

TESIS CON CARACTER ABIERTO

PROGRAMA: MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS

AUTOR: ENRIQUE ARIAS ARCINIEGAS FIRMA 

TITULO: Detección de *Escherichia coli* mediante interacción de las fimbrias tipo 1 con polímeros y oligómeros fenilnetileno funcionalizados con manosa.

ASESORES: Dr. Eduardo Manuel Arias Marín FIRMA 

Dr. Antonio Ledezma Pérez FIRMA 

El Centro de Investigación en Química Aplicada clasifica el presente documento de tesis como ABIERTO.

Un documento clasificado como Abierto se expone en los estantes del Centro de Información para su consulta. Dicho documento no puede ser copiado en ninguna modalidad sin autorización por escrito del Titular del Centro de Información o del Director General del CIQA.

Saltillo, Coahuila, a 23 de Febrero de 2009



Sello de la Institución

Dr. Juan Méndez Nonell
Director General del CIQA



Centro de investigación en Química Aplicada

TESIS

Detección de *Escherichia coli* mediante interacción de las fimbrias tipo I con polímeros y oligómeros fenilnetileno funcionalizados con manosa.

Presentado por:

Enrique Arias Arciniegas

Para obtener el grado de:

Maestro en Tecnología de Polímeros

Asesores:

Dr. Eduardo Arias Marín

Dr. Antonio Ledezma Pérez

Saltillo, Coahuila

Febrero 2009

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros

TESIS

**Detección de Escherichia coli mediante interacción de las fimbrias tipo 1 con
polímeros y oligómeros fenilnetinileno funcionalizados con manosa**

Presentada por:

ENRIQUE ARIAS ARCINIEGAS

Para obtener el grado de:

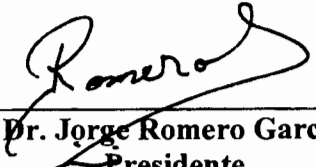
Maestro en Tecnología de Polímeros

Asesorado por:

Dr. Eduardo Manuel Arias Marín

Dr. Antonio Ledezma Pérez


SINODALES



Dr. Jorge Romero García
Presidente



Dra. Erika Vázquez Guzmán
Secretario



Dra. Ma. Isabel Reyes Valderrama
Vocal

Saltillo, Coahuila


CENTRO DE INFORMACIÓN

Febrero, 2009

01 SEP 2009

RECIBIDO

DECLARACIÓN

Declaro que la información contenida en la Parte Experimental así como en la Parte de Resultados y Discusiones de este documento y que forman parte de las actividades de investigación y desarrollo realizadas durante el período que se me asignó para llevar a cabo mi trabajo de tesis, será propiedad del Centro de Investigación en Química Aplicada.

Saltillo, Coahuila a 23 de febrero de 2009



ENRIQUE ARIAS ARCINIEGAS

Nombre y Firma

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis corresponde a los estudios realizados con una beca otorgada por la Secretaría de Relaciones Exteriores del Gobierno de México.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo de la beca terminal otorgado a través del proyecto U51504-R.

Al Centro de Investigaciones en Química Aplicada CIQA por la oportunidad brindada.

A mis asesores ante todo por la paciencia demostrada y en general por el seguimiento perseverante y el apoyo incondicional.

Al equipo de trabajo del laboratorio por brindarme su confianza, amistad y un continuo acompañamiento.

A la L.C.Q. Gabriela Padrón Gamboa por el apoyo técnico otorgado en la manipulación de material biológico.

A la L.C.Q. Diana Iris Medellín Banda por el apoyo técnico dado en la síntesis de compuestos químicos.

A la M.C. María Luisa López Quintanilla por el apoyo técnico dado en la obtención de imágenes de microscopía electrónica de transmisión.

A la QFB. Myriam Lozano Estrada por el apoyo técnico dado en la obtención de imágenes de microscopía electrónica de barrido.

A la Dra. Esmeralda Monserrat Saucedo Salazar por el apoyo dado para la consecución de imágenes de microscopía electrónica de transmisión.

Al grupo evaluador por sus enriquecedoras observaciones que me permitieron resaltar y los logros alcanzados.

A Santa Griselda de la Resonancia por ser mi Gurú personal y permitirme aproximar a su infinita sabiduría.

A Lizeth Adriana García Yeverino por dejar de ser la compañera de maestría para convertirse en la amiga que me acompañó en todo el trayecto.

A Karla Judith Moreno Bello por sus comentarios directos que me aterrizaron a la realidad constantemente.

A Mayela Govea Salas por la caracterización microbiológica realizada y por ofrecerme su amistad.

A mis amigos en general, ya estén cerca o lejos porque con sus palabras de apoyo supieron estar siempre presentes y darme las energías para avanzar.

Un agradecimiento especial a mi familia que, aunque alejados físicamente, nunca estuvieron ausentes, especialmente mi madre, fuente impulsadora de energía, motivo que me permitió concluir este trabajo a pesar de los inconvenientes.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Índice general	i
Índice de figuras	iv
Índice de tablas	viii
Resumen	ix
1 Introducción	1
2 Antecedentes	4
2.1 Reconocimiento molecular y adherencia bacteriana	4
2.2 Infección del tracto urinario por <i>Escherichia coli</i>	5
2.3 Fimbrias tipo I	7
2.4 Los polímeros y oligómeros conjugados	10
2.5 Oligómeros y polímeros del tipo fenilnetileno	11
2.6 Reacción de acoplamiento de Sonogashira-Heck	12
2.7 Estado del arte	17
3 Hipótesis	22
4 Objetivos	22
Metas	22
5 Justificación	23
6 Desarrollo experimental	24
6.1 Materiales y equipos	24
6.2 Reactivos y solventes	25
6.3 Síntesis de oligómeros	26
6.3.1 Síntesis del 4-yodo benzoato de bencilo	26
6.3.2 Síntesis del bencil 4, 4' - (2 - (undeciloxycarbonil) - 1, 4 - fenilen) bis (etin - 2, 1 - diil) dibenzoato	27
6.3.3 Síntesis del ácido 4, 4' - (2 - carboxi - 1, 4 - fenilen) bis (etino - 2, 1 - diil) dibenzoico	28
6.3.4 Síntesis del trímero fenilnetileno con terminaciones manosa	29

6.4	Síntesis de polímeros	29
6.4.1	Síntesis del monómero dihalogenado con una terminación manosa	29
6.4.2	Polimerización	30
6.5	Condiciones de cultivo de <i>Escherichia coli</i>	31
6.6	Reconocimiento de las fimbrias tipo I por aglutinación	33
6.7	Caracterización de la morfología celular por microscopía	37
6.7.1	Microscopía electrónica de barrido (MEB)	37
6.7.2	Microscopía de fuerza atómica AFM	38
6.7.3	Tinciones negativas	39
6.8	Reconocimiento bacteriano mediante el uso de los oligómeros y polímeros funcionalizados con manosa	39
6.9	Rendimiento cuántico	41
7	Resultados y discusiones	42
7.1	Síntesis del 4-yodo benzoato de bencilo	43
7.2	Síntesis del trímero fenilnetinileno con terminaciones manosa	45
7.2.1	Síntesis del trímero con los grupos ácidos carboxílicos protegidos con benzoatos de bencilo (reacción de acoplamiento de Sonogashira-Heck)	47
7.2.2	Desprotección de grupos carboxilo	48
7.2.3	Reacción de amidación	50
7.3	Síntesis del polímero	52
7.3.1	Síntesis de benzoato 2,5-dibromo con terminaciones manosa	52
7.3.2	Polimerización	53
7.4	Obtención de cultivos de <i>Escherichia coli</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55
7.5	Reconocimiento de las fimbrias tipo I por aglutinación	58
7.6	Caracterización de la morfología celular por microscopía	61
7.6.1	Caracterización de células de <i>E. coli</i> por microscopía electrónica de barrido (MEB)	61
7.6.2	Caracterización de células de <i>E. coli</i> por microscopía de fuerza atómica (AFM)	62

7.6.3	Caracterización de células de <i>E. coli</i> por microscopía electrónica de transmisión (MET)	66
7.7	Evaluación de oligómeros y del polímero funcionalizados con manosa para el reconocimiento molecular de las fimbrias tipo I de <i>Escherichia coli</i>	69
7.7.1	Evaluación de la interacción de concanavalina A con células de <i>E. coli</i>	69
7.7.2	Evaluación de la interacción de células de <i>E. coli</i> con oligómeros fenilnetinileno funcionalizados con grupos terminales carboxilo (Trímero 1)	72
7.7.3	Evaluación de la interacción de células de <i>E. coli</i> con oligómeros fenilnetinileno funcionalizados con grupos terminales manosa y éter (Trímero 2)	74
7.7.4	Evaluación de la interacción de células de <i>E. coli</i> con oligómeros fenilnetinileno funcionalizados con grupos terminales manosa (Trímero 3)	78
7.7.5	Evaluación de la interacción de células de <i>E. coli</i> con oligómeros fenilnetinileno funcionalizados con grupos terminales carboxilo y glicol (Trímero 4).	80
7.7.6	Evaluación del polímero funcionalizado con moléculas de manosa	81
7.8	Rendimiento cuántico	84
8	Conclusiones	85
9	Trabajo a futuro	86
10	Referencias	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Nombre	Pág.
1.1	Fimbrias tipo I en la membrana celular	2
2.1	Estructura de las fimbrias tipo I	8
2.2	Reacción de acoplamiento de Sonogashira-Heck	12
2.3	Mecanismo de reacción propuesto por Sonogashira-Heck para el acoplamiento de acetilenos terminales y halogenuros de arilo	13
2.4	Mecanismo de reacción propuesto para el acoplamiento de acetilenos terminales y halogenuros de arilo	14
2.5	Especies aniónicas producidas en la primera etapa del mecanismo de reacción propuesto por Amatore	15
2.6	Adición oxidativa en la segunda etapa descrita por Amatore	16
2.7	Poli(diacetileno) funcionalizado con ácido siálico para la identificación del virus de la influenza	18
2.8	Politiofenos (a) portador de manosa, (b) portador de ácido siálico	19
2.9	Polímero de tipo fenilnetileno funcionalizado con el monosacárido manosa para la detección de la bacteria <i>E. coli</i>	20
2.10	Imágenes de aglomerados bajo la lámpara UV	20
6.1	Modelo de aglutinación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con concanavalina A	33
6.2	Inhibición de la aglomeración de levaduras por presencia de moléculas de manosa	33
6.3	Modelo de aglutinación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con <i>Escherichia coli</i> .	37
7.1	Oligómeros portadores de grupos ácido carboxílico y funcionalizados con uno y dos grupos manosa empleados en el reconocimiento de la bacteria <i>E. coli</i>	42
7.2	Ruta de síntesis del 4-yodo benzoato de bencilo	43
7.3	Mecanismo de reacción para obtener el 4-yodo benzoato de bencilo	44

