ANEXOS	60

RESUMEN

La adquisición de hierro es un proceso fundamental para la viabilidad de la mayoría de organismos vivos, ya que está involucrado en procesos biológicos fundamentales como transporte de oxígeno, transferencia de electrones y síntesis de ADN. Sin embargo, el Fe(III) es un elemento biológicamente limitante debido a su baja solubilidad a pH neutro en condiciones aeróbicas. Para superar esta dificultad, las bacterias producen sideróforos, agentes quelatantes de bajo peso molecular, que presentan gran afinidad y selectividad por el Fe(III). Los sideróforos son excretados al medio para formar complejos con el Fe(III), que son transportados al interior de la célula a través de receptores de membrana específicos.

La interacción entre el complejo sideróforo-hierro es una de las opciones más prometedoras para desarrollar nuevos métodos de detección de bacterias. Siguiendo esa línea, planeamos acoplar sideróforos a nanopartículas magnéticas (MNP) a través de un espaciador, con el objetivo de conseguir un método que ofrezca tiempos de extracción más rápidos y mejor sensibilidad.

El presente trabajo está dividido en dos partes, la preparación de nanopartículas recubiertas con sílice mesoporosa y conjugadas con el sideróforo ferrioxamina, y la síntesis de un fragmento que contenga un grupo catecol, un agente quelatante común a un gran número de sideróforos.

El conjugado MNP(Meso)-ferrioxamina se caracterizó por técnicas de XRPD, TEM, TGA, FTIR-ATR y medidas de magnetismo. Los ensayos bacterianos realizados muestran que este conjugado es menos específico que el conjugado con cubierta de sílice normal para la extracción de *Yersinia enterocolitica*.

Se realizaron varias etapas en la ruta sintética diseñada para la obtención de un fragmento que contenga un grupo catecol, pero será necesario realizar una etapa adicional a las previstas inicialmente para poder completar esa ruta.

A adquisición de ferro é un proceso fundamental para a viabilidade da maioría de organismos vivos, xa que está involucrado en procesos biolóxicos fundamentais como transporte de osíxeno, transferencia de electróns e síntese de ADN. Con todo, o Fe(III) é un elemento biolóxicamente limitante debido á súa baixa solubilidade a pH neutro en condicións aerobias. Para superar esta dificultade, as bacterias producen sideróforos, axentes quelatantes de baixo peso molecular, que presentan gran afinidade e selectividade polo Fe(III). Os sideróforos son excretados ao medio para formar complexos co Fe(III), que son transportados ao interior da célula a través de receptores de membrana específicos.

A interacción entre o complexo sideróforo-ferro é unha das opcións máis prometedoras para desenvolver novos métodos de detección de bacterias. Seguindo esa liña, planeamos ensamblar sideróforos a nanopartículas magnéticas (MNP) a través dun espazador, co obxectivo de conseguir un método que ofrezca tempos de extracción máis rápidos e mellor sensibilidade.

O presente traballo está dividido en dous partes, a preparación de nanopartículas recubertas con sílice mesoporosa e conxugadas co sideróforo ferrioxamina, e a síntese dun fragmento que conteña un grupo catecol, un axente quelatante común a un gran número de sideróforos.

O conxugado MNP(Meso)-ferrioxamina caracterizouse por técnicas de XRPD, TEM, TGA, FTIR-ATR e medidas de magnetismo. Os ensaios bacterianos realizados mostran que este conxugado é menos específico que o conxugado con cuberta de sílice normal para a extracción de *Yersinia enterocolitica*.

Realizáronse varias etapas na ruta sintética deseñada para a obtención dun fragmento que conteña un grupo catecol, pero será necesario realizar unha etapa adicional ás previstas inicialmente para poder completar esa ruta.

Iron acquisition process is fundamental for the viability of most organisms, because it is involved in essential biological phenomena like oxygen transport, electron transfer and DNA synthesis. However, Fe(III) is a biologically limiting element due to its low solubility at neutral pH in aerobic environments. To overcome this difficulty, most bacteria produce siderophores, low molecular weight iron chelating agents with extraordinarily high affinity and selectivity for Fe(III). Siderophores are excreted to the environment to form Fe-complexes, which are internalized through specific membrane receptors.

Interaction between Fe-siderophore complexes and membrane receptors is one of the most promising choices to develop new pathogen detection methods. In this way, we planned to couple siderophores to magnetic nanoparticles (MNP) through a linker, with the aim to achieve a method which offers faster extraction times and better sensitivity.

The present work is divided in two parts, the preparation of mesoporous silica coated nanoparticles conjugated with the siderophore ferrioxamine, and the synthesis of a fragment with a catechol, a chelating common unit in various types of siderophores.

The ferrioxamine- MNP(Meso) conjugate was characterized by XRPD techniques, TEM, TGA, FTIR-ATR and magnetic measurements. Bacterial tests carried out show that this conjugate is less specific than the normal silica cover conjugated in the extraction of *Yersinia enterocolitica*.

Several steps were performed in the synthetic pathway designed to obtain a fragment containing a catechol group, but it will require an additional step in order to complete this route.

INTRODUCCIÓN

1. NANOPARTICULAS MAGNÉTICAS

1.1 Relevancia de las nanopartículas

La nanotecnología abarca los materiales, aparatos y sistemas cuya función y estructura son relevantes a pequeñas escalas de tamaño, en el rango de 1-1000 nm. Las propiedades que presentan los materiales de tamaño nanométrico varían enormemente respecto al comportamiento de esos mismos materiales a escala masiva, también denominada “bulk”. Es conocido que los electrones de la superficie de los materiales tienen un comportamiento diferente al de los que se encuentran en su interior, y a medida que un objeto disminuye más y más su tamaño, la proporción de átomos que conforman su superficie va aumentando. Esto provoca una mayor relevancia de las propiedades y el comportamiento de esos átomos superficiales respecto a los situados en el interior, y puede ocasionar modificaciones en sus propiedades eléctricas, ópticas, mecánicas y magnéticas.

Las nanopartículas magnéticas (MNP) han cobrado gran importancia en los últimos años debido a sus múltiples aplicaciones, tales como catálisis, almacenamiento de datos, agentes de contraste en imagen de resonancia magnética, biosensores y biomedicina. Para el desarrollo de estas aplicaciones, es fundamental controlar el tamaño, morfología, y estado de agregación de las nanopartículas.

1.2 Propiedades magnéticas

En un sólido, los átomos que lo componen tienen una localización determinada, cuya proximidad permite la interacción de éstos de forma cooperativa, produciendo efectos que no se llegan a encontrar en fluidos. Uno de estos efectos es el magnetismo cooperativo, fenómeno presente en materiales que contengan átomos o moléculas con electrones desapareados, y cuyos momentos magnéticos están alineados. Dependiendo de la alineación que presenten estos materiales, se pueden clasificar en ferromagnéticos, antiferromagnéticos y ferrimagnéticos.

A escala macroscópica, estos materiales están divididos en dominios magnéticos, regiones que engloban momentos magnéticos con una misma orientación y que están separadas unas de otras por paredes de dominio. En ausencia de campo magnético, los diferentes dominios están alineados aleatoriamente, tendiendo a anular entre sí la

magnetización neta del material. Pero al aplicar un campo magnético, los momentos magnéticos rotan gradualmente, haciendo que las paredes de dominio se muevan y el material se magnetice. Se considera que la capacidad de un material para magnetizarse o desmagnetizarse está relacionada con la movilidad de las paredes de dominio, y ésta a su vez, con el tamaño de partícula.

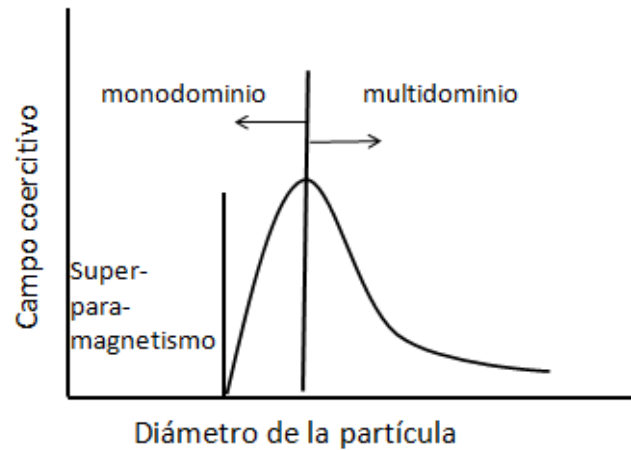


Figura 1 Diagrama de campo magnético coercitivo frente a diámetro de partícula¹

A medida que disminuye el tamaño de las partículas, las paredes de dominio van acercándose, y por tanto, mostrando mayor resistencia a magnetizarse, necesitando un mayor campo magnético para orientar todos los momentos magnéticos y alcanzar la magnetización máxima (o magnetización de saturación) (figura 1). Su comportamiento cambia al alcanzar un tamaño crítico a partir del cual sólo presenta un dominio magnético (monodominio). En esta situación, al existir un menor impedimento para alinear en una misma dirección los momentos magnéticos que lo componen, se va incrementando la respuesta magnética frente a un campo magnético externo al reducir las dimensiones de partícula (figura 2).

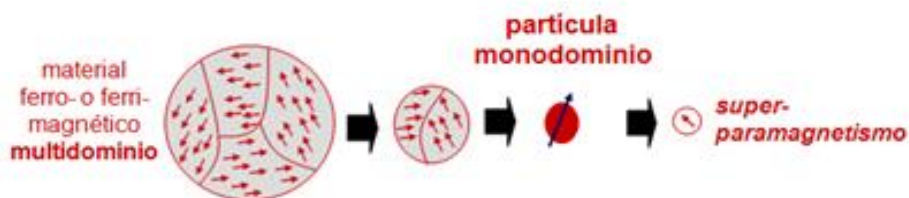


Figura 2 Evolución desde material multidominio a partículas monodominio

Una partícula monodominio se comporta como si todos los momentos magnéticos estuvieran rígidamente alineados como un único espín gigante. El tamaño de monodominio varía según el tipo de material, pero suele encontrarse en el orden de magnitud de los nanómetros. Los materiales multidominio ferro y ferrimagnéticos, al ser sometidos a la acción de un campo magnético, alcanzan un punto llamado magnetización de saturación (M_S), debido a la alineación máxima de los momentos magnéticos con el campo. Al retirar el campo aplicado, conservan parcialmente esa magnetización, fenómeno conocido como magnetización remanente (M_R). Los paramagnéticos no presentan M_R , pero su respuesta magnética es mucho más baja.

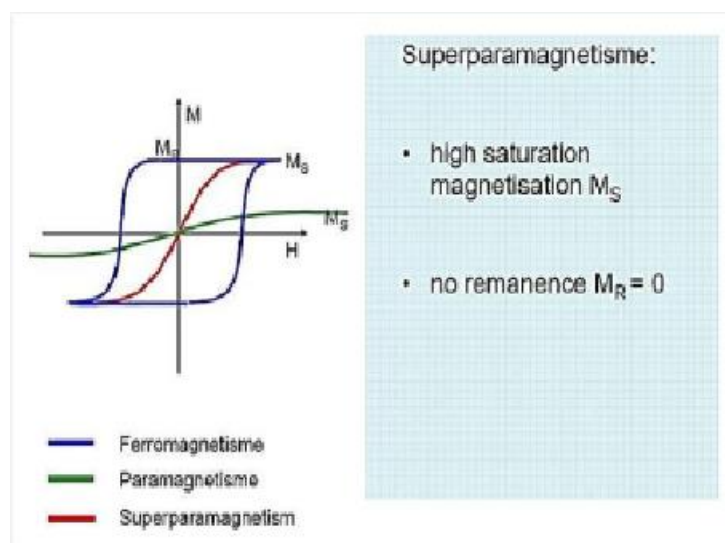


Figura 3 Ciclos de histéresis de materiales ferromagnéticos, paramagnéticos, y superparamagnéticos

Los materiales monodominio presentan la propiedad del superparamagnetismo, que combina las propiedades de los ferromagnéticos y los paramagnéticos. Presentan una alta respuesta frente a un campo magnético, pero no conservan M_R . Esta diferencia de características, que se pone de relieve en sus ciclos de histéresis (figura 3), le otorga a las partículas superparamagnéticas unas propiedades ideales para multitud de aplicaciones, como por ejemplo las biomédicas², ya que tienen una respuesta rápida a la aplicación de un imán, pero en ausencia de éste no tienden a aglomerarse por atracción magnética entre ellas.

Otro de los puntos clave en la síntesis de MNP es la cristalinidad de las mismas. En la superficie de las partículas de tamaño nanométrico existe un mayor desorden de momentos magnéticos (figura 4), rompiendo la simetría del cristal en estas regiones.

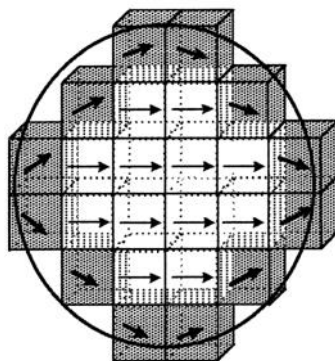


Figura 4 Representación del efecto de superficie en las MNP³

Debido a la elevada relación superficie/volumen en las MNP, el efecto de la superficie tiene una gran repercusión sobre la magnetización. Al mejorar la cristalinidad de las partículas se disminuye el grado de desorden, mejorando la magnetización. De ahí la gran importancia de sintetizar partículas muy pequeñas, pero de una elevada cristalinidad.

1.3 MNP de óxidos de hierro

Actualmente, unas de las MNP más estudiadas para diferentes aplicaciones tales como biomedicina, catálisis o medio ambiente, son las correspondientes a óxidos de hierro tipo magnetita (Fe_3O_4), y maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). De hecho, ya han llegado al mercado agentes de contraste para resonancia magnética (MRI) como el Endorem®⁴ basados en este tipo de material. A pesar de exhibir una menor M_S , se prefieren las partículas de los óxidos de hierro frente a otras nanopartículas (níquel, cobalto o hierro), debido a su bajo coste, relativa estabilidad frente a la oxidación, y menor toxicidad. Presentan superparamagnetismo cuando su tamaño de partícula es inferior a 15 nm^5 , aunque existe controversia en el valor exacto de ese límite.

La magnetita y la maghemita tienen la misma estructura: son ferritas de hierro, espinelas inversas, de grupo espacial $Fd3m$, presentando una estructura cristalina cúbica compacta centrada en las caras. La maghemita se puede considerar como una magnetita completamente oxidada, presentando vacantes catiónicas, y siendo sus posiciones únicamente ocupadas por Fe(III). Se diferencian a simple vista por su coloración, siendo la magnetita de color negro y la maghemita de un tono marrón-rojizo. Sus propiedades magnéticas son bastante similares, aunque la magnetita presenta valores algo más

elevados de magnetización. Debido a su gran similitud estructural, al sintetizar magnetita es habitual que se contamine parcialmente con maghemita.

Para la síntesis de MNP de magnetita, uno de los métodos más utilizados es la síntesis solvotermal, como el propuesto por Pinna⁶. En este método, la reacción se produce en un recipiente cerrado que genera una sobrepresión, y permite al disolvente alcanzar una temperatura mayor que su punto de ebullición a presión atmosférica. Como reactivos se utilizan una sal de Fe(III) (acetilacetonato de Fe(III)) y un disolvente (alcohol bencílico) que además ejerce como agente reductor para conseguir la reducción parcial de Fe(III) a Fe(II). Este método ofrece varias ventajas, como el reducido coste de los reactivos, robustez, reproducibilidad, previene la formación de aglomerados, y ofrece la posibilidad de controlar el tamaño, forma y cristalinidad de las partículas a través de la temperatura y tiempo de reacción.

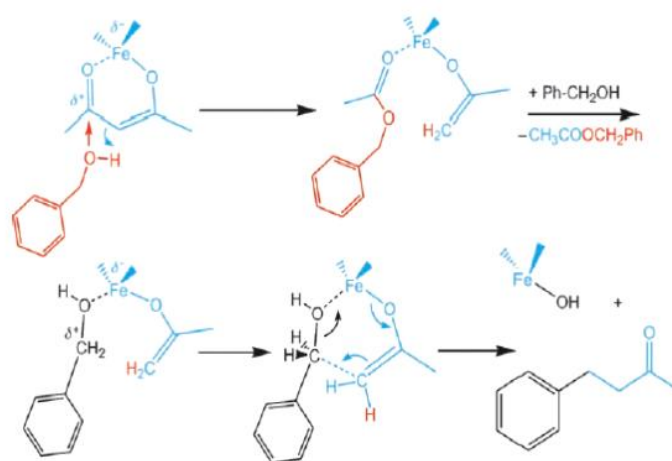


Figura 5 Mecanismo propuesto para la obtención de Fe_3O_4 por síntesis solvotermal⁷

Aunque el mecanismo para la obtención de magnetita aún no está demostrado, se han postulado diversas hipótesis, como el mecanismo propuesto por Niederberg⁷ (figura 5). El alcohol bencílico reduce un tercio del hierro(III) a hierro(II), hecho que queda demostrado debido a la obtención de pequeñas cantidades de 4-fenil-3-buten-2-ona, producto de oxidación de 4-fenil-2-butanona, subproducto de la reacción principal.

Para la utilización de las MNP de óxidos de hierro en aplicaciones biológicas, es necesario la funcionalización de la superficie de las mismas⁸. Existen multitud de estrategias diferentes según el objetivo que se persiga, pero entre las más habituales podemos citar los recubrimientos de sílice⁹, PEG¹⁰ o quitosano¹¹, que otorgan a las nanopartículas las propiedades adecuadas para su uso en medios biológicos.

2. SIDERÓFOROS

2.1 El papel del hierro

El hierro es un micronutriente esencial para cualquier organismo vivo, participando en reacciones enzimáticas fundamentales como el transporte de oxígeno, la química redox celular, o síntesis y reparación de ADN. Sin embargo, a pesar de su abundancia en la tierra, la disponibilidad del hierro es limitada. Desde que la Tierra adquirió una atmósfera oxidante, su forma oxidada Fe(III) es predominante, y su solubilidad en agua a pH neutro es muy baja ($K_{ps}=10^{-39}$), precipitando en forma de $Fe(OH)_3$, lo que dificulta su obtención por parte de los microorganismos. En el caso de las bacterias, cuando infectan a un huésped se enfrentan a un entorno pobre en hierro, ya que normalmente el nivel de hierro libre en fluidos biológicos es del orden de 10^{-18} M, y concretamente en el suero humano, la transferrina mantiene una concentración libre de iones férricos en torno a 10^{-24} M¹². Por tanto, la capacidad de obtención del hierro a partir del huésped es uno de los mecanismos de virulencia más importante de las bacterias patógenas¹³. Para superar esta dificultad, las bacterias han desarrollado diferentes mecanismos, como su obtención a partir de glicoproteínas o hemoproteínas, la adquisición en forma de Fe(II), o la producción de unos agentes quelatantes denominados sideróforos¹⁴.

2.2 Los sideróforos

Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular ($PM < 2000$ Da), biosintetizados y secretados por multitud de microorganismos, que presentan una gran selectividad a la hora de quelatar iones férricos. Una vez excretadas al medio extracelular, quelatan fuertemente al Fe(III), facilitando su solubilidad y posterior introducción en la célula.

Los mecanismos para la introducción del complejo sideróforo-Fe(III) varían según el tipo de bacteria. En las Gram negativas, unos receptores situados en la membrana externa reconocen y transportan el complejo dentro del periplasma (figura 6), donde son reconocidos y unidos a sistemas de transporte que los introduce en el citoplasma¹⁵. Ya en el interior del citoplasma, el Fe(III) puede desquelatarse por 2 mecanismos. El más frecuente es a través de un proceso redox mediante una reductasa, ya que el sideróforo presenta una afinidad mucho menor por el Fe(II). El otro mecanismo necesita de enzimas específicos para hidrolizar el complejo sideróforo-Fe(III). Para las Gram

positivas, al carecer de membrana externa y zona periplasmática, el proceso se simplifica e implica únicamente a un sistema de transporte activo.

