



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



CICA | CENTRO DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS AVANZADAS

Facultad de Ciencias

Grado en Química

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Preparación de nanopartículas de plata conjugadas con sideróforos
y evaluación de su aplicación en la detección bacteriana.

Preparación de nanopartículas de prata conxugadas con sideróforos
e avaliación da súa aplicación na detección bacteriana.

Preparation of silver nanoparticles conjugated with siderophores and
evaluation of their application in bacterial detection.

Directores: Carlos Jiménez González

Elena Pazos Chantrero

Alba Mallo Rey

Curso 2017/2018. Convocatoria de Junio

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	5
<i>Las bacterias</i>	6
<i>Hierro</i>	7
<i>Sideróforos</i>	8
<i>Nanopartículas</i>	12
ANTECEDENTES	16
OBJETIVO	19
PARTE EXPERIMENTAL	21
<i>Metodología general</i>	22
<i>Síntesis de nanopartículas de plata</i>	22
<i>Preparación del conjugado de AgNPs y deferoxamina</i>	23
<i>Preparación del conjugado de AgNPs y feroxamina</i>	25
<i>Preparación del conjugado de AgNPs con feroxamina y espaciador</i>	26
<i>Cultivo de bacterias</i>	30
<i>Detección bacteriana</i>	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
<i>Síntesis de nanopartículas de plata</i>	32
<i>Preparación de los ligandos</i>	37
<i>Conjugación de los ligandos a las AgNPs</i>	44
<i>Detección bacteriana</i>	50
CONCLUSIONES	52
BIBLIOGRAFÍA	54
ANEXOS	58

ABREVIATURAS

AgNPs	Nanopartículas de plata
DFO	Deferoxamina
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
ELISA	Ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas
ESI	Ionización por electrospray
FO	Feroxamina
h	Horas
MET	Microscopia Electrónica de Transmisión
mg	Miligramo
MHz	Megahercio
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
MS	Espectrometría de masas
m/z	Relación masa/carga
nm	Nanómetro
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pM	Picomolar
ppm	Partes por millón
QCM	Microbalanza de cristal de cuarzo
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
TFA	Ácido trifluoroacético
UFC	Unidad Formadora de Colonias
UV-Vis	Espectroscopia Ultravioleta-Visible
μM	Micromolar
μmol	Micromol

RESUMEN

RESUMEN

Palabras clave: sideróforos, nanopartículas, detección bacteriana.

La adquisición de hierro por parte de las bacterias es un proceso fundamental para la vida de éstas. En su interior, las bacterias biosintetizan sideróforos, agentes quelantes de bajo peso molecular, que presentan gran afinidad por el Fe (III). Los sideróforos son expulsados al medio para captar el hierro formando complejos hierro-sideróforo y posteriormente la célula los transporta a su interior mediante receptores de membrana específicos para cada sideróforo. Aprovechando la interacción entre el complejo hierro-sideróforo y las proteínas receptoras de membrana se pretende desarrollar un nuevo método de detección de bacterias. Para ello se plantea la síntesis de conjugados de nanopartículas de plata (AgNPs) y sideróforos empleando espaciadores, con el fin de conseguir un método sencillo de detección de bacterias.

Este trabajo se dividió en tres partes. En primer lugar, se realizó la síntesis de nanopartículas de plata y de determinados sideróforos unidos a espaciadores. Posteriormente, se realizó la conjugación de ambas partes para obtener un conjugado AgNPs-espaciador-sideróforo representado en la *Figura 1* y, por último, la realización de ensayos de detección bacteriana.

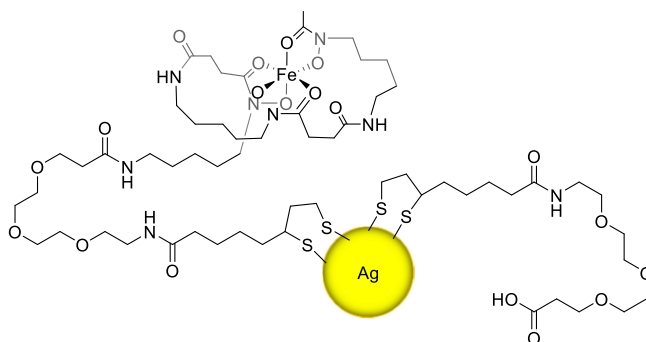


Figura 1 Conjugado nanopartícula-espaciador-sideróforo

Las AgNPs se caracterizaron mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) y espectroscopia UV-Vis, mientras que los sideróforos se caracterizaron mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón, carbono y técnicas de espectrometría de masas. Los ensayos de detección bacteriana se siguieron mediante espectroscopia UV-Vis.

RESUMO

Palabras chave: sideróforos, nanopartículas, detección bacteriana.

A adquisición de ferro por parte das bacterias é un proceso fundamental para a vida destas. No seu interior, as bacterias biosintetizan sideróforos, axentes quelantes de baixo peso molecular, que teñen unha gran afinidade polo Fe (III). Os sideróforos son expulsados ao medio para capturar o ferro formando os complexos ferro-sideróforos e, posteriormente, a célula transpórtaos ao seu interior a través de receptores de membrana específicos para cada sideróforo. Aproveitando a interacción entre o complexo ferro-sideróforo e as proteínas receptoras de membrana preténdese desenvolver un novo método para a detección de bacterias. Para iso, propónse a síntese de conxugados de nanopartículas de prata (AgNPs) e sideróforos empregando espazadores, para lograr un método sinxelo de detección bacteriana.

Este traballo dividiuse en tres partes. En primeiro lugar, realizouse a síntese de nanopartículas de prata e certos sideróforos unidos aos espazadores. Posteriormente, realizouse a conxugación de ambas partes para obter un conxugado AgNPs-espazador-sideróforo representado na *Figura 1* e, finalmente, o desempeño dos ensaios de detección bacteriana.

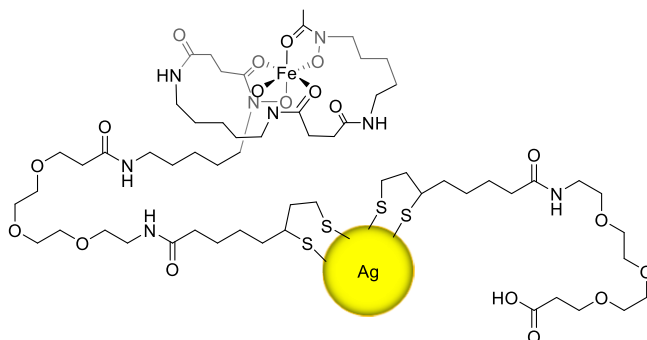


Figura 1 Conxugado de nanopartículas-espazador-sideróforo

As AgNPs caracterizándose mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) e espectroscopia UV-Vis, mentres que os sideróforos foron caracterizados por técnicas de espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón, carbono e técnicas de espectrometría de masas. Os ensaios de detección bacteriana foron seguidos mediante espectroscopia UV-Vis.

SUMMARY

Key words: siderophore, nanoparticles, bacterial detection.

The acquisition of iron by bacteria is a fundamental process for their life. Inside, bacteria biosynthesize siderophores, low molecular weight chelating agents, which have a high affinity for Fe (III). The siderophores are expelled to the medium to capture iron, forming iron-siderophore complexes and subsequently the cell transports them to the interior through specific membrane receptors for each siderophore. Taking advantage of the iron-siderophore complex and bacterial receptors interaction, we aim to develop a new method for the detection of bacteria. For this, we propose the synthesis of conjugates made of silver nanoparticles (AgNPs) and siderophores connected through a spacer is proposed, in order to achieve a simple method for bacterial detection.

This work was divided into three parts. The first one involves the synthesis of silver nanoparticles and certain siderophores modified with spacers. Subsequently, conjugation of both parts was performed to obtain the conjugate AgNPs-spacer-siderophore represented in *Figure 1* and, finally, the implementation of bacterial detection tests.

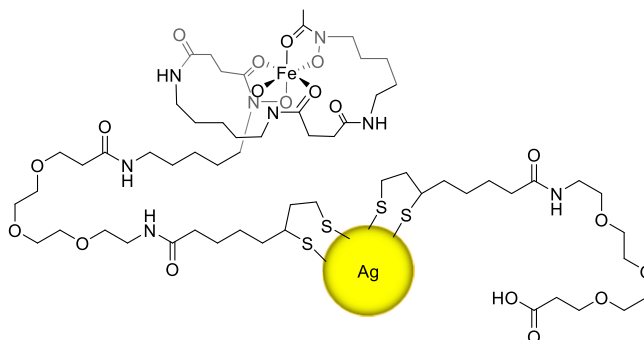


Figure 1 Nanoparticle-spacer-siderophore conjugate

AgNPs were characterized by Transmission Electron Microscopy (TEM) and UV-Vis spectroscopy, while the siderophores were characterized by proton and carbon nuclear magnetic resonance spectroscopy, and mass spectrometry. Bacterial detection assays were followed by UV-Vis spectroscopy.

INTRODUCCIÓN

1. Las bacterias

Las bacterias son los organismos vivos más abundantes. Se trata de unos microorganismos unicelulares procariontes, por lo que carecen de núcleo u orgánulos internos. Se pueden clasificar en base a su forma, ya que pueden tener forma de barra (bacilos), de esfera (cocos), de hélice (espirilos) o presentar filamentos (leptothrix). Otro método de clasificación es en base a su respiración. Las bacterias aerobias hacen uso del oxígeno, mientras que las anaerobias emplean otros elementos como por ejemplo el carbonato. Un gran número de bacterias son inocuas y/o beneficiosas, mientras que otras se comportan como microorganismos patógenos, y por tanto es necesario identificarlas para poder tratar las enfermedades que estas generan. Las bacterias causan algunas de las enfermedades más importantes, así como otras de menor gravedad.¹

La bacteria sobre la que se realizará la investigación será *Yersinia enterocolítica* (cepa WCA). El género *Yersinia* contiene tres especies de importancia médica: *Y. pestis*, el agente de la peste bubónica y neumónica, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolítica*, los cuales pueden resultar en gastroenteritis severa, con formación local de abscesos y muerte como resultado de peritonitis.²

1.1. Detección bacteriana

La identificación y caracterización rápida de patógenos bacterianos es importante para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, para la detección de agentes causantes de enfermedades en el suministro de alimentos y el medio ambiente, y para la prevención de actividades bioterroristas. El desarrollo de sensores fiables para la identificación rápida y precisa de patógenos es, por lo tanto, una alta prioridad desde la perspectiva de la salud pública y la seguridad. Idealmente, los ensayos de detección de patógenos deberían ser fáciles y rápidos de realizar, suficientemente sensibles para detectar patógenos a su dosis infecciosa o por debajo de ella, lo suficientemente robustos para su transporte y uso bajo condiciones duras, y adecuadamente económicos para su uso en países del tercer mundo.³

La realización de cultivos bacterianos⁴ sigue siendo una de las técnicas más empleadas para detección de bacterias. Sin embargo, las bacterias solo pueden cultivarse si sus requisitos metabólicos y fisiológicos pueden reproducirse *in vitro*. Estas técnicas pueden tardar varios días en producir un resultado y, por lo tanto, son inapropiadas en situaciones donde se requieren decisiones de diagnóstico rápidas. Cuando se

INTRODUCCIÓN

investigan comunidades microbianas complejas, como la variedad de hábitats microbianos en la cavidad oral, enumerar bacterias por técnicas de cultivo microbiano tradicional también puede producir resultados erróneos.⁵ Por ello, en los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas de detección bacteriana.

Algunas de las técnicas de detección bacteriana que cumplen con algunos de estos los requisitos son inmunoensayos⁶, resonancia de plasmones de superficie⁷, análisis de microbalanza de cristal de cuarzo (QCM)⁸, ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)⁹. Aunque cada uno de los métodos mencionados tiene ventajas, también tienen limitaciones. Por ejemplo, las tecnologías tradicionales de cultivo de bacterias requieren varios días para los resultados finales. Por el contrario, la PCR puede verse comprometida por contaminantes en la muestra analizada, la presencia de bacterias muertas sin relevancia para cuestiones de seguridad y la necesidad de una costosa instrumentación.³

2. Hierro

El hierro es el segundo metal más abundante en la corteza terrestre, en competencia con el aluminio, y es un elemento esencial para muchos organismos. Debido a la estructura electrónica de este, $[Ar]3d^64s^2$, el hierro existe en múltiples estados de oxidación. Las formas más comunes son Fe^{+2} y Fe^{+3} , aunque puede existir en estados de oxidación entre -2 y +6. En condiciones anóxicas, el hierro se encuentra en estado de oxidación +2 y es soluble. Sin embargo, en condiciones aeróbicas suele estar en estado de oxidación +3 y forma hidróxido férrico.¹⁰ Dependiendo del ligando que se encuentre en su entorno, se puede acceder tanto a los estados de alto espín como de bajo espín para ambos estados de oxidación.

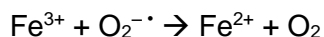
Debido a la amplia gama de potenciales redox que presentan los complejos de hierro, hace que éste se comporte como dador o aceptor de electrones, lo que permite que las unidades que contienen hierro cumplan una variedad de funciones biológicas clave en procesos de transferencia de electrones y catálisis.¹¹

2.1. Regulación del hierro

La regulación del hierro es fundamental para la supervivencia y la función en casi todas las células vivas. La deficiencia puede comprometer los procesos celulares vitales, tales como la respiración y la síntesis de aminoácidos, mientras que un exceso de hierro libre puede causar toxicidad a través de la producción de especies reactivas de oxígeno. Los

INTRODUCCIÓN

radicales dañinos se pueden generar a través de la química tipo Fenton representado en el *Esquema 1*:



Esquema 1 Generación de radicales vía química de Fenton

Mientras que los mamíferos pueden obtener hierro a través de la dieta, las bacterias deben adquirir hierro directamente de su entorno. El hierro (II) es soluble en medios biológicos acuosos y puede absorberse fácilmente a través de membranas biológicas mediante mecanismos de captación pasiva. Sin embargo, los niveles de hierro disponibles son comúnmente bajos, debido a la inestabilidad del hierro ferroso en condiciones aeróbicas oxidantes y la insolubilidad acuosa del hierro férrico (III). Debido a la escasez de hierro (II) en ambientes aeróbicos, el hierro (III) también debe ser utilizado por bacterias para mantener las concentraciones adecuadas de hierro celular para su supervivencia. El hierro (III), debido a su insolubilidad, requiere el uso de ligandos quelantes solubilizantes.¹¹

3. Sideróforos

Los sideróforos son compuestos quelantes de hierro de bajo peso molecular, producidos y exportados por las bacterias, hongos y plantas en condiciones deficientes de hierro ¹¹ que poseen una mayor afinidad por el hierro (III) que por el hierro (II). Hay una buena lógica para esta selectividad; mientras que es difícil diseñar ligandos que sean selectivos para el hierro (II) sobre los dicaciones biológicamente importantes como zinc (II), cobre (II), níquel (II) y manganeso (II), con hierro (III) el problema es más simple ya que no hay muchos cationes tripositivos biológicamente importantes salvo el Co (III), que es cinéticamente inerte.¹² Los complejos resultantes de sideróforos de hierro son capturados por las bacterias por receptores de membranas específicos.¹³

3.1. Biosíntesis de sideróforos

La biosíntesis de sideróforos en bacterias está regulada tanto por la cantidad de hierro presente en el medio ambiente como por la cantidad de hierro ya adquirida por la bacteria. Los metales distintos del hierro también pueden estimular o inhibir la producción de sideróforos en varias bacterias, incluso en presencia de altas concentraciones de hierro. Sin embargo, aún no está claro cómo otros metales

INTRODUCCIÓN

estimulan la producción de sideróforos. Una posible explicación es que la concentración de sideróforo libre en el medio se reduce en presencia de otros metales como resultado de la formación del complejo. Dicha disminución en la concentración de sideróforo puede ser suficiente para activar la secreción de sideróforo adicional en el medio.¹⁴

3.2. Tipos de sideróforos

Los primeros ejemplos de extracción e identificación de complejos de hierro-sideróforo naturales se describieron a principios de la década de 1950. Los primeros sideróforos se identificaron como factores de crecimiento para los organismos de los que se obtuvieron e incluían micobactinas (*Figura 2*) y desferricromo (*Figura 3*).

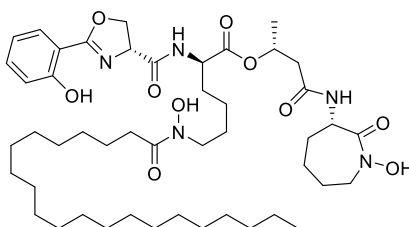


Figura 2. Estructura de micobactina T. lipofíllica

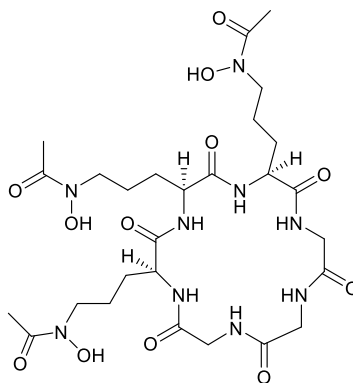


Figura 3. Estructura de desferricromo

Los ensayos estándar de identificación de sideróforos se desarrollaron en la década de 1980 como un requisito para el estudio de los sistemas bacterianos de absorción de hierro. Actualmente, se conocen más de 500 sideróforos distintos. Los sideróforos se pueden agrupar por unidades quelantes comunes, por sus orígenes, como especies bacterianas, fúngicas o vegetales, o por la disposición de sus átomos dadores coordinadores.

INTRODUCCIÓN

En general, los sideróforos bacterianos tienden a contener unidades de catecol para la fijación de hierro, mientras que los sideróforos fúngicos contienen unidades de unión de hierro hidroxamato. También se conocen derivados de carboxilatos y citrato (α -hidroxicarboxilato), cuyas estructuras se muestran en la *Figura 4*:

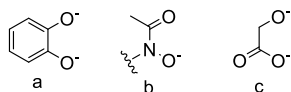


Figura 4. Unidades comunes de quelatantes de sideróforos. a) catecolato, b) hidroxamato y c) α -hidroxicarboxilato

3.3. Complejos hierro-sideróforo

Los átomos dadores con mayor afinidad por el hierro (III) son los átomos de oxígeno con carga negativa; por lo que cuanto mayor sea la carga en el oxígeno, más fuerte será la interacción. Por ello, las unidades comunes de quelatantes de sideróforos mencionados anteriormente contienen dadores duros, con átomos de oxígeno cargados negativamente, para cumplir los requisitos de unión del hierro (III), un ácido de Lewis duro.¹¹ Los sideróforos tienden a usar oxígenos cargados como átomos dadores y la geometría más común es octaédrica, lo que permite que se organicen seis ligandos alrededor del centro de hierro con una cantidad mínima de repulsión de ligando. El campo octaédrico favorece la formación de las especies termodinámicamente estables de hierro de alto espín (III). Dependiendo del sideróforo, el campo octaédrico puede estar distorsionado y, a veces, el nitrógeno o el azufre se incluyen como átomos dadores. Tales modificaciones tienden a reducir la afinidad por el hierro (III).¹³

La deferoxamina (*Figura 5*) es un sideróforo de hidroxamato lineal producido por varias especies bacterianas, que se utiliza para eliminar el exceso de hierro en la sangre en el tratamiento de pacientes que sufren de β -talasemia o envenenamiento agudo por hierro y recientemente se ha probado como un inhibidor del crecimiento del biofilm bacteriano.

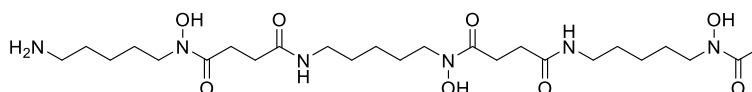


Figura 5. Estructura de la deferoxamina (DFO)

La estructura de DFO se caracteriza por una cadena que incluye tres grupos hidroxamato, con una amina libre terminal. Cuando DFO se quelata a un ion Fe (III), se forman dos circuitos cerrados y una cadena abierta que contiene la amina protonada.

INTRODUCCIÓN

Los seis átomos de oxígeno de hidroxamato coordinados al centro de Fe (III) forman una octava distorsión alrededor del centro metálico.¹⁵ Este ligando recibe el nombre de feroxamina (*Figura 6*) y el receptor de membrana específico de este sideróforo es común a distintos tipos de bacterias.