7.4	Espectro de RMN ^1H correspondiente al ácido 4-yodobenzoico y al 4-yodo benzoato de bencilo	45
7.5	Ruta de síntesis del trímero fenilnetinileno con terminaciones manosa	46
7.6	Espectro de RMN ^1H correspondiente al 4,4'-(2-(undeciloxicarbonil)-1,4-fenileno) bis (etino-2,1-diil) dibenzoato de bencilo	47
7.7	Mecanismo de reacción para la desprotección de funciones carboxílicas en medio alcalino (KOH)	48
7.8	Espectro de RMN ^1H correspondiente al ácido 4,4'-(2-carboxi-1,4-fenileno) bis (etino-2,1-diil) dibenzoico	49
7.9	Etapa 1 del mecanismo de reacción de amidación	50
7.10	Etapa 2 del mecanismo de reacción de amidación	50
7.11	Espectro de RMN ^1H correspondiente al trímero con tres terminaciones manosa	51
7.12	Ruta de síntesis del benzoato 2,5-dibromo con terminaciones manosa	52
7.13	Espectro de RMN ^1H correspondiente al trímero con tres terminaciones manosa	53
7.14	Ruta de síntesis del polímero con terminaciones manosa	53
7.15	Espectro de RMN ^1H correspondiente al trímero con tres terminaciones manosa	54
7.16	Espectros de IR del polímero comparado con el de la materia prima	55
7.17	Comportamiento de la prueba de aglutinación respecto a la concentración de bacterias a 200 aumentos	56
7.18	Comportamiento de la aglutinación de células de levadura tratadas con concanavalina A, a 200 aumentos	57
7.19	Pruebas de aglutinación de lavaduras con bacterias a 200 aumentos. Concentración de levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> constante a 10^8 células/mL, concentración de células de <i>Escherichia coli</i> variable	59
7.20	Inhibición de la interacción entre células de <i>E. coli</i> y células de <i>S. cerevisiae</i> en presencia de manosa a 200 aumentos	60
7.21	Agglomerado de células de <i>E. coli</i> observado por microscopía electrónica de barrido (MEB) a 10000x	61

7.22	Micrografías de células aisladas de <i>E. coli</i> observadas mediante microscopía electrónica de barrido (MEB)	62
7.23	Interacción entre las células de <i>Escherichia coli</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> observado en MEB	62
7.24	Modo de muestreo del AFM	63
7.25	Imagen de una célula de <i>E. coli</i> en AFM	63
7.26	Caracterización de células de <i>E. coli</i> por AFM	64
7.27	Caracterización de células de <i>E. coli</i> por AFM a velocidad baja de escaneo	65
7.28	Caracterización de <i>E. coli</i> por AFM mediante el montaje de células sobre portaobjetos de vidrio	66
7.29	<i>E. coli</i> mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) a 45000x	66
7.30	Células de <i>E. coli</i> con fimbrias y flagelos obtenidas mediante MET	67
7.31	Micrografías de células de <i>E. coli</i> con flagelos y fimbrias obtenidas a 130000x mediante MET	67
7.32	Caracterización por MET de células de <i>E. coli</i> con flagelos y fimbrias	68
7.33	Suspensiones de bacterias de <i>Escherichia coli</i> en microscopía óptica a 800 aumentos	70
7.34	Suspensión de bacterias obtenida por LSCM: <i>Escherichia coli</i> . (40 μ l), Concanavalina A (10 μ l) y PBS (950 μ l)	71
7.35	Aglomerados formados espontáneamente por el trímero 1 sin presencia de bacterias de <i>E. coli</i> a 800 aumentos	72
7.36	Solución del trímero 1 bajo la lámpara UV	73
7.37	Mezclas del trímero 1 con <i>Escherichia coli</i> y PBS a 800 aumentos	73
7.38	Suspensión de células bacterianas de <i>E. coli</i> , el trímero 1 y PBS obtenida por LSCM	74
7.39	Aglomerados formados espontáneamente por el trímero 2 en PBS y en ausencia de células de <i>E. coli</i> a 800 aumentos	75
7.40	Solución del trímero 2 bajo la lámpara UV	75
7.41	Mezclas del trímero 2 con <i>Escherichia coli</i> y PBS a 800 aumentos	76
7.42	Mecanismo propuesto de la interacción entre el trímero 2 y las bacterias	76

7.43	Suspensión de células de <i>E coli</i> en PBS, y trímero 2 obtenida por LSCM	77
7.44	Solución del trímero 2 bajo la lámpara UV	78
7.45	Mezclas del trímero 3 con <i>Escherichia coli</i> y PBS a 800 aumentos	78
7.46	Mecanismo propuesto para la formación de aglomerados de un compuesto con dos moléculas de manosa en su composición	79
7.47	Suspensión de células bacterianas de <i>E coli</i> en PBS y trímero 3 obtenida por LSCM	80
7.48	Solución del trímero 2 bajo la lámpara UV	81
7.49	Mezcla del polímero disuelto en THF con una suspensión de <i>Escherichia coli</i> y PBS, mediante microscopía óptica a 800 aumentos	81
7.50	Interacción del polímero, disuelto en THF, con células de <i>E. coli</i> , suspendidas en PBS, obtenida por LSCM	82
7.51	Suspensión de células bacterianas de <i>E coli</i> en PBS y polímero disuelto en THF (magnificación 4, obtenida por LSCM)	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Nombre	Pág.
6.1	Reactivos empleados para el desarrollo de la etapa experimental	25
6.2	Solventes empleados para el desarrollo de la etapa experimental	26
6.3	Composición caldo Luria	31
6.4	Composición de Buffer Fosfato Salino (PBS)	32
6.5	Composición caldo YM	34
6.6	Composición de las soluciones para las pruebas de aglutinación	35
6.7	Composición de las soluciones para las pruebas de inhibición	36
6.8	Composición de las soluciones para las pruebas de aglutinación con oligómeros y polímeros	40

RESUMEN

En el presente trabajo de tesis se reporta la síntesis de un nuevo compuesto; un co-polímero fenilnetileno funcionalizado con grupos glicol y moléculas de manosa para la detección por fluorescencia de la bacteria *Escherichia coli* uropatógena. Para su síntesis, se partió del monómero comercial ácido 2, 5 - dibromobenzoico, al cual se sometió a una reacción de amidación con la 4-aminofenil- α -D-manopiranosida. El monómero resultante, posteriormente se sometió a una reacción de policondensación de Sonogashira-Heck con el monómero 2-(2-metoxietoxi) etil 2,5-dietinilbenzoato o en su caso con el (undecil) 2,5-dietinilbenzoato. El polímero resultante de esta reacción, al igual que los productos intermedios, fueron caracterizados mediante la técnica de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). Además se utilizaron las técnicas de espectroscopia de ultravioleta visible (UV-Vis) y de fluorescencia para determinar las propiedades ópticas del producto final

Para la detección de la bacteria *Escherichia coli* uropatógena, en primera instancia se realizó el análisis microbiológico de varias cepas de la bacteria de *E. coli* y se escogió a la que presentó un mejor desarrollo de las fimbrias de tipo I. Los ensayos de aglutinación aplicados a las cepas con este polímero fueron caracterizados utilizando diferentes técnicas de microscopía: como la óptica, electrónica de transmisión, (MET), electrónica de barrido, (MEB) y de fuerza atómica (AFM).

El reconocimiento del polímero con la bacteria de *Escherichia coli* uropatógena, se caracterizó en solución utilizando Microscopía de Láser Confocal de Barrido (LSCM), espectroscopia de ultravioleta visible (UV-Vis) y de fluorescencia. Los resultados en cuanto a los cambios observados en los espectros UV-Vis y de fluorescencia para las soluciones de polímeros con y sin presencia de células bacterianas de *Escherichia coli* nos confirmaron que este tipo de moléculas pueden servir para el reconocimiento de bacterias aprovechando la fluorescencia como señal cuantificable para el desarrollo de biosensores.

1. INTRODUCCIÓN

El reconocimiento molecular es un mecanismo utilizado por los seres vivos, consistente en la interacción de grupos funcionales, que por acción de diversas fuerzas físico-químicas pueden mantener a las estructuras que los poseen unidas entre sí. Su finalidad es muy variada y la más conocida es la efectuada por las enzimas cuando reconocen al sustrato sobre el que trabajan, dándoles su elevada especificidad.

Las bacterias uropatógenas de *Escherichia coli* utilizan este tipo de interacciones para reconocer a sus receptores y unirse al tejido del tracto urinario. Para poder manifestar su acción patógena las bacterias deben tener capacidad de colonización, de penetración, de multiplicación e invasión y capacidad lesional¹.

Las fimbrias, unas estructuras filamentosas que se encuentran alrededor de la membrana celular de unos 2 - 8 nm de diámetro y 15 nm de longitud (figura 1.1), son factores determinantes de la capacidad colonizadora de la bacteria. Son las estructuras encargadas de reconocer y unirse a receptores específicos de las células de los tejidos. La expresión de las fimbrias adecuadas permite la colonización bacteriana de los diferentes tejidos del tracto urinario y el inicio del proceso infeccioso².

Las fimbrias tienen diversas funciones, todas ellas basadas en el reconocimiento molecular. La presencia de fimbrias tipo I, en las cepas bacterianas que las llegaran a poseer, no es constante, ya que la célula las pierde una vez adherida al tejido del tracto urinario, lo que hace necesario condiciones de cultivo específicas para que la bacteria las pueda desarrollar.

Las fimbrias tipo I están codificadas por un conjunto de nueve genes, denominados pil o fim. El gen fim A codifica la subunidad proteica base de la fimbria; ésta puede expresarse independientemente del fim H, codificada por la proteína H, que es la que se adhiere a la célula hospedadora³. La proteína fimH se encuentra únicamente en la punta de las fimbrias tipo I, y no todas las cepas de *E. coli* la poseen.

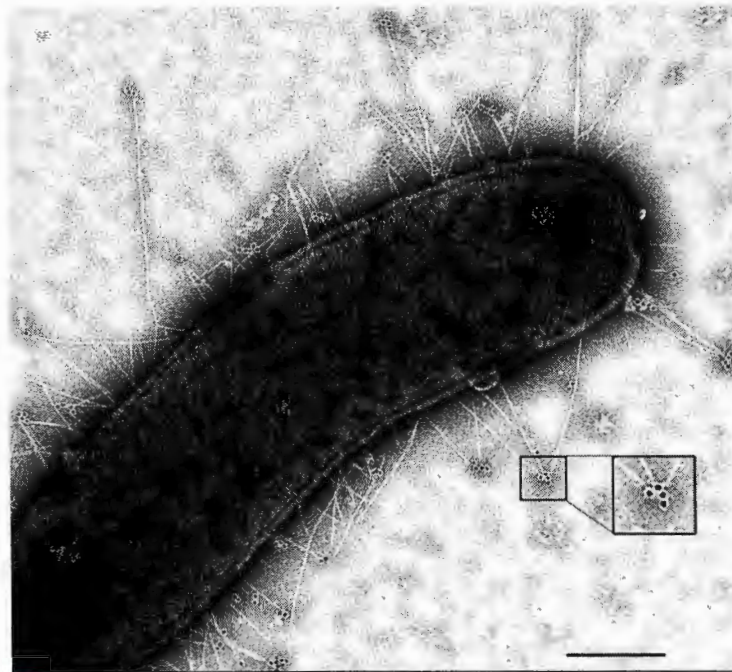


Figura 1.1. Fimbrias tipo I en la membrana celular.