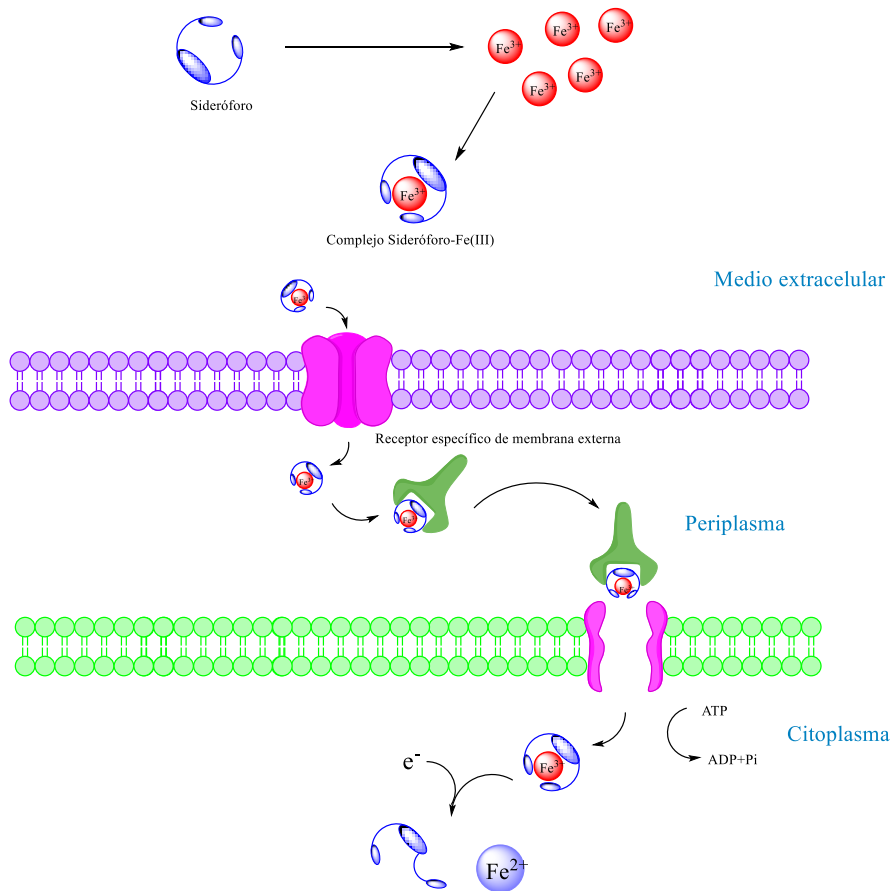


Figura 6 Mecanismo de introducción de Fe(III) en Gram-negativas mediante sideróforos

Aunque las distintas bacterias y hongos sintetizan sus propios sideróforos, la mayoría son capaces de reconocer y utilizar sideróforos ajenos. Además, estudios recientes señalan que los sideróforos tendrían una función adicional, protegiendo a las bacterias contra la toxicidad de los metales pesados¹⁶, ya que también tienen la capacidad de quelatar esos iones metálicos, pero al no ser reconocidos, impiden la entrada por difusión en la célula.

2.3 Tipos de sideróforos

Las propiedades químicas de los cationes de hierro han determinado la estructura de los sideróforos. La geometría más habitual de los complejos de hierro es la octaédrica, y dado que el Fe(III) es un catión pequeño y cargado, se comporta como metal “duro” dentro de la teoría de ácidos y bases de Pearson, por lo que tendrá mayor afinidad con átomos dadores duros como el oxígeno. Teniendo en cuenta estas características, los sideróforos presentan estructuras con ligandos bidentados con átomos de oxígeno dadores, pudiendo incorporar 3 ligandos bidentados en la misma estructura (ferrioxamina, enterobactina, etc.), o coordinándose varias unidades de sideróforo al centro metálico para completar la esfera de coordinación del Fe(III).

Aunque actualmente ya se conozcan unos 500 tipos¹⁷ de sideróforos distintos, la gran mayoría de ellos se pueden clasificar dentro de 3 grandes grupos en función del tipo de ligando bidentado que presenta su estructura: catecolatos, hidroxamatos y α -hidroxicarboxilatos (figura 7), presentando todos ellos una gran afinidad por el hierro¹⁸.

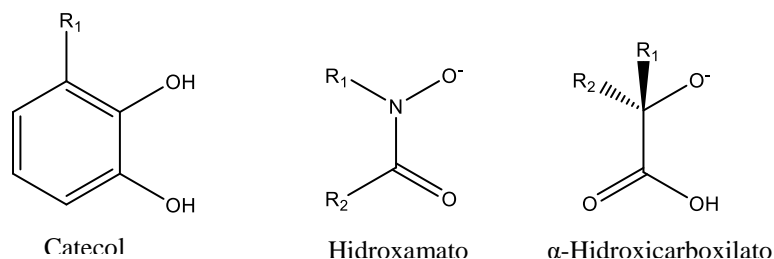


Figura 7 Estructura de los 3 principales ligandos de los sideróforos

Los sideróforos tipo catecolato poseen una elevada afinidad por el Fe(III) debido a la gran capacidad de donar carga de los hidroxilos fenólicos. Un ejemplo de este tipo es la enterobactina (figura 8), un triscatecolato, formado por 3 unidades de 2,3-hidroxibenzoico/serina, producido por enterobacterias como la *Escherichia coli* y especies del género *Salmonella*. La afinidad de los sideróforos tipo hidroxamato como el ferricromo (figura 8), se debe a la deslocalización de la carga entre sus formas resonantes. Por su parte, el ejemplo más habitual de los α -hidroxicarboxilatos es el ácido cítrico (figura 8), usado por una gran variedad de bacterias.

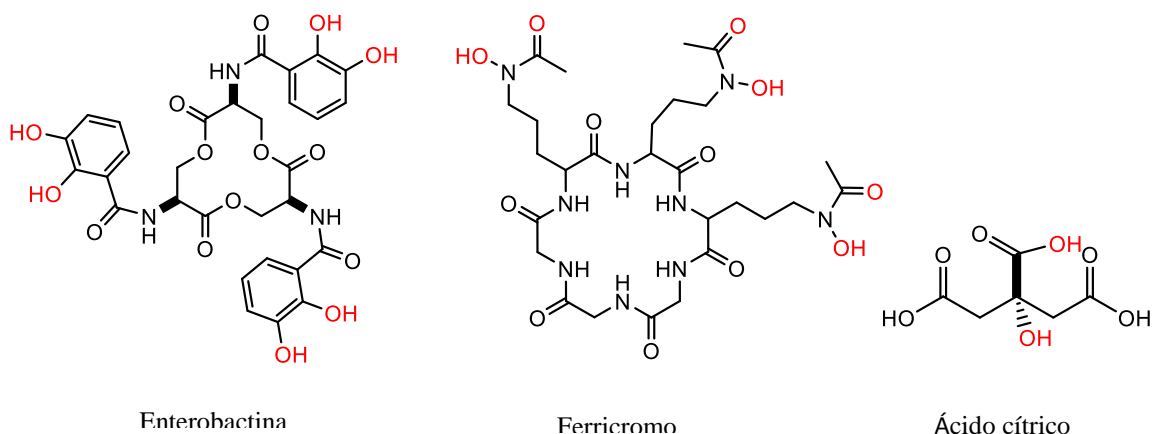


Figura 8 Ejemplos de sideróforos con diferentes ligandos

Además de estos tipos, existe otra categoría de sideróforos que podríamos denominar mixtos, ya que presentan 2 o más tipos diferentes de ligandos en su estructura. Ejemplo de ello es la anguibactina, que presenta un ligando catecol y un hidroxamato.

2.4 Aplicaciones terapéuticas de los sideróforos

La determinación de la estructura de los sideróforos y de los procesos de transporte de hierro en los que están implicados ha permitido desarrollar diversas aplicaciones, siendo la mayoría de ellas de carácter terapéutico. Aprovechando su gran afinidad por el hierro, la deferoxamina B (Desferal®) se utiliza para tratar enfermedades provocadas por exceso de hierro asociadas a transfusiones sucesivas de sangre. La deferoxamina B (figura 9) quelata los cationes Fe(III) libres formando ferrioxamina, que es mucho más soluble en agua y permite su eliminación a través de la orina. Aunque se aplique principalmente en enfermedades que necesitan transfusiones de sangre de forma continuada (talasemia, leucemia, etc.), también se ha utilizado para la eliminación de metales como aluminio o vanadio en casos de contaminación.

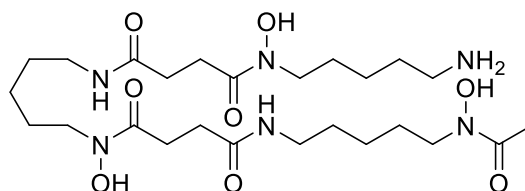


Figura 9 Estructura de la deferoxamina B

Dado el incremento de cepas multirresistentes a los antibióticos en los últimos años, se han multiplicado esfuerzos a la hora de desarrollar nuevos antimicrobianos y vacunas que resulten más efectivos a la hora de tratar las infecciones producidas por estas cepas. Existen 3 principales estrategias para el desarrollo de nuevos antibacterianos basados en los mecanismos de captación de hierro:

- a) **Inhibición de la biosíntesis de sideróforos:** Basado en la utilización de moléculas que inhiban las primeras etapas de la biosíntesis de los sideróforos.
- b) **Déficit de hierro basado en antagonistas:** Empleando análogos sintéticos de los sideróforos que actúan como antagonistas. Estos análogos son reconocidos por los receptores de membrana, y los bloquean irreversiblemente, limitando el crecimiento bacteriano.
- c) **Estrategia “caballo de Troya”:** En los años 60 se descubrieron unos compuestos que incluían antibióticos unidos covalentemente a sideróforos, denominados sideromicinas. Estos conjugados representan un conjunto único de antibióticos naturales, que aprovechan el reconocimiento de los mecanismos de obtención de hierro para aumentar su efectividad hasta 100 veces respecto al antibiótico libre. Tomando como modelos estos antibióticos naturales, en los últimos años se han ido desarrollando estrategias en las que sideróforos naturales o análogos sintéticos se utilizan como agentes que, conjugados a distintos antibióticos, mejoran en gran medida su efectividad contra las bacterias patógenas.

En la estrategia de caballo de Troya, los conjugados deben constar de: un compuesto con actividad siderófora que quelate Fe(III), y sea reconocido por los receptores de membrana, permitiendo la entrada del conjugado en la célula; un fármaco con actividad antibacteriana; y un espaciador que conecte ambos fragmentos, pero manteniéndolos separados para que el fármaco no interfiera en el proceso de quelatación y reconocimiento. Éste último punto es clave, ya que para que el conjugado sea efectivo debe seguir siendo capaz de quelatar Fe(III), ser reconocido por la célula (lo que puede depender de los sustituyentes periféricos), ser transportado de forma activa al interior de la célula, y que libere el agente antibacteriano adecuadamente.

2.5 Otras aplicaciones

Además de las aplicaciones terapéuticas, existen otros 2 principales campos en los que se ha estudiado la aplicación de sideróforos. El primero de ellos es la detección de Fe(III) por fluorescencia. Ya sea utilizando sideróforos naturales con propiedades fluorescentes como la azotobactina¹⁹, o conjugados sintéticos sideróforo-fluoróforo²⁰, se consigue la detección de Fe(III) por fluorescencia aprovechando la propiedad de los metales de transición de desactivar la emisión fluorescente.

La otra aplicación principal es la detección de bacterias patógenas, que se tratará más detenidamente en el siguiente punto. Aprovechando la gran afinidad entre los complejos sideróforo-hierro y los receptores de membrana de las bacterias, se han diseñado distintas estrategias para lograr este objetivo. Un ejemplo de estas estrategias es la utilización de un sideróforo sintético de tipo catecol inmovilizado sobre una lámina de oro²¹ para la detección de *Escherichia coli*.

3. DETECCIÓN BACTERIANA

3.1 Métodos clásicos

Las bacterias constituyen el organismo vivo más abundante del planeta. Son microorganismos procariotas (sin núcleo) y no presentan, en general, orgánulos membranosos internos, pero sí poseen pared celular. Presentan un tamaño variable, mayoritariamente entre 0,5 y 5 μm de longitud, y diversas formas como filamentos, esferas (cocos), barras (bacilos), sacacorchos (vibrios), etc. Si bien un gran número de bacterias son inocuas o beneficiosas, otras se comportan como organismos patógenos, y es necesario identificarlas convenientemente para poder tratar las enfermedades que generan.

Los primeros pasos en este sentido fueron llevados a cabo por el holandés Anton van Leeuwenhoek en 1683, que observó las primeras bacterias usando un microscopio de lente simple (figura 10) diseñado por él mismo²². En los siglos posteriores se fue gestando la idea de que esos microorganismos eran los responsables de multitud de enfermedades infecciosas, hasta que en 1859 Louis Pasteur demostró que los procesos de fermentación eran causados por el crecimiento de microorganismos, y que dicho crecimiento no era debido a la generación espontánea, como se suponía hasta entonces.

La primera técnica de identificación fue desarrollada por Hans Christian Gram en 1884, consistente en la tinción de membranas con distintos tintes, y posterior observación al microscopio (figura 10). Esta metodología permite distinguir dos tipos bacterianos en función de sus reacción diferencial de tinción y que, como se vería mucho más tarde, reflejaba la existencia de dos grupos de bacterias con rasgos estructurales distintivos, considerándose bacterias Gram positivas a aquellas que se tornan de color violeta y Gram negativas a las que se tornan de color rojo, clasificación que sigue vigente a día de hoy.

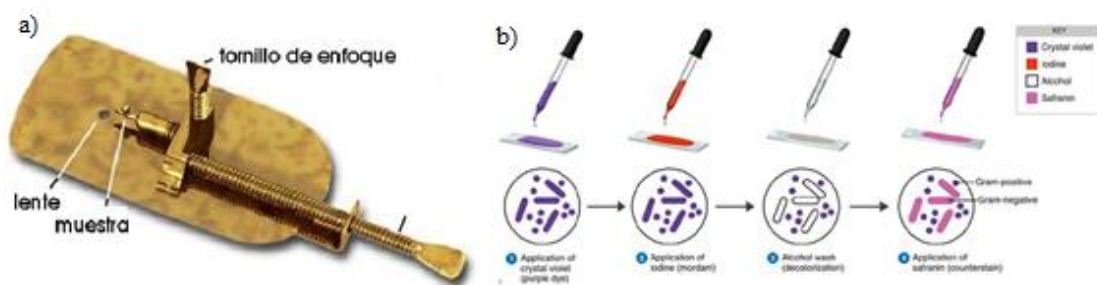


Figura 10 Imagen de a) Microscopio de Leeuwenhoek b) Tinción de Gram

Pero para poder realizar estas pruebas, fue necesario el desarrollo en paralelo de los cultivos. Los primeros cultivos puros fueron obtenidos por el micólogo Brefeld, quien logró aislar esporas de hongos y cultivarlas sobre medios sólidos a base de gelatina. Por su menor tamaño, este método se hacía inviable para las bacterias, hasta que Koch logró un medio adecuado al compactar el típico caldo de cultivo a partir de carne (diseñado por Loeffler) añadiéndole gelatina (1881). El medio sólido así logrado era transparente, lo que permitía visualizar fácilmente los rasgos coloniales, y contenía los nutrientes adecuados para el crecimiento de una amplia gama de bacterias. Sin embargo, la gelatina presentaba los inconvenientes de ser atacada por determinados microorganismos, y de tener un bajo punto de fusión; ambos problemas se solventaron cuando en 1882 el médico alemán Walter Hesse, siguiendo una sugerencia de su mujer Fanny, introdujo el agar-agar (polisacárido extraído de algas rojas) como nuevo agente solidificante. En 1887 Petri, un ayudante de Koch, sustituyó las engorrosas bandejas de vidrio cubiertas con campanas, usadas hasta entonces para los cultivos sólidos, por un sistema manejable de placas de cristal planas, que se conoce como placas de Petri. Éste método sigue siendo a día de hoy la base de multitud de ensayos bacterianos.

La realización de cultivos bacterianos sigue siendo una de las técnicas más utilizadas para la detección de bacterias en industrias como la alimentaria o la clínica, y continúa siendo una herramienta básica en cualquier laboratorio de microbiología. Su uso se encuentra limitado a que las condiciones fisiológicas y metabólicas requeridas por la bacteria en estudio puedan ser reproducidas *in vitro*. Estos estudios conllevan un gasto apreciable en recursos económicos, y sobre todo en tiempo, pues pueden tardar varios días en llegar a un resultado, lo que los hace inapropiados en situaciones que requieren una respuesta rápida. Además, pueden producir resultados erróneos cuando se estudian sistemas complejos con múltiples patógenos bacterianos simultáneamente a diferentes concentraciones²³. Por ello, en los últimos años se han desarrollado varias técnicas que permiten la detección simultánea y de forma rápida de distintos tipos de bacterias.

3.2 Técnicas modernas

Existen diferentes nuevas técnicas basadas en fluorescencia. Dentro de éstas destaca la citometría de flujo (figura 11), técnica biofísica basada en la utilización de luz láser para el recuento y clasificación de las células o bacterias según sus características morfológicas. Se puede describir como una microscopía automatizada, objetiva y rápida (puede analizar miles de células por segundo), en donde se mide las características ópticas de la partícula. Puede diferenciar taxonómicamente a multitud de bacterias basándose únicamente en sus características de dispersión de luz y su fluorescencia²⁴. Es una opción muy utilizada en ámbitos clínicos y medioambientales para una rápida detección y cuantificación de una gran variedad de bacterias. Sin embargo, debido al pequeño tamaño y el bajo contenido de orgánulos celulares de las bacterias, puede presentar problemas de baja sensibilidad, por lo que es necesario añadir algún grupo fluoróforo.

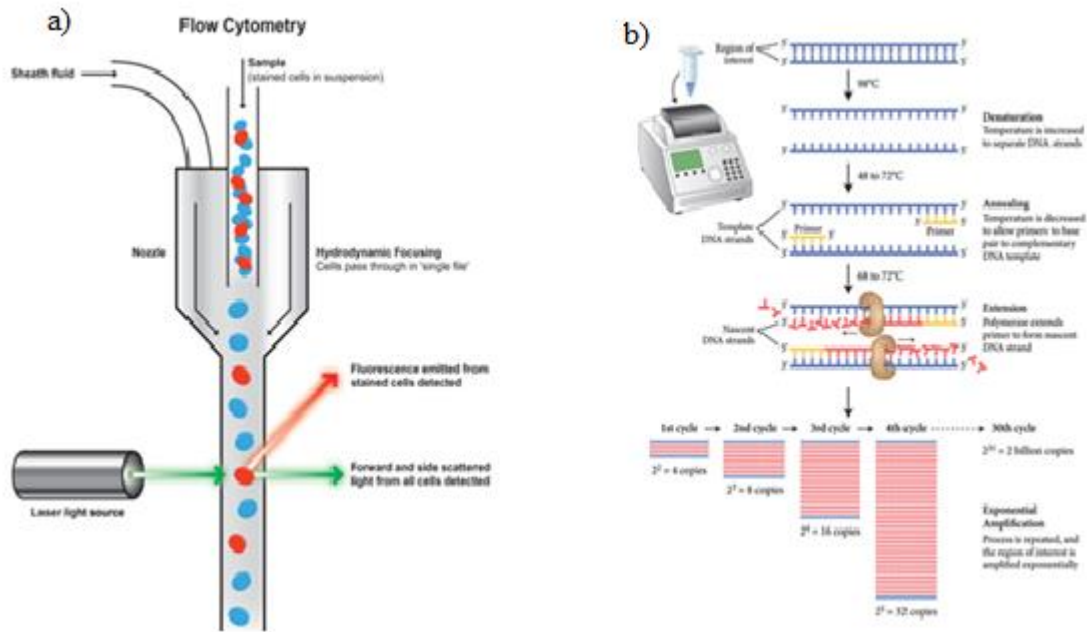


Figura 11 Técnicas de a) Citometría de flujo b) PCR

La mayoría de técnicas libres de cultivos para la detección e identificación de bacterias se basan en la secuencia de nucleótidos 16S rRNA. Todo el genoma bacteriano de interés se extrae, y la región correspondiente al gen 16S rRNA se amplifica por la polymerase chain reaction (PCR) (figura 11). La mezcla resultante se somete a un gradiente de desnaturalización sobre un gel de poliacrilamida, utilizando urea y formamida o aumentando la temperatura, para separar los fragmentos y generar una huella dactilar genética de la comunidad bacteriana en estudio^{25,26}. Así por comparación de las secuencias podemos establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariontes.

Se están empezando a utilizar métodos que combinan esta técnica con otras, como la espectrometría de masas (MS). Las plataformas PCR/MS permiten la detección universal de uno o varios patógenos presentes en una amplia variedad de muestras. Tras la extracción y una PCR con parejas de cebadores de amplio espectro, se obtienen uno o varios productos que corresponden a regiones genómicas de identificación de los distintos dominios microbianos. Estos productos se desalan y se introducen en un espectrómetro de masas, y los espectros obtenidos se vuelcan en una base de datos que permite la identificación por comparación²⁷. Este conjunto de metodologías basadas en la técnica de la PCR permite dar resultados fiables en cuestión de horas, por lo que es la opción más usada a día de hoy en multitud de ámbitos (investigación, medicina,

medioambiente...). Sin embargo, es un sistema de detección indirecto, y no es aplicable en todos los casos, o al igual que otras técnicas, presenta problemas para detectar especies minoritarias en mezclas complejas.

Aunque la espectrometría de masas pueda combinarse con otras técnicas, la MALDI-TOF²⁸ (figura 12) permite, a través de la identificación de un perfil proteico específico de cada bacteria, identificar de manera rápida, directa y fiable una gran variedad de bacterias, e incluso tipificar conjuntos de cepas pertenecientes a la misma especie bacteriana para realizar estudios epidemiológicos. Esta técnica es la que más fuertemente está desplazando a los cultivos en los ámbitos clínicos.