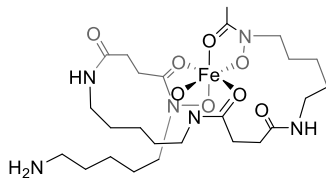


Figura 6 Estructura de la feroxamina (FO)

Una vez biosintetizados los sideróforos se secretan fuera de las células bacterianas, uniéndose a los iones Fe^{3+} para formar un complejo hierro-sideróforo. Este es luego internalizado por el mecanismo de transporte apropiado.¹⁶ Este mecanismo de introducción del complejo hierro-sideróforo varía según el tipo de bacteria. En el caso de las bacterias gram-negativas, como podemos observar en la *Figura 7*, los receptores situados en la membrana externa reconocen y transportan el complejo hacia dentro del periplasma, donde son reconocidos y unidos a sistemas de transporte que los introduce en el citoplasma. El hierro se libera en el citoplasma mediante mecanismos que implican degradación enzimática o modificación química del sideróforo y/o reducción del hierro, aunque también se puede liberar del sideróforo en el periplasma. En el interior del citoplasma, el Fe(III) puede desquelatarse por dos 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) . En el caso de las bacterias gram-positivas, al carecer de membrana externa y zona periplasmática, el proceso implica únicamente un sistema de transporte activo.^{14,17}

INTRODUCCIÓN

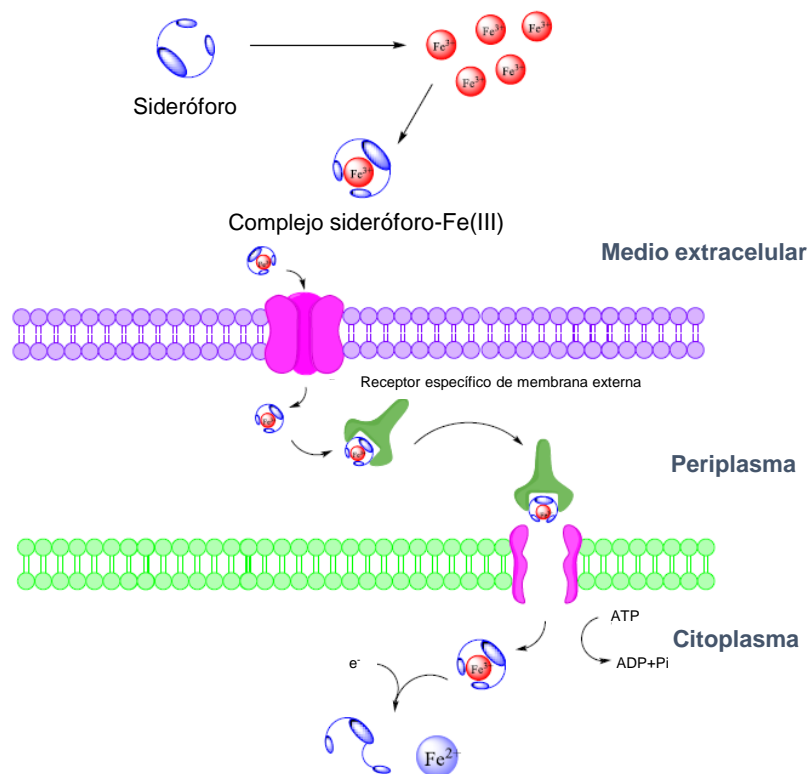


Figura 7. Mecanismo de captación de Fe(III) en bacterias gram-negativas mediante sideróforos¹⁷

3.4. Usos y aplicaciones de los sideróforos

Un uso medicinal establecido de sideróforos naturales y sintéticos es en el tratamiento de enfermedades por sobrecarga de hierro, incluyendo hemocromatosis y talasemia.¹⁸

Las sondas fluorescentes que incorporan sideróforos que proporcionan respuestas rápidas, selectivas y sensibles al Fe (III) son prometedoras para investigar la absorción de hierro por los organismos que utilizan sideróforos y, más ampliamente, las moléculas de hierro en biología. Las moléculas que proporcionan mejora de fluorescencia con coordinación de Fe (III), proporcionarán información valiosa de amplia relevancia para el campo de detección de iones metálicos y ayudarán al diseño futuro del sensor.¹⁸

4. Nanopartículas

Normalmente se considera nanopartícula a aquellas que tienen una dimensión inferior a 100 nm, aunque ésta no es una definición estricta, ya que en algunos casos se incluyen las que poseen más de 100 nm. Dichas partículas tienen una mayor relación área-volumen que partículas más grandes, lo que afecta a la forma en que reaccionan

INTRODUCCIÓN

entre sí y con otras sustancias. Una nanopartícula de 10 nm de diámetro tiene alrededor del 15% de los átomos en la superficie. En los metales, la luz interactúa con los electrones superficiales y posteriormente se refleja. Sin embargo, para las nanopartículas la luz incidente produce una oscilación colectiva de los electrones de conducción superficiales, conocida como resonancia de plasmón de superficie, y estos plasmones son los responsables de que las nanopartículas absorban y dispersen la luz de manera eficiente, dando lugar a su color característico que depende del tamaño y forma de la partícula. Las frecuencias de oscilación en la región visible solo se observan para Ag, Au, Cu y sus aleaciones, así como los metales del Grupo 1.¹⁹

La popularidad de las nanopartículas de metales nobles como sensores es en parte debido a sus propiedades colorimétricas altamente sensibles debido a su fuerte absorción y dispersión de la luz. En el caso de las nanopartículas de plata (AgNPs), estas propiedades colorimétricas son visualmente y espectroscópicamente detectables en concentraciones más bajas que en las nanopartículas de oro y hay varios estudios que demuestran su uso fácil como biosensores. Su aplicación como biosensores colorimétricos está intrínsecamente vinculado al tamaño de partícula, al estado de agregación, a la eficacia de extinción y a la concentración.²⁰

4.1. Nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata han sido de gran interés como sustratos plasmónicos para detección e imagen, y también como catalizadores o sistemas antimicrobianos.²¹ El uso como agentes antibacterianos ha sido uno de los temas referidos a la nanotecnología más estudiados durante la última década.¹⁵ Sus suspensiones coloidales presentan un color amarillo con una absorbancia intensa alrededor de 400 nm. Este color se debe a la absorción del plasmón superficial que se genera por las oscilaciones de los electrones de la banda de conducción presentes en la superficie metálica que se inducen cuando un haz de luz incide sobre dicha superficie. El plasmón de las nanopartículas es sensible al estado de agregación y forma de éstas.

Recientemente, en un artículo publicado por A. Sadovoy, P. Free y col.²⁰ se investigó la relación entre el diámetro de las AgNPs, la longitud de onda a la cual aparece el máximo de absorbancia y el coeficiente de extinción molar. Se ha elaborado una tabla de datos generalizados para nanopartículas de plata (*Tabla 1*), empleando un experimento de control paralelo de las nanopartículas de oro. Por lo tanto, este enfoque proporciona una manera rápida para estimar el tamaño y la concentración de las nanopartículas de plata esféricas utilizando una tabla generalizada.

INTRODUCCIÓN

Diámetro/nm	λ_{\max} /nm	$\epsilon/M^{-1}\text{cm}^{-1}\cdot 10^8$
10	392,1	5,56
20	400,8	41,8
30	405,6	145
40	412,3	336
50	420,9	537
60	431,5	739
70	443,8	941
80	458,3	1142
90	474,6	1344
100	492,8	1546

Tabla 1 Resumen de los datos simulados para λ_{\max} y coeficiente de extinción molar de varios tamaños de nanopartículas de plata²⁰

Por tanto, si medimos las nanopartículas en el espectrofotómetro UV-Vis obtenemos un máximo de absorbancia, que emplearemos para calcular la concentración de plata en la disolución y estimar su diámetro.²⁰

4.1.1. Síntesis de nanopartículas de plata

Uno de los procedimientos descritos para la síntesis de nanopartículas de plata emplea ácido ascórbico como iniciador de la reducción, junto con citrato de sodio que, a la vez que ejerce de reductor, recubre las nanopartículas de una capa de moléculas que las protege y proporciona estabilidad coloidal, evitando que se agreguen entre ellas.²⁰ Esto es debido a que la nanopartícula de plata tiene una ligera carga positiva en la superficie, que al juntarse con la carga negativa de los oxígenos del citrato, hace que se estabilice. Podrían emplearse otros reductores, pero se emplean el ácido ascórbico y el citrato de sodio por ser sustancias solubles en agua que permiten la obtención de nanopartículas homogéneas. Se emplea sulfato de magnesio para ralentizar la formación de óxido de plata en la superficie de la nanopartícula.

4.2. Caracterización de nanopartículas

Las técnicas más comunes para la caracterización de nanopartículas de plata son la Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) y la espectroscopia UV-Vis.

4.2.1. *Fundamento de la Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)*

Los métodos actuales para determinar la concentración de metal de las nanopartículas requieren conocer el tamaño de estas. Normalmente el diámetro exacto se mide mediante microscopía electrónica de transmisión. La MET se desarrolló debido a la resolución de imagen limitada en microscopios de luz, que se impone por la longitud de onda de la luz visible.²² La microscopía electrónica de transmisión aprovecha los fenómenos físico-atómicos que se producen cuando un haz de electrones suficientemente acelerado colisiona con una muestra delgada convenientemente preparada. Cuando los electrones colisionan con la muestra, en función de su grosor y del tipo de átomos que la forman, parte de ellos son dispersados selectivamente, es decir, unos electrones atraviesan la muestra directamente y otros son totalmente desviados. Todos ellos son conducidos y modulados por unas lentes para formar una imagen final que puede tener miles de aumentos con una definición inalcanzable para cualquier otro instrumento. La información que se obtiene es una imagen con distintas intensidades que se corresponden al grado de dispersión de los electrones incidentes.²³ Un instrumento de MET moderno se compone de un cañón de electrones, lentes magnéticas y uno o varios sistemas de registro de datos.²²

4.2.2. *Fundamento de la espectrofotometría UV-Vis*

La espectroscopia UV-Vis se basa en el proceso de absorción de la radiación ultravioleta-visible (radiación con longitud de onda comprendida entre los 160 y 780 nm) por una molécula. La absorción de esta radiación causa la promoción de un electrón a un estado excitado. Los electrones que se excitan al absorber radiación de esta frecuencia son los electrones de enlace de las moléculas, por lo que los picos de absorción se pueden correlacionar con los distintos tipos de enlace presentes en el compuesto. Debido a ello, la espectroscopia UV-Vis se utiliza para la identificación de los grupos funcionales presentes en una molécula. Las bandas que aparecen en un espectro UV-Vis son anchas debido a la superposición de transiciones vibracionales y electrónicas.²⁴

ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

El uso de cultivos microbianos sigue siendo la técnica más utilizada para identificar bacterias. Sin embargo, el tiempo que requiere esta técnica para proporcionar diagnósticos fiables, generalmente de 24 a 72 horas, es el motivo por el que se ha dedicado un gran esfuerzo al desarrollo de nuevos métodos para la identificación rápida de bacterias.²⁵ En la actualidad ya se cuenta con técnicas alternativas para la detección bacteriana, entre los que cabe mencionar la espectroscopia de masas MALDI-TOF o la PCR combinada con secuenciación.

La identificación bacteriana mediante espectroscopia de masas MALDI-TOF consiste en la obtención del espectro de masas del proteoma del microorganismo, que está fundamentalmente constituido por proteínas ribosomales, y su comparación con bases de datos que contienen el perfil proteico de organismos identificados.²⁶ Sin embargo, el método seguido para la preparación de las muestras o las condiciones de cultivo de los microorganismos pueden afectar al perfil de masas obtenido. Así por ejemplo, el método de cultivo utilizado puede variar el perfil de expresión proteico, pudiendo dar lugar a distintos espectros de masas. En el caso de la preparación de las muestras para su posterior análisis, hay métodos que utilizan el contenido completo de lisados celulares, mientras otros utilizan los disolventes en los que se prepara la matriz para extraer las proteínas del interior de las células, lo que también puede influir en los espectros de masas obtenidos. Además, este método aún depende del cultivo microbiano para aislar las colonias puras.

Por otra parte, los métodos de detección moleculares, como la PCR seguida de secuenciación, han jugado un papel importante en microbiología clínica ya que ha permitido la identificación de varios patógenos no cultivables. Sin embargo, estas técnicas requieren la extracción de los ácidos nucleicos para su amplificación y posterior secuenciación, proceso que lleva al menos un día, para la identificación de la bacteria.

A pesar de estos avances, en los últimos años se han desarrollado métodos que emplean nanopartículas de plata y permiten la identificación rápida de distintos patógenos. Son especialmente interesantes los métodos basados en espectroscopia Raman aumentada de superficie (SERS), ya que permiten la identificación simultánea de bacterias distintas en muestras reales.^{27,28} Estas técnicas utilizan nanopartículas de plata codificadas con moléculas orgánicas que poseen un espectro característico de Raman, y a su vez están modificadas con una biomolécula (anticuerpos o aptámeros) que reconoce específicamente el patógeno que se quiere identificar. De este modo, cuando las partículas identifican al patógeno se colocan muy próximas en su superficie generando *puntos calientes*, en los que la intensidad del campo electromagnético se

ANTECEDENTES

intensifica, y aumenta la intensidad del espectro Raman de las moléculas que codifican cada tipo de partícula, permitiendo la identificación de la bacteria. Sin embargo, a pesar de que estas técnicas permiten la identificación de concentraciones muy bajas de bacteria, en torno a 10 UFC/mL, y son rápidas, ya que se pueden obtener los resultados en menos de una hora, tienen limitaciones considerables. La primera es el tipo de biomoléculas que se utilizan para el reconocimiento de las bacterias, como son anticuerpos y aptámeros. Aunque ambos tipos de biomoléculas permiten un reconocimiento específico de las bacterias, los anticuerpos son caros de producir, delicados de manipular y bastante grandes. Los aptámeros, aunque presentan ventajas con respecto a los anticuerpos, como por ejemplo en términos de estabilidad, facilidad de producción, funcionalización y menor tamaño, para su generación es necesario recurrir a métodos como el SELEX que requieren mucho tiempo.²⁸ La otra limitación importante de estas técnicas reside en el uso de la espectroscopia Raman aumentada de superficie, ya que aunque es una técnica muy sensible que permite la identificación de moléculas en concentraciones muy bajas, los espectrofotómetros de Raman necesarios para realizar estos experimentos son muy caros en comparación con otros espectrofotómetros.

OBJETIVO

OBJETIVO

Este Trabajo de Fin de Grado tiene como objetivo desarrollar un método sencillo de detección bacteriana empleando nanopartículas de plata (AgNPs) conjugadas con sideróforos. Concretamente, se pretenden sintetizar AgNPs conjugadas a derivados de feroxamina para detectar *Yersinia enterocolitica*. Para ello, se aprovechará la alta afinidad y especificidad de feroxamina con su receptor bacteriano y el desplazamiento en el espectro de absorción de las AgNPs, que tiene lugar cuando sus plasmones superficiales se acoplan debido a la reducción de la distancia entre las partículas, que se producirá como consecuencia de su agregación en la superficie de las bacterias.

Para alcanzar dicho objetivo, se plantea el siguiente esquema de trabajo: la primera parte consistirá en la síntesis de AgNPs esféricas y de tamaño uniforme. De forma paralela, se realizará la síntesis y caracterización de derivados de feroxamina enlazados a espaciadores que posean grupos disulfuro. Posteriormente se llevará a cabo la conjugación de las AgNPs al derivado de feroxamina mediante la formación de enlaces Ag-S. Por último, se realizarán los ensayos de detección de *Yersinia enterocolitica*.

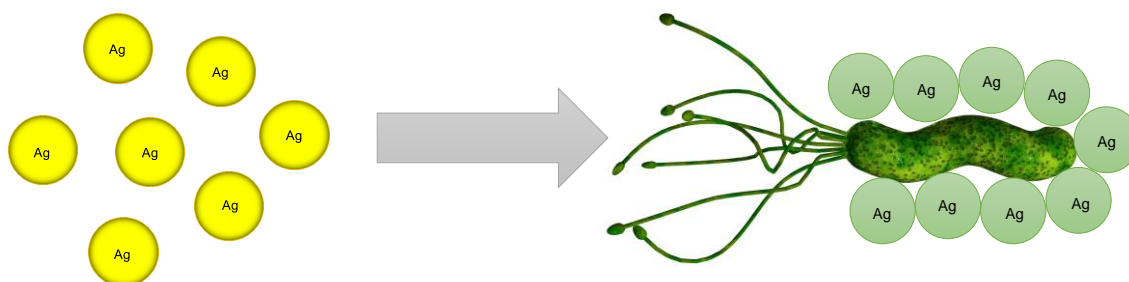


Figura 8 Detección bacteriana empleando AgNPs

PARTE EXPERIMENTAL

1. Metodología general

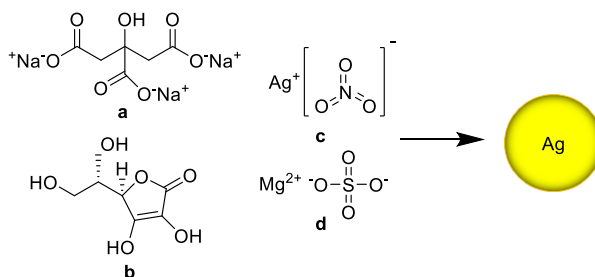
Todas aquellas reacciones que requirieron condiciones anhidras se realizaron bajo atmósfera de argón desoxigenado seco (Argón C-50) con agitación magnética.

Los disolventes utilizados son comerciales de la casa Panreac y se utilizaron sin purificación previa.

Los espectros de resonancia magnética nuclear se realizaron en el espectrómetro Bruker Avance 300 (300 MHz), utilizando como disolvente deuterado CDCl_3 (99,8% D) y CD_3OD (99,8% D). Se utilizó una bomba de vacío Buchi V-300 para llevar los compuestos a sequedad. El proceso de liofilización se realizó en el liofilizador Telstar Cryodos 88 equipado con una bomba de vacío Varian DS 102. Todas las centrifugaciones se han realizado en una centrífuga Himac CT15RE. Los espectros UV-Vis se realizaron en un espectrofotómetro UV-Vis Jasco V-650, empleando cubetas semimicro de rango UV de poliestireno de marca Kartell™. Estos equipos se encuentran en las instalaciones del Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA) de la UDC.

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 API Qstar-QqTOF Tandem Hybrid System, con fuente de ESI de Applied Biosystems. Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (MET) se obtuvieron en un equipo modelo JEOL JEM 1010.

2. Síntesis de nanopartículas de plata



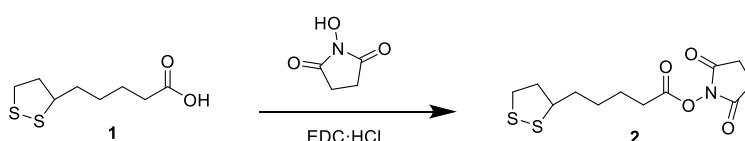
Se sintetizaron nanopartículas de plata de aproximadamente 30 nm de diámetro siguiendo procedimientos ya descritos.²⁷ Primeramente, se calentaron 250 mL de agua ultrapura hasta ebullición con ayuda de agitación magnética vigorosa. Una vez alcanzado el punto de ebullición, se añadieron consecutivamente disoluciones acuosas

PARTE EXPERIMENTAL

de una mezcla de citrato de sodio (**a**, 3,41 mL, 0,1 M) y ácido ascórbico (**b**, 0,25 mL, 0,1 M). Un minuto después, se añadió rápidamente otra mezcla de disoluciones acuosas que contiene nitrato de plata (**c**, 0,744 mL, 0,1 M) y sulfato de magnesio (**d**, 0,56 mL, 0,1 M). El color de la disolución cambió rápidamente de color amarillo hacia color naranja oscuro. Se continuó agitando y calentando la disolución durante 45 minutos para asegurar que haya transcurrido la reacción.

3. Preparación del conjugado de AgNPs y deferoxamina

3.1. Éster de succinimidilo del ácido lipoico (2)



Ácido lipoico (**1**, 200 mg, 0,97 mmol), *N*-hidroxisuccinimida (223 mg, 1,94 μ mol) y EDC (282 mg, 1,45 mmol) se disolvieron en diclorometano seco (6 mL) y la mezcla se agitó bajo atmosfera de argón a temperatura ambiente durante 24 horas. Trascurrido este tiempo, los subproductos de la reacción se extrajeron con H₂O (4 veces 5 mL), la fase orgánica resultante se secó con MgSO₄ y se concentró bajo presión reducida para dar un sólido amarillento (184,5 mg, 88%).

Compuesto 2:

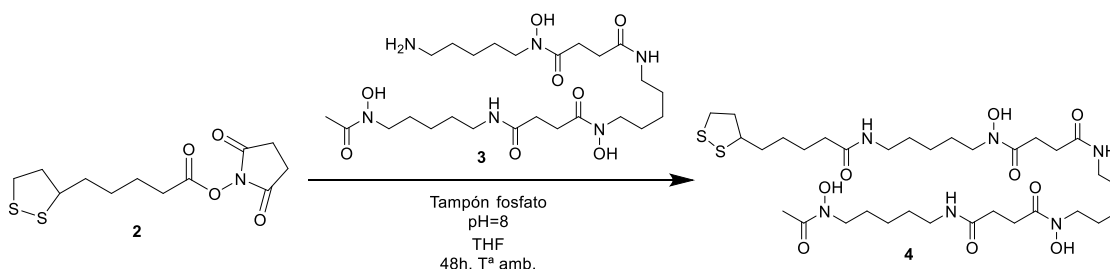
¹H RMN (300 MHz, CDCl₃), δ_H ppm: 3,56 (q, 1H); 3,13 (m, 2H); 2,82 (s, 4H); 2,61 (t, 2H); 2,45 (sx, 1H); 1,91 (sx, 1H); 1,73 (m, 4H); 1,54 (m, 2H).

¹³C RMN (75,5 MHz, CDCl₃), δ_C ppm: 169,1; 168,4; 56,1; 40,1; 38,5; 34,4; 30,8; 28,3; 25,6; 24,3.

MS-ESI (*m/z*): 326,05 [M+Na]⁺; 358,08 [M+MeOH+Na]⁺ y 336,09 [M+MeOH+H]⁺. (C₁₂H₁₇NO₄S₂: 303,06).

PARTE EXPERIMENTAL

3.2. Derivado de la deferoxamina-lipoico, compuesto 4



Se disolvieron los 184,5 mg (609 μ mol) obtenidos de compuesto **2** en 6 mL de THF, y se hicieron reaccionar con 185 mg de deferoxamina (**3**, 609 μ mol), previamente disuelto en 6 mL de una disolución tampón de NaHPO₄/NaH₂PO₄ a pH 8. La mezcla resultante se mantuvo bajo agitación magnética a temperatura ambiente durante 48 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se obtuvo una disolución amarillenta con un precipitado. Dicho producto se filtró a vacío realizando lavados con agua, NaHCO₃, acetona y CH₂Cl₂ enfriados previamente. El sólido resultante se secó a vacío (125,2 mg, 59%).

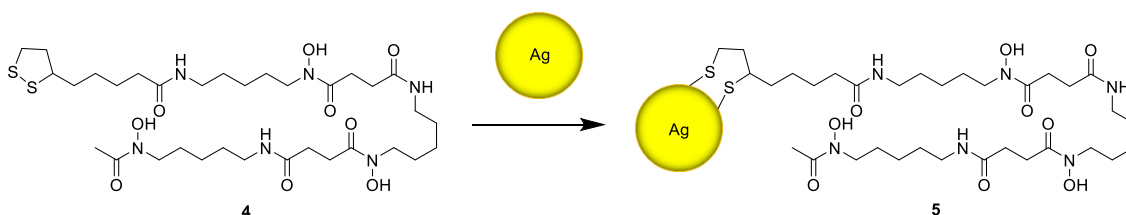
Compuesto 4:

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃), δ_H ppm: 9,63 (s, 3H); 7,77 (s, 3H).

¹³C RMN (75,5 MHz, CDCl₃), δ_C ppm: 172,4; 172,3; 171,8; 56,6; 56,4; 38,6; 35,7; 34,6; 34,4; 30,5; 29,2; 28,8; 28,4; 28,1; 26,5; 25,6; 25,5; 23,9; 20,8.

MS-ESI (*m/z*): 771,38 [M+Na]⁺. (C₃₃H₆₀N₆O₉S₂: 748,39).

3.3. Conjugado AgNPs@4 (5)



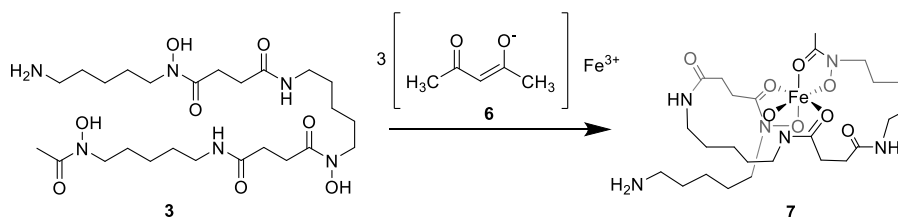
Sobre alícuotas de 1 mL de la disolución de AgNPs de concentración 176 μ M se añadieron 50 μ L de disoluciones del compuesto **4** de concentraciones 1 mM, 100 μ M y 10 μ M. Una vez añadido, se agitó rápidamente en el vórtex y se dejó reaccionando con agitación mecánica durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las disoluciones se centrifugaron a 8°C y 5000 rpm durante 15 minutos, se eliminó el

PARTE EXPERIMENTAL

sobrenadante y las nanopartículas se resuspendieron en 1 mL de agua ultrapura, repitiéndose este proceso una vez más.