En la actualidad, para determinar la presencia de bacterias en una muestra se realizan cultivos y pruebas bioquímicas para su identificación, técnica que no permite la obtención de resultados inmediatos. Ahora bien, siendo las bacterias uropatógenas reconocedoras de las moléculas de manosa, es viable la utilización de esta molécula en la construcción de biosensores para poder realizar este tipo de análisis de una forma más rápida. Se han reportado compuestos fluorescentes que contienen en su estructura moléculas de manosa⁴ y que han formado aglomerados al entrar en contacto con bacterias de *E. coli*; en estos trabajos la formación de los aglomerados de bacterias provocó un cambio en las propiedades físicas del compuesto. Entre estos compuestos se tienen a los polímeros y oligómeros conjugados de tipo fenilnetileno, que presentan fuertes propiedades de emisión en la región visible y un elevado rendimiento cuántico de fluorescencia y se pueden modificar estas características en presencia de bacterias, además son relativamente fáciles de sintetizar y de ser funcionalizados con diferentes sacáridos, entre ellos la manosa. Por todo lo anteriormente mencionado, este tipo de compuestos podrían ser idóneos para ser utilizados como biosensores ópticos.

Para determinar la eficacia de los compuestos que se sintetizan es necesario evaluar su comportamiento mediante diferentes técnicas de caracterización. Considerando que en la

misma molécula se encuentran dos grupos de reconocimiento como la manosa y los grupos fluorescentes, por un lado se tiene entonces que al emplear estas moléculas sean capaces de formar aglomerados de las bacterias de *E. coli*, y por esto sufrir un cambio en sus propiedades físicas, como una respuesta medible. Además deben ser solubles en solventes polares, aunque sea de forma parcial para que puedan interactuar con las células bacterianas. Por último las bacterias utilizadas en las pruebas de estos compuestos deben tener en su superficie celular, las fimbrias tipo I, sin las cuales el reconocimiento con las moléculas de manosa no se daría. En la mayoría de los casos estos requisitos son difíciles de cumplir en su totalidad, de ahí la necesidad de sintetizar y evaluar nuevas moléculas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Reconocimiento molecular y adherencia bacteriana

El concepto de reconocimiento molecular abarca un conjunto de fenómenos controlados por interacciones específicas y de naturaleza no covalente. Su campo de acción viene limitado por la forma en que las entidades químicas se reconocen e interaccionan selectivamente entre sí dentro de un entorno químico complejo⁵. En general, el fenómeno del reconocimiento molecular viene definido por la energía y la información involucradas en la asociación y selección de un sustrato y su receptor, y es algo más que la simple asociación de dos entidades químicas: implica la existencia de un conjunto bien definido de interacciones y requerimientos espaciales entre ambas especies para cumplir un propósito⁶. Así por ejemplo, la interacción de microorganismos patógenos con sus huéspedes; en el desarrollo de una infección, es un fenómeno propio de reconocimiento molecular que transcurre dentro de un entorno biológico complejo. Los microorganismos patógenos aprovechan habitualmente las zonas de contacto con el huésped como puertas de entrada que en el hombre incluyen, sobre todo, tracto urogenital, digestivo y respiratorio y la conjuntiva ocular⁷. Los organismos que normalmente infectan estas regiones han desarrollado mecanismos de adherencia a los tejidos y la habilidad para superar la presión ejercida por los sistemas de defensa del huésped.

La adherencia bacteriana es un fenómeno altamente específico que requiere de la participación tanto de las adhesinas bacterianas como de los receptores del huésped⁸. Las adhesinas son macro moléculas microbianas que median en la adherencia o unión de los microorganismos al huésped⁹. El tipo más frecuente son las lectinas bacterianas¹⁰, proteínas que se adhieren de forma específica y complementaria a los carbohidratos o residuos peptídicos de la superficie de las células eucarióticas; una adhesina puede unirse a más de un tipo de receptor y viceversa.

Los mecanismos de adherencia específica pueden incluir dos tipos de uniones, una de ellas la unión reversible de la bacteria a la superficie de la célula eucariótica, en donde se presentan interacciones y fuerzas de atracción que permiten el acercamiento de la bacteria a la superficie

celular, aquí estarán incluidas las interacciones hidrofóbicas, las atracciones electrostáticas, las vibraciones atómicas y moleculares, y el movimiento browniano; también puede haber un tipo de unión irreversible del microorganismo a la superficie celular, donde existe formación de enlaces permanentes y específicos tipo llave-cerradura entre moléculas complementarias de cada superficie¹¹; en este caso se requiere que tanto la adhesina como el receptor complementario estén accesibles y situados de forma que se puedan establecer las uniones entre ambos.

La adherencia inespecífica es reversible y consiste en la formación de biopelículas, similares a las capsulas sólo que flexibles, con el fin de proteger a las células o grupos de células de un medio adverso. La biopelícula se adhiere a cualquier superficie para evitar ser arrastrado y mantenerse en el tejido epitelial.

2.2. Infección del tracto urinario por *Escherichia coli*

La *Escherichia coli* es una de las especies bacterianas que más minuciosamente se ha estudiado, y no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole¹². Forma parte de la familia Enterobacteriaceae, del género *Escherichia*, integrada por bacilos Gram negativos¹³. Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales. Incluye gérmenes generalmente móviles, que producen ácido y gas a partir de la glucosa, la arabinosa, y habitualmente de la lactosa y otros azúcares.

E. coli coloniza el tracto gastrointestinal a las pocas horas de vida del niño, y establece con el huésped, desde ese momento, una relación estable de mutuo beneficio¹⁴. Como integrante de la flora normal del hombre y de muchos animales, se le considera un germen indicador de contaminación fecal cuando está presente en el ambiente, agua y alimentos, junto con otros similares agrupados bajo la denominación de "bacterias coliformes". *E. coli* puede ser causa de enfermedad endógena en pacientes debilitados o en situación de alteración de la pared intestinal, pero las infecciones entéricas provocadas por este germen no son causadas por las cepas que habitan normalmente el intestino, sino por líneas especialmente patógenas en esta

localización¹⁵ que se transmiten por vía fecal u oral de persona a persona o a través del agua y alimentos.

Algunas cepas de *E. coli* también son capaces de colonizar el sistema urinario, y éstas son las responsables de las infecciones del tracto urinario (ITU)¹⁶. La ITU es considerada generalmente como la existencia de microorganismos patógenos en el tracto urinario con o sin presencia de síntomas¹⁷. El origen bacteriano de la ITU es el más frecuente (80-90%); en este caso, la definición exacta exige no solo la presencia de gérmenes en las vías urinarias, sino también su cuantificación en al menos 105 unidades formadoras de colonias en un mililitro de orina (UFC/ml)¹⁸. Sin embargo, varios estudios han establecido que más de un tercio de los pacientes, mayoritariamente mujeres sintomáticas, tienen conteos de UFC por debajo de este nivel y presentan ITU¹⁹.

Entre las infecciones más importantes del ser humano, la ITU constituye un importante problema de salud que afecta a millones de personas cada año. Es la segunda causa de infección más frecuente en los humanos y es solo superada por las infecciones del tracto respiratorio²⁰. En más del 95% de los casos, un único microorganismo es el responsable de la ITU. El agente etiológico más frecuente de ITU en ambos sexos es la *Escherichia coli*, responsable del 75% a 80% de los casos; el 20% a 25% restante incluye microorganismos como: *Staphylococcus saprophyticus*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella sp.*, *Streptococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*²¹.

La infección se debe a un primer contacto entre una serie de estructuras químicas que poseen las bacterias, denominadas adhesinas, y unos ligandos que son receptores ubicados en la superficie del epitelio urinario²². De acuerdo con su naturaleza química, las adhesinas son moléculas muy heterogéneas, pueden ser glicoproteínas, glicolípidos, fosfolípidos ó lipoproteínas²³.

Las adhesinas cumplen las siguientes condiciones: son moléculas de superficie capaces de unirse a los receptores específicos correspondientes; la adhesina purificada y los anticuerpos dirigidos en contra de ella inhiben la adhesión del parásito a la célula blanco; los mutantes

deficientes en adhesión deberán presentar alteraciones en la adhesina; por último al revertir la alteración en la adhesina se deberá restablecer su función normal, es decir la capacidad de adherirse al receptor²⁴.

Hay gran variedad de factores de adherencia que, en general, se pueden agrupar por su estructura en fimbriales o no fimbriales²⁵. En las primeras, las proteínas adhesivas que permiten la unión a la superficie celular (adhesinas) están localizadas en el extremo distal de un apéndice denominado fimbria, mientras que en las no fimbriales, esas adhesinas están localizadas directamente en la superficie de la membrana celular. Para el caso de las bacterias de *E. coli*, la mayoría de las estructuras adherentes se encuentran en fimbrias proteicas, las cuales se unen a moléculas de un sustrato específico, situadas en las membranas de las células epiteliales.

Las fimbrias pueden ser agrupadas en dos grandes apartados: las manosa sensibles (MS) y las manosa resistentes (MR). Aunque entre ellas existen diferencias en su morfología, en su estructura al microscopio electrónico, en sus funciones y en su aglutinación de hematíes, la más importante de ellas, por la cual se hizo la clasificación y reciben su nombre, radica en que la adherencia de las fimbrias MS al sustrato presente en el urotelio puede ser inhibida por la manosa, mientras que las fimbrias MR en presencia de manosa no pierden sus propiedades de adherencia²⁶.

2.3. Fimbrias tipo I

Las fimbrias tipo I son las más comunes en *Escherichia coli* y son, también, los factores de adherencia mejor estudiados, pues están presentes en muchos miembros de la familia Enterobacteriaceae; en su biosíntesis, expresión y función intervienen 8 genes; se ha comprobado que, además de adherirse a las células del tracto urinario, lo hacen también a receptores de células epiteliales de la boca, células intestinales y células vaginales²⁷.

Las fimbrias son organelos filamentosos que se localizan en la membrana externa de las bacterias y poseen de 2 a 8 nm de diámetro y hasta 15 nm de longitud, encontrándose

distribuidas alrededor de toda la bacteria, en un número de 100 a 1,000 por célula²⁸. Se diferencian de otros componentes externos de la célula, por ser rectas y de menor longitud y grosor²⁹. Estructuralmente están compuestas por una serie de fracciones de 1 a 3 nm de longitud³⁰, entre las cuales se encuentran las subunidades helicoidales repetidas de unos 7 nm de diámetro de FimA y las adhesinas Fim H (figura 2.1).

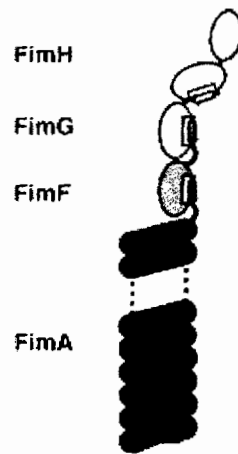


Figura 2.1 Estructura de las fimbrias tipo I.

La manosa, presente en las membranas de la mayoría de las células del huésped, juega el rol de sustrato en el reconocimiento molecular, mientras que la adhesina FimH de la fimbria tipo I juega el rol de receptor. La FimH está formada por 279 residuos de aminoácidos distribuidos en dos dominios, uno de ellos es un barril que agrupa a los primeros 157 residuos en 11 plegamientos tipo β y además posee una cavidad receptora en donde se lleva a cabo la interacción con la manosa, por lo que a este dominio se le conoce como dominio receptor. El resto de los aminoácidos tienen la función de unir la adhesina a la fimbria.³¹

La principal subunidad proteica de la fimbria, unida a un extremo de 3 nm de diámetro contiene dos proteínas adaptadoras, FimG y FimF, y la adhesina FimH³². Ésta última es una proteína de 30 kDa responsable de la adherencia específica de la bacteria a los residuos de manosa de las células eucariotas³³, demostrándose eficaz el bloqueo específico de esta proteína en modelos animales en la prevención de la infección de la mucosa urogenital por *E. coli*³⁴. Están codificadas por el cromosoma o núcleo bacteriano, a diferencia de las codificadas por

plásmidos de *E. coli* enterotoxigénico (ETEC)³⁵. Las ETEC son un tipo patogénico de esta especie que agrupa cepas capaces de producir enterotoxinas proteicas termolábiles o termoestables, las cuales no se ingieren preformadas ni ingresan al medio interno, sino que se forman y ejercen su acción localmente sobre la mucosa intestinal, promoviendo hipersecreción de agua y electrolitos³⁶.