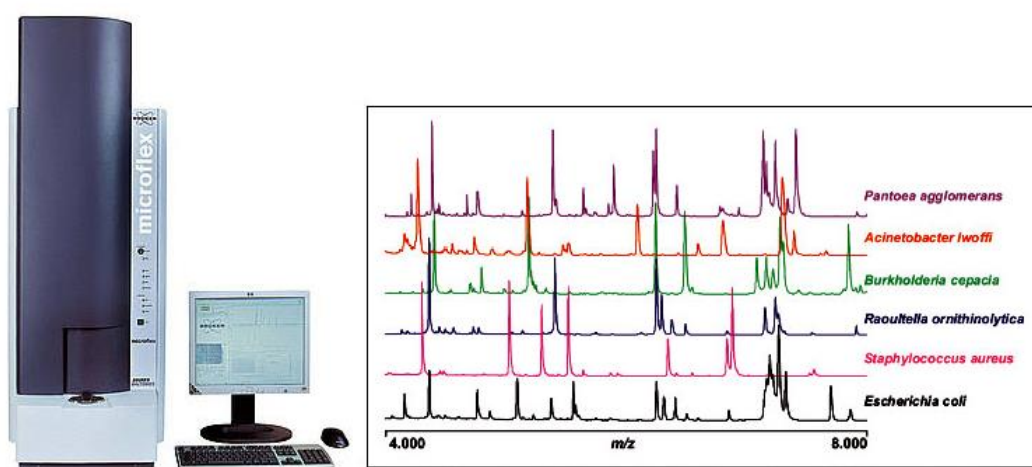


Figura 12 Imagen de equipo MALDI-TOF y perfiles de proteínas que genera para diferentes bacterias

3.3 Estrategias en desarrollo

Con la aparición y el desarrollo de las nanopartículas de diferentes materiales desde principios de siglo XXI, se ha intentado aplicar esta tecnología en la creación de nuevos sistemas para la detección y/o extracción de bacterias. Estos materiales poseen una elevada relación superficie/volumen, lo que ofrece más área de contacto para generar interacciones, y el tamaño de estos materiales es de 2 órdenes de magnitud inferiores que la mayoría de bacterias, lo que permite que varias unidades interaccionen con cada unidad bacteriana. Además, presentan cinéticas más rápidas en suspensión que sus análogos de escala microscópica.

Uno de los primeros biosensores de escala nanométrica en ser publicado estaba basado en funcionalizar la superficie interior de una estructura con distintas capas de

sílica porosa con moléculas que presentaran afinidad por la pared celular de las bacterias. Para poder detectar selectivamente las Gram negativa, se diseñó y sintetizó un receptor orgánico de tetratriptófano ter-ciclopentano (TWTCP) que se une específicamente al difosforil lípido A de la cubierta de lipopolisacáridos que poseen este tipo de bacterias²⁹. El nanosensor se expone a un lisado bacteriano, y en el caso de ser gram negativas, se detecta por un desplazamiento de las bandas en el espectro de fotoluminiscencia que se genera al hacer pasar luz a través de las capas del nanosensor. En los últimos años se han desarrollado nuevos soportes enfocados para la posterior detección de las bacterias por fluorescencia. Ejemplos de ello, nanopartículas de carbono funcionalizadas con aptámeros para la detección por Transferencia de Energía de Resonancia de Förster (FRET) de *V. parahaemolyticus*, *S. aureus*, y *S. typhimurium*³⁰, o nanopartículas de silicio funcionalizadas con conjugados de aptámero-estreptavidina para la detección por microscopía de fluorescencia de *S. typhimurium*³¹.

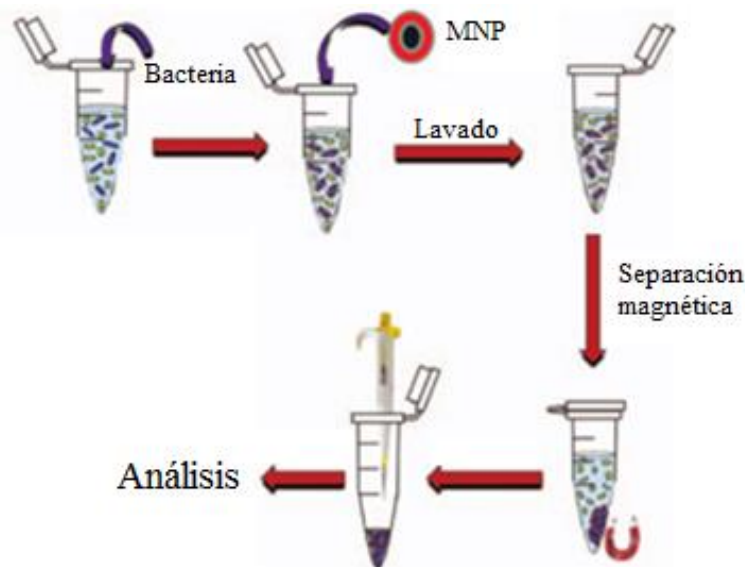


Figura 13 Utilización de MNP para detección bacteriana

La utilización de MNP para la detección de bacterias presenta la ventaja adicional de permitir una sencilla separación posterior con ayuda de un imán (figura 13), lo que agiliza enormemente el proceso. Por ello, se han venido desarrollando distintos tipos de MNP con diferentes funcionalizaciones, para lograr un método de identificación rápido, eficiente, y sencillo de usar. Uno de los primeros ejemplos lo encontramos en la utilización de MNP recubiertas con sílice y funcionalizadas con D-manosa, unidas a la superficie de las MNP a través de un puente tiazol o amida³² (figura 14).

Con estas MNP se logró la captación de *Escherichia coli* de forma más eficiente que otras MNP funcionalizadas con anticuerpos o lectinas, posiblemente por la dificultad de controlar la orientación de estas biomacromoléculas sobre la superficie de las MNP, lo que afecta a su capacidad de interacción. Pero éste método carece de la selectividad que sí ofrece la funcionalización con anticuerpos policlonales anti-*E. coli*³³ (figura 14), que se pueden unir a las MNP recubiertas con sílice a través de un puente que contenga un grupo amino, como el (3-Aminopropil)trietoxisilano (APTES). Otra forma de conseguir grupos amino en la superficie de las MNP es realizar un recubrimiento con quitosano¹¹, que además de proporcionar biocompatibilidad, permite la extracción de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

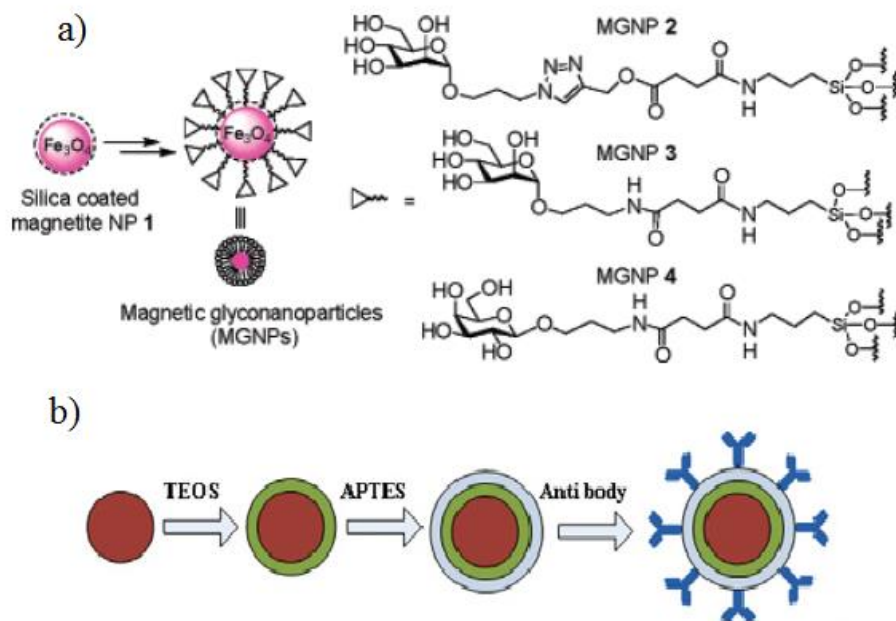


Figura 14 Ilustración de MNP funcionalizadas con a) Monosacáridos³² b) Anticuerpos³³

En el extremo opuesto, encontramos las MNP recubiertas con un surfactante como el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB). Estas MNP son capaces de extraer tanto las Gram positivas como las Gram negativas, mostrando potencial para la desinfección de aguas³⁴.

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Aprovechando la gran afinidad y el reconocimiento específico entre los sideróforos y los receptores de membrana de las bacterias, y las ventajas ya citadas que ofrece la utilización de MNP, el grupo de investigación Quimolmat se planteó la síntesis de conjugados de sideróforos con MNP con el objetivo de desarrollar una nueva metodología en el campo de la detección bacteriana. La prueba de concepto que se planteó consistía en MNP de Fe_3O_4 , recubiertas de SiO_2 y funcionalizadas con grupos amino, sobre las que se acoplaría el sideróforo ferrioxamina (figura 15).

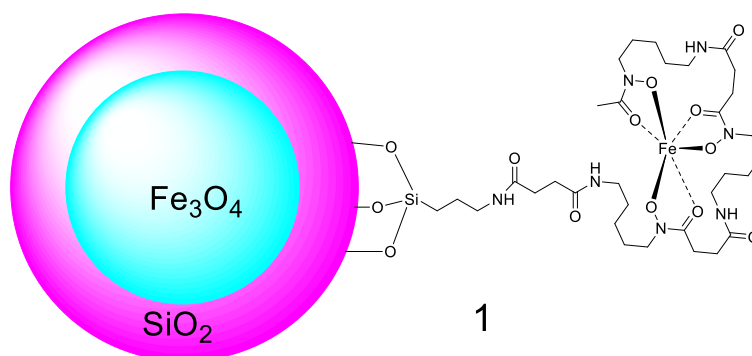


Figura 15 Conjugado de MNP con el sideróforo ferrioxamina (**1**)

La elección de magnetita como material para el núcleo de la nanopartícula se debió a sus buenas propiedades magnéticas, su facilidad y control de morfología en el proceso de síntesis, su bajo coste, y su menor toxicidad que otros materiales magnéticos. La cubierta de sílice reduce su tendencia a aglomerarse por atracción magnética, aporta una reducción en su toxicidad, y además permite su funcionalización con grupos amino en su superficie a través de un compuesto de tipo aminosilano. La ferrioxamina es fácil de obtener a partir del compuesto comercial deferoxamina B, y el receptor de membrana específico de esta sideróforo es común a distintos tipos de bacterias. Ambos fragmentos se acoplaron a través de un enlace amida.

El conjugado **1** ha mostrado resultados prometedores en los ensayos bacterianos con *Yersinia enterocolitica* que se realizaron (figura 16), mostrando capacidad de extraer de forma mucho más eficiente las bacterias que tienen el receptor de membrana específico del sideróforo ferrioxamina, frente a las que no disponen del receptor.

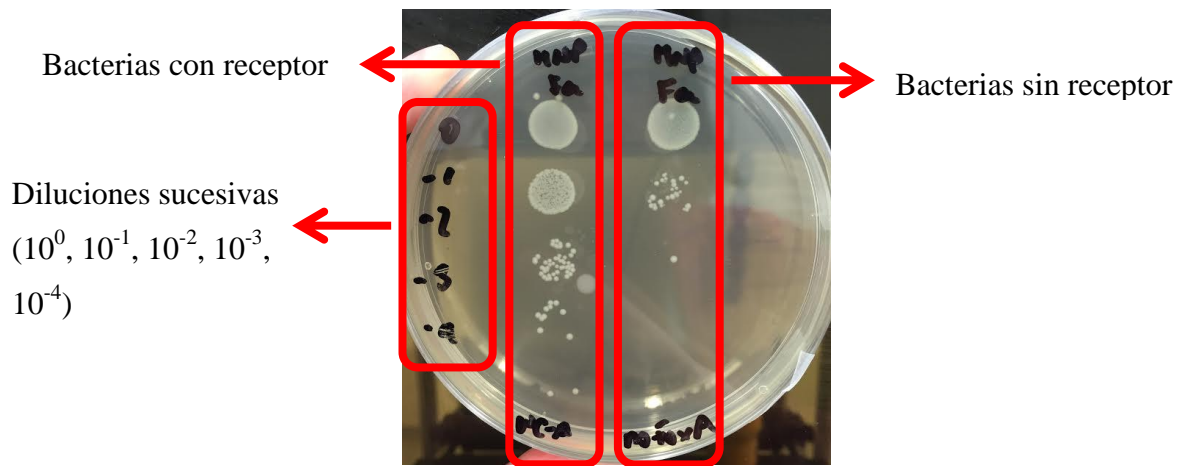


Figura 16 Ensayo bacteriano del conjugado MNP-ferrioxamina (1) frente a *Yersinia enterocolitica*

La metodología del ensayo es muy similar a la que se muestra en la figura 13. Sobre un cultivo de bacterias (para este caso se utilizó *Yersinia enterocolitica*) en el *buffer* adecuado, se añaden las nanopartículas, se mezclan por agitación en un vórtex, se separan magnéticamente, se descarta el sobrenadante, se disuelve de nuevo en el tampón, y una fracción se deposita en un punto específico de una placa Petri. Este proceso se repite sobre diluciones sucesivas del cultivo bacteriano, hasta conformar sobre la placa una columna con las fracciones de las distintas diluciones. Se deja incubar la placa, y posteriormente se observan las colonias aparecidas. Tras optimizar las condiciones del ensayo, se logró el resultado de la figura 16, donde se observa a simple vista que se consigue extraer un porcentaje mucho mayor de las bacterias que sí presentaban el receptor específico de ferrioxamina, frente al mutante que no poseía el receptor. Hay que tener en cuenta que las bacterias tienen una gran tendencia a adherirse a todo tipo de superficie, y las Gram negativas de forma especial a aquellas que estén cargadas positivamente, o contengan grupos OH terminales. Por eso, las que no tienen receptor también muestran cierta tendencia a adherirse a las nanopartículas, pero significativamente menor que las que sí lo poseen, como se observa al realizar las sucesivas diluciones.

En vista de los resultados positivos obtenidos para el conjugado MNP-ferrioxamina (1), se plantearon distintas líneas sobre las que continuar la investigación. La primera de ellas, variar la estructura de las MNP para conseguir mejoras en distintas propiedades (grado de dispersión, toxicidad, respuesta magnética, interacción con las bacterias). Teniendo en cuenta el uso extendido de la sílice mesoporosa en aplicaciones nanomédicas, y el aumento de la superficie de contacto que ofrece este material, a la vez que mantiene una baja densidad para evitar la precipitación de las MNP cuando se encuentran en suspensión, se seleccionó como la primera modificación a estudiar.

La segunda, variar el sideróforo utilizado. Teniendo en cuenta la gran capacidad de quelatación de los grupos catecol como se explicó en el apartado de introducción, se decidió sintetizar un fragmento que contuviera un catecol, para posteriormente conjugarlo con las MNP. Así, además de estudiar la efectividad de estos conjugados para la extracción de bacterias que produzcan este tipo de sideróforos, permitiría iniciar paralelamente un estudio sobre cómo afectan los sustituyentes a la interacción entre sideróforo y receptor de membrana.

Por tanto, los objetivos concretos que se plantearon para este trabajo fueron:

- 1) Sintetizar MNP con recubrimiento de sílice mesoporosa conjugadas con el sideróforo ferrioxamina.
- 2) Sintetizar MNP conjugadas con un fragmento que contenga un grupo catecol.

PARTE EXPERIMENTAL

1. METODOLOGÍA GENERAL

Todas aquellas reacciones que requirieron condiciones anhidras se realizaron bajo atmósfera de argón desoxigenado seco (Argón C-50) con agitación magnética. Las reacciones de hidrogenación se realizaron empleando metanol grado HPLC de la casa VWR bajo atmósfera de hidrógeno (H₂ Premier X50S) y una leve presión de hidrógeno.

Los disolventes utilizados son comerciales de la casa Panreac, salvo la N,N-dimetilformamida (DMF) de 99,8% de pureza de la casa Sigma-Aldrich, y se utilizaron sin purificación previa.

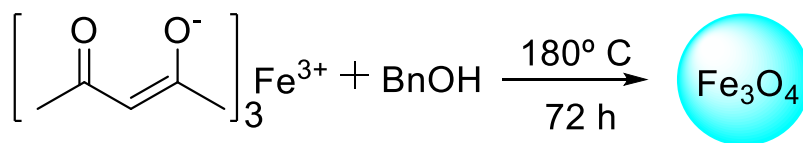
El avance de las reacciones orgánicas fue seguido por cromatografía en capa fina (CCF) empleando cromatoplasmas de gel de sílice Merck 60 F254. Las manchas se visualizaron por exposición a luz UV de $\lambda=254$ nm, o por revelado por calor tras inmersión en molibdato cérico amónico.

La cromatografía en columna se realizó en columna de vidrio, utilizando como fase estacionaria gel de sílice Merck 60 (0,040-0,063 mm), y la extracción en fase sólida se realizó en cartuchos de C-18 modelo WAT023635 de la casa Waters.

Los espectros de resonancia magnética nuclear se realizaron en el espectrómetro Bruker Avance 300 (300 MHz), utilizando como disolvente deuterado CDCl₃ (99,8% D). Los espectros de infrarrojos se realizaron en un equipo Nicolet IS10 de FTIR, con accesorio de ATR con cristal de ZnSe. Las medidas de tamaño de partícula en suspensión mediante dispersión de luz dinámica se realizaron en un equipo 90Plus/BI-MAS. Estos equipos se encuentran en las instalaciones del Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA) de la UDC. Las medidas de comportamiento magnético se realizaron en un equipo DMS-1660 Vibrating Sample Magnetometer (VSM).

El resto de medidas de caracterización se realizaron en equipos situados en el edificio de *Servicio de Apoyo a Investigación* (SAI) de la UDC. Los espectros de masas con ionización por electrospray (ESI) fueron realizados en un equipo Qstar-QqTOF Tandem Hybrid System, con fuente de ESI de Applied Biosystems. Las imágenes de microscopía de transmisión (TEM) se obtuvieron en un equipo modelo JEOL JEM 1010. Los difractogramas de rayos X de polvo se realizaron en un difractor Siemens D5000 con radiación de Cu (K α)= 1,541874 Å, sobre portamuestras de silicio. Los análisis termogravimétricos se realizaron en el equipo ThermalAnalysis SDT 2960.

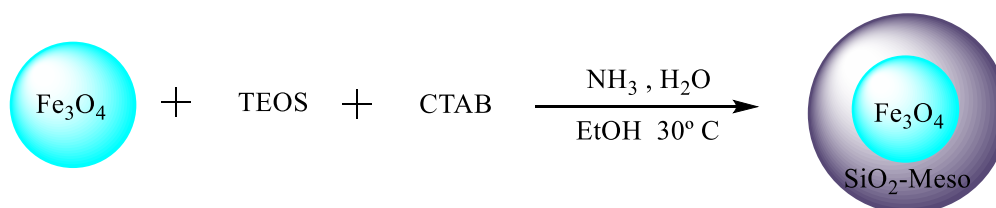
2. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA (Fe₃O₄)



En viales de vidrio de 20 mL con tapones de teflón se prepararon suspensiones que contenían 0,667 g de acetilacetonato de hierro (III) (Fe(acac)₃) y 10 mL de alcohol bencílico (BnOH). Los viales se sometieron a 2 min de agitación ultrasónica, y se dispusieron en un bloque térmico a 180° C durante 72 h. Transcurrido ese tiempo, se dejó enfriar los viales, y se trasvasó el contenido de los mismos a tubos de centrifuga. Se aplicó un ciclo de centrifugado de 30 min a 5000 rpm, se desechó el sobrenadante, y al sólido negro obtenido se le aplicaron 3 ciclos de lavado con etanol y agitación ultrasónica, y centrifugado de 15 min a 5000 rpm. El producto obtenido se secó en desecador. Partiendo de 6,67 g de Fe(acac)₃ se obtuvieron 1,31 g (89% de rendimiento) de MNP de Fe₃O₄, como un sólido de color negro.

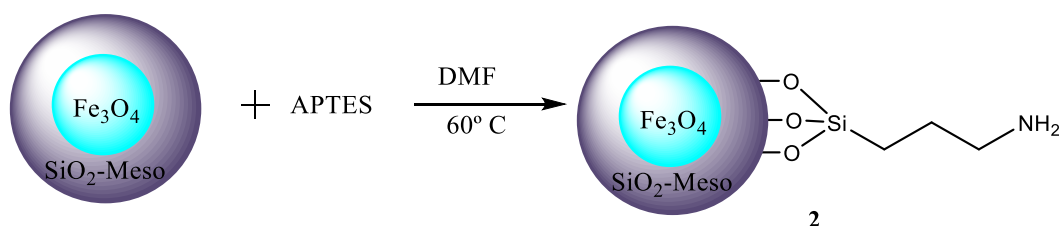
3. PREPARACIÓN DEL CONJUGADO MNP CON SÍLICE MESOPOROSA Y FERRIOXAMINA

3.1 Síntesis de Fe₃O₄@SiO₂-Meso



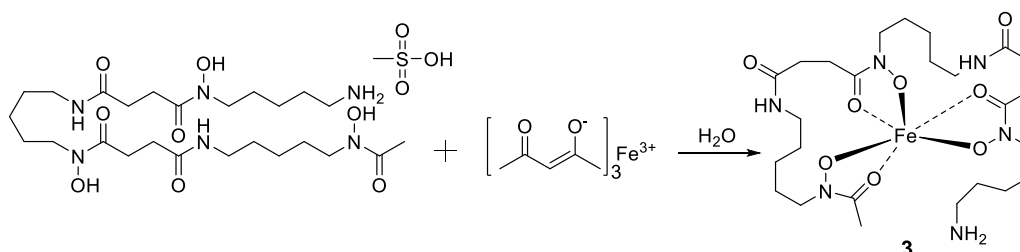
Se disolvió 0,5 g de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) en una mezcla de 80 mL de etanol y 40 mL de agua bidestilada. Se añadió 3 mL de NH₃ (30%) y 0,25 g de Fe₃O₄ MNP, que se suspendieron mediante 30 min de agitación ultrasónica. Manteniendo condiciones de 30° C de temperatura y 200 rpm de agitación magnética, se añadió gota a gota 1,6 mL de tetraetil ortosilicato (TEOS). Tras 24 h de reacción, se realizaron 4 ciclos de lavado con etanol y agitación ultrasónica, recuperando el sólido por separación magnética, y posteriormente se calcinó a 550° C durante 4 h. Se obtuvo 0,464 g de Fe₃O₄@SiO₂-Meso como un sólido de color marrón claro.