4. Preparación del conjugado de AgNPs y feroxamina

4.1. Feroxamina (7)

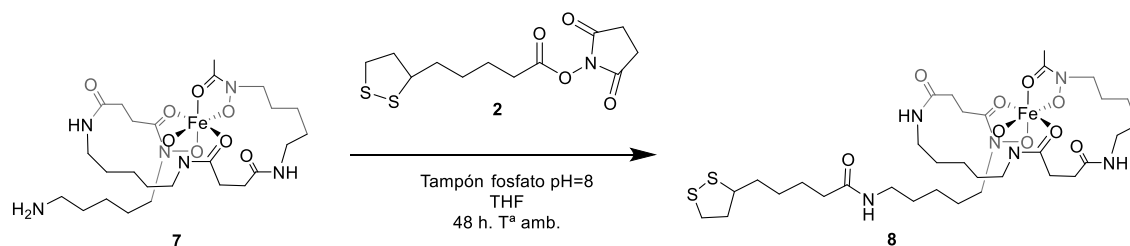


Deferoxamina (**3**, 60 mg, 107 μmol), acetilacetonato de hierro (III) (**6**, 37,8 mg, 107 μmol) se disolvieron en 5 mL de agua a temperatura ambiente con ayuda de agitación magnética durante 24 horas. Trascurrido este tiempo, los subproductos de la reacción se extrajeron con acetato de etilo (4 veces 5 mL) y la fase acuosa resultante se concentró bajo presión reducida para dar un aceite rojo que se liofilizó dando lugar a un sólido de color marrón (47,3 mg, 72%).

Compuesto 7:

MS-ESI (m/z): 614,27 $[\text{M}+\text{H}]^+$ y 636,25 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. ($\text{C}_{25}\text{H}_{45}\text{FeN}_6\text{O}_8$: 613,26).

4.2. Derivado de la feroxamina-lipoico, compuesto 8



A 49 mg (163 μmol) de compuesto **2** se le añadieron 100 mg de feroxamina (**7**, 163 μmol) y se realizó la misma metodología que en el apartado 3.2 excepto el proceso de purificación. Una vez transcurrida la reacción se concentró a sequedad con ayuda de un rotavapor, posteriormente se disolvió en metanol y filtró a gravedad asegurándose de que no queda ninguna partícula en suspensión. La disolución resultante se pasó por una columna Sephadex LH-20 y el producto deseado se eluyó con metanol. El análisis de las

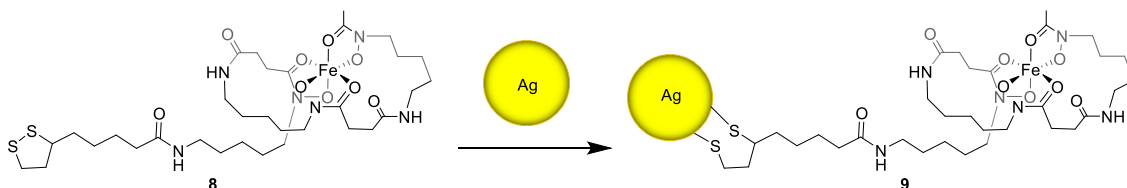
PARTE EXPERIMENTAL

fracciones obtenidas por espectrometría de masas nos permitió identificar el producto deseado (37,8 mg, 59%).

Compuesto 8:

MS-ESI (m/z): 802,31 $[M+H]^+$ y 824,29 $[M+Na]^+$. ($C_{33}H_{57}FeN_6O_9S_2$: 801,30).

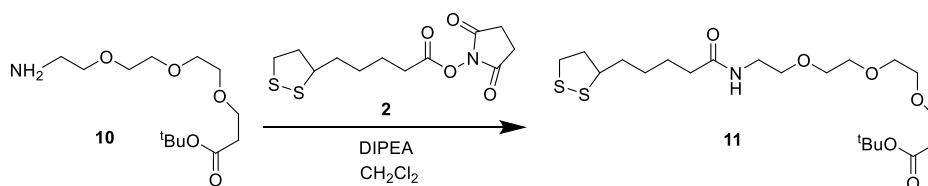
4.3. Conjugado AgNPs@8 (9)



Sobre alícuotas de 1 mL de una disolución de AgNPs de concentración de concentración 176 μM se añadieron alícuotas de 50 μL de disoluciones del compuesto **8** de concentraciones 1 mM, 100 μM y 10 μM . Una vez añadido, se siguió el mismo procedimiento ya descrito en el apartado 3.3.

5. Preparación del conjugado de AgNPs con feroxamina y espaciador

5.1. Derivado espaciador-lipoico protegido, compuesto 11



Se disolvieron 113 mg (325 μmol) de compuesto **10** y 100 mg (325 μmol) de compuesto **2** en 6 mL de diclorometano seco y 60 μL de DIPEA en condiciones inertes con ayuda de agitación magnética durante 24 horas. Trascurrido este tiempo, los subproductos de la reacción se extrajeron con H_2O (4 veces 5 mL) y la fase orgánica resultante se concentró bajo presión reducida para dar un sólido que se secó a vacío. (112,3 mg, 74%).

PARTE EXPERIMENTAL

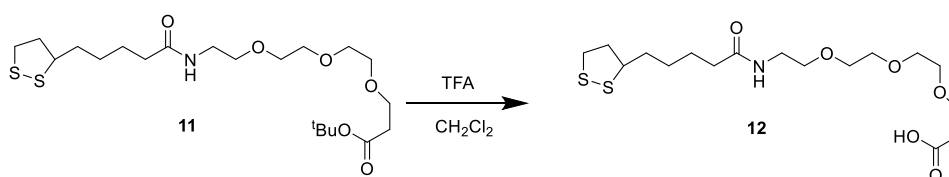
Compuesto 11:

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3), δ_{H} ppm: 3,67 (t, 4H); 3,57 (s, 8H); 3,51 (t, 2H); 3,41 (q, 2H); 2,80 (m, 2H); 2,43 (m, 3H); 2,15 (t, 2H); 1,87 (m, 2H); 1,63 (m, 3H); 1,43 (m, 9H).

^{13}C RMN (75,5 MHz, CDCl_3), δ_{C} ppm: 172,8; 170,9; 70,5; 70,4; 70,2; 69,9; 66,9; 56,4; 40,2; 39,2; 38,4; 36,3; 36,2; 34,6; 28,9; 28,1; 25,4.

MS-ESI (m/z): 466,23 $[\text{M}+\text{H}]^+$. y 488,20 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ($\text{C}_{21}\text{H}_{39}\text{NO}_6\text{S}_2$: 465,22).

5.2. Derivado espaciador-lipoico desprotegido, compuesto 12



A 112,3 mg (241,16 μmol) del compuesto **11**, se añadieron 0,5 mL de ácido trifluoroacético (TFA) y 4,5 mL de diclorometano, dejando que transcurriese la reacción con ayuda de agitación magnética durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se eliminó el disolvente a presión reducida y el compuesto obtenido se secó a vacío para dar el producto deseado **12**. (89,6 mg, 79%).

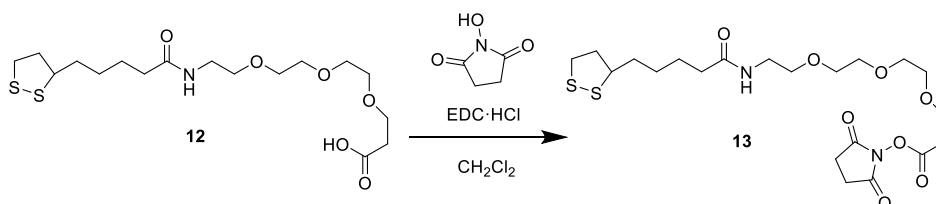
Compuesto 12:

^1H RMN (300 MHz, CD_3OD), δ_{H} ppm: 3,75 (m, 2H); 3,56 (m, 2H); 3,40 (m, 2H); 3,32 (m, 1H); 3,14 (m, 1H); 2,86 (m, 2H); 2,56 (m, 2H); 2,25 (m, 2H); 2,06 (m, 1H); 1,70 (m, 4H); 1,31 (m, 1H).

^{13}C RMN (75,5 MHz, CD_3OD), δ_{C} ppm: 174,7; 173,9; 70,2; 70,1; 70,0; 69,9; 69,2; 66,4; 56,2; 39,9; 39,0; 38,0; 35,4; 34,3; 28,5; 25,3.

MS-ESI (m/z): 408,15 $[\text{M}+\text{H}]^+$. ($\text{C}_{17}\text{H}_{31}\text{NO}_6\text{S}_2$: 409,16).

5.3. Derivado espaciador-lipoico funcionalizado, compuesto 13



PARTE EXPERIMENTAL

44,8 mg (109 μmol) de compuesto **12**, 21 mg (109 μmol) de EDC y 13 mg (109 μmol) de *N*-hidroxisuccinimida se hicieron reaccionar siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado 3.1, obteniéndose 14,4 mg de compuesto **13** (26%).

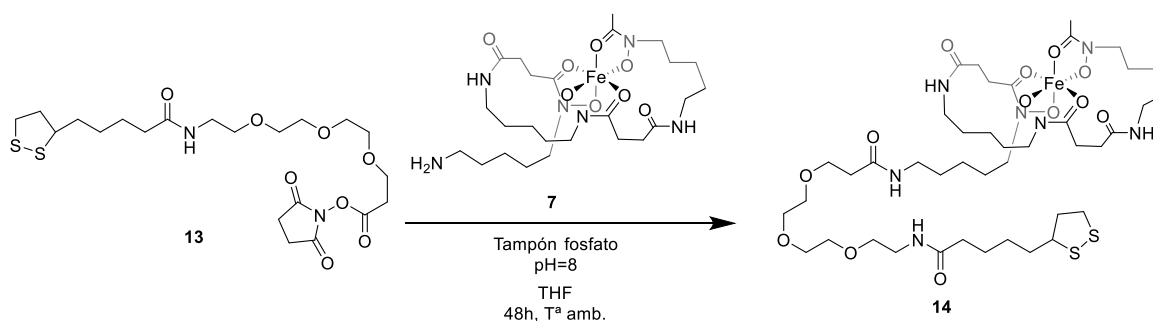
Compuesto 13:

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3), δ_{H} ppm: 3,85 (t, 2H); 3,66 (s, 3H); 3,54 (t, 3H); 3,43 (m, 2H); 3,12 (m, 1H); 2,88 (m, 3H); 2,60 (m, 1H); 2,45 (m, 1H); 2,18 (m, 2H); 1,91 (m, 1H).

$^{13}\text{C RMN}$ (75,5 MHz, CDCl_3), δ_{C} ppm: 169,1; 166,7; 70,7; 70,5; 704; 70,2; 69,8; 65,7; 56,4; 39,1; 38,4; 36,3; 32,1; 28,9; 25,6.

MS-ESI (m/z): 507,18 $[\text{M}+\text{H}]^+$ y 529,16 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ($\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$: 506,18).

5.4. Derivado feroxamina-espaciador-lipoico, compuesto **14**

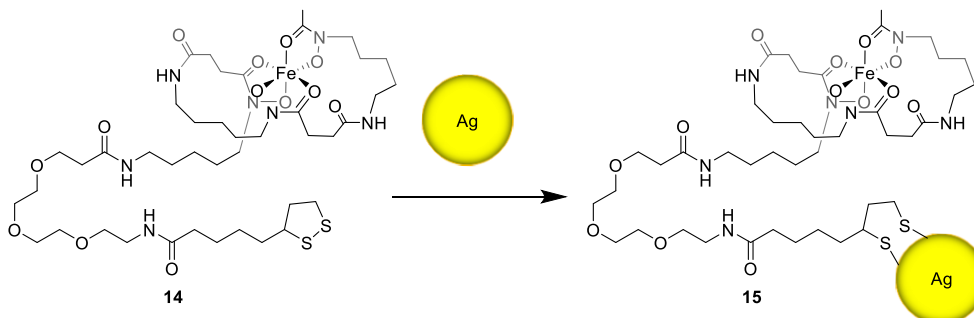


14 mg (27 μmol) de compuesto **13** y 17 mg (27 μmol) de feroxamina (**7**) se disolvieron en 8 mL de una mezcla de THF-tampón fosfato (1:1) y se hicieron reaccionar empleando la misma metodología que en el apartado 4.2. (12,6 mg, 45%).

Compuesto 14:

MS-ESI (m/z): 1005,42 $[\text{M}+\text{H}]^+$ y 1027,40 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. ($\text{C}_{42}\text{H}_{74}\text{FeN}_7\text{O}_{13}\text{S}_2$: 1004,41).

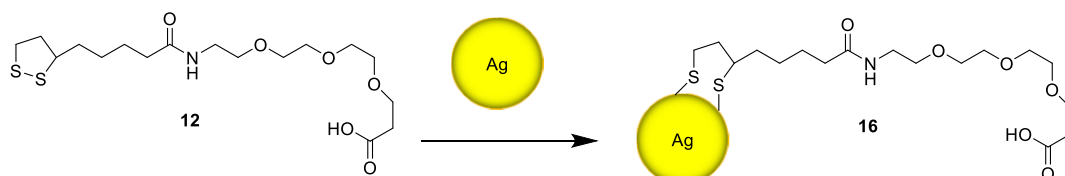
5.5. Conjugado AgNPs@14 (**15**)



PARTE EXPERIMENTAL

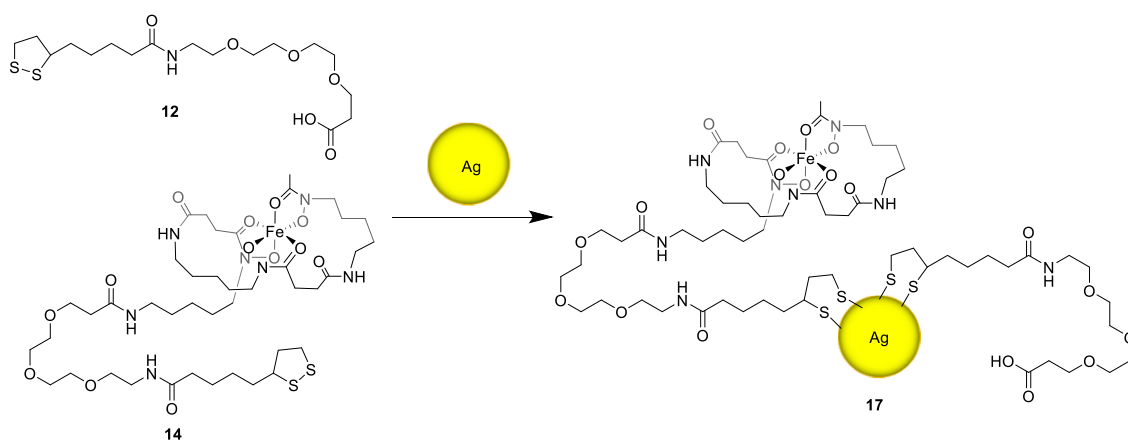
Sobre alícuotas de 1 mL de una disolución de AgNPs de concentración de concentración 176 pM se añadieron alícuotas de 50 μ L de disoluciones de compuesto **14** con concentraciones 1 mM, 100 μ M y 10 μ M. Una vez añadidas, se siguió el mismo procedimiento descrito en el apartado 3.3.

5.6. Conjugado AgNPs@12 (16)



Sobre alícuotas de 1 mL de una disolución de AgNPs de concentración de concentración 176 pM se añadieron alícuotas de 50 μ L de disoluciones de compuesto **12** de concentraciones 1 mM, 100 μ M y 10 μ M. Una vez añadido, se siguió el mismo procedimiento descrito en el apartado 3.3.

5.7. Conjugado AgNPs@12@14 (17)



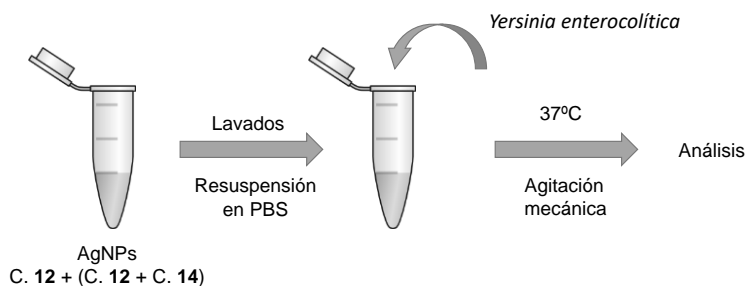
Sobre seis alícuotas de 1 mL de una disolución de AgNPs de concentración de concentración 176 pM se añadieron concentraciones crecientes de una disolución 10:1 de los compuestos **12** y **14**. Para ello, se preparó una disolución de concentración final 100 μ M de compuesto **12** y 10 μ M de compuesto **14**, de la cual se añadieron 100, 120, 140, 160, 180 y 200 μ L a las alícuotas de AgNPs. La conjugación se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 3.3.

6. Cultivo de bacterias

Se realizó una inoculación de 50 μL de bacteria *Yersinia enterocolitica* en 5 mL de medio LB en presencia de 50 μL de biperidilo 0,01 M. La mezcla se incubó durante 2 horas y 30 minutos a 37°C con agitación mecánica, hasta que se alcanzase el momento de crecimiento exponencial. Posteriormente, se diluyeron 100 μL de dicha disolución de bacterias en 900 μL de PBS, y esa disolución madre se diluyó a su vez 4 veces en proporción 1:10.

7. Detección bacteriana

Una vez lavadas y resuspendidas en PBS se hicieron alícuotas de una disolución de AgNPs@12@14 (17) de concentración de AgNPs 0,157 nM, 10,71 μM de compuesto 12 y 1,07 μM de compuesto 14 a las que se le añadieron alícuotas de las disoluciones de bacteria (*Yersinia enterocolitica*) conteniendo 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 y 10^6 UFC/mL. Estas disoluciones se dejaron incubando bajo agitación mecánica a 37°C durante una hora, para su posterior análisis. El procedimiento viene indicado en el *Esquema 2*



Esquema 2 Procedimiento para el ensayo de detección bacteriana

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Síntesis de nanopartículas de plata

El primer paso de este trabajo consistió en sintetizar nanopartículas de plata estabilizadas por una película de citrato. Se hicieron varias síntesis hasta conseguir unas nanopartículas con un tamaño homogéneo y forma esférica. La primera síntesis de nanopartículas se realizó con AgNO_3 de una pureza del 99,99 %. Como se puede observar en la *Figura 9*, se comprobó que hay una baja homogeneidad de tamaño y de forma. Tras el análisis de las imágenes obtenidas con el programa ImageJ se comprobó que tienen un tamaño de $50 \pm 11,09$ nm.

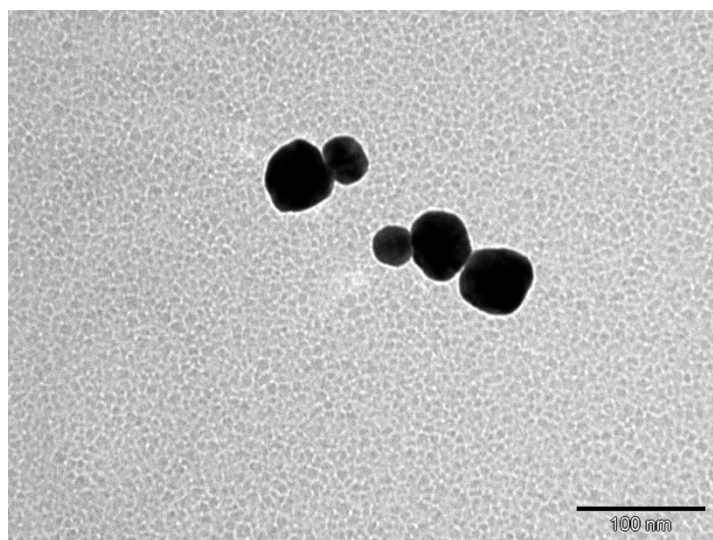


Figura 9 Imagen MET de la primera síntesis de AgNPs

Las nanopartículas también se analizaron mediante espectroscopia UV-Vis (*Figura 10*) y se observó el máximo de absorción a la longitud de onda de 408 nm, resultado que contrasta con los datos tabulados que indican que las AgNPs de 50 nm deberían de tener su máximo de absorción en torno a 420,9 nm.²⁰ Esta desviación puede deberse al uso de una sal de plata de baja pureza que produce AgNPs polidispersas en comparación con las descritas en la bibliografía. Tras realizar los cálculos pertinentes, se concluye que la disolución tiene una concentración de AgNPs de 19 pM ($1,13 \cdot 10^{10}$ nanopartículas/mL).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

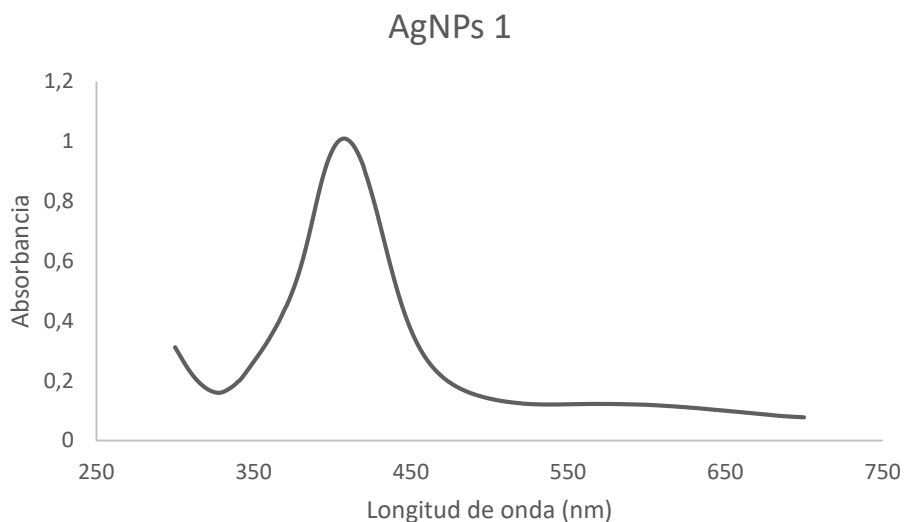


Figura 10 Espectro UV-Vis de la primera síntesis de AgNPs

Las posteriores síntesis de nanopartículas de plata se realizaron con AgNO_3 con una pureza del 99,9999%. Como se puede ver en la *Figura 11*, se comprobó que las nuevas partículas poseen un tamaño más homogéneo y presentan forma esférica, corroborando que la pureza de la sal de plata empleada es un factor muy importante a tener en cuenta para la síntesis de AgNPs. Tras el análisis de las imágenes obtenidas con el programa ImageJ se comprobó que su tamaño corresponde a $25 \pm 5,10$ nm.