Las fimbrias tipo I desempeñan un papel fundamental para iniciar la infección. En las vías urinarias se unen a la proteína Tamm-Horsfall (uromucoide rico en manosa excretado por las células epiteliales urinarias). Esta unión actúa como un mecanismo de defensa inespecífico, ya que evita la unión del *E. coli* a sus 2 receptores urinarios principales, las uropectinas **Ia** y **Ib**. La unión a la proteína Tamm-Horsfall favorece por lo tanto, la eliminación de *E. coli* por la orina. Cuando la capa formada por esta proteína se daña, quedan adheridos al epitelio gran número de células bacterianas, proceso que podría representar el punto de inflexión en el que la colonización se convierte en infección, como también podría explicar las ITU de repetición, en las cuales se han observado brotes persistentes³⁷.

En la vejiga la adhesina presente en el extremo distal de la fimbria tipo I, FimH, se une e interacciona con la uropectina³⁸. Esta unión parece ser la señal para activar la cascada defensiva del huésped que incluye la muerte programada y la exfoliación de las células del epitelio vesical y la activación de los mediadores de respuesta inflamatoria³⁹. Sin embargo *E. coli* es capaz de eludir estos mecanismos defensivos del huésped invadiendo las capas profundas del tejido vesical, replicándose en el interior de sus células y creando biopelículas o pods que contienen bacterias bañadas en una matriz rica en polisacáridos y rodeados por una envoltura de uropectina. Estas biopelículas pueden constituir un reservorio para la *E. coli* productora de las ITU recurrentes⁴⁰.

Por otro lado, la expresión de las fimbrias tipo I es fase-variable, es decir, pasa de estado no fimbriado a fimbriado o viceversa según las necesidades de la bacteria. La presencia de fimbrias confiere a las bacterias una mayor capacidad infectiva⁴¹, mientras que la ausencia de las mismas permite eludir la respuesta del sistema inmune y confiere una mayor virulencia a la bacteria una vez en el interior del huésped⁴². Esta variación reversible en el estado de las

fimbrias se ha detectado en peritonitis y en infecciones experimentales del tracto urinario con ratones⁴³, constituyendo un factor importante de virulencia bacteriana. De esta manera, la producción o síntesis de fimbrias en las bacterias de *E. coli* depende de las condiciones de crecimiento a las que se someta⁴⁴ en general, y en particular del medio de cultivo.

2.4. Los polímeros y oligómeros conjugados

El uso de los materiales poliméricos en diversas aplicaciones, tales como recubrimiento de cables y construcción de tarjetas electrónicas, se ha debido a su carácter de aislante eléctrico, una propiedad que se creía inalterable en este tipo de materiales. Sin embargo se han sintetizado un nuevo tipo de polímeros, cuyas aplicaciones tienen que ver con propiedades de conductividad eléctrica y luminiscencia. Estas características y aplicaciones se traducen en un valor agregado indiscutiblemente superior en los precios típicos de los polímeros tradicionales⁴⁵.

Estos polímeros se conocen como polímeros conjugados (PC), resumiendo así el hecho de que en su estructura química, hay un alto grado de hibridación de enlaces π . Es decir, los polímeros conjugados son materiales orgánicos, cuya estructura tiene enlaces dobles o triples alternados con enlaces sencillos a lo largo de su cadena principal. Los enlaces π se pueden encontrar en radicales aromáticos o heterocíclicos. Así, los polímeros y oligómeros conjugados presentan propiedades ópticas y eléctricas, propias de metales y materiales semiconductores.⁴⁶

El primer polímero conductor sintético fue el poliacetileno, y el descubrimiento de este material y del mecanismo por el cual es posible aumentar la conductividad de un material conjugado en varios órdenes de magnitud⁴⁷ fue premiado con el premio Nobel de Química para el año 2000. Lo anterior ha traído como consecuencia un aumento creciente en investigación, para explotar y aprovechar estas propiedades y encontrar diferentes aplicaciones como circuitos electrónicos, fotodetectores, láseres, diodos luminiscentes, celdas solares y sensores de reconocimiento molecular, baterías ligeras, dispositivos electrocrómicos y biosensores.⁴⁸

Con el propósito de modificar sus propiedades físicas y químicas se introducen a la molécula una amplia variedad de grupos sustituyentes, obteniéndose así compuestos conjugados con aplicaciones muy específicas. Gracias a la sensibilidad que presentan ante estímulos externos, como cambios de temperatura o a diversos ambientes químicos, estos materiales pueden ser utilizados como moléculas de detección.⁴⁹

Una de las primeras aplicaciones de los polímeros conjugados fue en la inmovilización de moléculas biológicas sobre la superficie de un electrodo⁵⁰. Aunque también se han diseñado diversos dispositivos para determinar glucosa⁵¹. En algunos casos, la propiedad de conductividad eléctrica característica de estos materiales fue utilizada para detectar compuestos como la penicilina.⁵² Hoy en día, se sintetizan materiales conjugados que poseen en su estructura moléculas de tipo químico o biológico que funcionan como sitios receptores o de reconocimiento, mientras que la parte conjugada del polímero u oligómero funciona como elemento de transducción de la señal. Entre los compuestos empleados como elementos de reconocimiento se pueden usar diversos biocompuestos, tales como las proteínas, los péptidos y los carbohidratos, los cuales deben contener grupos amino, hidroxilo o mercapto disponibles, para poder incorporarlos a las estructuras de los polímeros. Las señales que se generan a partir de la interacción analito-receptor son transformadas por la parte conjugada de la molécula de detección a señales ya sean eléctricas, fluorescentes, electroquímicas o cromatográficas.⁵³

2.5. Oligómeros y polímeros del tipo fenilnetileno

Los poli (fenilnetilenos) se encuentran entre los polímeros conjugados de mayor potencial en aplicaciones optoelectrónicas⁵⁴. Sin embargo la baja solubilidad que presentan, debida a la fuerte interacción intra molecular π - π , provoca la formación de agregados. Esta interacción se debe a la planaridad y rigidez del esqueleto polimérico. La presencia de estos agregados afecta sus propiedades ópticas y optoelectrónicas, lo que limita la aplicación de este tipo de materiales. Para aumentar la solubilidad de estos polímeros conjugados se ha recurrido, en primer lugar a la síntesis de moléculas menos planas, lo que se consigue con la introducción de cadenas alifáticas como sustituyentes laterales; también se puede disminuir la rigidez de la

cadena con la funcionalización de partes flexibles alternadas con el esqueleto principal; también el empleo de oligómeros de tamaño controlado, en lugar del polímero aumentaría la solubilidad, lo que disminuiría la formación de agregados.⁵⁵

Los polímeros comúnmente son una mezcla de varias cadenas de diferentes pesos moleculares, mientras que los oligómeros son monodispersos, por lo que presentan un mayor grado de pureza, lo que les confiere propiedades ópticas y optoelectrónicas más elevadas. También presentan una amplia gama de emisión en el espectro electromagnético, además que son solubles en solventes como cloroformo, cloruro de metileno o tetrahidrofurano, y en general tienen menor tendencia a formar agregados. Sin embargo, la síntesis de oligómeros es más laboriosa que la de los correspondientes polímeros, aunque los productos obtenidos se obtengan con propiedades químicas y fisicoquímicas reproducibles. Con relación a los polímeros, existen casos en la literatura en los cuales sus propiedades ópticas, macro moleculares y fisicoquímicas varían de un artículo a otro, aún cuando se utilizaron, en principio, las mismas condiciones de síntesis⁴⁸.

2.6. Reacción de acoplamiento de Sonogashira-Heck

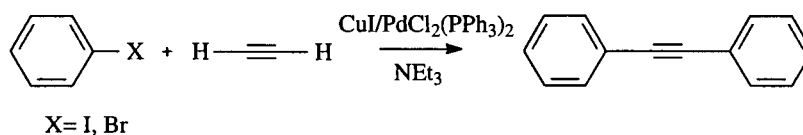


Figura 2.2. Reacción de acoplamiento de Sonogashira-Heck.

La síntesis, tanto de oligómeros, como de polímeros del tipo fenilnetinileno se lleva a cabo mediante una reacción conocida como acoplamiento de Sonogashira-Heck⁵⁶. La reacción consiste en el acoplamiento de un hidrógeno de un acetileno terminal a un halogenuro de arilo, como se puede observar en la figura 2.2. Para que la reacción se lleve a cabo con relativa facilidad, se utiliza la acción del complejo dicloro bis (trifenilfosfina) paladio II [PdCl₂(PPh₃)₂], que actúa en calidad de catalizador. Como solvente se puede emplear algún compuesto aminado como por ejemplo la trietilamina (TEA), que permite la formación de sales aminadas insolubles y de fácil remoción por precipitación. De esta manera las

condiciones bajo las que ocurre la reacción pueden ser suaves, al punto que se la puede realizar a temperatura ambiente

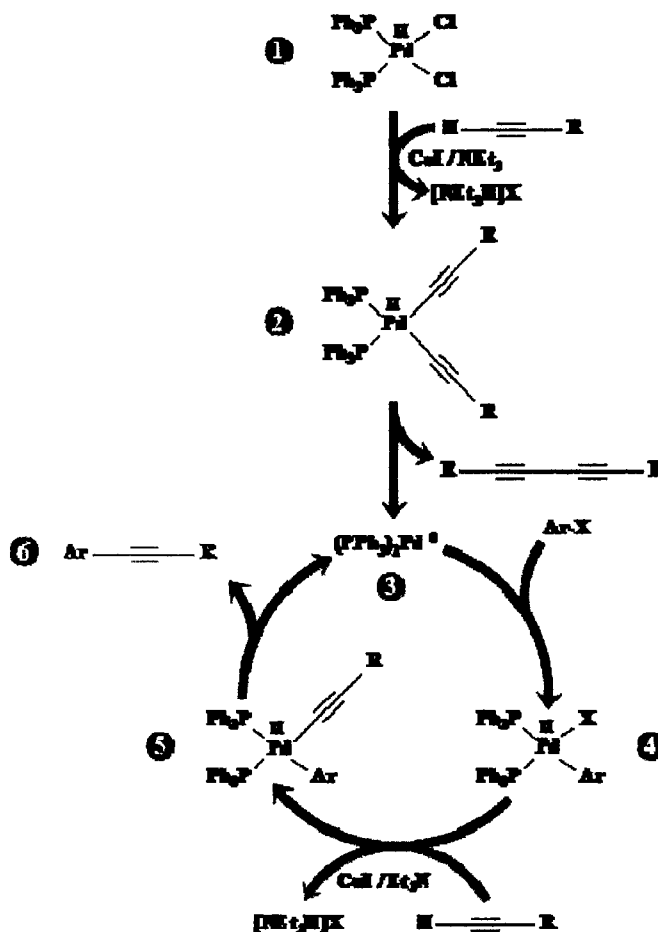


Figura 2.3 Mecanismo de reacción propuesto por Sonogashira-Heck para el acoplamiento de acetilenos terminales y halogenuros de arilo.