3.2 Síntesis de Fe₃O₄@SiO₂-Meso@APTES (2)



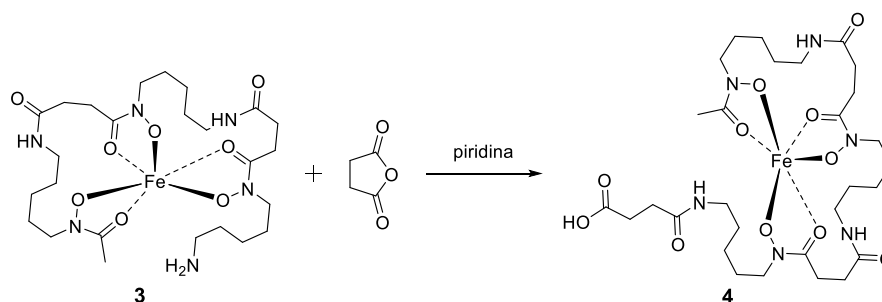
Sobre 0,5 g de Fe₃O₄@SiO₂-Meso se realizaron 3 ciclos de lavado con 3 mL de DMF y agitación ultrasónica, recuperando el sólido por separación magnética. Posteriormente se resuspendieron las MNP en 9 mL de DMF con 10 min de agitación ultrasónica, y manteniendo condiciones de 60° C de temperatura y 200 rpm de agitación magnética, se añadió 9 mL de 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES). Tras 24 h de reacción, se realizaron 4 ciclos de lavado con etanol y agitación ultrasónica, recuperando el sólido por separación magnética, que posteriormente se secó en desecador. Se obtuvo 0,556 g de Fe₃O₄@SiO₂-Meso@APTES (2) como un sólido de color marrón claro.

3.3 Síntesis de ferrioxamina (3)



Sobre una disolución de 100 mg (0,15 mmol) de mesilato de deferoxamina en 5 mL de agua bidestilada se añadió 54 mg (0,15 mmol) de Fe(acac)₃, tornándose roja la disolución al instante de realizar la adición. Se dejó agitando toda la noche a temperatura ambiente. La mezcla resultante se lavó con acetato de etilo (AcOEt), se eliminó los restos de AcOEt a presión reducida, y se llevó a sequedad por medio de liofilización, obteniendo 78 mg (84% de rendimiento) de ferrioxamina (3) como un sólido de color rojo intenso.

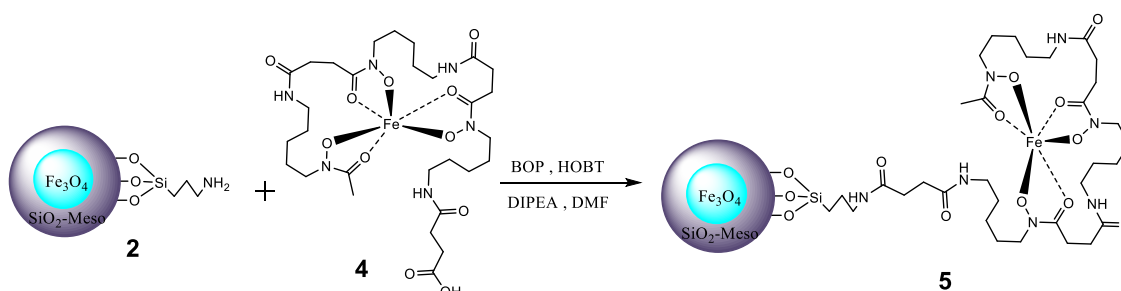
3.4 Síntesis de la *N*-succinilferrioxamina (4)



Sobre una disolución de 78 mg (0,13 mmol) de **3** en 5 mL de piridina, se añadió 267 mg (2,67 mmol) de anhídrido succínico, y se dejó agitando toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, se concentró a presión reducida, y el sólido rojo obtenido se purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaño, utilizando MeOH como eluyente. Se obtuvo 89 mg de *N*-succinilferrioxamina (**4**) como un sólido de color rojo intenso con un rendimiento cuantitativo.

(+)-LR-ESIMS *m/z*: 714,29 [M+H]⁺.

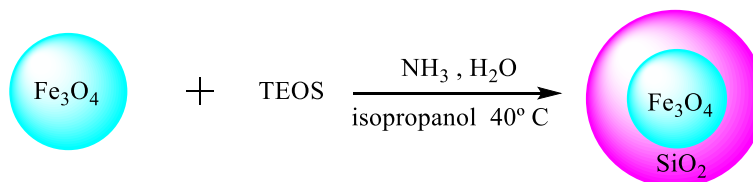
3.5 Síntesis del conjugado MNP(Meso)-ferrioxamina (5)



Sobre 30 mg de **2** se realizaron 3 lavados con 3 mL de DMF y 5 min de agitación ultrasónica, recuperando el sólido por separación magnética. Posteriormente se resuspendieron las MNP en 5 mL de DMF con 10 min de agitación ultrasónica, y sobre esta suspensión, mientras se mantenía agitación ultrasónica, se adicionó una disolución con 89 mg (0,13 mmol) de **4**, los agentes acoplantes, 84 mg (0,19 mmol) de hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tris (dimetilamino)fosfonio (BOP) y 25 mg (0,16 mmol) de hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), y 88 μ L (0,50 mmol) de DIPEA en 10 mL de DMF. Finalizada la adición, se dejó reaccionando a 25° C con agitación mecánica durante toda la noche. Tras este tiempo, se recuperaron las MNP por separación magnética, se realizan 4 ciclos de lavado con etanol y agitación ultrasónica, y el sólido recogido se secó a vacío. Se obtuvo 46mg del conjugado **5** como un sólido de color marrón claro.

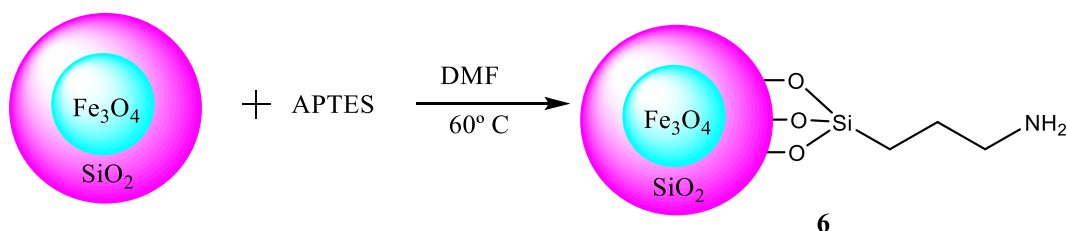
4. PREPARACIÓN DEL CONJUGADO MNP Y FRAGMENTO CON GRUPO CATECOL

4.1 Síntesis de Fe₃O₄@SiO₂



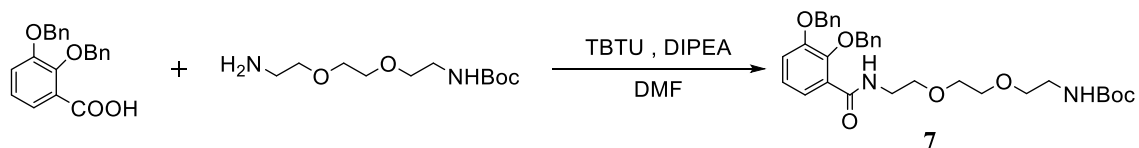
Se suspendieron 2 g de Fe₃O₄ MNP en 70 mL de isopropanol mediante 30 min de agitación ultrasónica. Se añadió 3,5 mL de NH₃ (30%) y 7,5 mL de agua bidestilada. Manteniendo condiciones de 40° C de temperatura y 200 rpm de agitación magnética, se añadió gota a gota 0,56 mL de tetraetil ortosilicato (TEOS). Tras 2 h de reacción, se sometió a 1 h de agitación ultrasónica, y se decantó la mezcla con ayuda de un imán. El sólido obtenido se sometió a un segundo recubrimiento, repitiendo los pasos anteriormente descritos. Posteriormente, se realizaron 3 ciclos de lavado con etanol y agitación ultrasónica, recuperando el sólido por separación magnética, que posteriormente se secó en desecador. Se obtuvo 2,815 g de Fe₃O₄@SiO₂ como un sólido de color marrón oscuro.

4.2 Síntesis de Fe₃O₄@SiO₂@APTES (6)



Sobre 0,5 g de Fe₃O₄@SiO₂ se siguió el mismo procedimiento que en el apartado 3.2 de esta sección, con lo que se obtuvo 0,539 g de Fe₃O₄@SiO₂@APTES (6) como un sólido de color marrón oscuro.

4.3 Síntesis de *tert*-butil(2-(2-(2-(2,3-bis(benciloxi(benzamido)etoxi)etoxi)etil)carbamato (7)



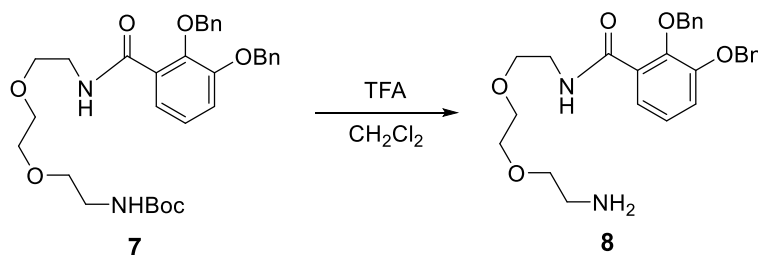
Sobre una disolución de 300 mg (0,9 mmol) de ácido-2,3-bis(benciloxi)benzoico en 10 mL de DMF se adicionó otra disolución de 222 mg (0,9 mmol) de (*tert*-butil(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)carbamato, 345 mg (1,07 mmol) de agente acoplante *O*-(Benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TBTU), y 234 μ L (1,35 mmol) de DIPEA, en 10 mL de DMF, bajo condiciones inertes. Se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, la mezcla se concentró a presión reducida, y el aceite amarillo intenso obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [AcOEt:Hexano (9:1)], obteniendo finalmente 327 mg (65% de rendimiento) de **7** como un aceite amarillo pálido.

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3), δ_{H} ppm: 1,41 (s, 9H); 3,22 (c, 2H); 3,47 (m, 10H); 4,94 (s, 1H); 5,07 (s, 2H); 5,13 (s, 2H); 7,13 (d, 2H); 7,34 (m, 10H); 7,70 (t, 1H); 8,20 (s, 1H).

(+)-**LR-ESIMS** m/z : 587,27 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

(+)-**HR-ESIMS** m/z : 587,2728 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calculada para $\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_7\text{Na}$: 587,2727).

4.4 Síntesis de *N*-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-2,3-bis(benciloxi)benzamida (8)



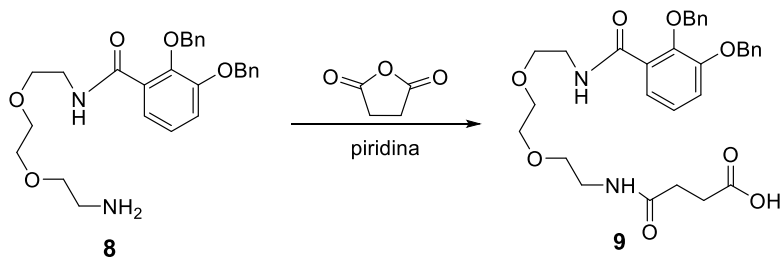
Una disolución de 100 mg (0,18 mmol) de **7** en una mezcla 5:1 de CH_2Cl_2 /ácido trifluoroacético (TFA), se agitó a temperatura ambiente durante 90 min. Transcurrido ese tiempo, la mezcla se concentró a presión reducida, obteniendo 80 mg de **8** como un aceite amarillo pálido con un rendimiento cuantitativo.

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3), δ_{H} ppm: 3,62 (m, 12H); 5,38 (s, 4H); 7,31 (m, 13H); 8,52 (s, 1H).

(+)-**LR-ESIMS** m/z : 465,25 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(+)-**HR-ESIMS** m/z : 465,2414 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calculada para $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_5$: 465,2383).

4.5 Síntesis de ácido 1-(2,3-bis(benziloxi)fenil)-1,12-dioxo-5,8-dioxa-2,11-diazapentadecan-15-oico (9)



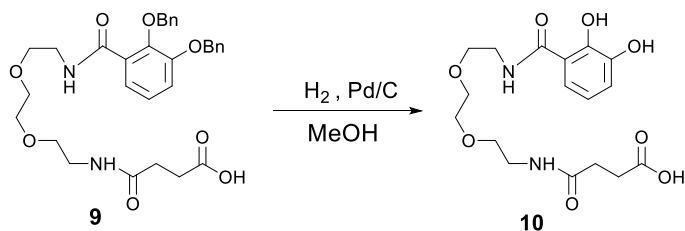
Sobre una disolución de 220 mg (0,47 mmol) de **8** en 5 mL de piridina, se añadió 71 mg (0,71 mmol) de anhídrido succínico, y se dejó agitando toda la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida, y el sólido obtenido se purificó mediante extracción en fase sólida (columna C-18), utilizando un gradiente de mezcla H₂O:MeOH como fase móvil. Se obtuvo 167 mg (62% de rendimiento) de **9** como un aceite amarillo.

¹H-RMN (CDCl₃), δ_H ppm: 2,45 (dd, 2H); 2,61 (dd, 2H); 3,55 (m, 12H) 5,09 (s, 2H); 5,15 (s, 2H); 7,16 (d, 2H); 7,38 (m, 11H); 7,66 (s, 1H); 8,36 (s, 1H).

(+)-LR-ESIMS m/z: 587,24 [M+Na]⁺.

(+)-HR-ESIMS m/z: 587,2358 [M+Na]⁺ (calculada para C₃₁H₃₆N₂O₈Na: 587,2363).

4.6 Síntesis de ácido-1-(2,3-dihidroxifenil)-1,12-dioxo-5,8-dioxa-2,11-diazapentadecan-15-oico (10)



Una suspensión de 60 mg (0,10 mmol) de **9** y una cantidad catalítica de catalizador Pd/C al 5% en p/p en 10 mL de MeOH, se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de H₂ (1atm) durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, se filtró a través de celita, y se eliminó el disolvente a presión reducida, obteniendo 41 mg de un sólido que no se correspondía con **10** (ver resultados y discusión).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MNP

1. 1 Preparación de nanopartículas de Fe₃O₄

El primer paso de este trabajo consistió en la preparación de nanopartículas de Fe₃O₄ siguiendo el método propuesto por Pinna⁶, explicado en el apartado 1.3 de la introducción. Estas MNP son la base de los distintos pasos de recubrimiento y funcionalización que se realizaron acorde a los objetivos propuestos para este trabajo. Su caracterización se llevó a cabo por difracción de rayos X de polvo, TEM, y medidas de tamaño de partícula en suspensión, que aportan información sobre su tamaño, morfología, y cristalinidad.

1. 2 Caracterización de nanopartículas de Fe₃O₄

El difractograma de rayos X de polvo de la muestra de nanopartículas de Fe₃O₄ obtenidas mediante síntesis solvotermal (figura 17) se comparó con patrones de magnetita utilizando el programa Match³⁵.

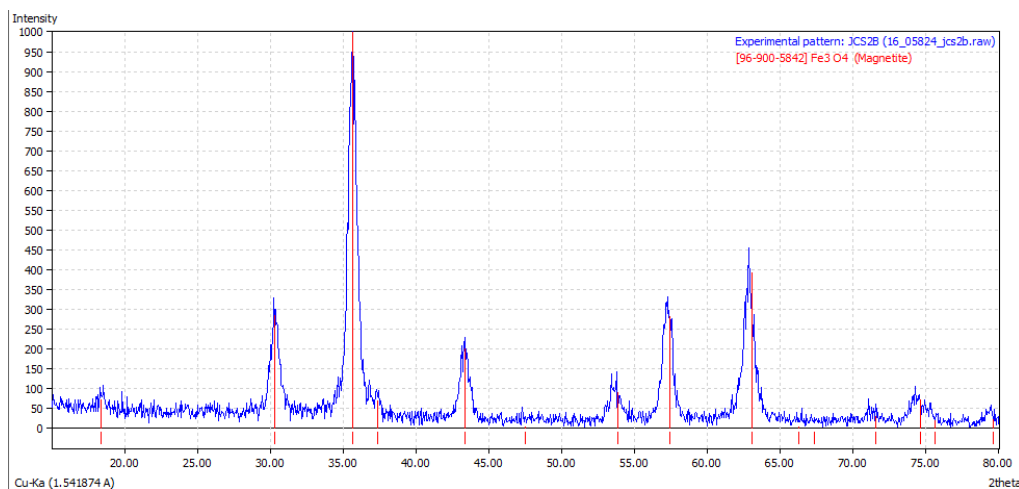


Figura 17 Difractograma experimental de Fe₃O₄, comparada con un patrón de la base de datos de Match

El valor de 2θ de los máximos de intensidad del difractograma experimental coinciden con los del patrón de Fe₃O₄, confirmando que el producto obtenido es magnetita, sin impurezas de otras fases. La anchura de los picos indica que, además de ser cristalina, la muestra está formada por partículas de pequeño tamaño (orden nanométrico).

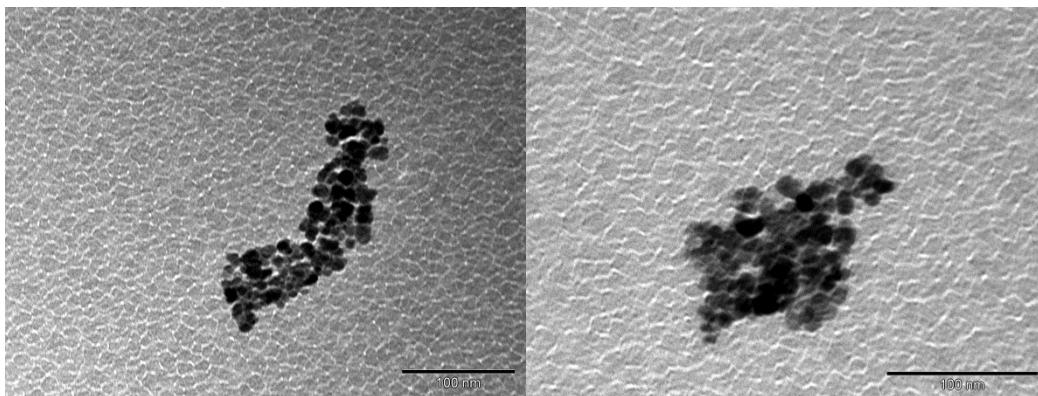


Figura 18 Micrografías TEM de las nanopartículas de Fe_3O_4

Las imágenes obtenidas por TEM (figura 18) muestran que el tamaño de las nanopartículas se encuentra alrededor de los 10 nm, con una distribución de tamaños uniforme, y con tendencia a formar pequeños aglomerados. La morfología de las partículas es bastante regular, adaptando todas ellas una forma más o menos esférica. Las medidas de tamaño de partícula en una suspensión de etanol muestran una distribución de tamaño medio de 87 ± 6 nm, confirmando la tendencia a formar pequeños aglomerados.

2. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL CONJUGADO MNP CON SÍLICE MESOPOROSA Y FERRIOXAMINA

2.1 Preparación de $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ -Meso

Para sintetizar las MNP recubiertas de sílice mesoporoso, se optó por realizar una modificación del método de Stöber³⁶, añadiendo un surfactante utilizado habitualmente en las síntesis de sílice mesoporosa. Se efectuó una hidrólisis de TEOS en una suspensión de las nanopartículas de Fe_3O_4 en una mezcla agua/etanol, en presencia de catalizador básico (NH_3), y el surfactante CTAB. Finalizada la reacción, se realizó un paso adicional de calcinación para eliminar el surfactante. Su caracterización se llevó a cabo por las mismas técnicas que las MNP de Fe_3O_4 .

2.2 Caracterización de Fe₃O₄@SiO₂-Meso

En el difractograma experimental de Fe₃O₄@SiO₂-Meso (figura 19), los máximos de difracción se siguen correspondiendo a los de un patrón de magnetita. Se observa también un incremento de ruido en la señal de fondo (background), que junto a una pequeña elevación en la zona de 2θ entre 20° y 28°, evidencia la presencia de sílice recubriendo la estructura cristalina de las nanopartículas.