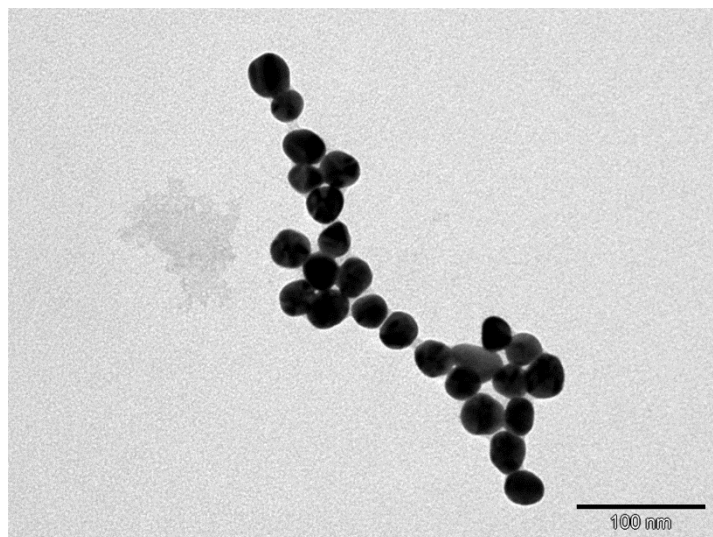


Figura 11 Imagen MET de la segunda síntesis de AgNPs

Tras el análisis mediante espectrofotometría UV-Vis, como se puede ver en la *Figura 12*, se observó que presenta un máximo de absorbancia a 404 nm, que está en concordancia con los datos descritos en la bibliografía²⁰. Teniendo esto en cuenta, se

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

calculó la concentración de dicha disolución que resultó ser 176 pM ($1,06 \cdot 10^{11}$ nanopartículas/mL).

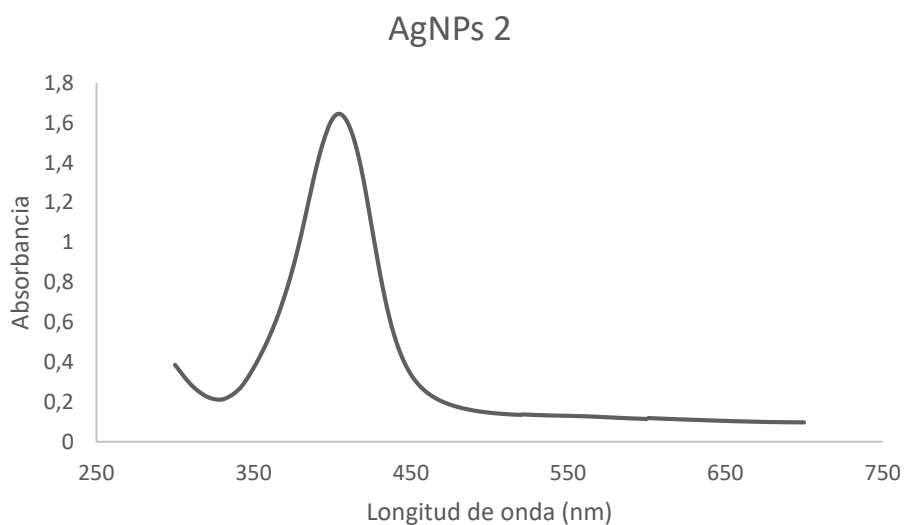


Figura 12 Espectro UV-Vis de la segunda síntesis de AgNPs

Se realizó una tercera síntesis de nanopartículas de plata y se comprobó mediante MET que la forma y el tamaño de las partículas obtenidas no fue del todo homogéneo. Como se puede ver en la *Figura 13* las partículas tienen un tamaño heterogéneo y también se observan partículas que no son esféricas. Tras el análisis de las imágenes obtenidas con el programa ImageJ se comprobó que las partículas tienen un tamaño de $35 \pm 5,98$ nm.

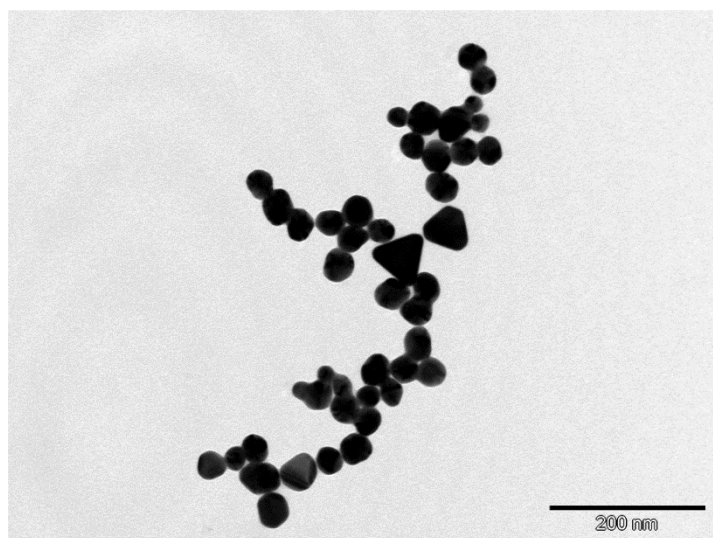


Figura 13 Imagen MET de la tercera síntesis de AgNPs

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras el análisis mediante espectrofotometría UV-Vis, como se puede ver en la *Figura 14*, se observó que presenta un máximo de absorbancia a 410 nm, que difiere ligeramente con los datos descritos en la bibliografía.²⁰ Esto podría deberse a que las partículas obtenidas, aunque son mayoritariamente esféricas y de tamaño similar, no son del todo homogéneas en cuanto a tamaño y forma. Con los datos tabulados se calculó la concentración de la disolución de AgNPs, que resultó ser de 64 pM ($3,85 \cdot 10^{10}$ nanopartículas/mL).

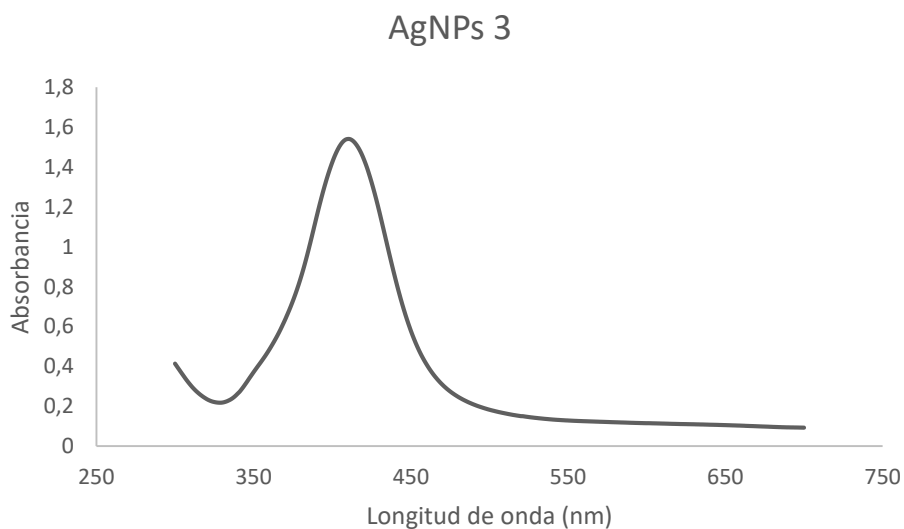


Figura 14 Espectro UV-Vis de la tercera síntesis de AgNPs

En la cuarta síntesis de nanopartículas de plata (*Figura 15*) se observó que las partículas resultantes tienen tamaño homogéneo y forma esférica. Tras el análisis de las imágenes obtenidas con el programa ImageJ se comprobó que tienen un tamaño de $36 \pm 5,06$ nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

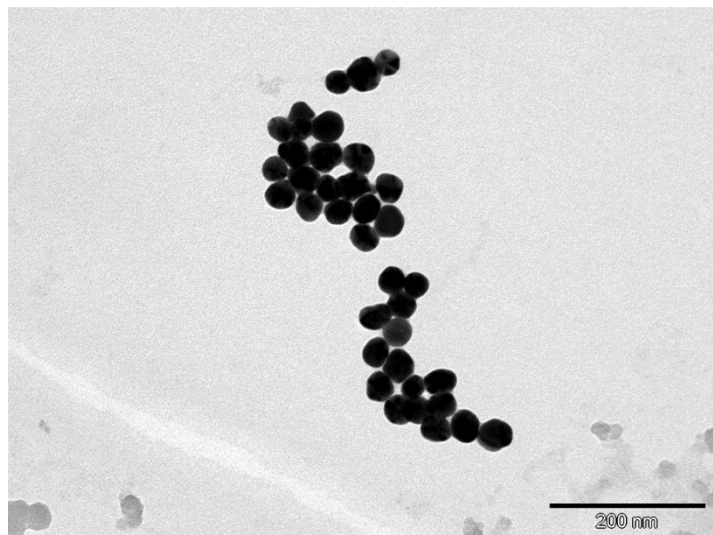


Figura 15 Imagen MET de la cuarta síntesis de AgNPs

Tras el análisis mediante espectrofotometría UV-VIS, como se puede ver en la *Figura 16*, se observó que presenta el máximo de absorbancia a 409 nm, que coincide con los datos descritos en la bibliografía²⁰, por lo que se puede afirmar que los datos tabulados son de gran utilidad cuando las partículas obtenidas son homogéneas en forma y tamaño. A partir de los datos tabulados se calculó la concentración de dicha disolución que resultó ser de 49 pM ($2,96 \cdot 10^{10}$ nanopartículas/mL).

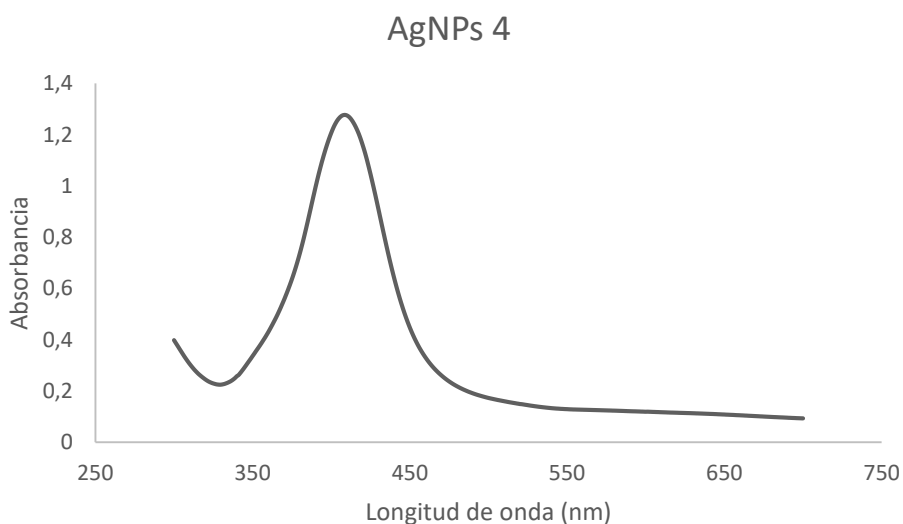


Figura 16 Espectro UV-Vis de la cuarta síntesis de AgNPs

En vista a los experimentos realizados, se puede afirmar que los datos tabulados descritos en la bibliografía son válidos si las nanopartículas tienen un tamaño y forma homogéneos, pero cuando las partículas sintetizadas no presentan homogeneidad de tamaño y forma los datos experimentales se desvían ligeramente de los datos tabulados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A mayores, se puede afirmar que la pureza del AgNO_3 utilizado para la síntesis de las partículas influye en su homogeneidad de tamaño, siendo esta mayor cuanto más alta sea la pureza del reactivo utilizado.

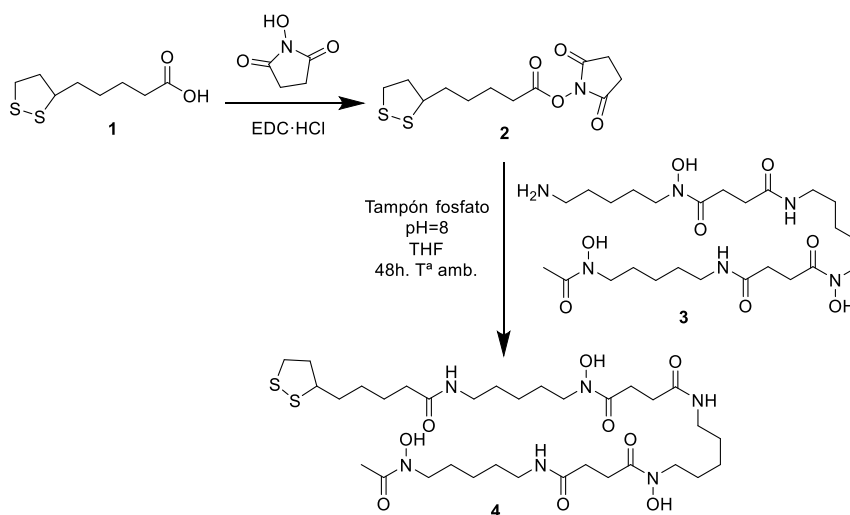
2. Preparación de los ligandos

Para esta parte del trabajo se propuso enlazar una molécula de sideróforo a un espaciador que contenga un grupo disulfuro, ya que estos se conjugarán a las AgNPs mediante un enlace Ag-S. Se escogió unir covalentemente deferoxamina a ácido lipoico a través de un enlace de tipo amida, lo que necesita una activación previa del ácido carboxílico con *N*-hidroxisuccinimida.

Este derivado lipoico-deferoxamina también se unió covalentemente a una molécula que contiene tres unidades de etilenglicol, con el fin de que el complejo metálico feroxamina esté más alejado de la superficie de las nanopartículas.

2.1. Preparación del compuesto 4

El compuesto 4 se preparó según se indica en el *Esquema 3*. El primer paso de esta síntesis consistió en la formación de un éster de succinimidilo del ácido lipoico.



Esquema 3 Síntesis del compuesto 4

El espectro de ^1H RMN del compuesto 2 (*Figura 17*) muestra las señales de los 4H equivalentes correspondientes al anillo de succinimida a 2,82 ppm y la señal de los 2H correspondientes al carbono α del grupo éster a 2,61 ppm. El espectro de ^{13}C RMN (*Figura 27*) muestra las señales de los carbonos de los grupos carbonilo de amida a

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

169,12 ppm y la señal del carbonilo del grupo éster a 168,39 ppm. El espectro de masas ESI de baja resolución en modo positivo (*Figura 32*) confirmó la obtención del compuesto al mostrar los iones $[M+Na]^+$ a m/z 326,06 $[M+MeOH+H]^+$ a m/z 336,09 y $[M+MeOH+Na]^+$ a m/z 358,08.

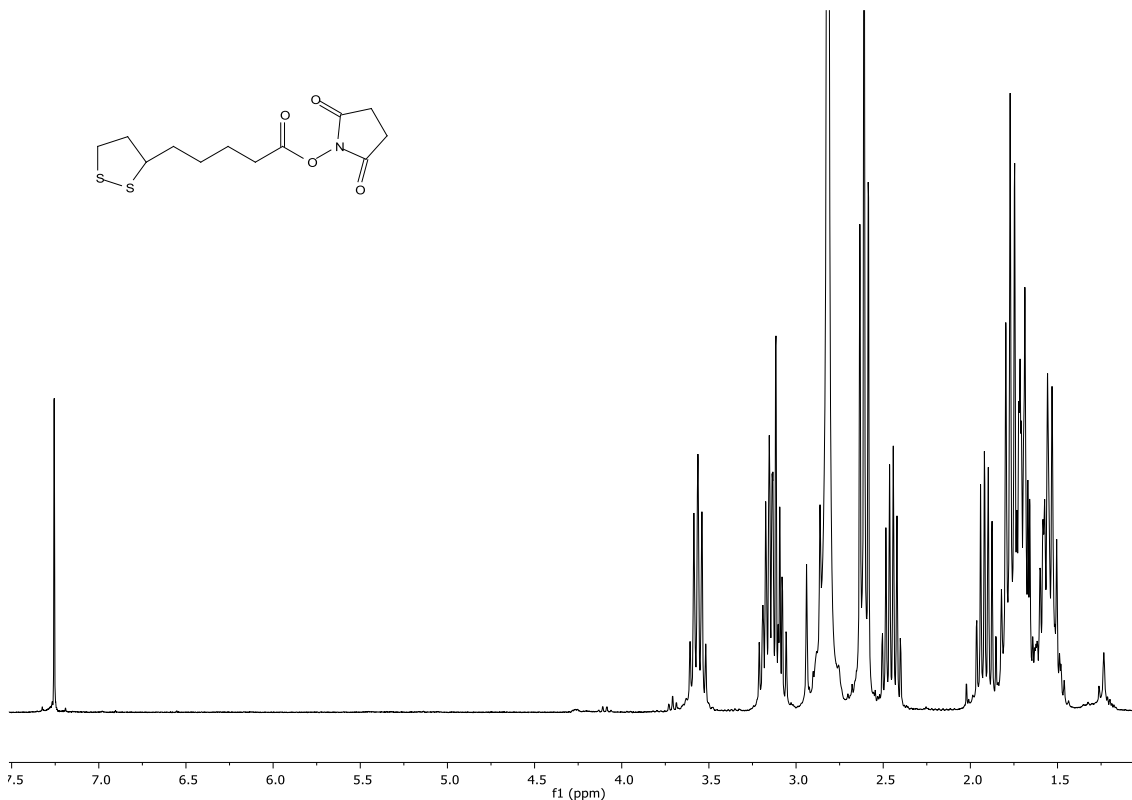


Figura 17 Espectro de 1H RMN del compuesto **2** en $CDCl_3$

El segundo paso de la síntesis supuso la unión covalente del compuesto **2** a la deferoxamina (**3**), a través de un enlace de tipo amida. Como se observa en la *Figura 18*, el espectro 1H de RMN del compuesto **4** muestra las señales correspondientes a los 3H de los grupos amida a 7,77 ppm, así como los 3H de los hidroxilos de los grupos hidroxámicos a 9,63 ppm. El espectro de ^{13}C RMN (*Figura 28*) muestra las señales de los carbonilos de las amidas a 172,4; 172,3 y 171,84 ppm. El espectro de masas de baja resolución en modo positivo (*Figura 33*) confirmó la obtención del compuesto al mostrar el ion $[M+Na]^+$ a m/z 771,38.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

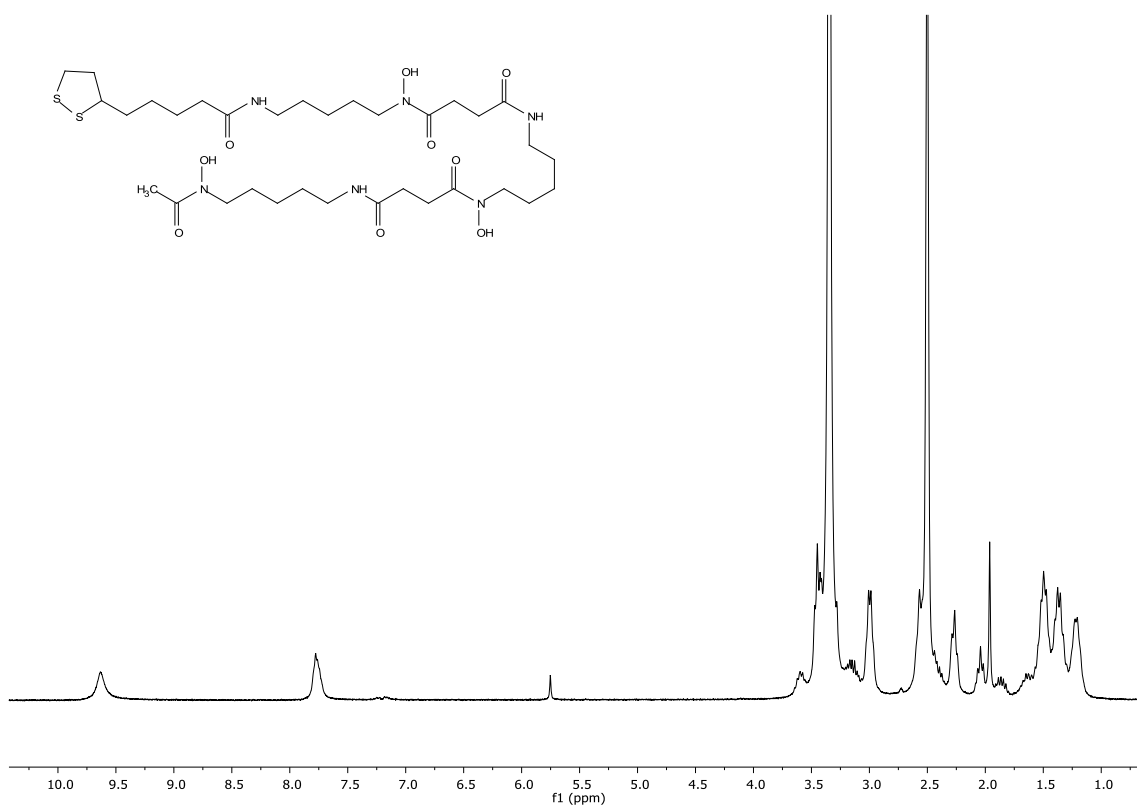
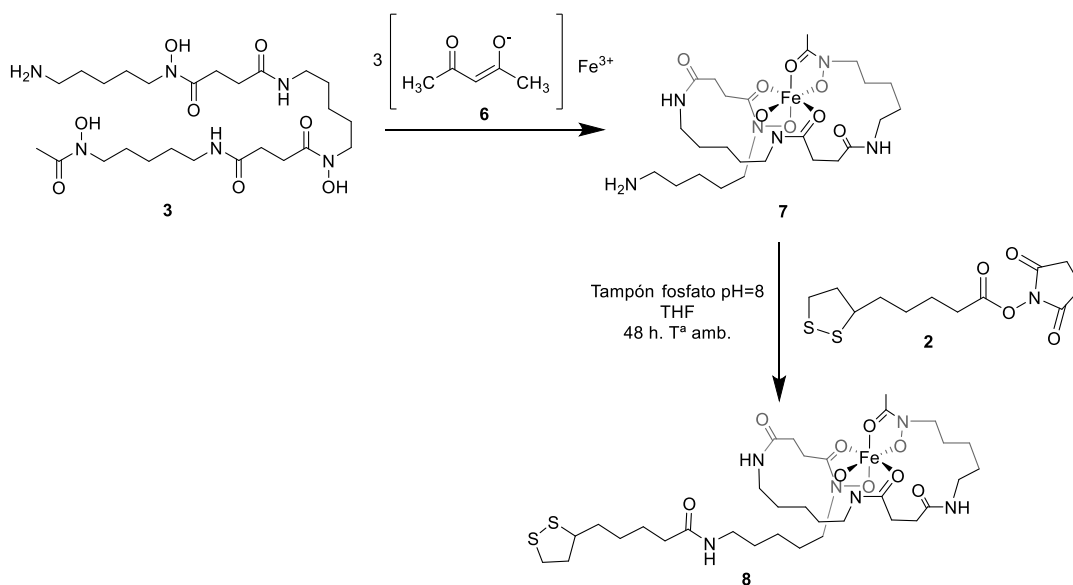


Figura 18 Espectro de ^1H RMN del compuesto **4** en CDCl_3

2.2. Preparación del compuesto **8**

La síntesis del compuesto **8** se realizó conforme al *Esquema 4*:



Esquema 4 Síntesis del compuesto **8**

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

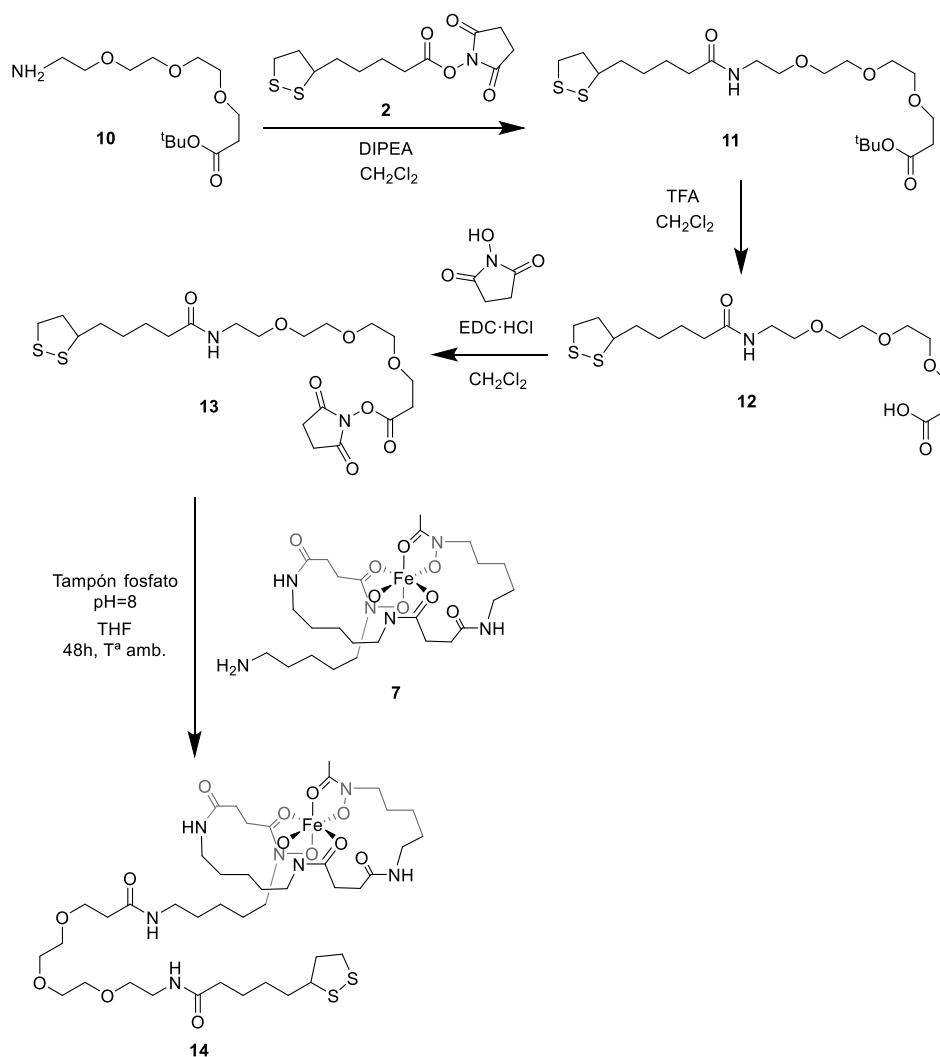
El primer paso de esta síntesis consistió en preparar feroxamina (**7**) a partir de deferoxamina haciéndola reaccionar con acetilacetato de hierro (III) en agua, sometiendo posteriormente el producto a liofilización para eliminar el agua. El espectro de masas de baja resolución en modo positivo del compuesto **7** (*Figura 34*) confirmó la obtención de feroxamina al mostrar los iones $[M+H]^+$ a m/z 614,27 y $[M+Na]^+$ a m/z 636,25.

Tras esto, se hizo reaccionar con el compuesto **2** en THF bajo atmósfera inerte, purificando el producto obtenido posteriormente mediante cromatografía de exclusión molecular en columna Sephadex LH-20. El espectro de masas de baja resolución en modo positivo del compuesto **8** (*Figura 35*) confirmó la obtención del compuesto al mostrar los iones $[M+H]^+$ a m/z 802,31 y $[M+Na]^+$ a m/z 824,29.

2.3. Preparación del compuesto 14

Con el fin de comprobar si se podía aumentar la estabilidad del conjugado nanopartícula-sideróforo, se decidió añadir un espaciador entre la nanopartícula y el sideróforo funcionalizado para así alejar el sideróforo de la nanopartícula. Se escogió un espaciador con tres grupos de etilenglicol con su ácido carboxílico protegido que, tras su desprotección, se activó con *N*-hidroxisuccinimida para así formar su éster de succinimidilo y poder unirlo posteriormente a la feroxamina. La síntesis del compuesto **14** se muestra en el *Esquema 5*:

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Esquema 5 Síntesis del compuesto 14

En el primer paso de la síntesis se hizo reaccionar el compuesto **10** con el compuesto **2**, empleando DIPEA como base. Como se puede observar en el espectro ¹H RMN del compuesto **11** (Figura 19) se confirmó la presencia de los 6H del grupo *tert*-butilo a 1,43 ppm, así como los protones de la cadena carbonada de los grupos éter en el intervalo 3,3-3,7 ppm. El espectro ¹³C RMN (Figura 29) muestra las señales de los carbonos correspondientes a los grupos amida y éster, a 172,8 y 170,9 ppm, respectivamente. El espectro de masas de baja resolución en modo positivo (Figura 36) confirmó la obtención del compuesto al mostrar el ion [M+H]⁺ a *m/z* 466,23.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

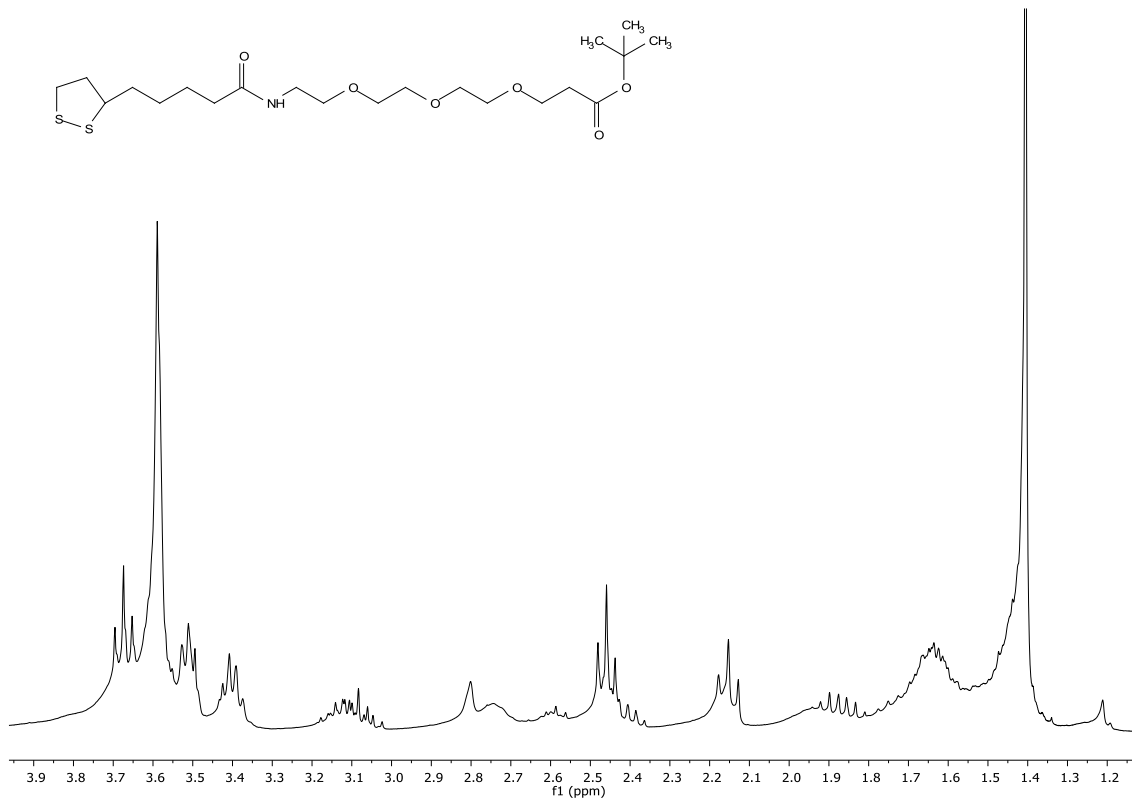


Figura 19 Espectro de ¹H RMN del compuesto 11 en CDCl₃

El segundo paso de la síntesis correspondió a la desprotección del grupo ácido carboxílico con TFA. En el espectro de ¹H RMN del compuesto 12 (Figura 20) se observó la desaparición de la señal correspondiente al grupo *tert*-butilo y se muestran las señales correspondientes a los hidrógenos correspondientes a la cadena carbonada de los grupos éter en el intervalo de 2 a 3,7 ppm. El espectro de masas de baja resolución (Figura 37) confirmó la obtención del compuesto al mostrar el ion [M-H]⁻ a *m/z* 408,15.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

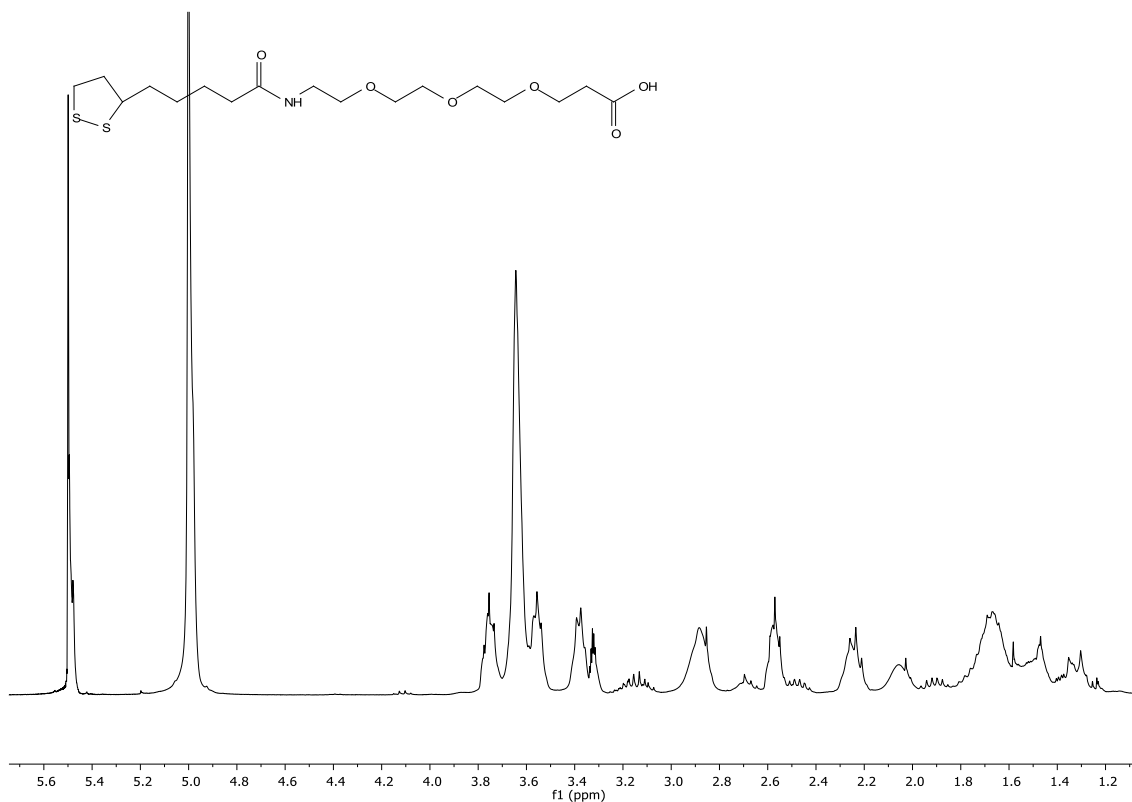


Figura 20 Espectro de ^1H RMN del compuesto **12** en CD_3OD

El siguiente paso de la síntesis correspondió a la funcionalización del compuesto **12**, empleando EDC como agente activante del grupo carboxilo. En el espectro de ^1H RMN del compuesto **13**, (Figura 21) se pueden observar las señales correspondientes a los hidrógenos de la cadena carbonada que contiene los grupos éter. El espectro de ^{13}C RMN (Figura 31) muestra las señales correspondientes a los carbonilos de los grupos amida a 169,1 y 166,7 ppm. El espectro de masas de baja resolución en modo positivo (Figura 38) confirmó la obtención del compuesto al mostrar los iones $[\text{M}+\text{H}]^+$ a m/z 507,18 y $[\text{M}+\text{MeOH}+\text{H}]^+$ a m/z 539,21.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

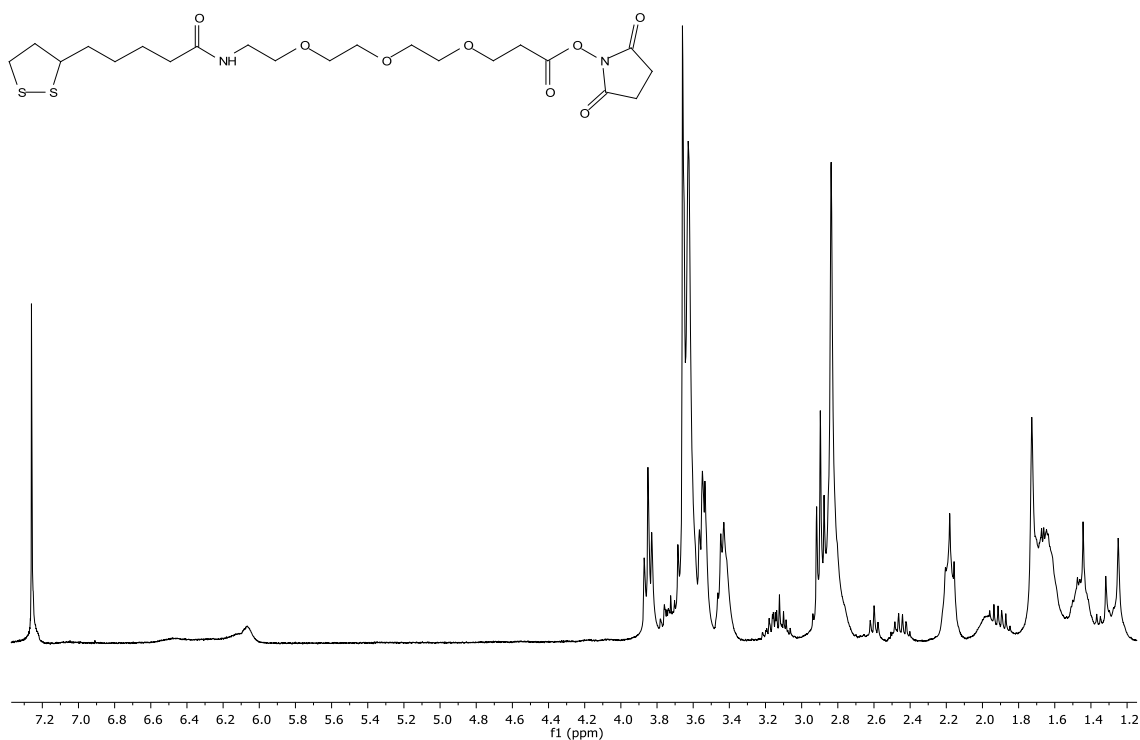


Figura 21 Espectro de ¹H RMN del compuesto **13** en CDCl₃

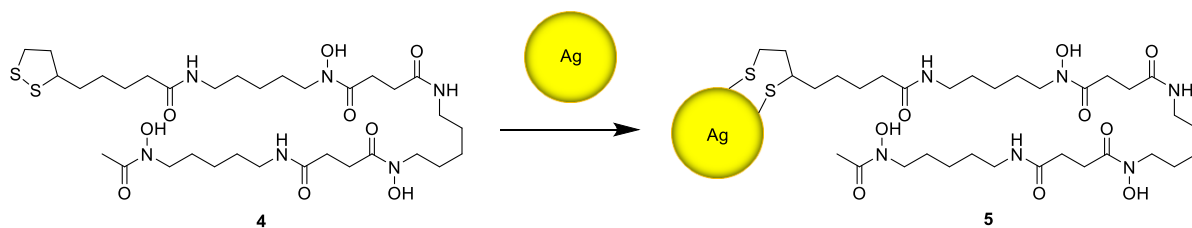
El compuesto **12** se hizo reaccionar con feroxamina (**7**) en THF y tampón fosfato para obtener el compuesto **14** tras una purificación mediante cromatografía de exclusión molecular en columna Sephadex LH-20. El espectro de masas de baja resolución en modo positivo (Figura 39) confirmó la obtención del compuesto al mostrar los iones [M+H]⁺ a m/z 1005,42 y [M+Na]⁺ a m/z 1027,40.

3. Conjugación de los ligandos a las AgNPs

3.1. Obtención del conjugado AgNPs@4 (**5**)

La obtención del conjugado AgNPs@4 (**5**) se muestra en el Esquema 6. Como se mencionó anteriormente, las nanopartículas se unieron mediante enlaces Ag-S a los grupos disulfuro del sideróforo previamente sintetizado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Esquema 6 Obtención del conjugado AgNPs@4 (5)

Para realizar la conjugación del derivado de deferoxamina **4** a las nanopartículas de plata, se hizo una disolución stock del compuesto **4** de concentración 0,01 M y, a partir de ésta, tres diluciones 1:10. Posteriormente, se prepararon 4 alícuotas de 1 mL de la disolución de nanopartículas a las cuales se le añadieron 50 μ L de las disoluciones de sideróforo anteriores. Se dejaron en agitación mecánica y posteriormente se realizaron dos centrifugaciones y las nanopartículas se resuspendieron en agua ultrapura para su posterior medida. Se estimó que las tres disoluciones de AgNPs@**4** (**5**) obtenidas tienen 144,63, 14,46 y 1,45 moléculas de ligando/nm².

Las partículas sintetizadas se analizaron mediante espectroscopia UV-Vis y sus espectros se muestran en la *Figura 22*. Se consideró como blanco la disolución original de AgNPs sin modificar con el ligando **4**. La disolución con menos cantidad de ligando, es decir, la de 1,45 moléculas de ligando por nm² de nanopartícula, no se pudo medir ya que las partículas se agregaron en los lavados tornando un color gris.

Desafortunadamente, por lo que se puede deducir de su espectro de UV-Vis, las AgNPs@**4** (**5**) obtenidas no son estables en ninguna de las concentraciones de ligando utilizado, ya que el plasmón se vuelve más ancho y se observan contribuciones a mayores longitudes de onda correspondientes a agregados de partículas más grandes en todos los casos. Además, se puede afirmar que a menor concentración de sideróforo por superficie de nanopartículas, menos estables son las nanopartículas resultantes. Por este motivo se estudia si el ligando feroxamina puede aumentar la estabilidad de las nanopartículas finales.

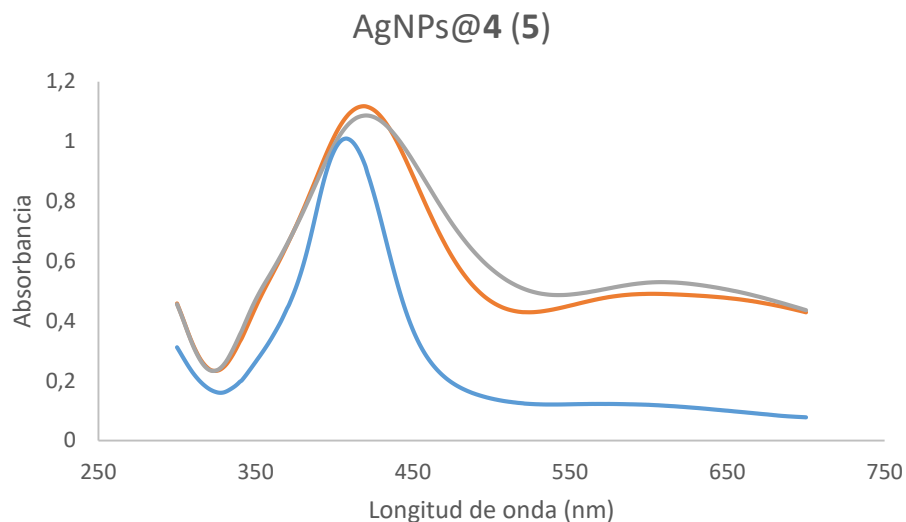
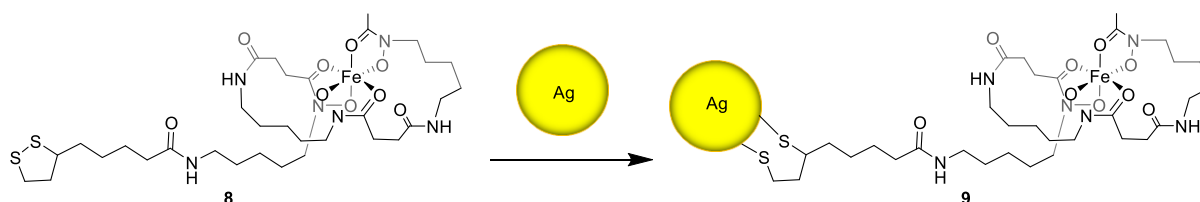


Figura 22 Espectro UV-Vis de AgNPs@4 (5). La línea azul corresponde a la disolución de AgNPs, sin funcionalizar. La línea naranja corresponde al conjugado de AgNPs@4 (5) con 144,63 moléculas de ligando/nm² y la línea azul corresponde al conjugado de AgNPs@4 (5) con 14,46 moléculas de ligando/nm²

3.2. Obtención del conjugado AgNPs@8 (9)

La preparación del conjugado AgNPs@8 (9) se muestra en el *Esquema 7*.



Esquema 7 Obtención del conjugado AgNPs@8 (9)

Para la conjugación del compuesto **8** con las nanopartículas de plata se realizó el mismo procedimiento anterior, preparando disoluciones del sideróforo funcionalizado de concentraciones 1 mM, 100 μ M y 10 μ M. La disolución que presentó mayor estabilidad fue la de 14,46 moléculas de ligando/nm², como se muestra en el espectro UV-Vis en la *Figura 23*. Como los ensayos de detección de bacterias se realizarán en medio fisiológico, se decidió estudiar la estabilidad del conjugado **9** preparado en medio salino, por lo que se añadieron concentraciones crecientes de una disolución de cloruro sódico sobre la disolución de AgNPs@8 (9). Como se puede observar, tras la adición de cloruro de sodio, se observa que el conjugado no es estable en medio salino, ya que la banda del plasmón se vuelve más ancha, con contribuciones a mayores longitudes de onda. Esto puede ser debido a que el centro metálico del sideróforo se encuentre demasiado

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

próximo a la nanopartícula de plata. Para tratar de evitarlo, se propone otro conjugado que contenga un espaciador entre la nanopartícula y el sideróforo.