El primer mecanismo para esta reacción (figura 2.3) fue propuesto por Sonogashira y colaboradores en 1975. El ciclo catalítico inicia con la formación del complejo bis (trifenilfosfina) dialquilpaldadio (II), el cual se genera por la acción catalítica del CuI sobre el diclorobis (trifenilfosfina) paladio (II) 1 y HC≡CR; posteriormente, se produce la especie catalítica bis (trifenilfosfina) paladio (0) mediante la reducción de Pd (II) a Pd (0) y la eliminación reductiva de una molécula de diacetileno. Enseguida ocurre la adición oxidativa del haluro de arilo formándose el aducto, el cual posteriormente forma una especie aril-

alquinil derivada del paladio. Por último, a través de una eliminación reductiva se obtienen el aril-etinileno y la regeneración de la especie catalítica. De este ciclo resalta el hecho que hay, inevitablemente, la formación de diacetileno como subproducto y que de hecho es el acetileno el que da lugar a la formación del paladio cero.

En 1993 Amatore y col. proponen un nuevo mecanismo para las sustituciones nucleofílicas catalizadas por complejos de paladio cero-valente. Los estudios realizados por resonancia magnética nuclear de y por métodos electroquímicos establecieron que el acoplamiento de acetilenos terminales con haluros de arilo se realiza en un ciclo de cuatro etapas⁵⁷ (figura 2.4).

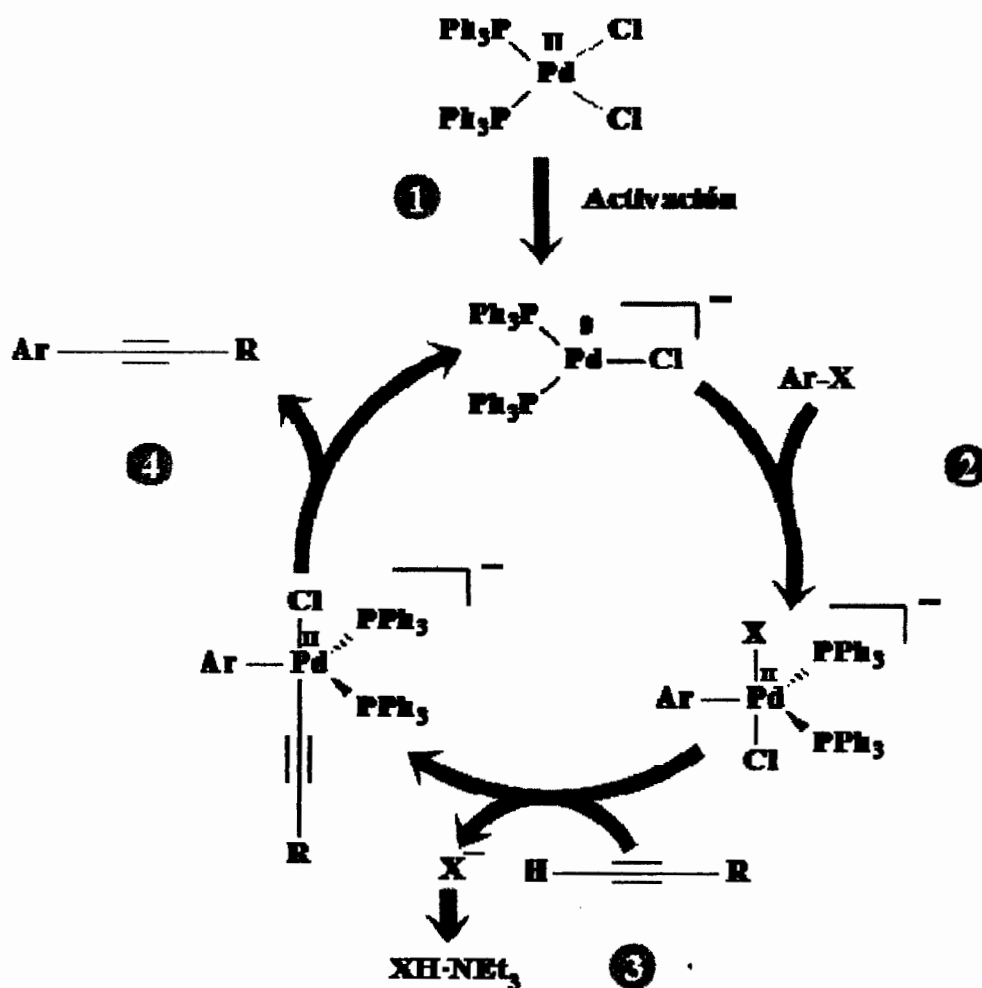


Figura 2.4. Mecanismo de reacción propuesto para el acoplamiento de acetilenos terminales y halogenuros de arilo.

La primera etapa consiste en la reducción del paladio (II) a paladio (0). Los cationes producidos por el co-catalizador yoduro de cobre (CuI) actúan como agentes reductores, participando en la formación de pares de iones a partir de $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$. Se obtiene un complejo b que corresponde al paladio cerovalente (figura 2.5). En ausencia de iones de cloruro, se obtiene únicamente este tipo de complejos. Sin embargo, en base a los análisis electroquímicos, cinéticos y a la resonancia magnética nuclear ^{31}P , el autor deduce la presencia del complejo a, producto de la dimerización del complejo b, así como también la del complejo iónico cloruro (complejo c). La cinética estudiada en este trabajo establece, por los valores de las constantes de velocidad obtenidos, que el complejo b es la especie principal presente en la solución⁵⁷.

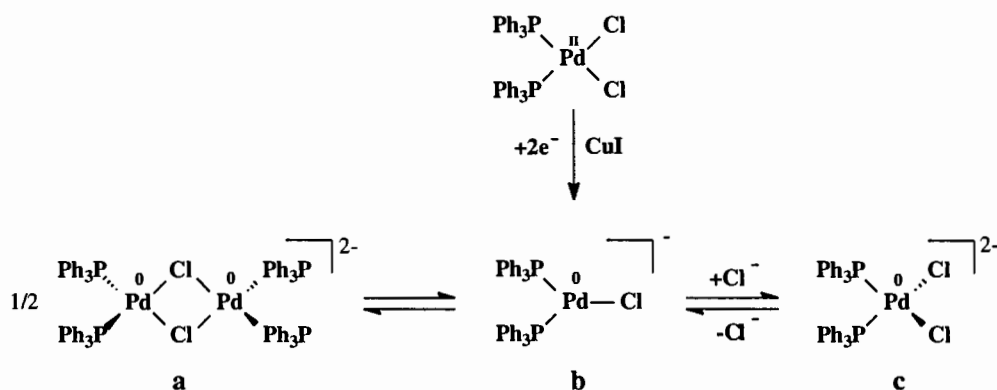


Figura 2.5. Especies aniónicas producidas en la primera etapa del mecanismo de reacción propuesto por Amatore.

La siguiente etapa consiste en una rápida adición oxidativa de un haluro de arilo al complejo de paladio (0) obtenido en la etapa anterior. De esta manera se forma un complejo aniónico pentacoordinado *trans*- $\text{ArPd}_2\text{X}(\text{PPh}_3)_2$, el cual, a pesar de ser estable, es susceptible de reaccionar con el nucleófilo formado a partir del acetileno (figura 2.6).

En la tercera etapa se lleva a cabo la sustitución nucleofílica del haluro por el acetileno, obteniéndose un nuevo complejo aniónico pentacoordinado de paladio. Se libera el protón del acetileno y el haluro del complejo, formando junto con la trietilamina una sal que precipita, lo que facilita su separación del producto. Finalmente, se efectúa la eliminación reductiva de los

sustituyentes arilo y acetiluro, obteniéndose el arilnetinileno y la regeneración del complejo de paladio (0), el cual comienza un nuevo ciclo de acoplamiento. Para que esta etapa pueda realizarse, el complejo trans termodinámicamente estable debe isomerizarse a cis.

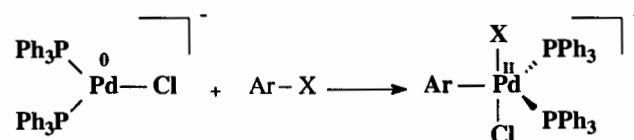


Figura 2.6. Adición oxidativa en la segunda etapa descrita por Amatore.

Es importante remover el oxígeno de la reacción para evitar la desactivación del catalizador y minimizar de esta manera el homoacoplamiento oxidativo de acetilenos terminales. Por tal motivo, las reacciones de acoplamiento catalizadas por paladio y que emplean un co-catalizador como el CuI se realizan bajo atmósfera inerte, a pesar de que Sonogashira propone en su mecanismo de reacción la formación inevitable de diacetilenos. También se debe evitar toda traza de humedad, debido a que el agua actúa como nucleófilo y rompe los complejos formados durante la reacción. Otras variables que también deben ser consideradas al realizar una reacción de acoplamiento son la elección del halogenuro de arilo, el efecto electrónico de los sustituyentes sobre dicho halogenuro de arilo, el tipo de catalizador, así como el disolvente.

Para la elección del halogenuro de arilo se tiene en cuenta la reactividad del compuesto. Los compuestos que presentan mayor reactividad, y por lo que son los más utilizados en las reacciones de acoplamiento, son los yodoarilos y los bromoarilos. La diferencia de reactividades existentes entre uno y otro tipo de compuestos permite la realización de reacciones muy selectivas. Los yoduros de arilo reaccionan a temperatura cercana a los 0°C, mientras que los bromoarilos requieren de la aplicación de energía para que se lleve a cabo la reacción.

Para la elección de los sustituyentes en el halogenuro de arilo se debe considerar que el complejo de paladio (0) es una especie rica en electrones y la adición oxidativa del halogenuro de arilo al complejo de paladio (0) estará influenciada por la naturaleza de los grupos

sustituyentes en el núcleo aromático. Entre más electro atractor sea el grupo sustituyente, más rápida será su adición al complejo de Pd (0). Por el contrario entre más electro donador sea el sustituyente, más lenta será la adición oxidativa.

Con relación al tipo de catalizador a utilizar se puede decir que el dicloro bis (trifenilfosfina) paladio (II), PdCl₂ (PPh₃)₂, ha sido el complejo tetracoordinado más utilizado por su estabilidad al aire y relativo bajo costo en relación a otros catalizadores como Pd (PPh₃)₄, Pd (OAc)₂ y el Pd₂ (dba)₃.

El disolvente a emplear para una reacción de esta naturaleza debe tratarse de una base capaz de sustraer el protón del acetileno terminal y de esta manera realizar la sustitución nucleofílica del alquino en el complejo pentacoordinado de Pd (II). Principalmente las aminas tienen un buen desempeño, entre ellas destacan la trietilamina, la dietilamina y la diisopropilamina. Además, se pueden emplear co-solventes como tetrahidrofurano (THF), tolueno, N,N dimetilformamida (DMF), entre otros. Su función radica en difundir el compuesto organometálico en el medio y el de mantener a las especies monoméricas, oligoméricas o macromoleculares en solución conforme se van formando. Cabe resaltar que el THF es el más utilizado ya que tiene buenas propiedades de solvatación para los complejos metálicos y promueve la solubilidad de las cadenas laterales.