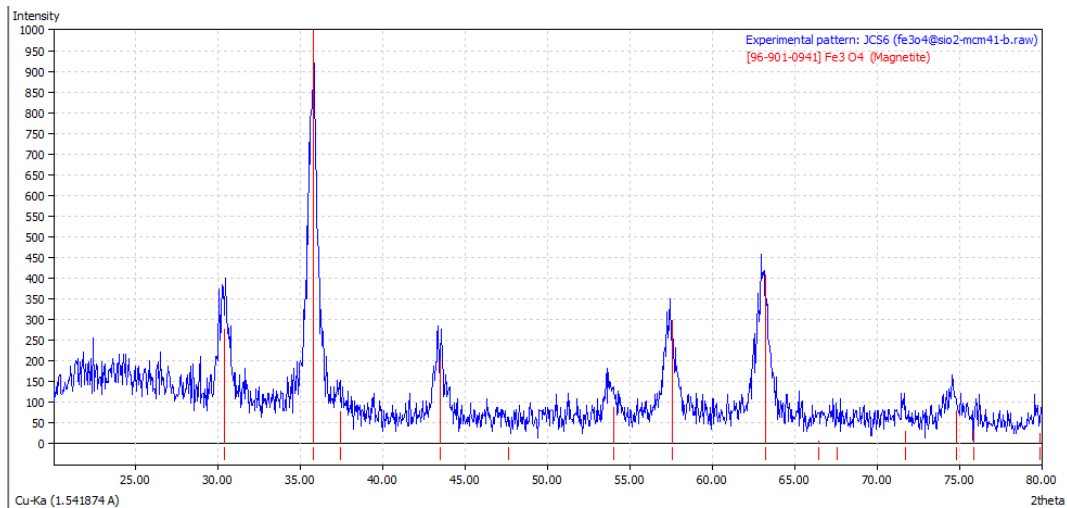


Figura 19 Difractograma experimental de Fe₃O₄@SiO₂-Meso, comparado con un patrón de magnetita

La estructura mesoporosa del recubrimiento de sílice se confirma por el difractograma realizado entre ángulos de 2θ de 1° a 10° (figura 20). Los máximos situados a 2θ= 2,53°; 2θ= 4,29°; 2θ=4,94° se corresponden con los planos cristalográficos (1 0 0), (1 1 0), y (2 0 0) de la estructura de sílice mesoporosa tipo MCM-41³⁷.

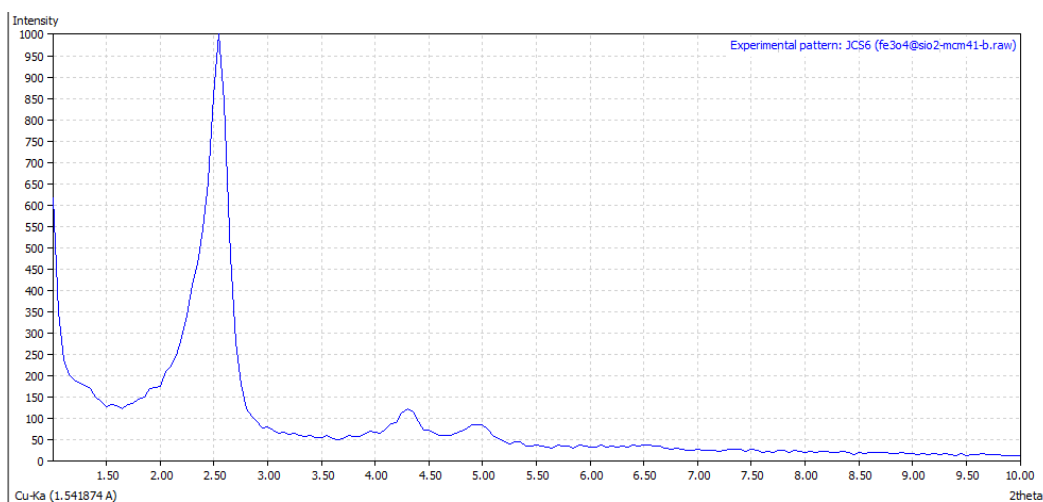


Figura 20 Difractograma experimental de Fe₃O₄@SiO₂-Meso, entre ángulos de 1° a 10°

El diámetro de poro puede ser calculado restando 1 nm al valor de la distancia entre centro de los poros (a_0), que se puede obtener con el valor de $d(1\ 0\ 0)$, que a su vez se despeja con la ley de Bragg:

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad ; \quad d_{(1\ 0\ 0)} = \frac{n\lambda}{2 \sin \theta} = \frac{0,1541874 \text{ nm}}{2 \sin \frac{2,53}{2}} = 3,492 \text{ nm}$$

$$a_0 = \left(\frac{2}{\sqrt{3}} \right) d_{(1\ 0\ 0)} = 4,032 \text{ nm}$$

De esta forma, obtenemos un valor de diámetro de poro de 3,032 nm. En las imágenes obtenidas por TEM (figura 21) se observa fácilmente el recubrimiento de sílice, aunque no se llega a observar la estructura de los poros. Las nanopartículas se encuentran mucho más agregadas, formando aglomerados de alrededor de 200 nm. El tamaño de partícula medido en una suspensión de agua desionizada muestra un valor promedio de $2,2 \pm 0,6 \mu\text{m}$, lo que pone de manifiesto la mayor tendencia a agregarse al realizarse el recubrimiento de sílice mesoporosa.

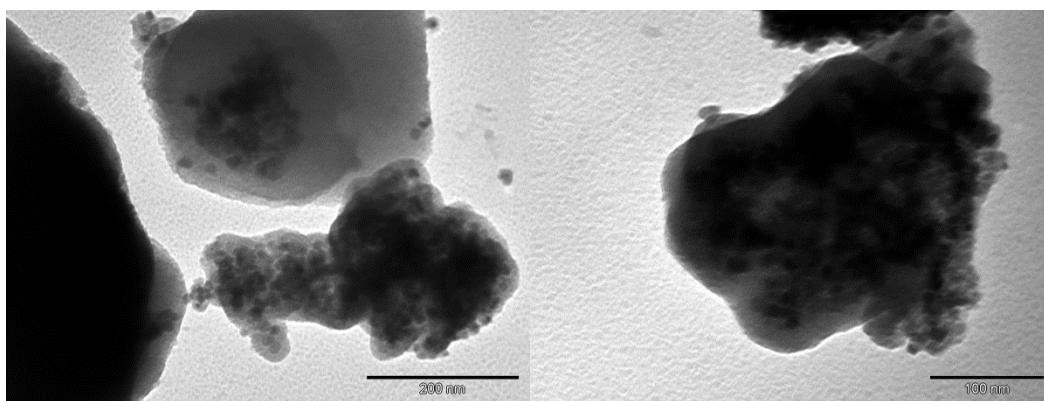


Figura 21 Micrográficas TEM de $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-Meso}$

2.3 Preparación de *N*-succinilferrioxamina, $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-Meso}@ \text{APTES}$, y conjugado MNP(Meso)-ferrioxamina

Una vez confirmada la estructura mesoporosa del recubrimiento, se preparó de forma paralela $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-Meso}@ \text{APTES}$ (2) y la *N*-succinilferrioxamina (4). Finalmente se realizó la conjugación de ambos fragmentos para sintetizar el conjugado MNP(Meso)-ferrioxamina (5), y se estudió su capacidad para extraer bacterias, comparando los resultados con los obtenidos para el conjugado MNP-ferrioxamina (1).

La preparación de la **4** se consigue con dos pasos sintéticos (figura 22), la quelatación del mesilato de deferoxamina con $\text{Fe}(\text{acac})_3$, y posterior adición de un exceso de anhídrido succínico. El compuesto obtenido se caracterizó por espectrometría de masas.

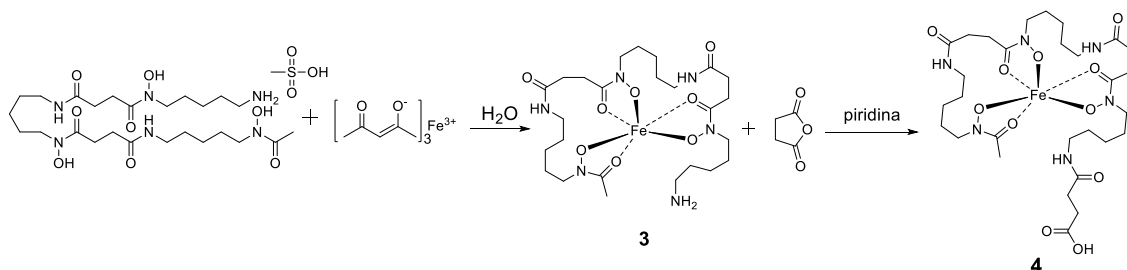


Figura 22 Ruta sintética para la obtención de *N*-succinilferrioxamina

La funcionalización con grupos amino de las MNP para obtener **2** se llevó a cabo por medio de la adición de APTES en una suspensión en DMF de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-Meso}$. Los lavados previos con DMF realizados sobre las nanopartículas activan la superficie de las mismas al desprotonar los grupos hidroxilo terminales de la cubierta de sílice.

La reacción de acoplamiento entre los fragmentos **2** y **4** se realizó siguiendo el modelo propuesto por Huang³² para la síntesis de MNP funcionalizadas con monosacáridos.

La funcionalización con APTES y el conjugado **5** se caracterizaron por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier acoplada a la técnica de reflectancia total atenuada (FTIR-ATR), análisis termogravimétrico (ATG), y medidas de magnetización.

2.4 Caracterización de *N*-succinilferrioxamina, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-Meso@APTES}$, y conjugado MNP(Meso)-ferrioxamina

La caracterización de **4** se llevó a cabo por espectrometría de masas (+)-ESI de baja resolución, que confirmó la obtención del compuesto al mostrar el ión $[\text{M}+\text{H}]^+$ a m/z 714,29 (masa calculada para $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{FeN}_6\text{O}_{11}$: 714,28).

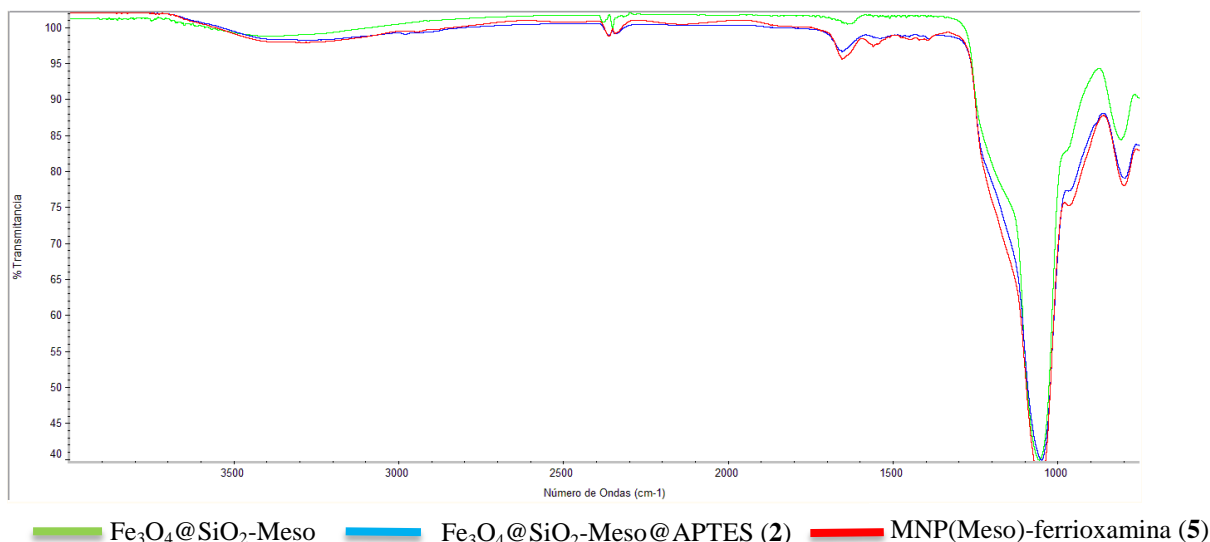


Figura 23 Espectros de IR de las MNP mesoporosas en los distintos pasos de funcionalización

Los espectros de IR (figura 23) de todas las MNP recubiertas con sílice mesoporosa presentan una gran banda sobre 1050 cm^{-1} , correspondiente al enlace Si-O. Las muestras **2** y **5** muestran un aumento de intensidad en la zona entre 3500 cm^{-1} y 2800 cm^{-1} , correspondiente a los enlaces N-H y C-H. En la muestra **5** se aprecia un aumento de la banda en torno a 1650 cm^{-1} , que puede corresponderse con el enlace amida del conjugado. Hay que tener en cuenta que en este tipo de muestras, la proporción de masa de nanopartícula es muy superior respecto al de las moléculas con que se funcionalización, por lo que la banda del enlace Si-O será siempre mucho más intensa que las observadas para el resto de enlaces.

El ATG realizado sobre las muestras (figura 24) se realizó bajo atmósfera de N₂, desde temperatura ambiente hasta 900°C , con una rampa de $20^{\circ}/\text{min}$.

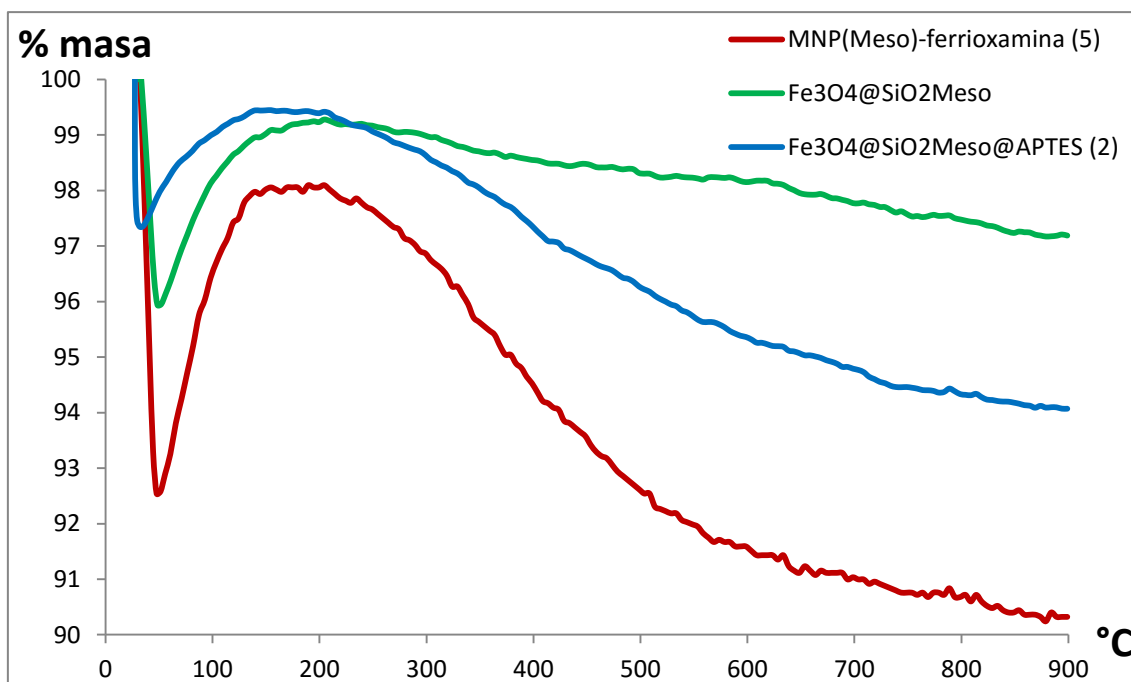


Figura 24 ATG de las MNP mesoporosas en los distintos pasos de funcionalización

En la gráfica se observa que todas las muestras sufren una pérdida importante de masa hasta alcanzar los 60° C, debida a la pérdida de agua o restos de disolvente de síntesis que hayan quedado retenidos en su superficie. Posteriormente, se produce una recuperación parcial de esa masa perdida, que puede deberse a un proceso de adsorción de N₂, causado por la estructura mesoporosa de la superficie de las nanopartículas. A partir de ese punto se va produciendo una pérdida gradual de masa, hasta alcanzar un % total de pérdida de masa del 2,8% para las Fe₃O₄@SiO₂-Meso, un 5,9% para **2**, y un 9,7% para el conjugado **5**. Por tanto, la pérdida de masa aumenta con los distintos pasos de funcionalización, acorde a lo esperado.

Las medidas del comportamiento magnético (figura 25) muestran que las nanopartículas de magnetita no presentan histéresis en todo el ciclo medido, lo que justifica su comportamiento superparamagnético, y conservan esta propiedad a lo largo de los distintos pasos de recubrimiento y funcionalización. Para la obtención de los datos de magnetismo, se realizaron 4 ciclos de magnetización completos desde -10 a 10 kOe, a temperatura ambiente, y los valores representados corresponden a la media de las 4 medidas.

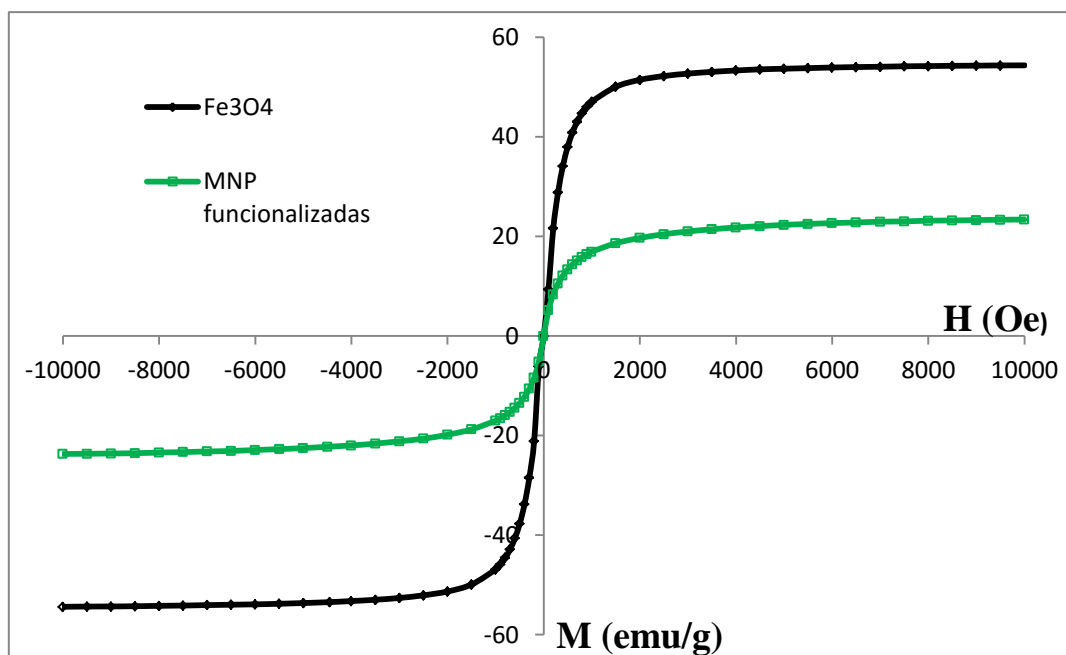


Figura 25 Medidas de magnetización de las MNP

El valor de la magnetización de saturación (M_S) medido para las nanopartículas de Fe_3O_4 es de 54,36 emu/g, un valor que asegura una respuesta magnética fuerte, pero inferior a los valores máximos que se han llegado a observar para las MNP de Fe_3O_4 , que se encuentra en torno a 80 emu/g³⁸. El valor de M_S se ve reducido prácticamente a la mitad cuando se realiza el recubrimiento de sílice mesoporosa, hasta 23,57 emu/g, ya que hay mucho menos material magnético por gramo de muestra. Al realizar la funcionalización con APTES y la conjugación con ferrioxamina, los valores de M_S descienden ligeramente como cabría esperar, obteniendo unos valores de 23,20 emu/g para **2**, y 22,92 emu/g para el conjugado **5**.

Todas las gráficas muestran una pendiente muy pronunciada en los valores de magnetización frente al campo magnético, logrando alcanzar prácticamente la M_S al aplicar un campo de 1 kOe. Esto asegura una respuesta rápida de las MNP al aplicar un campo magnético, una propiedad muy adecuada para el tipo de aplicaciones que estamos enfocando, ya que nos permite realizar acelerar el proceso de separación con un imán, obteniendo una respuesta inmediata de las MNP.

2.5 Ensayos bacterianos

Para comparar la efectividad del conjugado sintetizado con recubrimiento mesoporoso, frente al conjugado con recubrimiento de sílice normal a la hora de extraer bacterias, se realizó un ensayo bacteriano (figura 26) siguiendo metodología descrita en la sección de antecedentes.