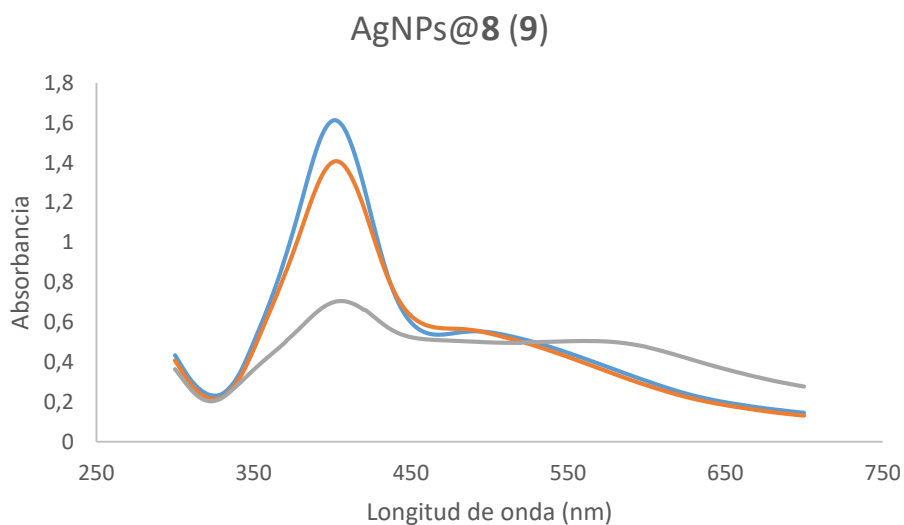
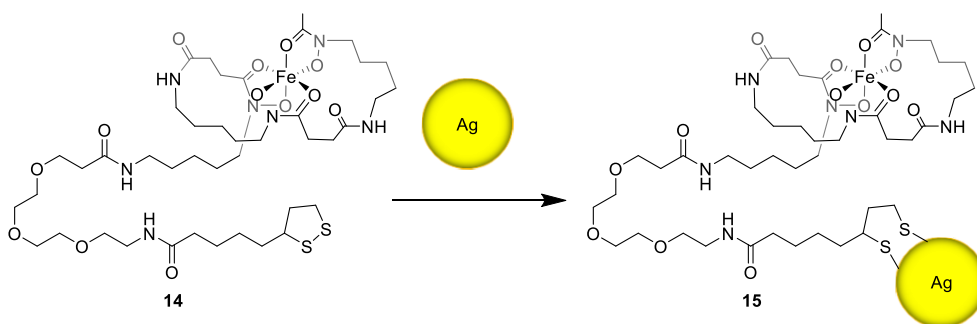


Figura 23 Espectro UV-Vis de AgNPs@8 (9). La línea azul corresponde a la disolución AgNPs@8 (9) de 14,46 moléculas de ligando/nm². La línea naranja corresponde a la misma disolución anterior a la que se le añadió una concentración final de 0,08 M de NaCl, mientras que la línea gris representa la adición de 0,15 M de NaCl

3.3. Obtención del conjugado AgNPs@14 (15)

La síntesis del conjugado AgNPs@14 (15) se muestra en el *Esquema 8*.



Esquema 8 Obtención del conjugado AgNPs@14 (15)

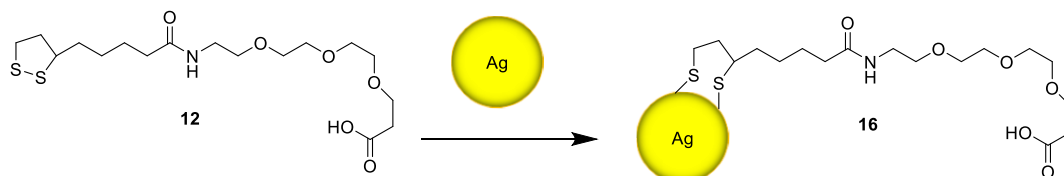
Para la conjugación del compuesto **14** con las nanopartículas de plata se realizó el mismo procedimiento anterior, preparando disoluciones del sideróforo funcionalizado de concentraciones 1 mM, 100 μ M y 10 μ M. Los conjugados obtenidos no fueron estables, ya que las disoluciones se agregaron durante el ensayo tornando un color grisáceo probablemente debido a la alta concentración de sideróforo alrededor de la

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

nanopartícula. Por ello, se probó a añadirle a las AgNPs ciertas concentraciones de compuesto **12** en su entorno para tratar de reducir la concentración de sideróforo.

3.4. Obtención del conjugado AgNPs@**12** (**16**)

La síntesis del conjugado AgNPs@**12** (**16**) se representa en el *Esquema 9*. Se unió el espaciador **12** a las AgNPs con la idea de aumentar la estabilidad de las nanopartículas y así mantener la cantidad de sideróforo en un equilibrio suficiente para producir el reconocimiento de la bacteria.



Esquema 9 Obtención del conjugado AgNPs@**12** (**16**)

Para la conjugación del compuesto **12** con las nanopartículas de plata se realizó el mismo procedimiento anterior, preparando disoluciones del espaciador funcionalizado a concentraciones 1 mM, 100 μ M y 10 μ M. La disolución de conjugado AgNPs@**12** (**16**) de 4,76 μ M (14,46 moléculas de ligando/nm²). fue la que presentó mayor estabilidad. Como se observa en los espectros de UV-Vis de la *Figura 24*, las nanopartículas preparadas mostraron una alta estabilidad incluso al añadir una concentración final de cloruro de sodio de 0,15 M, confirmando que la incorporación del derivado de etilenglicol proporciona estabilidad a las nanopartículas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

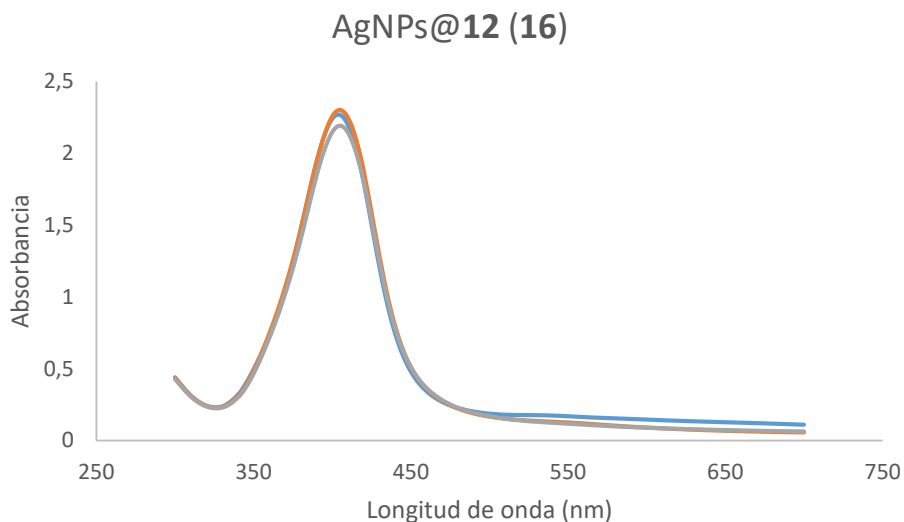
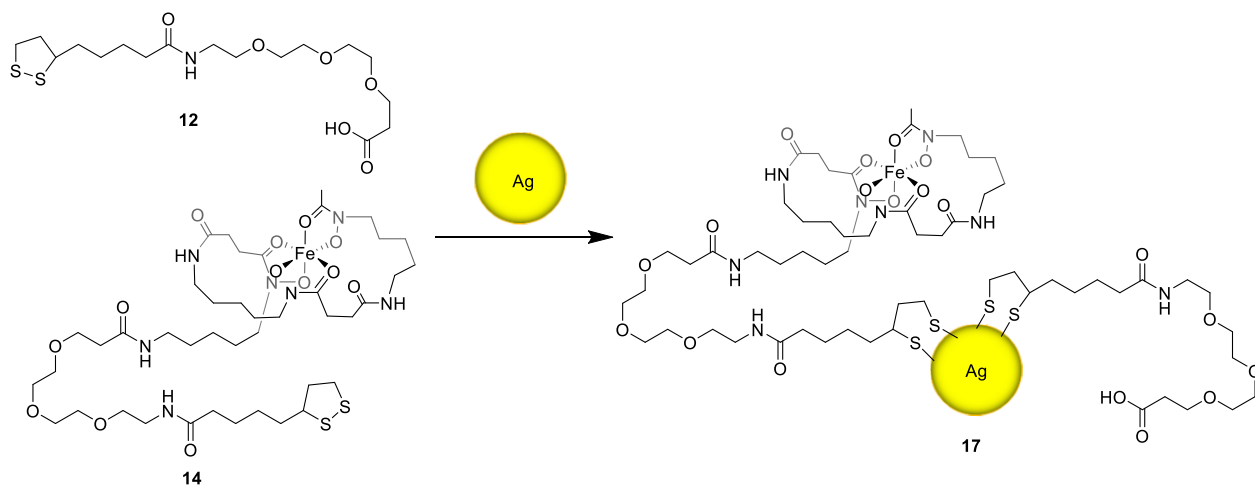


Figura 24 Espectro UV-Vis de AgNPs@12 (16). La línea azul corresponde a la disolución AgNPs@12 (16) con 14,46 moléculas de ligando/nm². La línea naranja corresponde a la misma disolución anterior tras la adición de una concentración final de 0,08 M de NaCl, mientras que la línea gris corresponde a la misma disolución anterior tras la adición de una concentración final de 0,15 M de NaCl.

3.5. Obtención del conjugado AgNPs@12@14 (17)

Se realizó la conjugación de las nanopartículas de plata con los compuestos **12** y **14**, empleando para ello una disolución de ambos compuestos en proporción 10:1, con la intención de disminuir la cantidad de sideróforo **14** en la superficie de las partículas mientras que se mantiene la estabilidad coloidal de éstas gracias al derivado de etilenglicol **12**. Se añadieron concentraciones crecientes de dicha disolución para comprobar cual presentaba mayor absorbancia. La síntesis del conjugado AgNPs@12@14 (17) viene representada en el *Esquema 10*.



Esquema 10 Obtención del conjugado AgNPs@12@14 (17)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El conjugado AgNPs@**12**@**14** (**17**) de concentración 10,7 μM de compuesto **12** y 1,07 μM de compuesto **14** fue el que mostró mayor estabilidad, como se puede comprobar en su espectro UV-Vis en la *Figura 25*. A continuación, se estudió su estabilidad coloidal tras la adición de una concentración final de 0,15 M de NaCl y en concordancia con los resultados obtenidos para las AgNPs@**12** (**16**) las partículas fueron estables en las condiciones testadas. Se estimó que dicha disolución del conjugado tiene 34,71 moléculas de ligando/nm² en compuesto **12** y 3,47 moléculas de ligando/nm² de compuesto **14**.

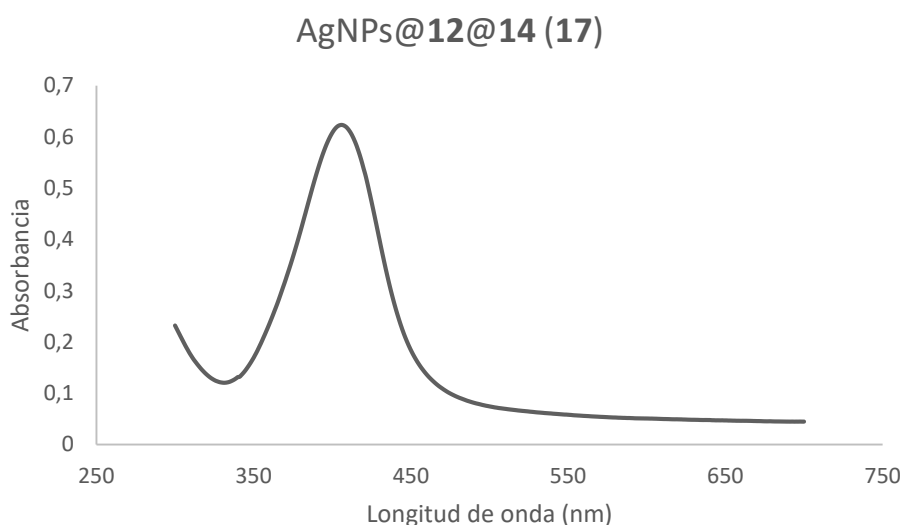


Figura 25 Espectro UV-Vis de AgNPs@**12**@**14** (**17**). Las partículas tienen 34,71 moléculas de ligando **12**/nm² de compuesto **12** y 3,47 moléculas de ligando **14**/nm².

4. Detección bacteriana

Para realizar los ensayos de detección de *Yersinia enterocolitica*, se utilizó el conjugado AgNPs@**12**@**14** (**17**) que mostró mayor estabilidad en las condiciones fisiológicas en las que se va a realizar el ensayo de detección y que se corresponde al conjugado de 34,71 moléculas/nm² para el ligando **12** y 3,47 moléculas/nm² para el compuesto **14**. Para ello, sobre distintas alícuotas de AgNPs@**12**@**14** (**17**) se añadieron alícuotas de disoluciones de *Yersinia enterocolitica* de 10², 10³, 10⁴, 10⁵ y 10⁶ UFC/mL. Tras dejarlas incubando una hora, se recogieron los espectros de absorbancia en el espectrofotómetro UV-Vis, que se muestran en la *Figura 26*.

A pesar de que los ensayos se repitieron, los resultados obtenidos en ambos casos no corresponden con lo que cabría esperar, ya que se observó un aumento de la intensidad del plasmón al aumentar la cantidad de bacteria en la muestra en lugar de observarse

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

un ensanchamiento de la banda correspondiente al plasmón y su desplazamiento a mayores longitudes de onda.

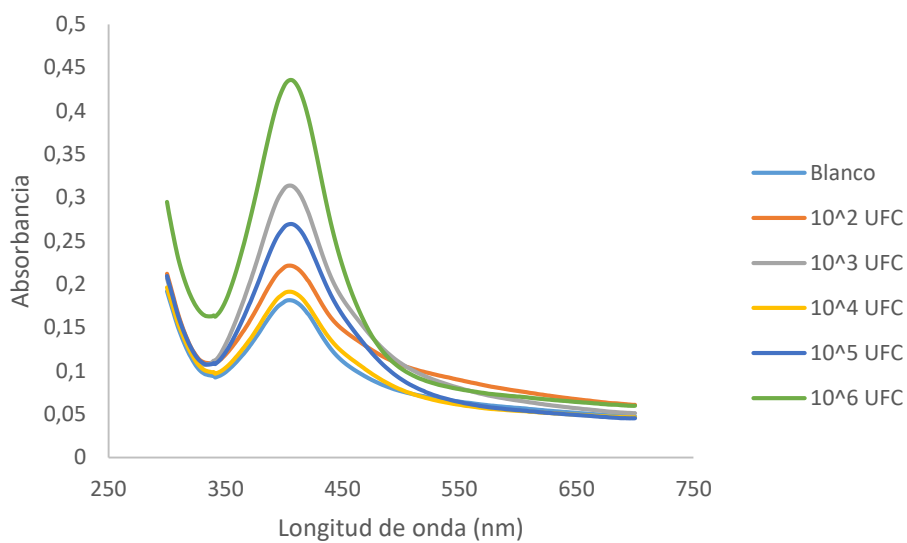


Figura 26 Espectro UV-Vis correspondiente a las AgNPs@12@14 (17) en presencia de distintas cantidades de Yersinia enterocolitica

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En este trabajo de fin de grado se han preparado conjugados de nanopartículas de plata con feroxamina, y se ha evaluado su uso en la detección de *Yersinia enterocolítica*.

Tras realizar varias síntesis, se obtuvieron satisfactoriamente AgNPs de tamaño y forma homogénea, que fueron caracterizadas por MET y espectroscopia UV-Vis.

Se prepararon satisfactoriamente distintos derivados del sideróforo feroxamina y estos se conjugaron a las AgNPs obteniéndose nanopartículas modificadas que presentan distinta estabilidad coloidal dependiendo del derivado de feroxamina utilizado. Finalmente, se concluyó que las partículas que presentan mayor estabilidad coloidal en condiciones fisiológicas son aquellas que se modificaron con el derivado de feroxamina **14**, que contiene trietilenglicol en su estructura, y el derivado de trietilenglicol **12** en proporción 1:10.

Con estas partículas se realizó un ensayo para detectar *Yersinia enterocolítica* y desafortunadamente no se obtuvieron resultados concluyentes.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Singleton, P. *Bacterias En Biología, Biotecnología y Medicina*; Editorial Acribia, 2003.
- (2) Collins, F. M. *Pasteurella, Yersinia, and Francisella*; University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.
- (3) Kim, Y.; Lyvers, D. P.; Wei, A.; Reifenger, R. G.; Low, P. S. Label-Free Detection of a Bacterial Pathogen Using an Immobilized Siderophore, Deferoxamine. *Lab Chip* **2012**, *12*, 971–976.
- (4) Brock, T. D. *Milestones in Microbiology*; ASM Press, 1999.
- (5) Nadkarni, M. A.; Martin, E.; Jacques, N. A.; Hunter, N. Determination of Bacterial Load by Real-Time PCR Using a Broad-Range (Universal) Probe and Primers Set. *Microbiology* **2002**, *148*, 257–266.
- (6) Farrell, S.; Halsall, H. B.; Heineman, W. R. Immunoassay for *B. Globigii* Spores as a Model for Detecting *B. Anthracis* Spores in Finished Water. *Analyst* **2005**, *130*, 489–497.
- (7) Barlen, B.; Datta Mazumdar, S.; Lezrich, O.; Kämpfer, P.; Keusgen, M. Detection of Salmonella by Surface Plasmon Resonance. *Sensors* **2007**, *7*, 1427–1446.
- (8) Wang, L.; Wu, C.; Hu, Z.; Zhang, Y.; Li, R.; Wang, P. Sensing Escherichia Coli O157:H7 via Frequency Shift through a Self-Assembled Monolayer Based QCM Immunosensor. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **2008**, *9*, 121–131.
- (9) Lee, H.-J.; Kim, B. C.; Kim, K.-W.; Kim, Y. K.; Kim, J.; Oh, M.-K. A Sensitive Method to Detect Escherichia Coli Based on Immunomagnetic Separation and Real-Time PCR Amplification of Aptamers. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 3550–3555.
- (10) Brock, T. D.; Madigan, M. T. 1949-; Guerrero, R.; Chica Rueda, M. C.; Duro, R.; Piqueras, M.; Barrachina, C. *Biología de Los Microorganismos*, Ed. Prenti.; 1999.
- (11) Raines, D. J.; Sanderson, T. J.; Wilde, E. J.; Duhme-Klair, A.-K. *Siderophores*, Elsevier.; 2015.
- (12) Crosa, J. H.; Walsh, C. T. Genetics and Assembly Line Enzymology of Siderophore Biosynthesis in Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2002**, *66*, 223–249.

BIBLIOGRAFÍA

- (13) Hider, R. C.; Kong, X. Chemistry and Biology of Siderophores. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 637–657.
- (14) Schalk, I. J.; Hannauer, M.; Braud, A. New Roles for Bacterial Siderophores in Metal Transport and Tolerance. *Environ. Microbiol.* **2011**, *13*, 2844–2854.
- (15) Galinetto, P.; Taglietti, A.; Pasotti, L.; Pallavicini, P.; Dacarro, G.; Giulotto, E.; Grandi, M. S. SERS Activity of Silver Nanoparticles Functionalized with A Desferrioxamine B Derived Ligand for Fe(III) Binding and Sensing. *J. Appl. Spectrosc.* **2016**, *82*, 1052–1059.
- (16) Balado, M.; Segade, Y.; Rey, D.; Osorio, C. R.; Rodríguez, J.; Lemos, M. L.; Jimenez, C. Identification of the Ferric-Acinetobactin Outer Membrane Receptor in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* and Structure–Activity Relationships of Synthetic Acinetobactin Analogues. *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 479–493.
- (17) Cisneros, J.; Castro, S.; Carlos, G.; González, J. Preparación de Conjugados de Sideróforos Con Nanopartículas Magnéticas y Su Posible Aplicación En La Detección de Patógenos, Trabajo Fin de Máster, Universidade da Coruña, 2016.
- (18) Zheng, T.; Nolan, E. M. Siderophore-Based Detection of Fe(III) and Microbial Pathogens. *Metallomics* **2012**, *4*, 866–880.
- (19) Smart, L.; Moore, E. *Solid State Chemistry: An Introduction*; CRC Press, 2012.
- (20) Paramelle, D.; Sadovoy, A.; Gorelik, S.; Free, P.; Hobley, J.; Fernig, D. G. A Rapid Method to Estimate the Concentration of Citrate Capped Silver Nanoparticles from UV-Visible Light Spectra. *Analyst* **2014**, *139*, 4855–4861.
- (21) Pazos, E.; Sleep, E.; Rubert Peez, C. M.; Lee, S. S.; Tantakitti, F.; Stupp, S. I. Nucleation and Growth of Ordered Arrays of Silver Nanoparticles on Peptide Nanofibers: Hybrid Nanostructures with Antimicrobial Properties. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 5507–5510.
- (22) Wang, Z. L. Transmission Electron Microscopy of Shape-Controlled Nanocrystals and Their Assemblies. *J. Phys. Chem.* **2000**, *104*, 1153–1175.
- (23) Microscopia electrónica de transmisión: Servicio de Microscopia Electrónica: UPV <http://www.upv.es/entidades/SME/info/753329normalc.html> (accedido el 13

BIBLIOGRAFÍA

- de abril del 2018).
- (24) Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J. *Fundamentos de Química Analítica*; Reverté, 1996.
- (25) Fournier, P.-E.; Drancourt, M.; Colson, P.; Rolain, J.-M.; La Scola, B.; Raoult, D. Modern Clinical Microbiology: New Challenges and Solutions. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 574–585.
- (26) Singhal, N.; Kumar, M.; Kanaujia, P. K.; Viridi, J. S. MALDI-TOF Mass Spectrometry: An Emerging Technology for Microbial Identification and Diagnosis. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 791.
- (27) Pazos-Perez, N.; Pazos, E.; Catala, C.; Mir-Simon, B.; Gómez-De Pedro, S.; Sagales, J.; Villanueva, C.; Vila, J.; Soriano, A.; Javier García De Abajo, F.; et al. Ultrasensitive Multiplex Optical Quantification of Bacteria in Large Samples of Biofluids. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 29014.
- (28) Catala, C.; Mir-Simon, B.; Xiaotong, F.; Cardozo, C.; Pazos-Perez, N.; Pazos, E.; Gómez-de Pedro, S. Online SERS Quantification of Staphylococcus Aureus and the Application to Diagnostics in Human Fluids. *Adv. Mater. Technol.* **2016**, *1*, 1600163.