2.7. Estado del arte

Los estudios aquí descritos están basados en la adhesión de un receptor con un sustrato determinado: en el caso de las bacterias de *E. coli* la adhesina FimH, presente en las fimbrias tipo I, conocida como dominio receptor, tiene la función de adherirse a la molécula de manosa, presente en las moléculas detectoras.

Un estudio bastante interesante se relaciona con la detección del virus de la influenza, realizado por el grupo de investigación de la doctora Charych, y se centra en las transiciones colorimétricas que presenta el polidiacetileno (figura 2.7) como consecuencia del reconocimiento molecular. Cuando el virus interacciona con el ácido siálico del

polidiacetileno, se observa un cambio de coloración de azul a rojo, debido a cambios conformacionales en el esqueleto conjugado.⁵⁸

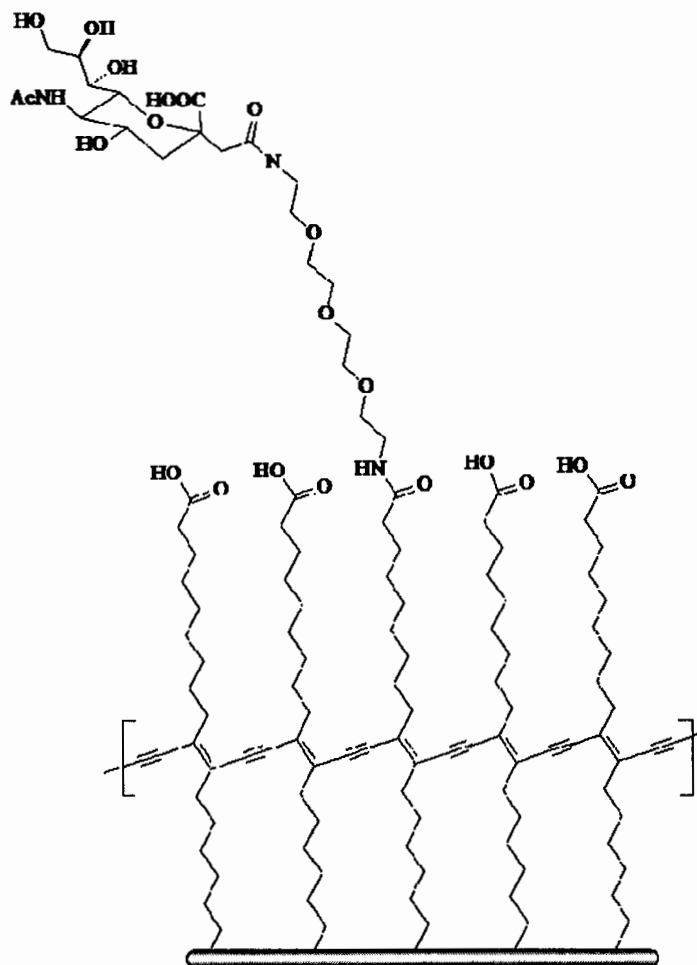


Figura 2.7. Poli(diacetileno) funcionalizado con ácido siálico para la identificación del virus de la influenza.

Otras investigaciones han empleado poli(tiofenos) solubles en agua, los cuales son portadores de manosa o de ácido siálico como moléculas de reconocimiento de la bacteria *Escherichia coli* y del virus de la influenza, respectivamente (figura 2.8). El principio de reconocimiento, de manera similar, también se basa en transiciones colorimétricas, es decir una vez que la molécula ha reconocido, ya sea al virus o a la bacteria, y se encuentra ahora adherida al polímero, comienzan a eliminarse paulatinamente las interacciones intermoleculares causantes

de las diferentes distorsiones del esqueleto, resultando al final un esqueleto planar que al comienzo ocasiona un desplazamiento de la longitud de onda hacia la región del rojo⁵⁹.

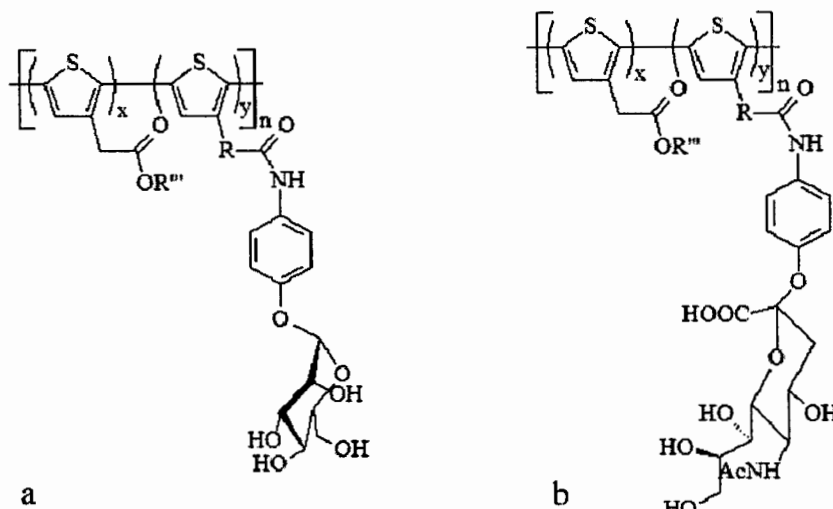


Figura 2.8. Politiofenos (a) portador de manosa, (b) portador de ácido siálico.

Otro estudio, basado en la aplicación de moléculas de politiofenos, está relacionado con la posibilidad de lograr una cuantificación rápida de células bacterianas. La cuantificación se realizó en varias diluciones logarítmicas. El estudio se basa en la pérdida de la intensidad de la fluorescencia de nanopartículas de politiofeno y oro, por la presencia de las células bacterianas de *E. coli*. Los resultados fueron complementados con la aplicación de microscopía electrónica de transmisión, técnica que permitió revelar que las bacterias no sufren cambio perceptible en su morfología celular. Además se realizaron experimentos dinámicos de la dispersión luminosa que permitieron mostrar la relación existente entre el tamaño de partículas con las diferentes concentraciones bacterianas⁶⁰.

Con respecto a los polímeros de fenilnetileno se reportan los resultados obtenidos por el grupo de trabajo de Disney¹, sobre la identificación selectiva de la bacteria *Escherichia coli*. El polímero está funcionalizado con el monosacárido manosa y además, según el autor es soluble en medio acuoso, aunque no se explica la interacción π - π que, en teoría, haría de los polímeros insolubles en solventes polares y es la razón de la presencia de agregados en soluciones acuosas (figura 2.9).

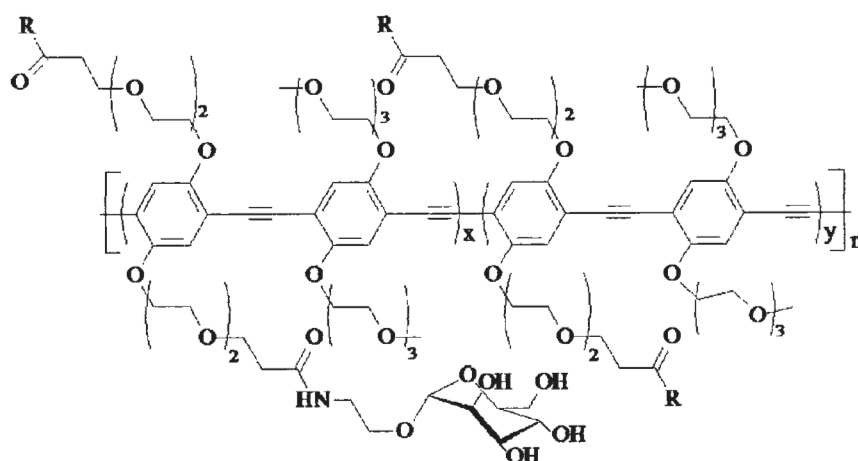


Figura 2.9. Polímero de tipo fenilnetinileno funcionalizado con el monosacárido manosa para la detección de la bacteria *E. coli*.

La detección de la bacteria se basa en la formación de aglomerados celulares fluorescentes cuando la bacteria interactúa con la parte carbohidratada del polímero. Estos aglomerados se pueden visualizar fácilmente bajo la luz ultravioleta (figura 2.10).

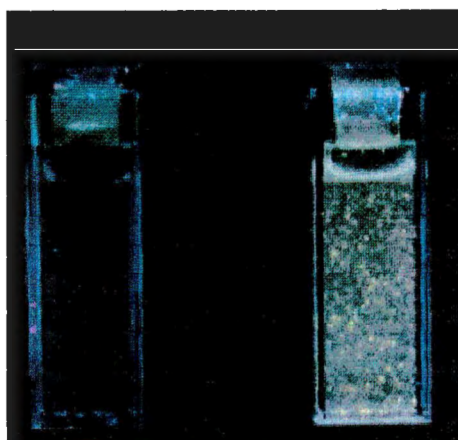


Figura 2.10. Imágenes de aglomerados bajo la lámpara UV.

En este trabajo se analizaron varios resultados obtenidos, tomando como variable la concentración de las células bacterianas de *E. coli* en la suspensión, pero no se mencionan cuáles serían esos resultados si la variable fuera la concentración del polímero; tampoco existen datos que permitan corroborar la estructura química del producto ya que no se muestran resultados de la caracterización del polímero ni antes ni después de su

funcionalización con moléculas de manosa⁴⁹, ni se muestran resultados que permitan evidenciar alguna interferencia en la emisión del compuesto fluorescente, causada por la presencia de bacterias en la suspensión.

Con relación a este último punto se han realizado estudios sobre la reducción de la fluorescencia en polímeros de fenilnetileno por su interacción con otro tipo de moléculas. El trabajo se centra en moléculas de concanavalina A, variando su concentración y midiendo la emisión de la solución resultante. Los resultados evidencian una directa relación entre la presencia de moléculas de CoA y la reducción en la emisión⁶¹.

Lo anterior implica la posibilidad de la obtención de un complejo fluorescente capaz de detectar la presencia de bacterias de *Escherichia coli*, cuya reducción en la fluorescencia permitiría el diseño de biosensores cualitativos.

3. HIPÓTESIS

La interacción entre moléculas de tipo fenilnetileno portadoras de biomoléculas de manosa y las fimbrias tipo I de Escherichia coli es detectable mediante fluorescencia.

4. OBJETIVOS

Evaluar compuestos de tipo fenilnetileno portadores de manosa y su capacidad de reconocimiento de cepas uropatógenas de Escherichia coli.

Metas

1. Inducir y determinar la formación de fimbrias tipo I en cultivos de la bacteria Escherichia coli mediante:
 - pruebas de aglutinación con levaduras
 - microscopía electrónica
2. Evaluar la interacción de moléculas fluorescentes portadoras de manosa con la bacteria de Escherichia coli mediante:
 - ensayos de aglutinación bacteria – molécula fluorescente
 - microscopía óptica
 - láser confocal.
3. Proponer un mecanismo de interacción bacteria - molécula fluorescente.

5. JUSTIFICACIÓN

Los oligómeros y los polímeros del tipo fenilnetileno (FE) forma parte de los compuestos conjugados, que poseen propiedades de semiconducción y fluorescencia. Esta última propiedad puede ser aprovechada para la construcción de dispositivos tales como los biosensores, ya sea en solución o en películas, después de ser excitados con una luz de longitud de onda específica. Estos materiales al ser funcionalizados con moléculas capaces de reconocer proteínas, toxinas, lectinas, bacterias y virus constituyen una justificación de exploración y estudio.