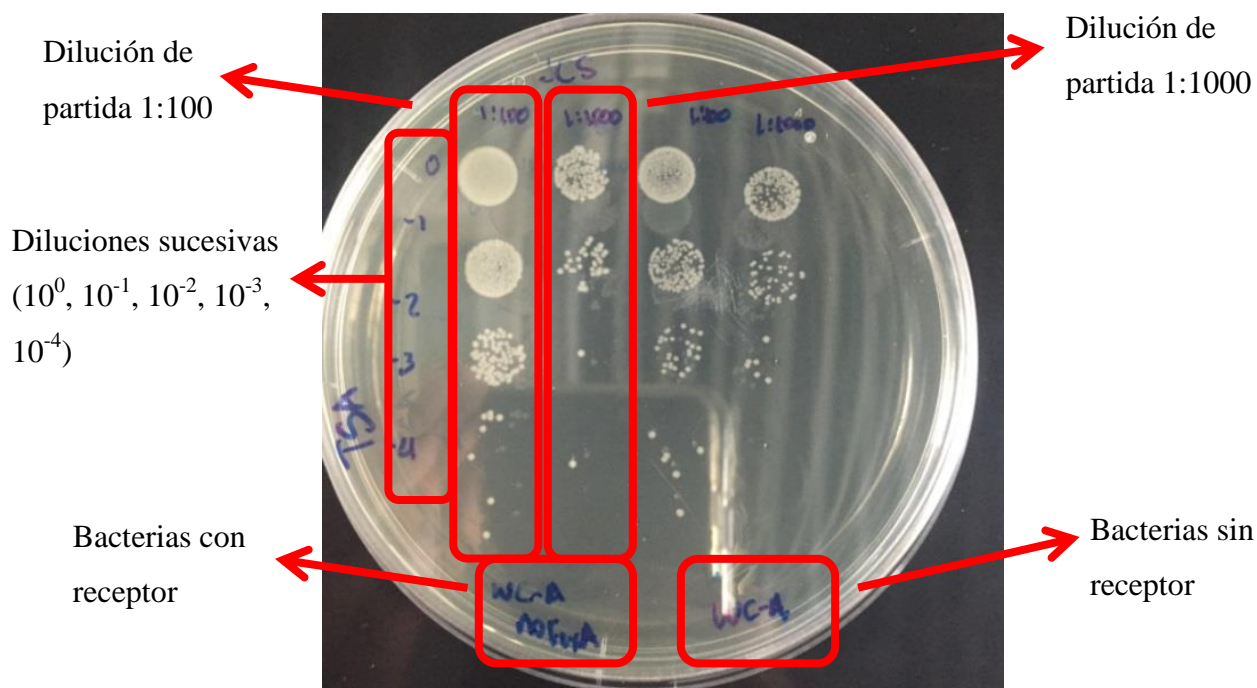


Figura 26 Ensayo bacteriano del conjugado MNP-Meso con ferrioxamina frente a *Yersinia enterocolitica*

Como se observa en la imagen, el conjugado 5 presenta una buena capacidad de extracción general para esta bacteria, pero no muestra la especificidad que demostraba el conjugado 1 para ser selectivo con las bacterias que poseen el receptor de membrana específico de la ferrioxamina. En vista de estos resultados, todo indica que las fuerzas de adhesión entre la superficie mesoporosa y la pared celular de las bacterias están primando sobre la interacción entre el sideróforo y el receptor de membrana. Esto puede deberse a la mayor área superficial que presenta la estructura mesoporosa frente a la cubierta de sílice normal, lo que deriva en una menor proporción de sideróforos por nanopartícula. Una posible alternativa a estudiar implicaría realizar este conjugado aumentando la proporción de APTES y de sideróforo a conjugar para la misma cantidad de MNP. Se deberán realizar más ensayos para confirmar esta hipótesis.

3. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL CONJUGADO MNP Y FRAGMENTO CON GRUPO CATECOL

3.1 Preparación de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ y de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{APTES}$

La síntesis de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ se realizó por hidrólisis de TEOS con catalizador básico (NH_3) sobre una suspensión de nanopartículas de Fe_3O_4 en isopropanol. Por experiencias previas de nuestro grupo de investigación, se realizó una segunda etapa consecutiva de recubrimiento, que otorga más grosor a la capa de sílice, y ofrece mejores resultados en la funcionalización con APTES, que se realizó de la misma forma que para las MNP mesoporosas.

3.2 Caracterización de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ y de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{APTES}$

El difractograma experimental (figura 27) de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ sigue correspondiéndose con los del patrón de magnetita. Al contrario que en las recubiertas con sílice mesoporosa, no se aprecia un aumento en la señal de fondo ni en la zona de 2θ entre 20° y 28° , lo que ya nos sugiere que el recubrimiento contiene menor cantidad de sílice que en la cubierta mesoporosa.

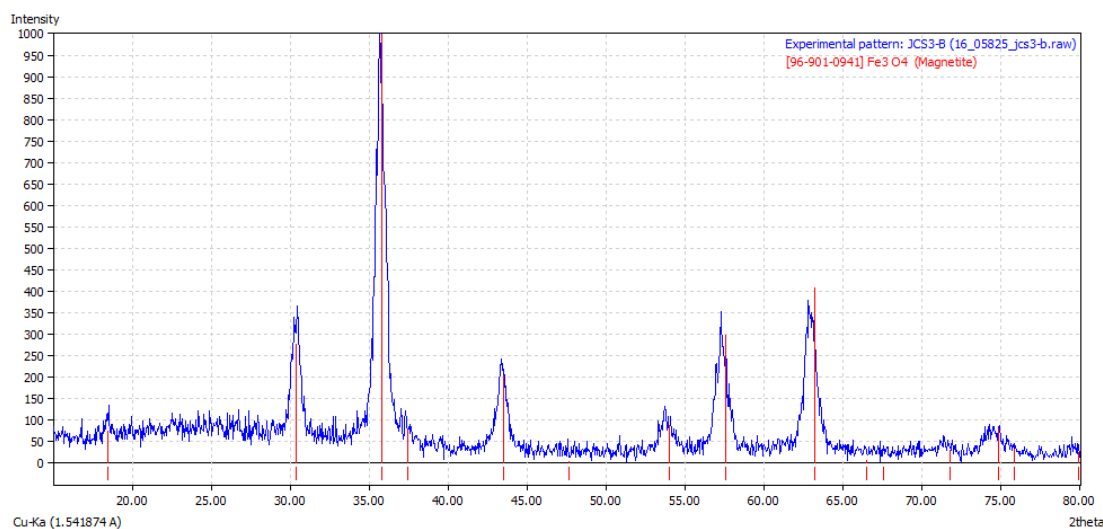


Figura 27 Difractograma experimental de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, comparado con un patrón de magnetita

Las imágenes obtenidas por TEM (figura 28) confirman esta hipótesis, mostrando un recubrimiento mucho más fino que en el anterior caso, y siendo más difícil de observar el recubrimiento, que en este caso es de unos pocos nanómetros. Vemos que las nanopartículas también tienen tendencia a formar agregados algo más grandes que antes de realizar el recubrimiento, de 200 a 300 nm.

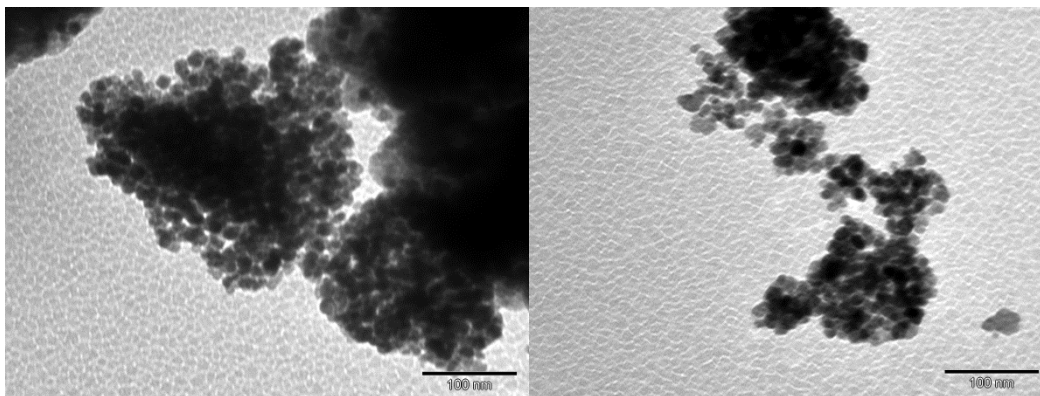


Figura 28 Micrografías TEM de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$

Las medidas de tamaño de partícula en suspensión de agua desionizada ofrecen un valor medio de 281 ± 5 nm, lo que coincide plenamente con la información obtenida por TEM, e indica que tienen menor tendencia a aglomerarse en suspensión y forman un coloide más estable que los de cubierta mesoporosa.

La funcionalización con grupos amino se caracterizó por IR y ATG. El espectro de IR (figura 29) comparativo entre las muestras de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{APTES}$ (**6**) muestra un aumento de intensidad en la zona entre 3500 cm^{-1} y 2800 cm^{-1} , correspondiente a los enlaces N-H y C-H, y una banda en torno a 1650 cm^{-1} en la muestra **6**, que se puede deber tanto a bandas de flexión de los grupos amino, como a restos del disolvente de síntesis (DMF).

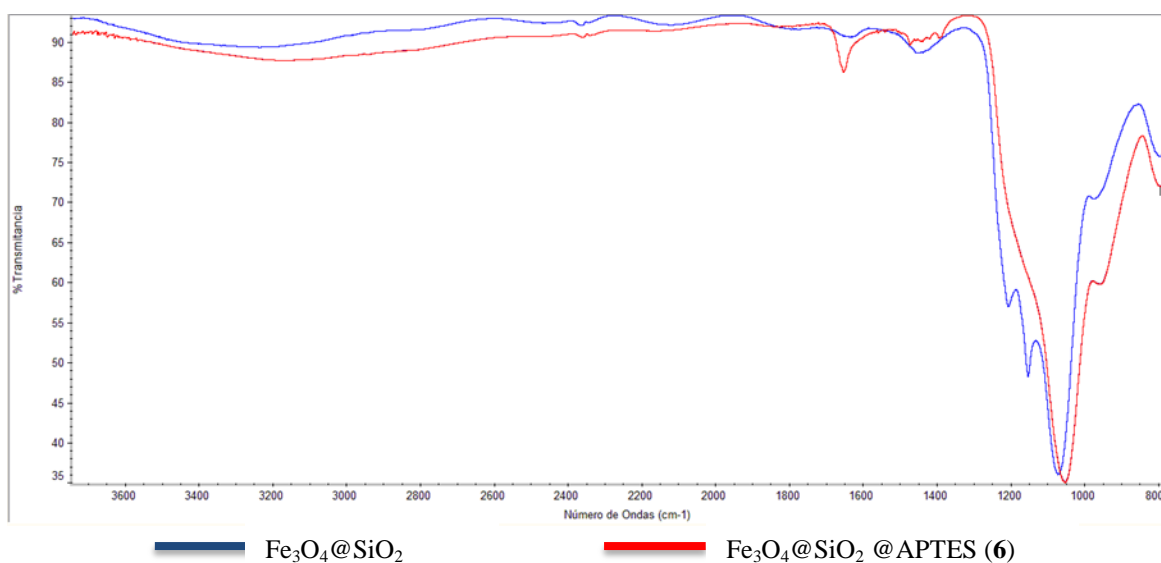


Figura 29 Espectros de IR de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{APTES}$

El ATG de estas muestras (figura 30) no muestra una pérdida de peso brusca en los primeros 60° C, ni la posterior adsorción de N₂ como ocurría en las mesoporosas. En este caso, la pérdida de masa es gradual a lo largo de todo el calentamiento, llegando a una pérdida de masa total de 5,9% para Fe₃O₄@SiO₂, y 7,3% para **6**, por lo que la pérdida de masa vuelve a aumentar al realizar la funcionalización, igual que en las mesoporosas y acorde a lo esperado.

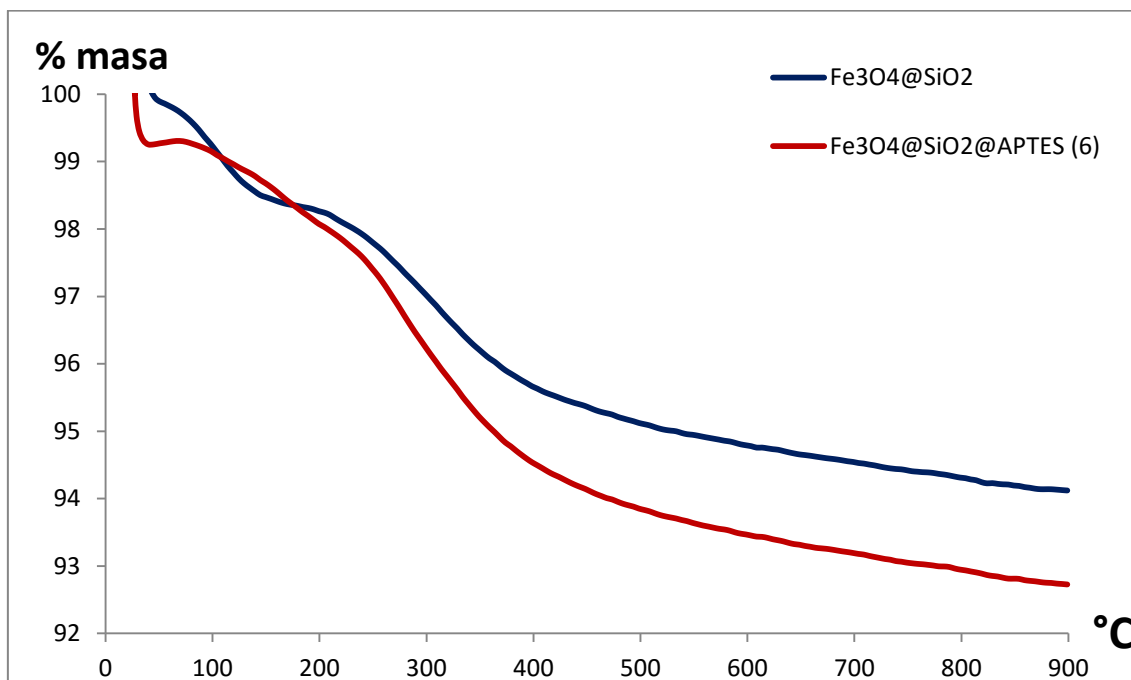


Figura 30 ATG de Fe₃O₄@SiO₂ y Fe₃O₄@SiO₂@APTES

En cuanto a las medidas de magnetización, el valor de M_S medido para la muestra de Fe₃O₄@SiO₂ es de 26,52 emu/g, ligeramente superior que el valor obtenido para Fe₃O₄@SiO₂-Meso (23,57 emu/g), pero que sigue sufriendo un brusco descenso respecto a las MNP de magnetita (54,36 emu/g) como consecuencia del recubrimiento. Para **6**, el valor obtenido fue de 25,77 emu/g, siguiendo la misma tendencia a la baja al realizar la funcionalización que en las mesoporosas.

3.3 Preparación y caracterización del fragmento que contiene un grupo catecol

Para esta parte del trabajo, se propuso sintetizar un fragmento que contuviera un grupo catecol y posteriormente conjugarlo con las MNP, ya que este grupo posee una gran afinidad por el Fe(III) y además está presente en un gran número de sideróforos. Esto nos da acceso a realizar extracciones de una gran variedad de bacterias que utilizan sideróforos que contienen esta unidad estructural, y adicionalmente conseguiríamos una mejor comprensión de los mecanismos de reconocimiento entre el receptor de membrana y el complejo sideróforo-Fe(III).

Para ello, se planteó unir la unidad catecol a un espaciador que permitiera su posterior acoplamiento a las MNP a través de un enlace amida. Se decidió partir del ácido 2,3-dihidroxibenzoico con los grupos hidroxilos protegidos en forma de éteres de bencilo, compuesto que ya había sido sintetizado previamente en nuestro grupo de investigación. Teniendo en cuenta todo esto, se diseñó el esquema sintético que se muestra en la figura 31.

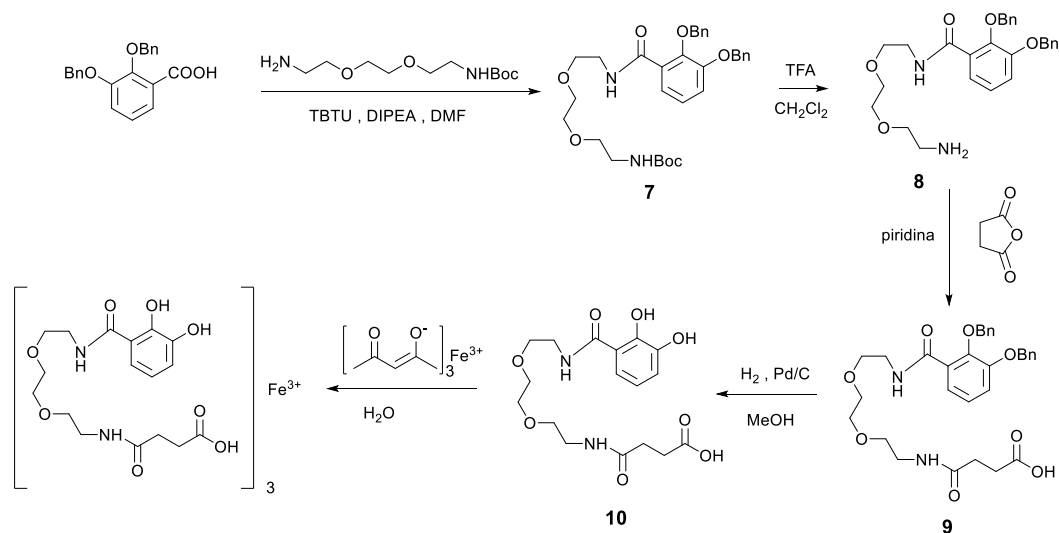


Figura 31 Ruta sintética diseñada para elaborar el fragmento que contiene un grupo catecol

Como espaciador a utilizar se partió del *tert*-butil (2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)carbamato, porque nos permitiría enlazarlo al catecol a través un enlace amida, y además los átomos de oxígeno de la cadena impiden el completo plegamiento de la misma, impidiendo de esta forma que el resto del fragmento interfiera en el proceso de reconocimiento del grupo catecol.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El primer paso de la síntesis consistió por tanto en la formación de un enlace amida entre el catecol y el *tert*-butil (2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi) etil)carbamato. La reacción fue llevada a cabo en condiciones inertes, y se seleccionó como agente acoplante el TBTU, por los buenos resultados que había ofrecido previamente en este tipo de reacciones dentro del grupo de investigación, y DIPEA como base. Tras realizar una purificación por cromatografía en columna de gel de sílice [AcOEt:Hexano (9:1)], se obtuvo el compuesto **7**, que se caracterizó por ^1H -RMN y espectrometría de masas de baja y alta resolución.

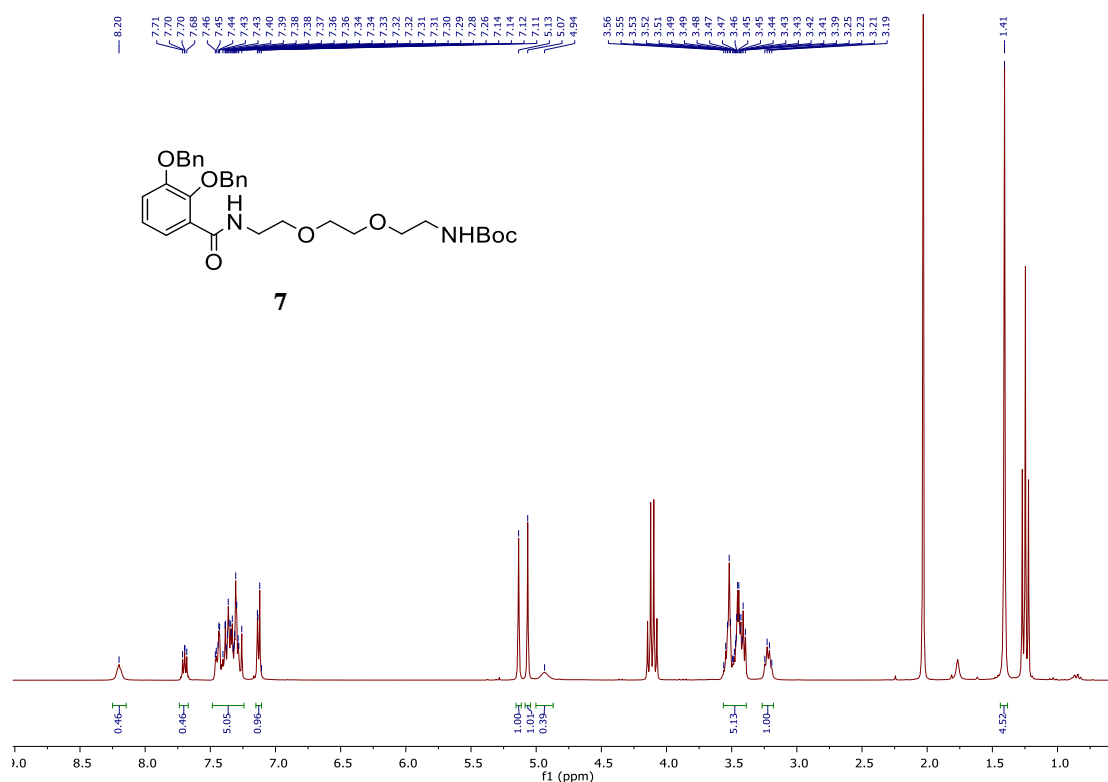


Figura 32 Espectro de ^1H -RMN del compuesto **7**

El espectro de RMN del compuesto **7** (figura 32) muestra las señales de los 9H correspondientes al grupo protector *tert*-butil carbamato del espaciador a 1,41 ppm, los 12H alifáticos en torno a 3,5 ppm, los 4H bencílicos a 5,10 ppm, los 13H aromáticos entre 7 y 8 ppm, y una señal de amida a 8,20 ppm. El espectro de masas (+)-ESI de alta resolución confirmó la obtención del compuesto al mostrar el ion $[\text{M}+\text{Na}]^+$ a m/z 587,2728 (masa calculada para $\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_7\text{Na}$: 587,2727).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El segundo paso consistió en la desprotección del grupo protector del espaciador, que se realizó mediante tratamiento de TFA sobre una disolución del compuesto **7** en CH_2Cl_2 . En el espectro de RMN del compuesto **8** (figura 33) se observa la desaparición de la señal correspondiente al grupo *tert*-butil carbamato, y la aparición de una señal a 1,57 ppm que se corresponde con *tert*-butanol, subproducto de la reacción de desprotección. El espectro de masas (+)-ESI de alta resolución confirmó la obtención del compuesto al mostrar el ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ a m/z 465,2414 (masa calculada para $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_5$: 465,2383).