ANEXOS

ANEXOS

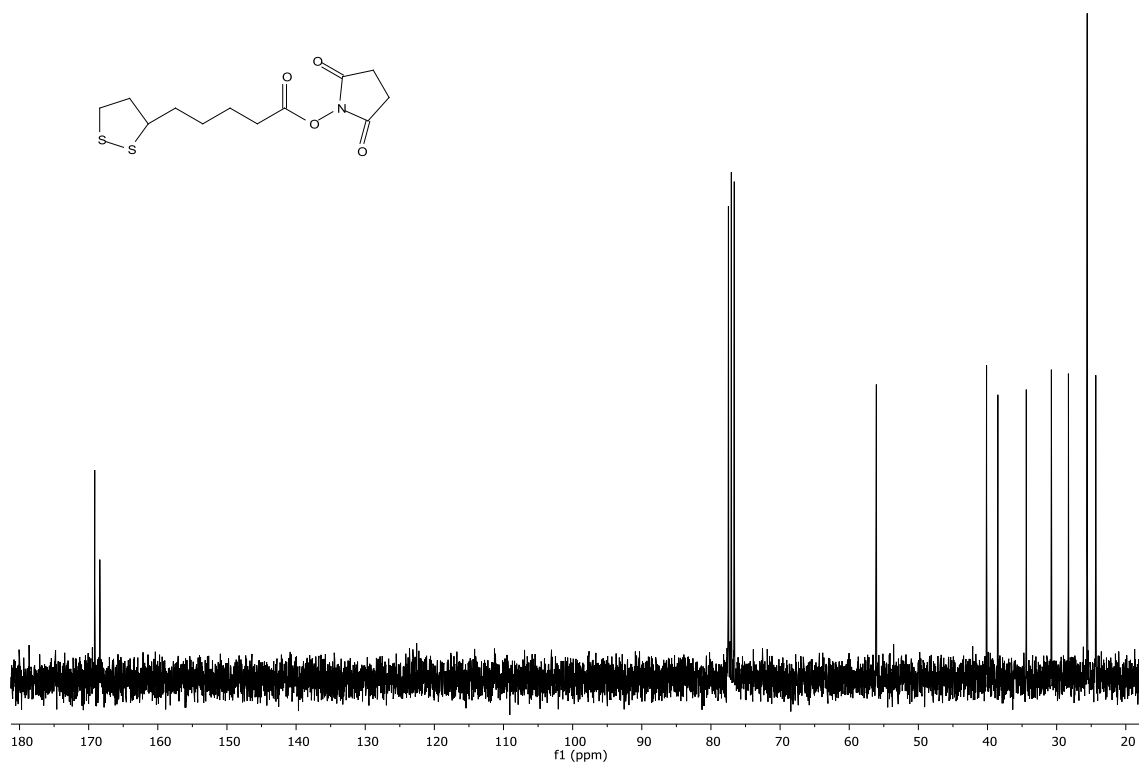


Figura 27 Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 2 en CDCl_3

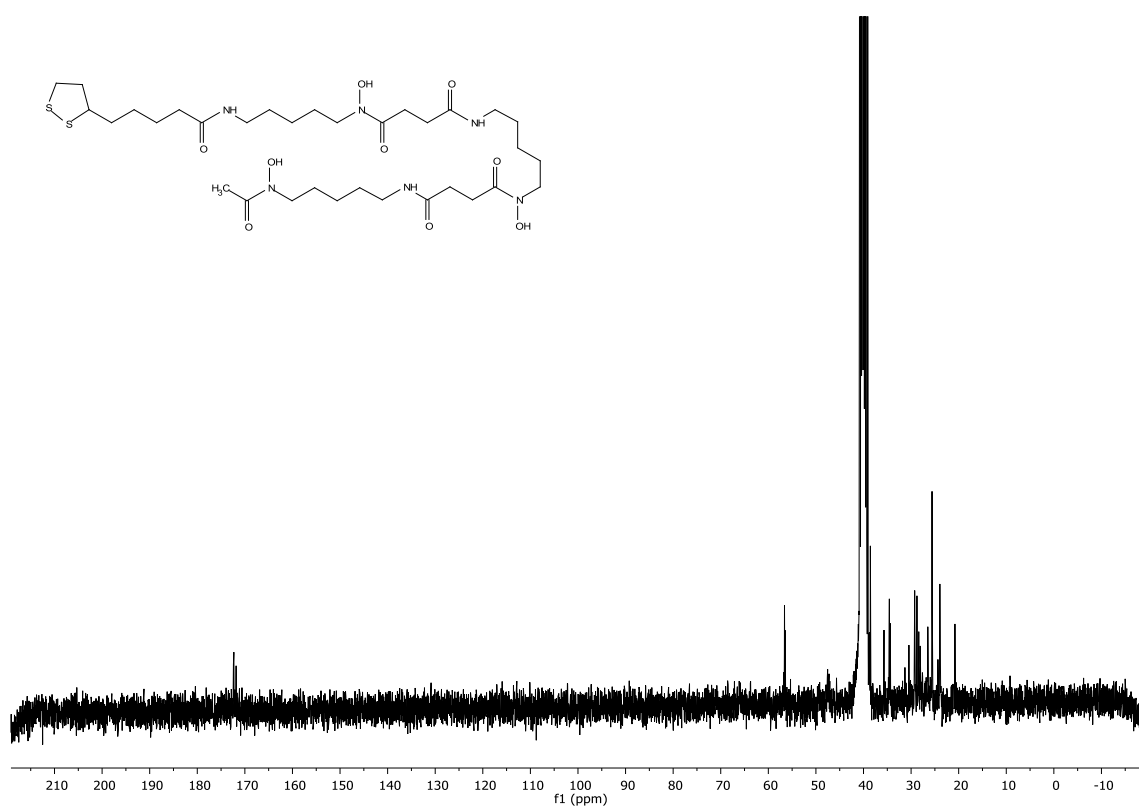


Figura 28 Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 4 en CDCl_3

ANEXOS

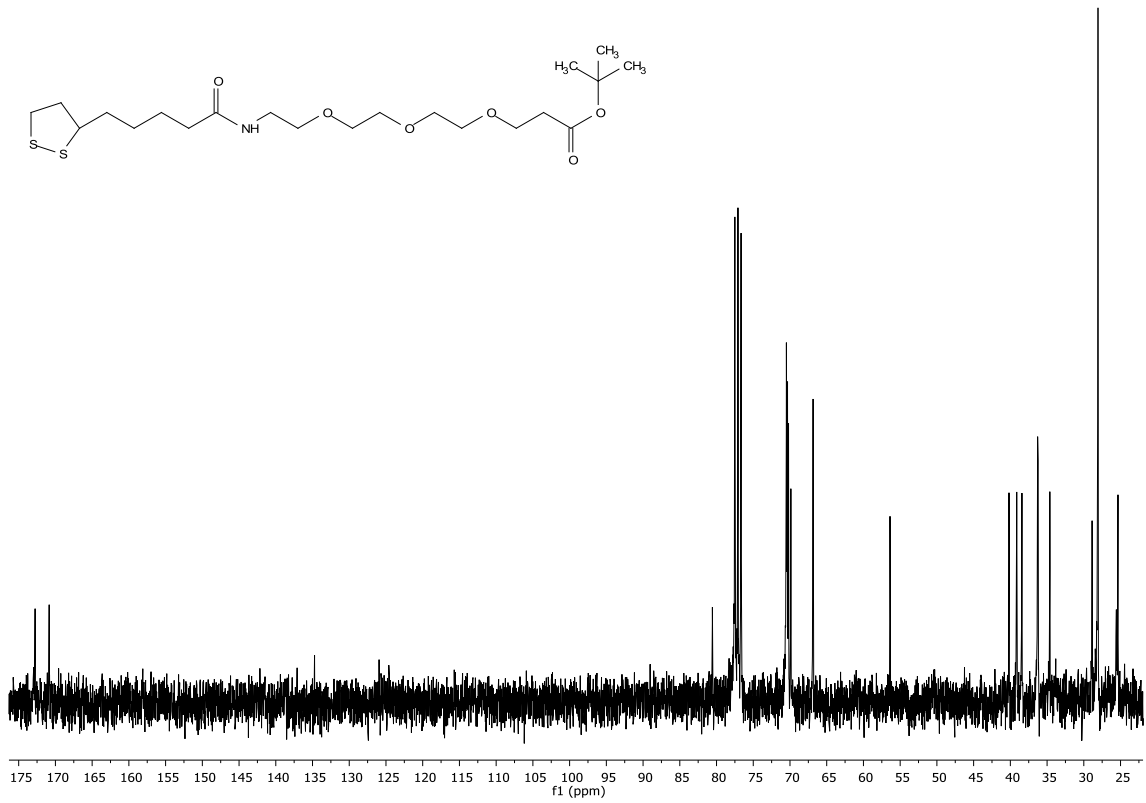


Figura 29 Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 11 en CDCl_3

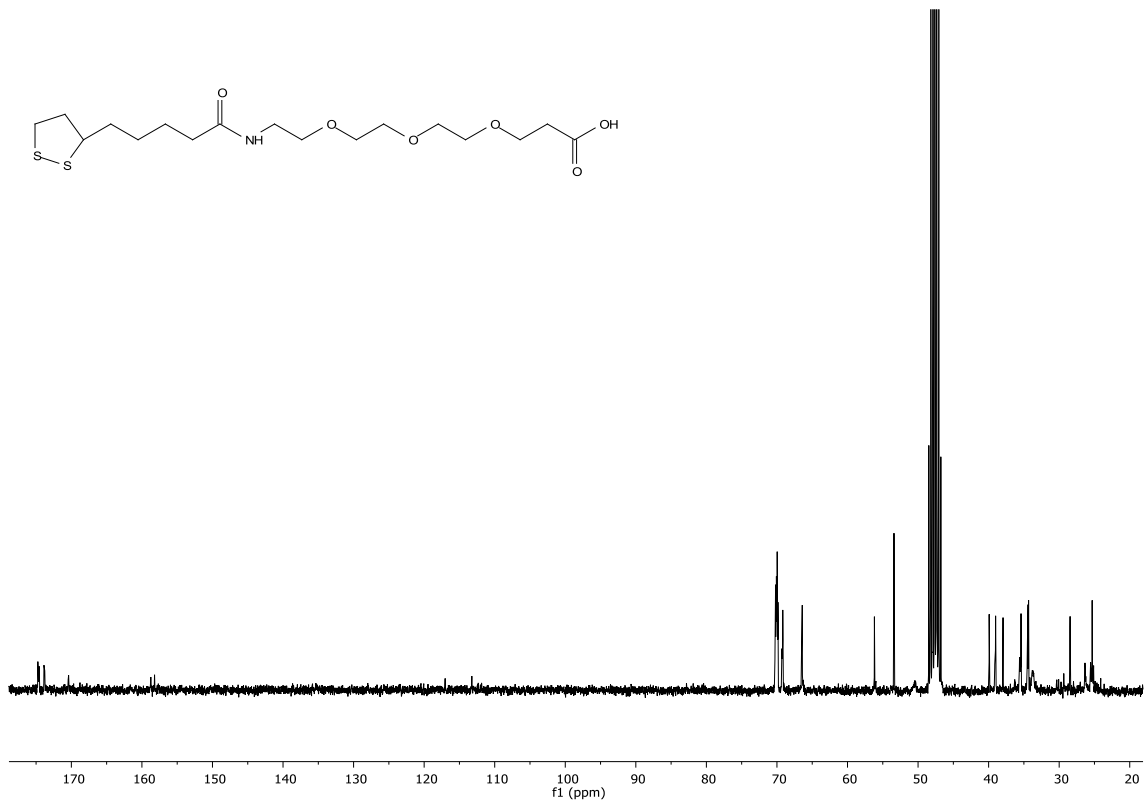


Figura 30 Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 12 en CD_3OD

ANEXOS

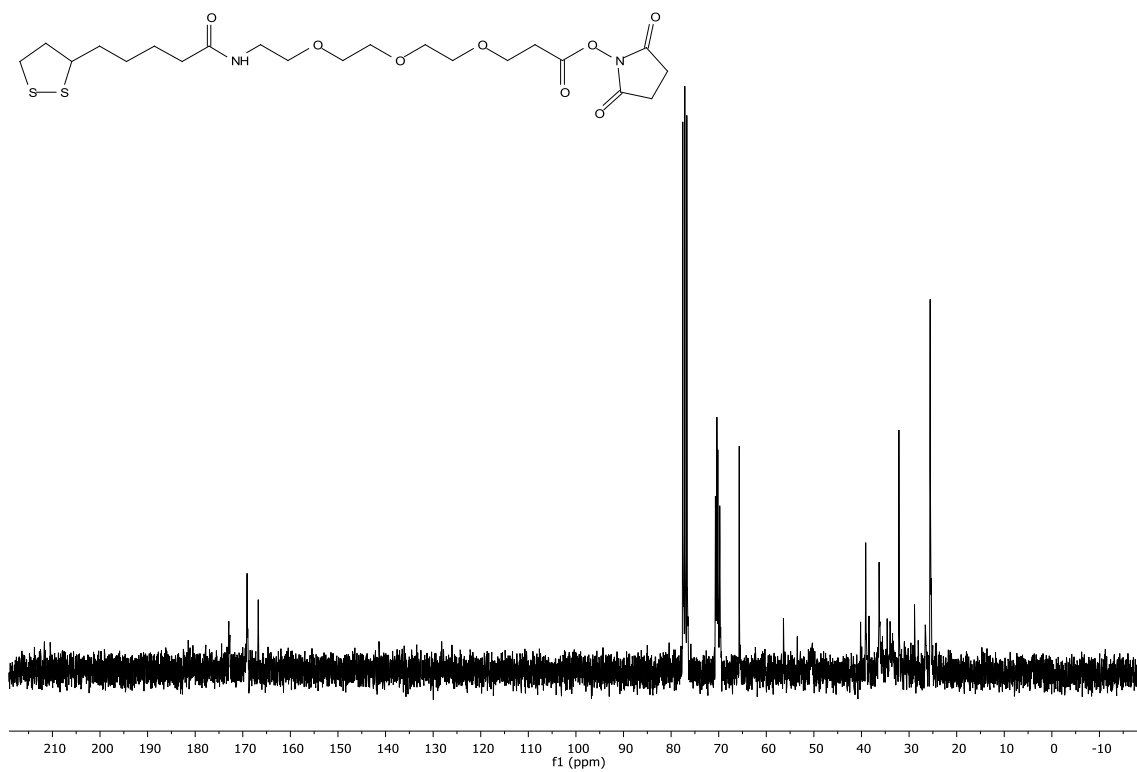


Figura 31 Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 13 en CDCl_3

ANEXOS

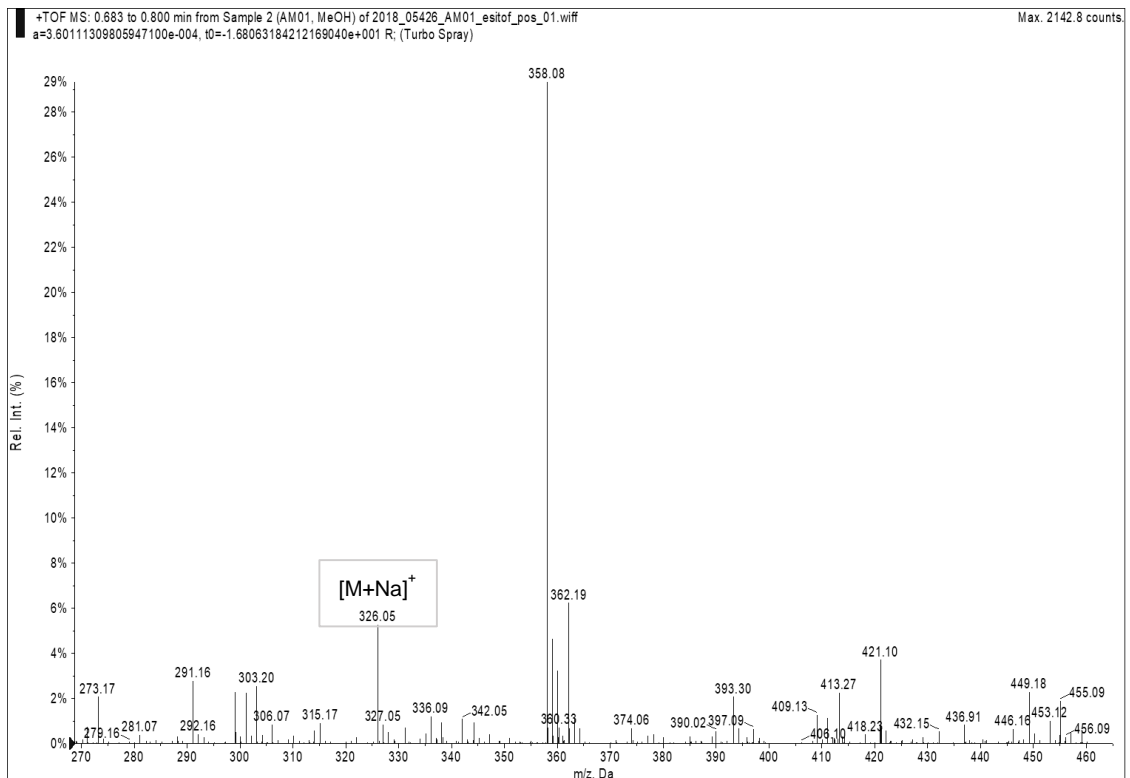
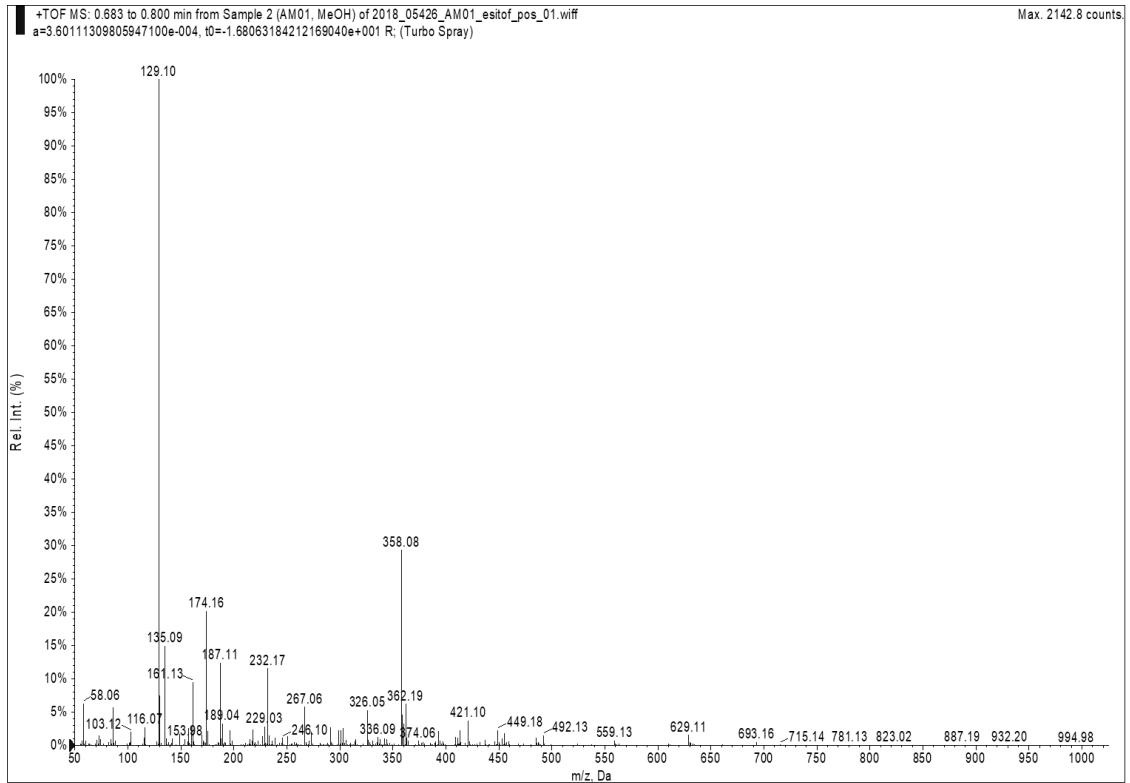