Las bacterias, virus y otros microorganismos se encuentran en la naturaleza y en el ambiente en una cantidad y diversidad inimaginable. Las bacterias patógenas, por ejemplo están distribuidas en el suelo, aguas marinas, en los tractos intestinales del hombre y animales o en aguas negras. Una persona en promedio presenta más de 150 tipos diferentes de bacterias dentro y fuera de su cuerpo. Si bien, la mayor parte de los microorganismos que existen en la naturaleza desarrollan actividades benéficas, sin embargo existen algunos microorganismos potencialmente dañinos como por ejemplo las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* que pueden producir enfermedades graves y hasta la muerte en el ser que los hospeda. Si a esto le agregamos las recientes amenazas de ataques terroristas con armas biológicas, resulta evidente y **justificable** la necesidad de disponer de una tecnología que permita a las personas comunes (no necesariamente gente capacitada), y de forma económica identificar y cuantificar las bacterias, virus y otros microorganismos en los fluidos corporales (sangre, orina, saliva), de forma *simple, rápida y selectiva*, ya que los métodos convencionales de análisis, usualmente incluyen la evaluación morfológica del microorganismo así como pruebas bioquímicas y de cultivo que demandan tiempo y personal capacitado. En los últimos años se ha venido desarrollando la tecnología de los biosensores como alternativa viable y a bajo costo. En principio, los biosensores permiten tener una respuesta rápida y selectiva con un equipo sencillo y económico que cualquier persona no entrenada pueda usar en el momento y lugar que se requiera. Esto abre la posibilidad de poder analizar por ejemplo desde la calidad de aguas *in situ*, hasta realizarse análisis médicos sin acudir a un hospital.

6. DESARROLLO EXPERIMENTAL

6.1. Materiales y equipos

Materiales

Matraz balón de dos bocas de 250 ml.	Llave para gas.
Matraz balón de una boca de 25, 100 , 250 y 500 ml.	Termómetro.
Matraces Erlenmeyer de 250 y 500 ml.	Trampa para vapores.
Columnas para cromatografía.	Gradillas.
Refrigerante rosario.	Tubos con rosca.
Trampa de humedad.	Micropipetas.
Embudo de separación de 250 ml.	Cajas Pietri.
Embudo de adición de 25 ml.	Mantilla de calentamiento.
Embudo de tallo largo.	Parrilla de agitación.
Probetas de 15 y 100 ml.	Agitador magnético.
Jeringas de vidrio de 0.025, 2, 5 y 10 ml.	Cánula.
Tubos de cultivo	

Equipos

Rotavapor Büchi

Lámpara UV Cole Parmer 9815-series lamps

Autoclave Tuttnauer Brinkamnn 2540E

Incubadora Lab-line Imperial II

Centrífuga Unico DSC-158T

Liofilizador Labconco Freeze Dry SyMET/Freezone 4.5

Fusiómetro Electrothermal. Mel Temp.

Microscopio Leica ATC 2000

Microscopio de fuerza atómica (AFM) Multidimension 3100 digital instruments

Espectrofotómetro UV-Vis Shimatzu 2401 PC con un rango de detección de 190 a 800 nm.

Espectrómetro de RMN ^1H y ^{13}C Jeol Eclipse de 300 MHz. En la obtención de los espectros de resonancia magnética se utilizaron como solventes cloroformo- d_1 , tetrahidrofurano- d_8 y dimetilsulfóxido- d_6 , se utilizó como referencia interna tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0$ ppm). Espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS 50B.

6.2. Reactivos y solventes

Tabla 6.1. Reactivos empleados para el desarrollo de la etapa experimental.

Reactivo	Fórmula Química	Peso molecular g/mol	Densidad g/ml	Pureza %
Ácido 2,5-dibromo benzoico	$\text{C}_6\text{H}_3\text{CO}_2\text{HBr}_2$	279,91	-	96
Ácido clorhídrico	HCl	36.46	1.192	36,5-38
Ácido 4-yodobenzoico	$\text{C}_7\text{H}_5\text{IO}_2$	248	-	98
Alcohol bencílico	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OH}$	108.141	1.038	99,3
4-Aminofenil α -D-manopiranosida	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NO}_6$	271.3	-	-
Cloro fosfato de difenilo	$\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{ClO}_3\text{P}$	268.64	1.299	99
Diclorobis(trifenilfosfina) paladio II	$[(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{P}]_2\text{PdCl}_2$	701.89	-	98
2,5-Dietinil-benzoato de undecilo	$\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_2$	324,21	-	99
difenil (2, 3 - dihidro - 2 - tioxo - 3 - benzoxazolil) fosfonato	$\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{NO}_4\text{PS}$	383,04	-	99
Hidroquinona	$\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$	110.11	1.332	99
Hidróxido de potasio	KOH	56.11	2.044	85
Hidróxido de sodio	NaOH	40.01	2.130	98
N-metil-2-pirrolidinona	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}$	99.13	1.028	99
N,N'-Diciclohexilcarbodiimida	$\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_2$	206,33	0,95	98
4-Yodofenol	$\text{C}_6\text{H}_5\text{IO}$	220.01	-	99
Yoduro de cobre	CuI	190.44	-	98

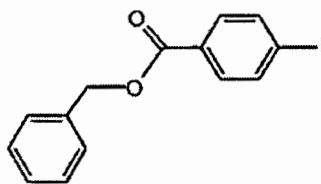
Algunos solventes como el benceno y el tolueno fueron secados con hidruro de sodio (NaH), la trietilamina fue secada con KOH, el THF fue secado primero con KOH.

Tabla 6.2. Solventes empleados para el desarrollo de la etapa experimental.

Solvente	Estructura química	Peso molecular g/mol
Acetona	$(\text{CH}_3)_2\text{CO}$	58.08
Benceno	C_6H_6	78.11
Cloroformo	CHCl_3	119.38
Diclorometano	CH_2Cl_2	84.93
N, N-Dimetilformamida	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$	73.10
Etanol	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	46.07
Éter dietílico	$(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$	74.12
Hexanos	C_6H_{14}	86.18
Metanol	CH_3OH	32.04
Tetracloruro de carbono	CCl_4	153.82
Tetrahidrofurano	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$	72.11
Tolueno	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$	92.14
Trietilamina	$\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}$	101.19

6.3. Síntesis de oligómeros

6.3.1. Síntesis de 4-yodo benzoato de bencilo

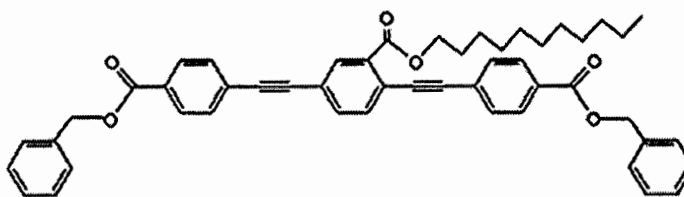


1

En un matraz de dos bocas se colocaron 5 g (0,0202 mol) de ácido p-yodobenzoico, 40 ml de cloruro de metileno y un agitador magnético. Al matraz se le adaptó una trampa de humedad y se le adicionó 0,1 g ($8,19 \times 10^{-4}$ mol) de dimetilaminopiridina y 2,18 g (2,12 ml, 0,0202 mol) de alcohol bencilico. La mezcla se agitó vigorosamente para disolver los reactivos y se colocó en un baño frío (0 °C), adicionando gota a gota 4,16 g (0,0202 mol) de

diciclohexilcarbodiimida (DCC) disuelta en dimetilformamida (DMF). La reacción se dejó a temperatura ambiente durante 16 h. Luego la mezcla de reacción se filtró para separar la urea formada y se evaporó el solvente. El residuo se disolvió en cloruro de metileno y se lavó tres veces con una solución de ácido clorhídrico (HCl) 1 N. La fase acuosa se desechó y la fase orgánica se secó con sulfato de sodio. El producto fue purificado por cromatografía en columna empacada con silica gel usando como solvente una solución de hexano y cloruro de metileno (1:4), $R_f = 0.78$, rendimiento 62 %. Punto de fusión 67 °C. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7,79 (s, 4H, Ar), 7.48 - 7.36 ppm (m, 5H, Bz), 5,38 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$).

6.3.2. Síntesis del bencil 4, 4' - (2 - (undeciloxicarbonil) - 1, 4 - fenilen) bis (etin - 2, 1 - diil) dibenzoato



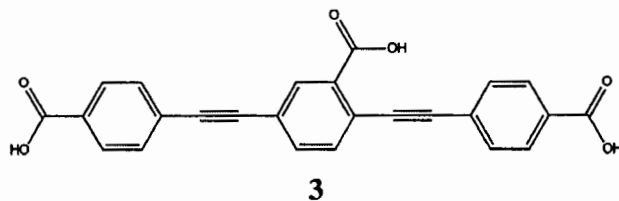
2

Siguiendo el procedimiento para el acoplamiento de Sonogashira-Heck, se removió el aire, con un ciclo vacío-nitrógeno de un matraz de 250 ml de 2 bocas, provisto de agitador magnético, llave para gas y un séptum. Se adicionaron 21,9 mg ($3,12 \times 10^{-5}$ mol) de diclorobis (trifenil) fosfina paladio II, 3,6 mg ($1,87 \times 10^{-5}$ mol) de yoduro de cobre, 182 mg ($5,62 \times 10^{-4}$ mol) de 2,5-dietinil-benzoato de undecilo y 422 mg ($1,25 \times 10^{-3}$ mol) de 4-yodobenzoato de bencilo. Se transfirieron 15 ml de trietilamina (TEA) y 10 ml de tetrahidrofurano (THF) destilados y desgasificados previamente con 3 ciclos continuos vacío-nitrógeno y se calentó por 10 minutos. La reacción se dejó en atmósfera inerte, con agitación y a temperatura ambiente durante 18 horas.

Para eliminar las sales de amonio formadas durante la reacción, se filtró la solución resultante y ésta se lavó con THF; el solvente se elimina posteriormente por evaporación. El producto puro se obtuvo por cromatografía en columna empacada con silica gel usando como solvente

una mezcla de hexano: cloruro de metileno (1:1). Punto de fusión entre 104 – 107 °C. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8,16 (s, 1H, Ca), 8,09 (d, 4H, Ce), 7,56 – 7,66 (m, 6H, Cb, Cc, Cd), 7,4 (m, 10H, g), 5,37 (s, 4H, - CH₂ - f), 4,38 (t, 2H, - CH₂ - α) 1,69 (q, 2H, - CH₂ - β), 1,46 (m, 2H, - CH₂ - γ), 1,1 (s 14H - CH₂ - ε), 0,9 (t, 3H, - CH₃ - φ).