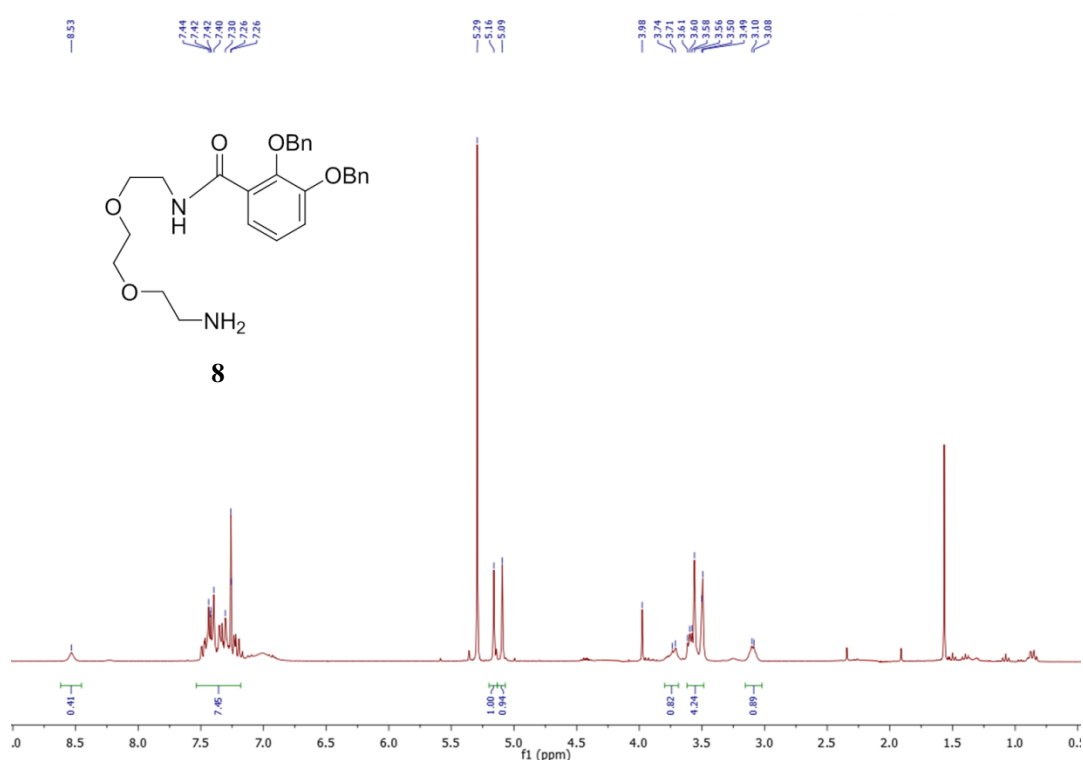


Figura 33 Espectro de ^1H -RMN del compuesto **8**

El siguiente paso consistió en la adición de anhídrido succínico a una disolución del compuesto **8** en piridina, para lograr un grupo ácido en el extremo libre del espaciador. El producto se purificó al hacerlo pasar a través de C-18, utilizando un gradiente de mezcla $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ como fase móvil. En el espectro de RMN del compuesto **9** (figura 34) se observa la aparición de 2 señales en torno a 2,5 ppm, correspondientes a los protones alifáticos de la cadena carbonada proveniente del succínico. También se aprecia la aparición de una segunda señal de protón de grupo amida a 7,66 ppm. El espectro de masas (+)-ESI de alta resolución confirmó la obtención del compuesto al mostrar el ion $[\text{M}+\text{Na}]^+$ a m/z 587,2358 (masa calculada para $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}$: 587,2363).

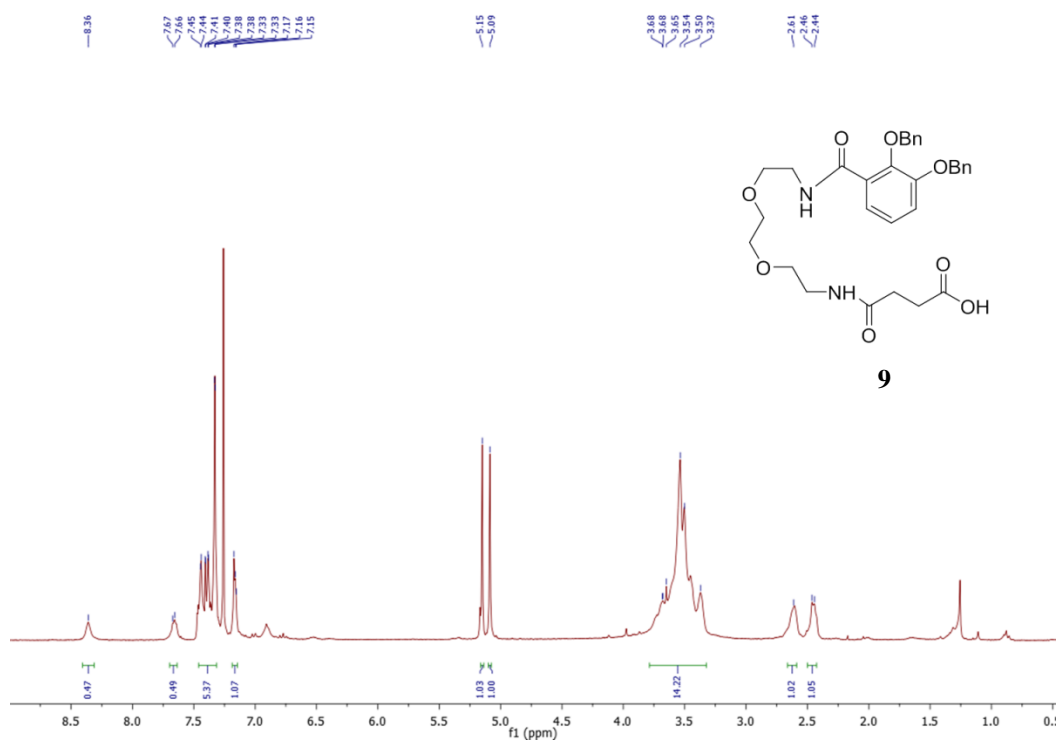


Figura 34 Espectro de ^1H -RMN del compuesto **9**

A continuación, se realizó la desprotección de los hidroxilos fenólicos. Para ello, se realizó una hidrogenación catalítica en una disolución en MeOH del compuesto **9**. En este paso sintético se ha obtenido un resultado diferente al esperado, debido a que para completarse totalmente la desprotección de los dos hidroxilos se requiere un tiempo de reacción largo, de al menos 24 h. Sin embargo, los tiempos largos de reacción favorecen la formación del éster metílico. Esta estructura se deduce a partir de la aparición de una señal característica a 52 ppm en el espectro de ^{13}C -RMN (figura 35). El espectro de masas (-)-ESI de baja resolución confirmó la obtención del éster metílico al mostrar el ion $[\text{M}-\text{H}]^-$ a m/z 397,16 (masa calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_8$: 397,17).

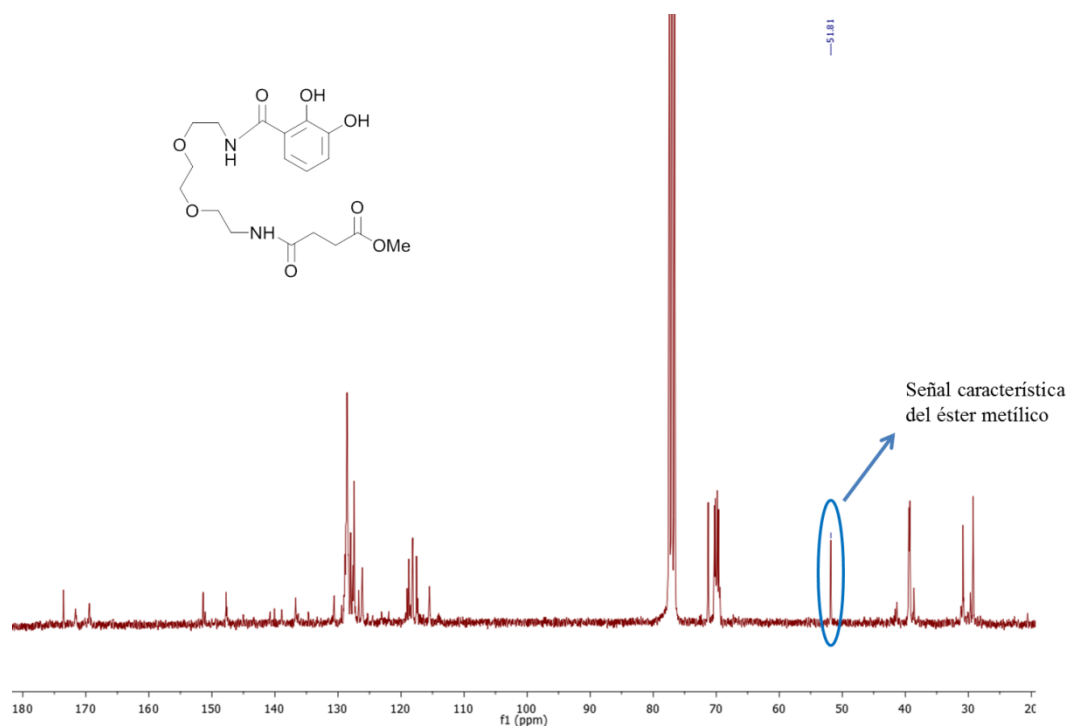


Figura 35 Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **10** en forma de éster metílico

Se han probado diferentes tiempos de reacción y la adición de ácido acético al medio de reacción, pero no se ha logrado modificar el resultado. Por tanto, se plantea realizar en el futuro una etapa sintética que implica la saponificación del éster. Posteriormente, se realizará la quelatación del fragmento con $\text{Fe}(\text{acac})_3$, completando así la ruta sintética diseñada, y se procederá a realizar el acoplamiento con $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2 @\text{APTES}$.

CONCLUSIONES

Continuando con el trabajo iniciado hace meses en nuestro grupo de investigación, en el presente Trabajo Fin de Máster se han preparado nuevos conjugados de sideróforos con nanopartículas magnéticas (MNP), evaluando su posible aplicación en la detección de patógenos bacterianos. De acuerdo con los objetivos concretos propuestos, las conclusiones a las que se ha llegado son:

- 1) Se sintetizó un conjugado MNP-ferrioxamina con una cubierta de sílice mesoporosa, y se caracterizó por las técnicas de difracción de rayos X de polvo, TEM, ATG, FTIR-ATR, y medidas de magnetización. Se ha probado su efectividad en ensayos bacterianos, demostrando ser menos específico que el conjugado con cubierta de sílice normal. En comparación con éstas, sus propiedades magnéticas apenas variaron, pero sí presentan mayor tendencia a aglomerarse.
- 2) Se sintetizaron MNP con cubierta de sílice normal y funcionalizadas con grupos amino, y se avanzó varias etapas en la ruta sintética diseñada para el fragmento que contiene un grupo catecol. Será necesario realizar una etapa adicional a las previstas inicialmente para poder completar esta ruta.

Continuando co traballo iniciado fai meses no noso grupo de investigación, no presente Traballo Fin de Máster preparáronse novos conxugados de sideróforos con nanopartículas magnéticas (MNP), avaliando a súa posible aplicación na detección de patóxenos bacterianos. De acordo cos obxectivos concretos propostos, as conclusións ás que se chegou son:

- 1) Sintetizouse un conxugado MNP-ferrioxamina cunha cuberta de sílice mesoporosa, e caracterizouse polas técnicas de difracción de raios X de po, TEM, ATG, FTIR-ATR, e medidas de magnetización. Probouse á seu efectividade en ensaios bacterianos, demostrando ser menos específico que o conxugado con cuberta de sílice normal. En comparación con estas, as súas propiedades magnéticas apenas variaron, pero si presentan maior tendencia a aglomerarse.
- 2) Sintetizáronse MNP con cuberta de sílice normal e funcionalizadas con grupos amino, e avanzouse varias etapas na ruta sintética deseñada para o fragmento que contén un grupo catecol. Será necesario realizar unha etapa adicional ás previstas inicialmente para poder completar esta ruta.

Continuing with the work initiated months ago in our research group, the present work has accomplished the preparation of new siderophore-magnetic nanoparticles (MNP) conjugates, evaluating its possible application in pathogen detection. According to the specific proposed objectives, the conclusions have been reached are:

- 1) It has been synthesized a ferrioxamine-MNP conjugate with a mesoporous silica coating, and it has been characterized by XRPD, TEM, ATG, FTIR-ATR, and magnetic measurements. It has been proved its effectiveness in bacterial culture essays, proving to be less specific than the normal silica coated conjugate. Magnetic properties barely change, but present more propensity to agglomerate.
- 2) It has been synthesized MNP with normal silica coating and functionalized with amine groups, and progress was made in the synthetic route designed for the fragment containing a catechol. It will be necessary to make an additional step to complete this route.

BIBLIOGRAFÍA

Referencias bibliográficas:

- (1) L. E. Smart, E. A. M. *Solid State Chemistry: An Introduction*, 2005th ed.; Francis, T. & Ed.
- (2) Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Vander Elst, L.; Muller, R. N. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2064–2110.
- (3) Morales, M. P.; Veintemillas-Verdaguer, S.; Montero, M. I.; Serna, C. J.; Roig, A.; Casas, L.; Martínez, B.; Sandiumenge, F. *Chem. Mater.* **1999**, *11*, 3058–3064.
- (4) Grootendorst, D. J.; Jose, J.; Fratila, R. M.; Visscher, M.; Velders, A. H.; Ten Haken, B.; Van Leeuwen, T. G.; Steenbergen, W.; Manohar, S.; Ruers, T. J. M. *Contrast Media Mol. Imaging* **2013**, *8*, 83–91.
- (5) Gupta, A. K.; Gupta, M. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3995–4021.
- (6) Pinna, N.; Grancharov, S.; Beato, P.; Bonville, P.; Antonietti, M.; Niederberger, M. *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 3044–3049.
- (7) Niederberger, M.; Garnweitner, G. *Chem. - A Eur. J.* **2006**, *12*, 7282–7302.
- (8) Bohara, R. A.; Thorat, N. D.; Pawar, S. H. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 43989–44012.
- (9) Kim, J.; Kim, H. S.; Lee, N.; Kim, T.; Kim, H.; Yu, T.; Song, I. C.; Moon, W. K.; Hyeon, T. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47*, 8438–8441.
- (10) Zhang, J.; Rana, S.; Srivastava, R. S.; Misra, R. D. K. *Acta Biomater.* **2008**, *4*, 40–48.
- (11) Bhaisare, M. L.; Gedda, G.; Khan, M. S.; Wu, H.-F. *Anal. Chim. Acta* **2016**, 1–9.
- (12) Raymond, K. N.; Dertz, E. a; Kim, S. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 3584–3588.
- (13) Wandersman, C.; Delepelaire, P. *Annu. Rev. Microbiol.* **2004**, *58*, 611–647.
- (14) Lankford, C. E.; Byers, B. R. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **1973**, *2*, 273–331.
- (15) Crosa, J. H.; Walsh, C. T. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2002**, *66*, 223–249.
- (16) Schalk, I. J.; Hannauer, M.; Braud, A. *Environ. Microbiol.* **2011**, *13*, 2844–2854.
- (17) Zheng, T.; Nolan, E. M. *Metallomics* **2012**, *4*, 866–880.
- (18) Miethke, M.; Marahiel, M. A. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2007**, *71*, 413–451.
- (19) Palanché, T.; Marmolle, F.; Abdallah, M. A.; Shanzer, A. *JBIC*, **1999**, *4*, 188–198.
- (20) Ye, Y.; Bloch, S.; Xu, B.; Achilefu, S. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 225–234.

-
- (21) Inomata, T.; Tanabashi, H.; Funahashi, Y.; Ozawa, T.; Masuda, H. *Dalton Trans.* **2013**, 42, 16043–16048.
- (22) Porter, J. R. *Bacteriol. Rev.* **1976**, 40, 260–269.
- (23) Nadkarni, M.; Martin, F. E.; Jacques, N. A.; Hunter, N. *Microbiology* **2002**, 148, 257–266.
- (24) Veal, D. A.; Deere, D.; Ferrari, B.; Piper, J.; Attfield, P. V. *J. Immunol. Methods* **2000**, 243, 191–210.
- (25) Walter, J.; Hertel, C.; Tannock, G. W.; Lis, C. M.; Munro, K.; Hammes, W. P. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, 67, 2578–2585.
- (26) Rodicio, R. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2016**, 22, 238–245.
- (27) Bou, G.; Fernández-olmos, A.; García, C.; Antonio, J.; Valdezate, S. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2016**, 29, 601–608.
- (28) Jordana-Lluch, E.; Martró Català, E.; Ausina Ruiz, V. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2012**, 30, 635–644.
- (29) Chan, S.; Horner, S. R.; Fauchet, P. M.; Miller, B. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 11797–11798.
- (30) Duan, N.; Gong, W.; Wang, Z.; Wu, S. *Anal. Methods* **2016**, 8, 1390–1395.
- (31) Wang, Q.-Y.; Kang, Y.-J. *Nanoscale Res. Lett.* **2016**, 1, 1–9.
- (32) El-boubbou, K.; Gruden, C.; Huang, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 1–26.
- (33) Zhan, S.; Yang, Y.; Shen, Z.; Shan, J.; Li, Y.; Yang, S.; Zhu, D. *J. Hazard. Mater.* **2014**, 274, 115–123.
- (34) Jin, Y.; Deng, J.; Liang, J.; Shan, C.; Tong, M. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2015**, 136, 659–665.
- (35) MATCH! Versión 1.10, Brandenburg, K. and Putz, H., University of Bonn (2010)
- (36) Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E. *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, 26, 62–69.
- (37) Cai, Q.; Luo, Z. S.; Pang, W. Q.; Fan, Y. W.; Chen, X. H.; Cui, F. Z. *Chem. Mater.* **2001**, 13, 258–263.
- (38) Xiaowang Liu, Qiyan Hu, Zhen Fang, X. Z.; Zhang, B. *Langmuir* **2009**, 2, 3–8.