Figura 32 Espectro de masas (+)-ESI de baja resolución del compuesto 2

ANEXOS

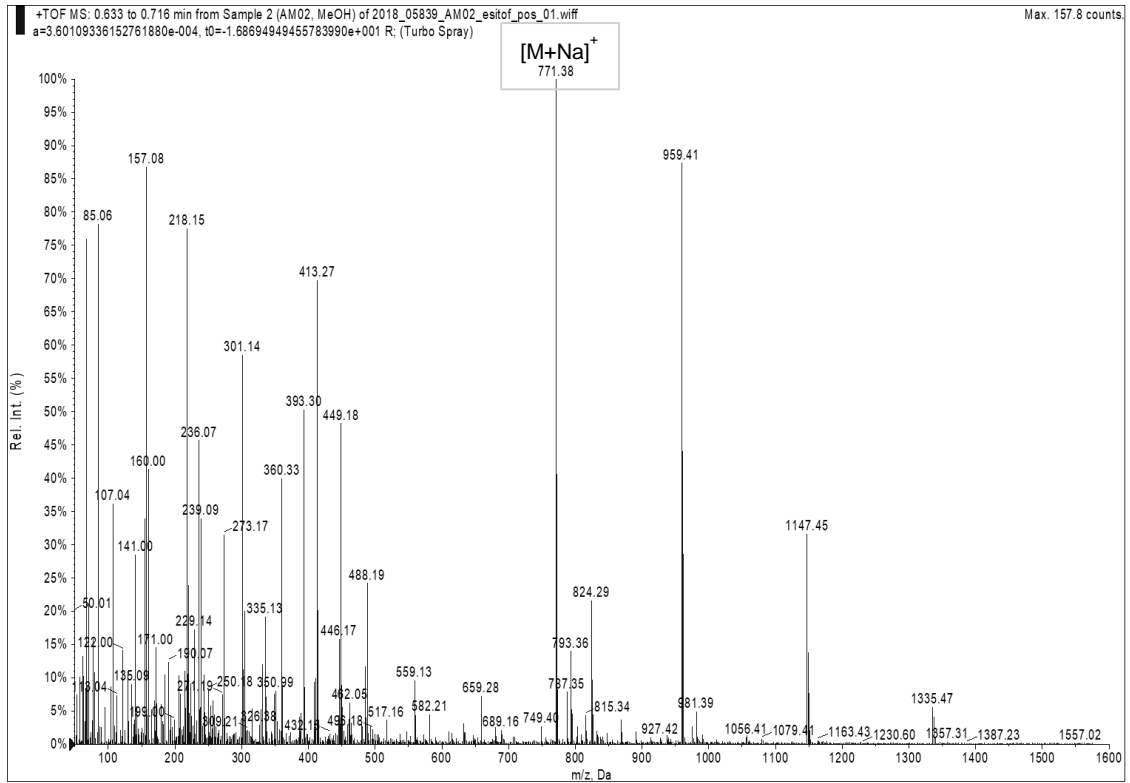


Figura 33 Espectro de masas (+)-ESI de baja resolución del compuesto 4

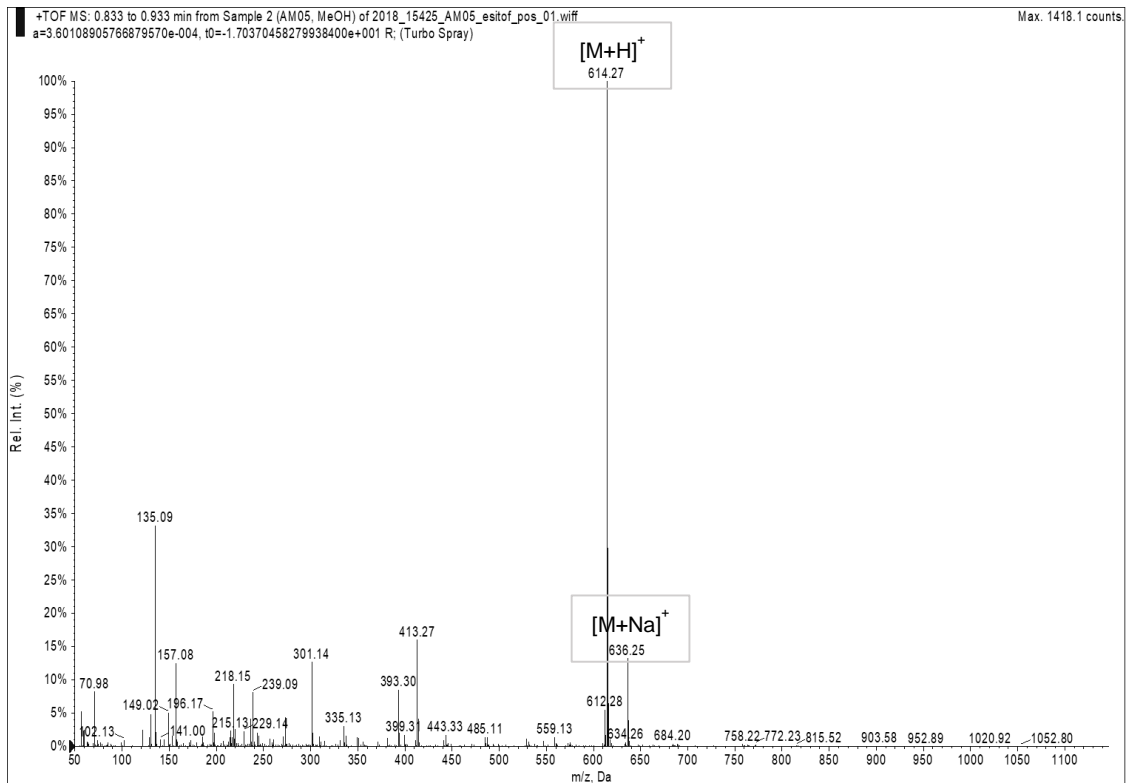


Figura 34 Espectro de masas (+)-ESI de baja resolución del compuesto 7

ANEXOS

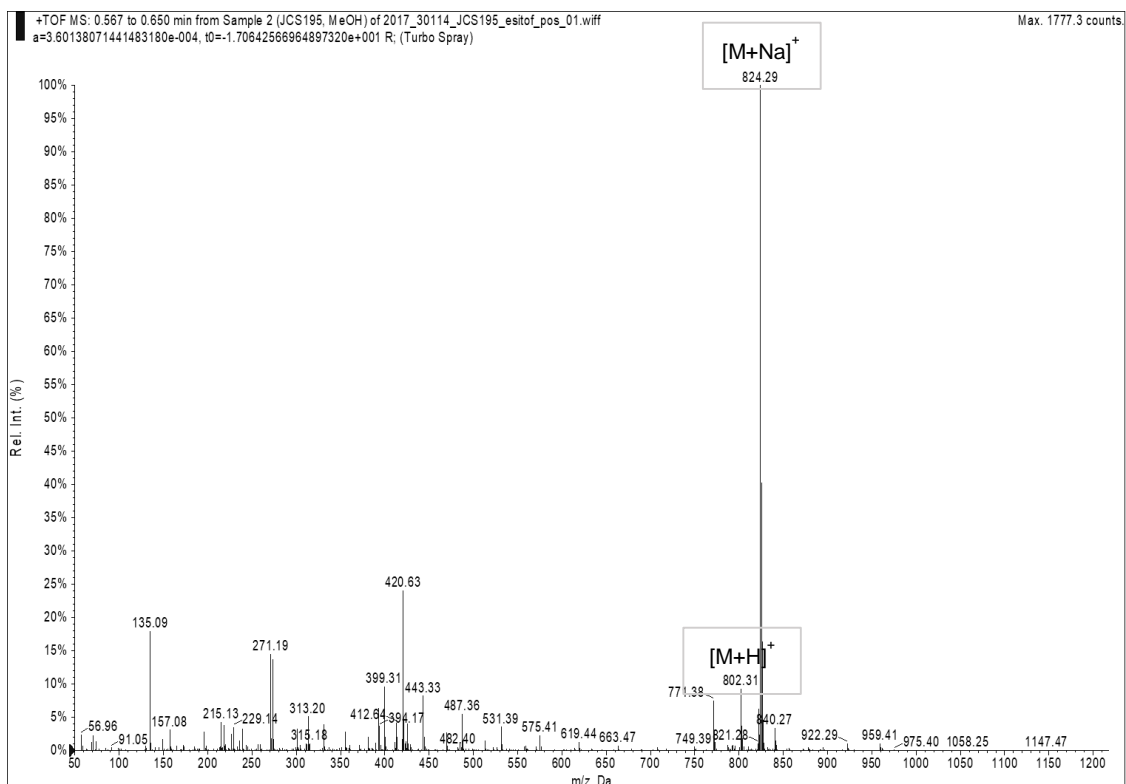


Figura 35 Espectro de masas (+)-ESI de baja resolución del compuesto 8

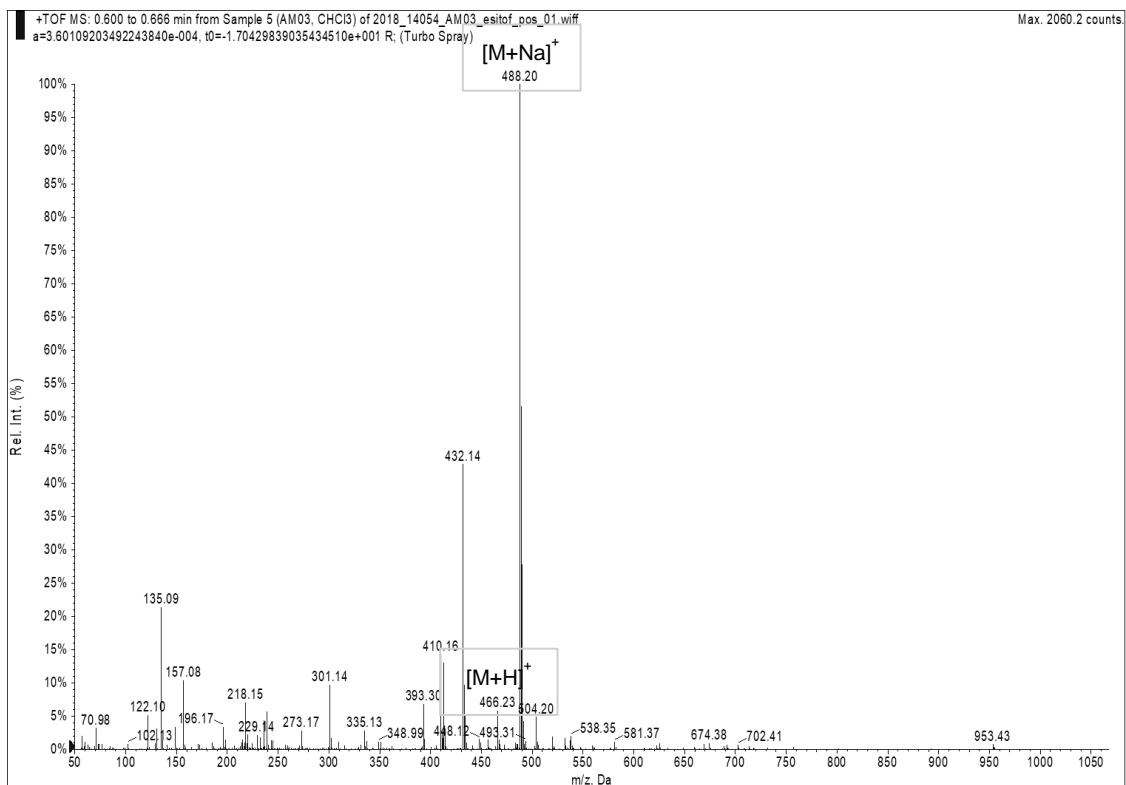


Figura 36 Espectro de masas (+)-ESI de baja resolución del compuesto 11

ANEXOS

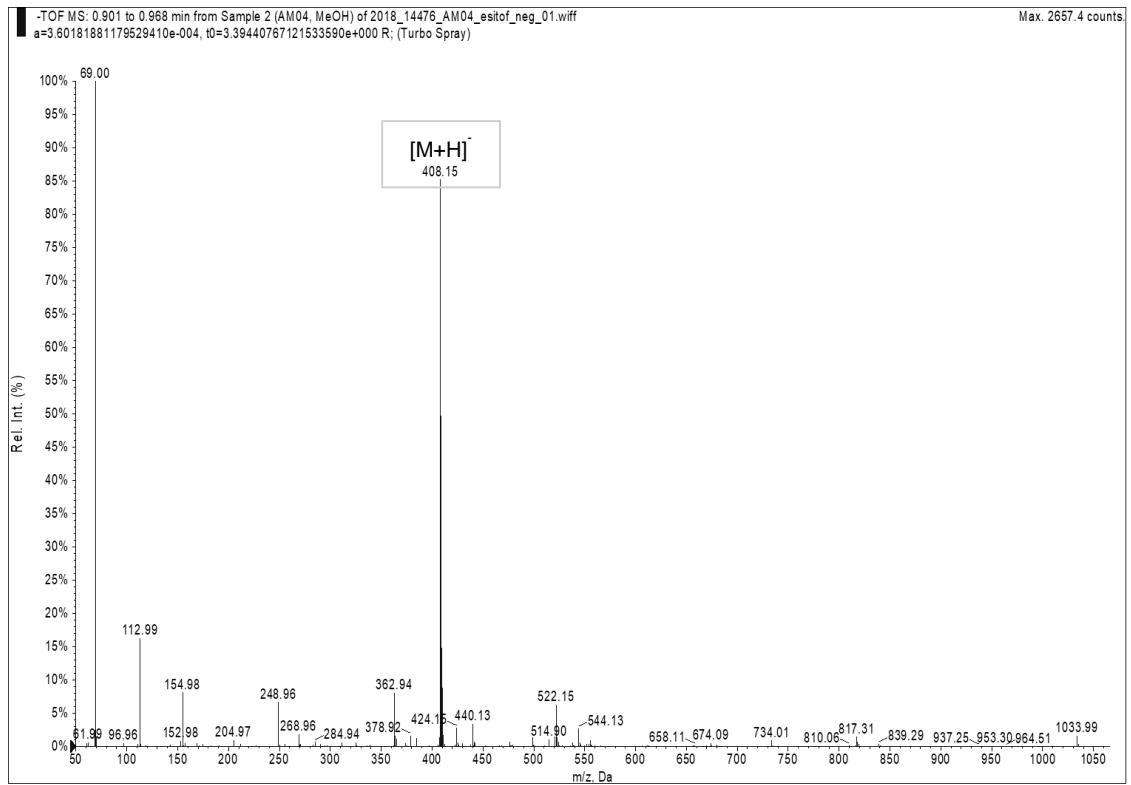


Figura 37 Espectro de masas (-)-ESI de baja resolución del compuesto 12

ANEXOS

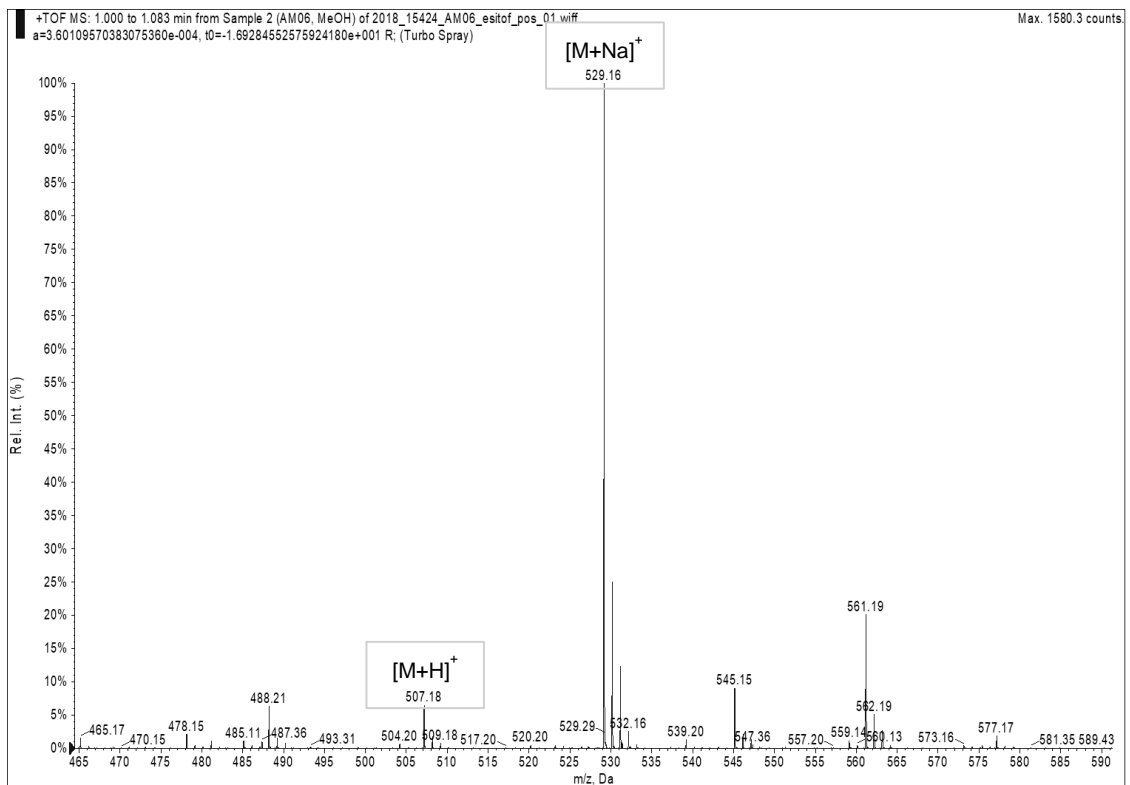
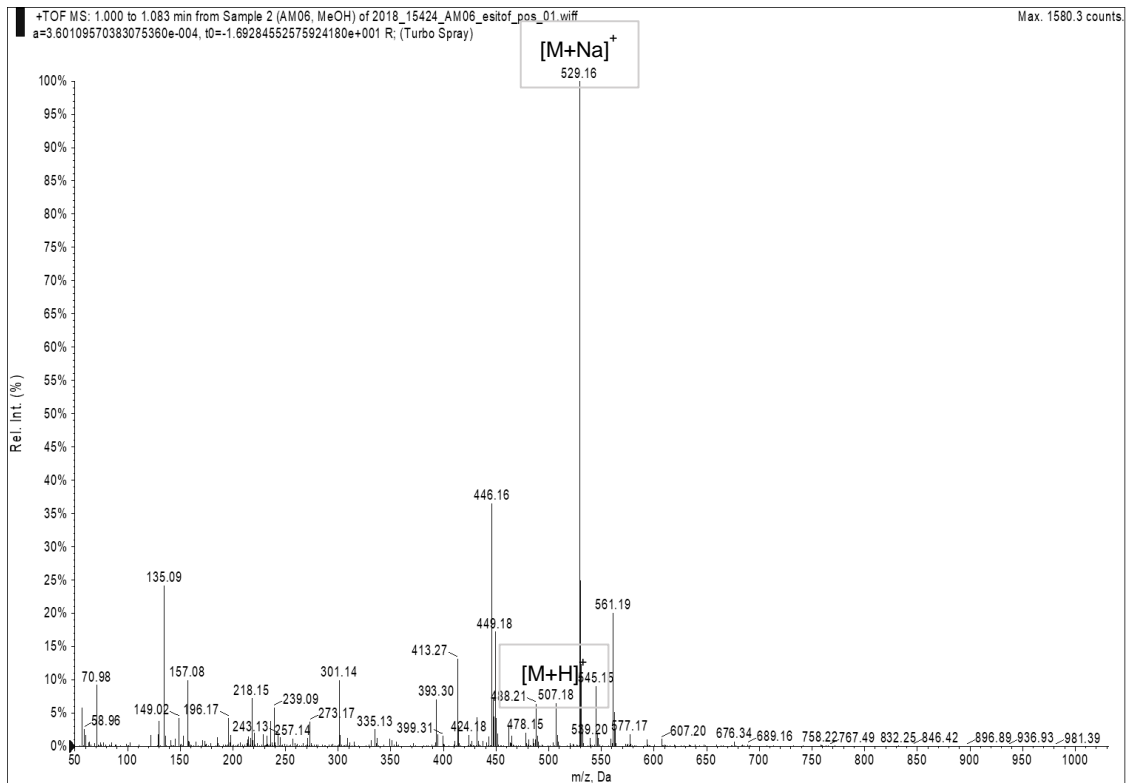


Figura 38 Espectro de masas (+)-ESI de baja resolución del compuesto 13

ANEXOS

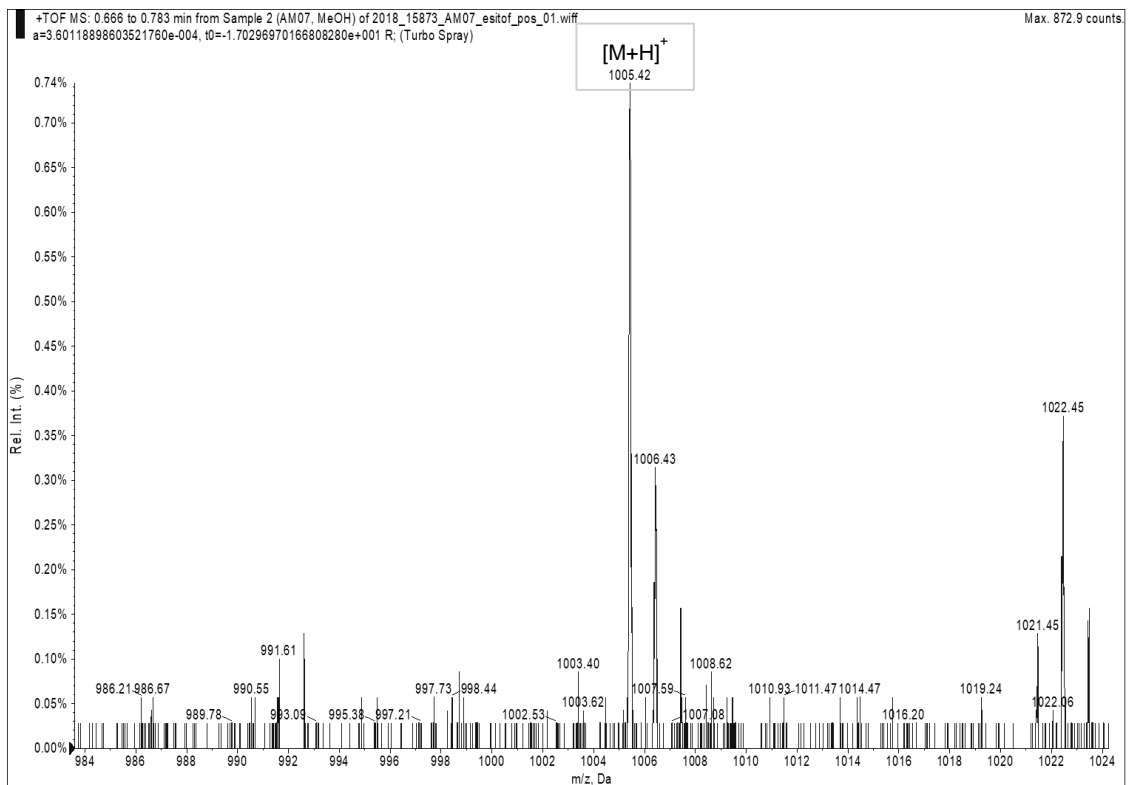
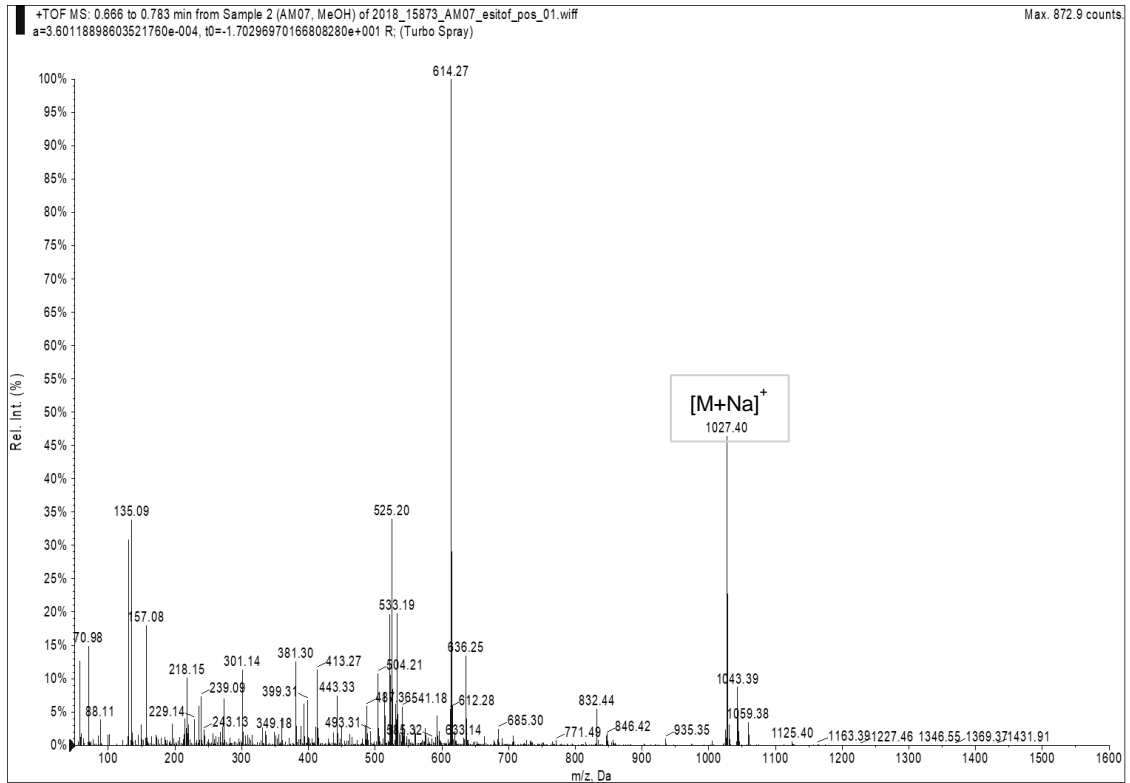


Figura 39 Espectro de masas (+)-ESI de baja resolución del compuesto 14