ANEXOS

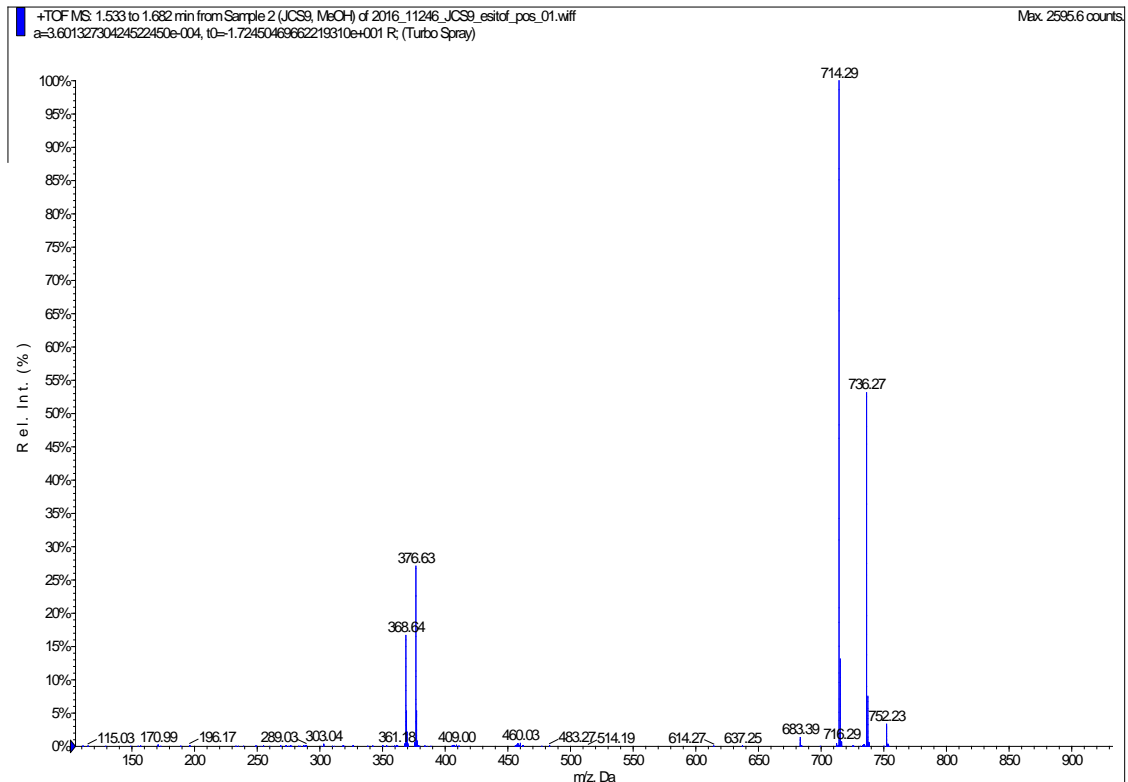


Figura 18 Espectro de masas (+)-ESI de baja resolución de 4

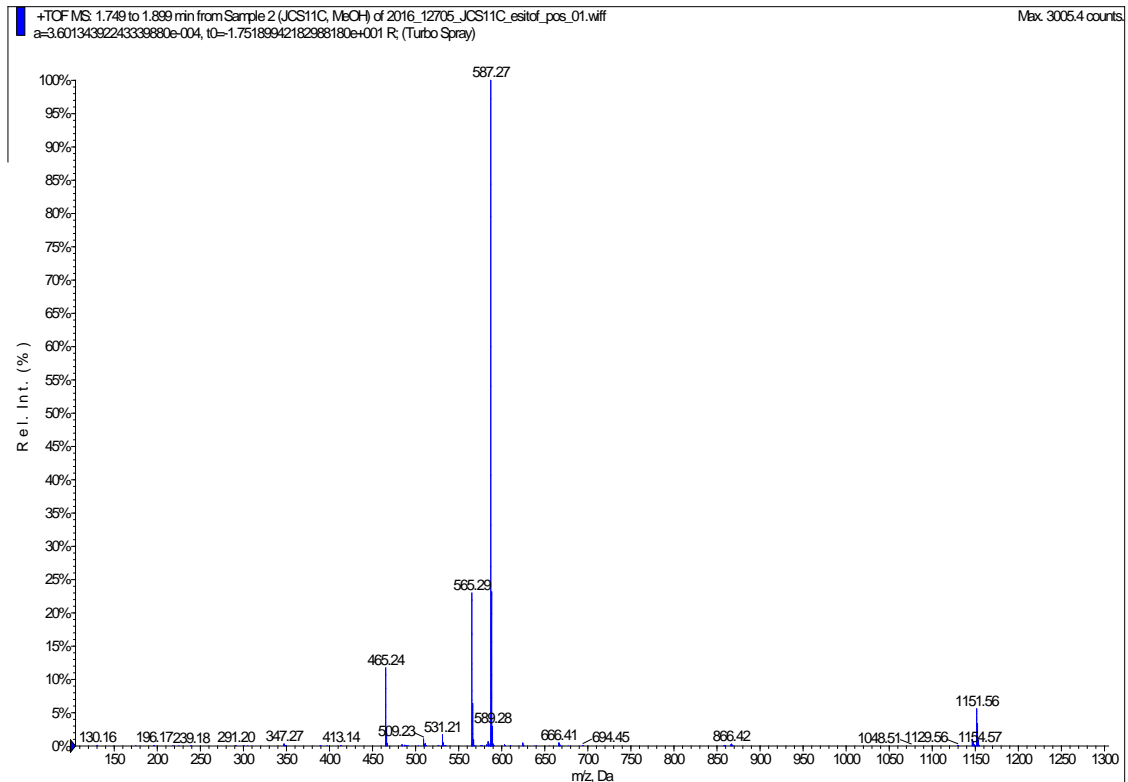


Figura 19 Espectro de masas (+)-ESI de baja resolución de 7

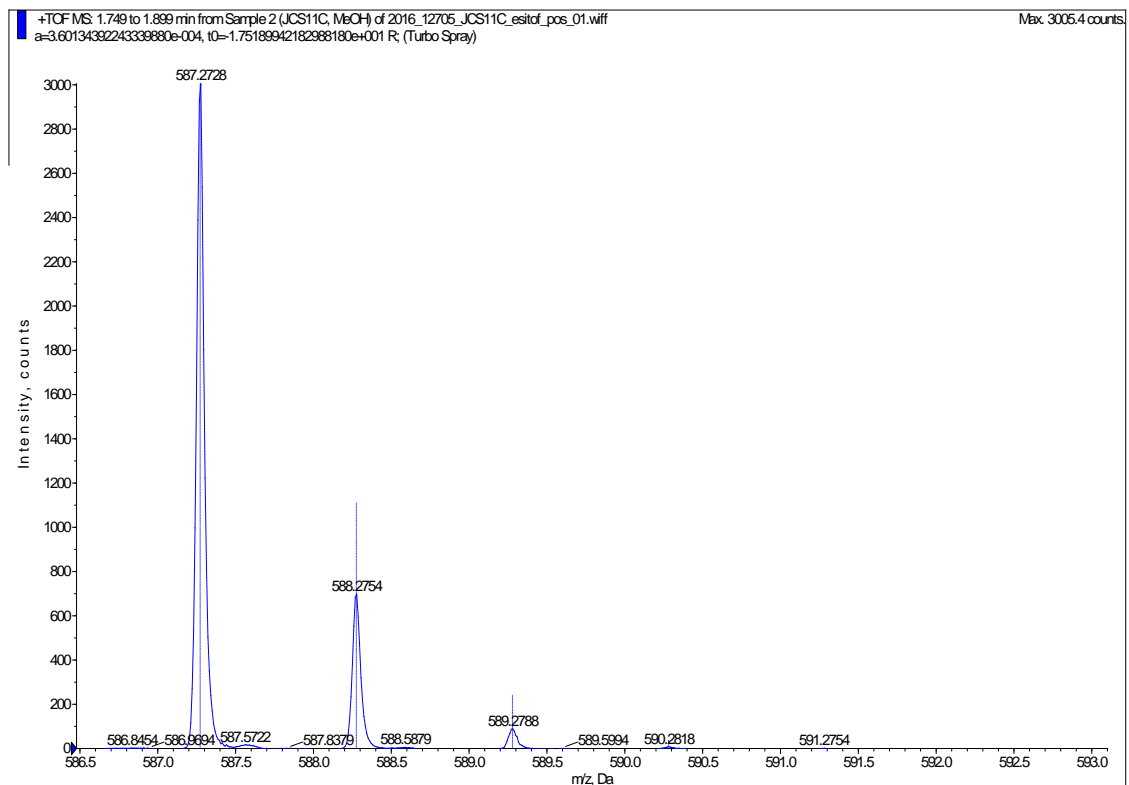


Figura 20 Espectro de masas (+)-ESI de alta resolución de 7

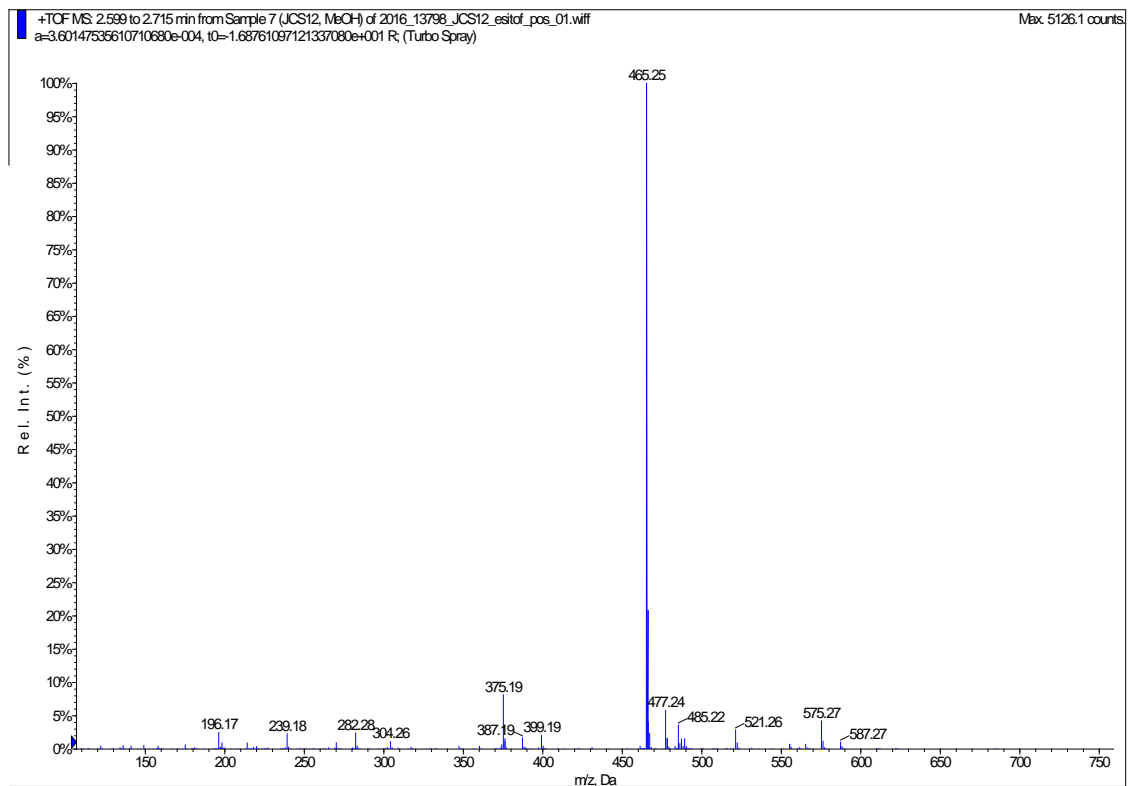


Figura 21 Espectro de masas (+)-ESI de baja resolución de 8

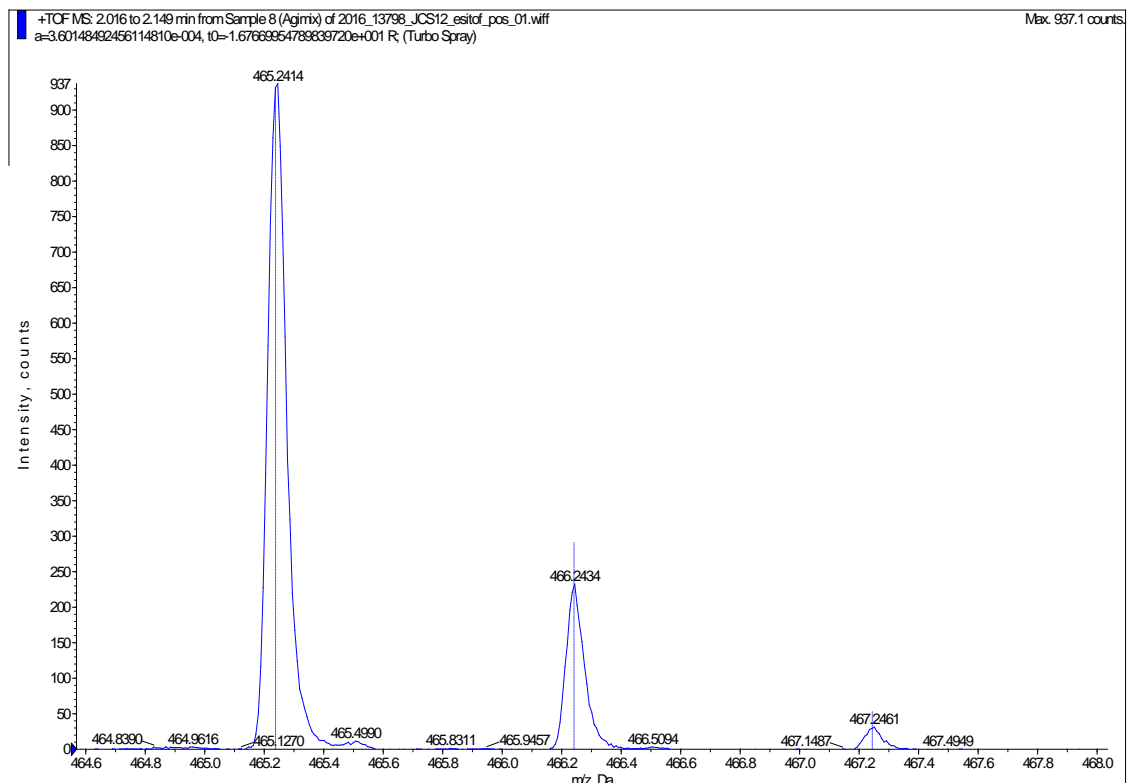


Figura 22 Espectro de masas (+)-ESI de alta resolución de **8**

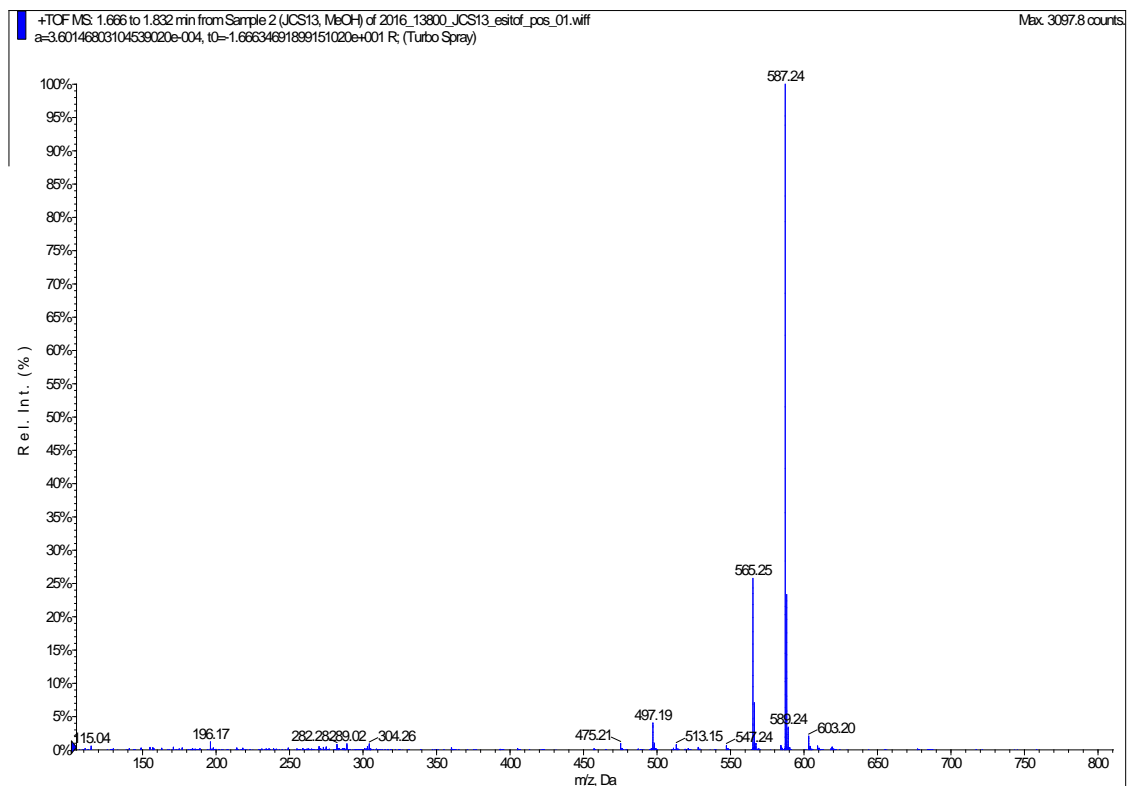


Figura 23 Espectro de masas (+)-ESI de baja resolución de **9**

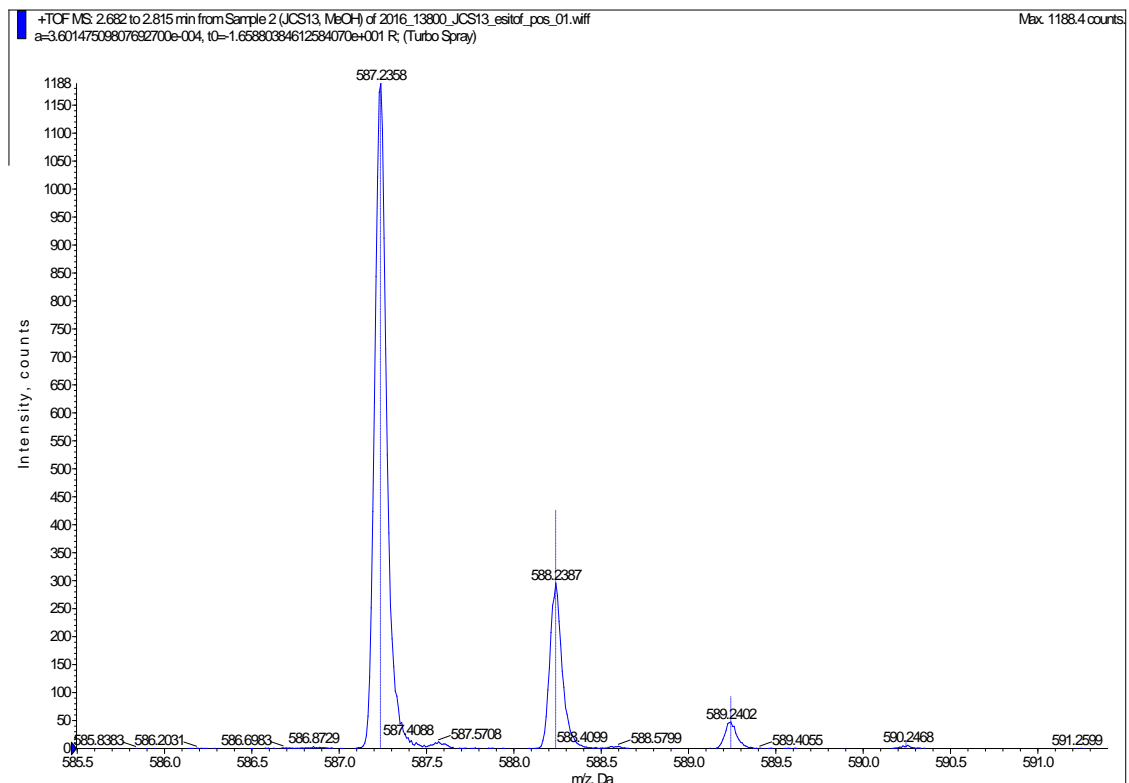


Figura 24 Espectro de masas (+)-ESI de alta resolución de **9**

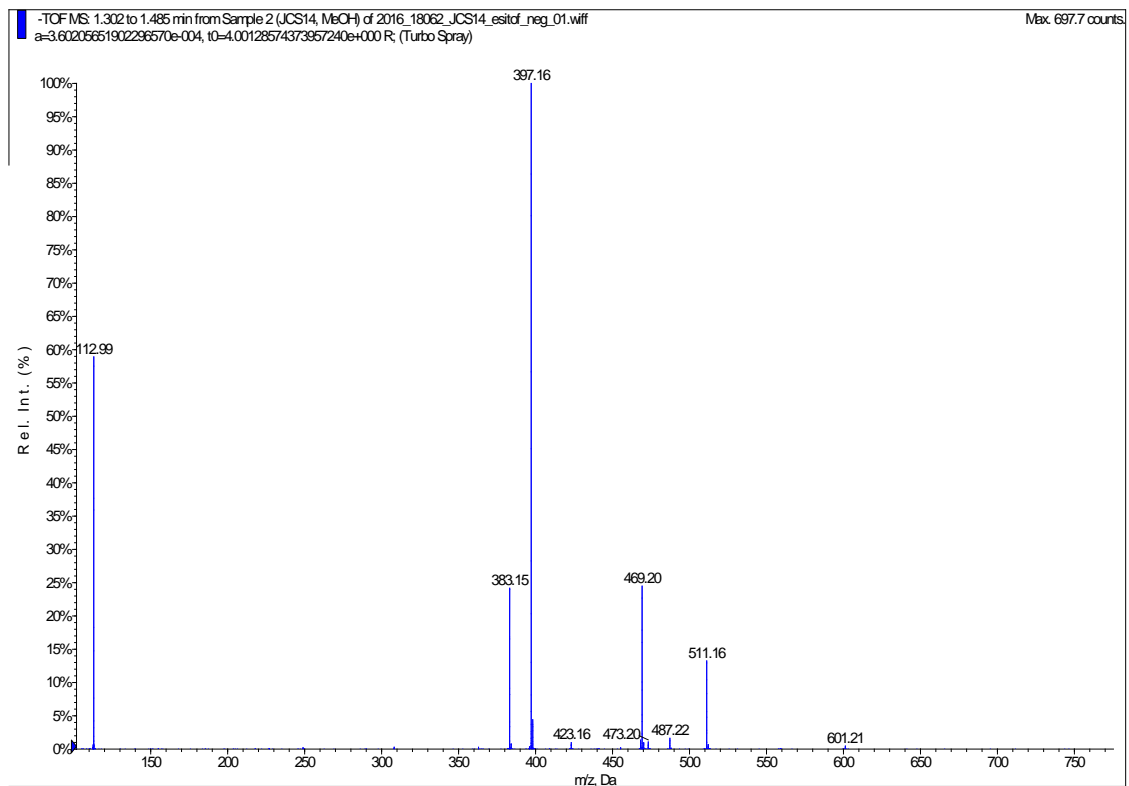


Figura 25 Espectro de masas (-)-ESI de baja resolución de **10** en forma de éster metílico