6.3.3. Síntesis del ácido 4, 4' - (2 - carboxi - 1, 4 - fenilen) bis (etino - 2, 1 - diil) dibenzoico

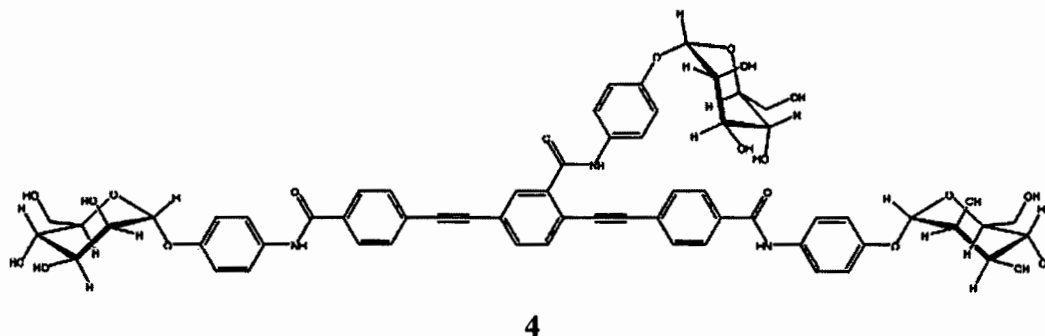


En un matraz balón de 100 mL se colocó, bajo atmósfera inerte, un agitador magnético, 102,4 mg ($1,38 \times 10^{-4}$ mol) del compuesto **2** y 553,8 mg ($2,75 \times 10^{-3}$ mol) de hidróxido de potasio (KOH) en polvo (pureza del 85 %). Con una jeringa de vidrio, previamente purgada con nitrógeno, se adicionaron 15 ml de tolueno seco y destilado para disolver los reactantes. Esta solución se desgasificó burbujeando nitrógeno durante 60 min. Después de este tiempo el balón se puso a reflujo con un refrigerante rosario y se dejó la reacción por un espacio de 90 minutos a una temperatura de 111 °C y bajo presión de nitrógeno. Posteriormente, se dejó que la solución alcanzara la temperatura ambiente y se le añadió agua acidificada con HCl (pH=1) hasta la formación de un precipitado. Luego se filtró la solución y el sólido formado fue disuelto en THF y reprecipitado en cloroformo. No fue posible determinar el punto de fusión ya que el compuesto se degrada térmicamente antes de alcanzarlo. El rendimiento de la reacción fue del 53,11 %. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 8,04 (s, 8H, Cd, Ce), 7,98 (s, 1H, Ca), 7,60 (d, 1H, Cb) 7,73 (d, 1H, Cc).

6.3.4. Síntesis del trímero de fenilnetileno con tres terminaciones manosa

En un matraz balón de 50 ml, se disolvieron 38 mg ($9,27 \times 10^{-5}$ mol) del compuesto **3** y 159,13 mg ($4,17 \times 10^{-4}$ mol) de difenil (2, 3 - dihidro - 2 - tioxo - 3 - benzoxazolil) fosfonato en 1,53 ml de N-metil-2-pirrolidinona (calentando ligeramente para ayudar a la disolución). El uso del

difenil (2,3-dihidro-2-tioxo-3-benzoxazolil) fosfonato como agente activante se debe a que este compuesto es bastante selectivo con el grupo carboxilo para una reacción de amidación, evitando reacciones secundarias de esterificación entre los grupos carboxilos y los grupos hidróxidos de la manosa.



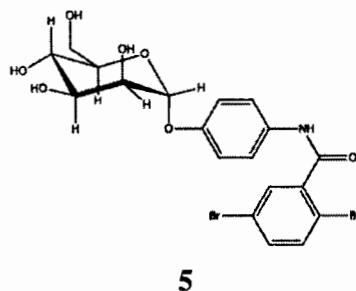
La solución se dejó en agitación por 3 minutos y después se agregaron 28,1 mg (38,39 μl , $2,78 \times 10^{-4}$ mol) de TEA destilada. Por último se adicionaron 75,35 mg ($2,78 \times 10^{-4}$ mol) de 4-Aminofenil α -D-manopiranosida disuelta en 2,7 ml de N-metil-2-pirrolidinona. La reacción se realizó a temperatura ambiente y con agitación por 8 días. Transcurrido este tiempo, se evaporó todo el solvente y el sólido formado se disolvió en THF y se precipitó en cloroformo en dos ocasiones. Posteriormente se realizaron precipitaciones en acetona a bajas temperaturas y se purificó en columna empacada con silica gel usando como solvente una mezcla de THF. RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 8,32 (s, 1H, Ca), 7,8 (d, 1H, Cb), 7,58 (d, 1H, Cc) 7,99 (d, 4H, Ce), 7,7 (d, 4H, Cd), 6,65 (d, 6H, Cf), 6,88 (d, 6H, Cg), 5,31 (d, 6H, carbono anomérico) 3,02 - 3,81 (m, 27H, manosa), 9,71 (s, 3H, N)

6.4. Síntesis del polímero

6.4.1. Síntesis del monómero dihalogenado con una terminación manosa

En un matraz balón de 25 ml, se disolvieron 54 mg ($1,85 \times 10^{-4}$ mol) de ácido 2,5-dibromo benzoico y 77,8 mg ($2,03 \times 10^{-4}$ mol) del agente activante en 0,5 ml de N-metil-2-pirrolidinona (calentando ligeramente para ayudar a la disolución). Esta solución se dejó en

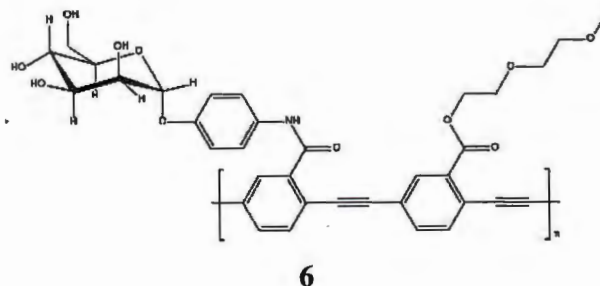
agitación por 10 minutos y después se agregaron 28,1 mg (28,59 μl , $1,85 \times 10^{-4}$ mol) de diazabicyclo-(5, 7, 0)-undeca-7-eno (DBU). Por último se adicionaron 50 mg ($1,85 \times 10^{-4}$ mol) de 4-Aminofenil α -D-manopiranosida disuelta en 2 ml de N-metil-2-pirrolidinona. La reacción se realizó a temperatura ambiente y con agitación por cuatro días. Transcurrido este tiempo, se evaporó todo el solvente y el sólido formado resultante se disolvió en THF y se precipitó en cloroformo en dos ocasiones y se recuperó el producto por centrifugado. Posteriormente se realizaron precipitaciones en acetona a bajas temperaturas y se purificó en columna empacada con silica gel usando THF como solvente. RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 10.2 (s, 1H, NH), 7,67 (s, 1H, Cc), 7,44 (d, 1H, Ce), 7,16 (d, 1H, Cd), 6,78 (d, 2H, Cb), 6,48 ppm (d, 2H, Ca), 5,06 (d, 2H, carbono anomérico), 3,17 - 3,78 (m, 9H, manosa).



6.4.2. Polimerización

Siguiendo el procedimiento general para el acoplamiento de Sonogashira-Heck, se removió el aire, con ciclos de vacío-nitrógeno de un matraz de 250 ml de 2 bocas (matraz de reacción) provisto de agitador magnético, llave para gas y un séptum, al cual se adicionaron 3,54 mg ($4,94 \times 10^{-6}$ mol) de diclorobis (trifenil) fosfina paladio II y 3,6 mg ($1,87 \times 10^{-5}$ mol) de yoduro de cobre. El matraz se colocó en un baño frío y se añadió 105 mg ($1,98 \times 10^{-3}$ mol) del compuesto bromado portador de la manosa (obtenido en la reacción anterior) y disuelto en TEA/THF, se dejó en agitación por 10 min y enseguida se burbujeó 48,9 mg ($1,8 \times 10^{-4}$ mol) de 2,5-dietinil-benzoato de 2-(2-metoxi-etoxi)-etilo disueltos en 1,5 ml de (TEA) y 10 ml de (THF) destilados y desgasificados previamente. La reacción se dejó en atmósfera inerte, con agitación y a temperatura ambiente durante 18 horas. Transcurrido este tiempo, se filtró para eliminar la sal de amonio y se lavó con THF, eliminando el solvente por evaporación. El

producto fue purificado por cromatografía preparativa de GPC usando THF como solvente. RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 3,64 (s, 3nH, CH_3), 3,3 - 4,3 (m, 17nH, manosa y glicol), 6,96 (d, 2nH, fenil manosa), 7,1 (d, 2nH, fenil manosa), 7,25 (s, 1nH, Ar), 7,4 (d, 2nH, Ar), 7,8 (d, 2nH, Ar).



6.5. Condiciones de cultivo de *Escherichia coli*.

Tabla 6.3. Composición caldo Luria.

Compuesto	Cantidad
Bacto peptona	750 mg
Extracto de levadura	380 mg
NaCl	750 mg
Glucosa	75 mg
Cloruro de magnesio	75 mg
Agua destilada	75 ml

Las cepas utilizadas de *Escherichia coli* uropatógeno se obtuvieron del Hospital de la Mujer, del Instituto Mexicano del Seguro Social, y de laboratorios de la localidad. El término *E. coli* uropatógeno ha sido utilizado para describir los serotipos de estas bacterias capaces de colonizar e invadir el tracto urinario, ya que sólo pocas tienen esa capacidad⁶², resultante de la producción de fimbrias tipo I. La síntesis de estas fimbrias depende de las condiciones de crecimiento a las que se someta la cepa, por lo que se hace necesario escoger adecuadamente un medio de cultivo que favorezca dicha producción. El medio utilizado fue el caldo Luria, el cual favorece el desarrollo de fimbrias y cuya composición se describe en la tabla 6.3.

Este medio de cultivo, como el resto de las soluciones y materiales empleados en el análisis microbiológico, fue esterilizado en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. El desarrollo de la cepa *E. coli* se llevó a cabo mediante 2 cultivos sucesivos, en condiciones estáticas a 37 °C durante 48 horas. Una vez desarrollado el primer cultivo, se tomaron dos mililitros del cultivo resultante y se inocularon en un nuevo matraz conteniendo caldo Luria. Para el segundo cultivo, se le aplicaron las mismas condiciones manejadas anteriormente.

Tabla 6.4. Composición de buffer fosfato salino (PBS).

Compuesto	Concentración (g/L)
Cloruro de potasio	0,2
Fosfato de potasio monobásico	0,2
Cloruro de sodio	8
Fosfato de sodio di básico (heptahidratado)	1,74
Cloruro de calcio dihidratado	0,132
pH	7,2

Después del segundo periodo de incubación se recuperó el paquete celular y se lavó con una solución búfer, con el fin de eliminar los restos del medio de cultivo utilizado, y de esta forma obtener una suspensión celular de bacterias. La solución amortiguadora utilizada fue búfer fosfato salino (PBS) y su composición está descrita en la tabla 6.4. El procedimiento de lavado consistió en centrifugar el cultivo obtenido, eliminar el sobrenadante libre de células y, finalmente, resuspender el material en la solución amortiguadora. De esta manera se obtuvo una suspensión celular dispersada en la solución búfer. Esta suspensión permitió un manejo adecuado de las células, tanto para almacenamiento, como para otras tareas.

Eventualmente se realizaron recuentos celulares en placa de la suspensión de bacterias, con el fin de que en las diferentes pruebas experimentales realizadas, se utilizara una concentración de bacterias (unidades formadoras de colonia) constante y en un rango determinado⁶³. Para esto la suspensión celular se ajustó hasta alcanzar una población de bacterias de alrededor de 10^8 UCF/ mL, la cual corresponde a una absorbancia aproximada de 2, tomada a 625 nm.

6.6. Reconocimiento de las fimbrias tipo I por aglutinación

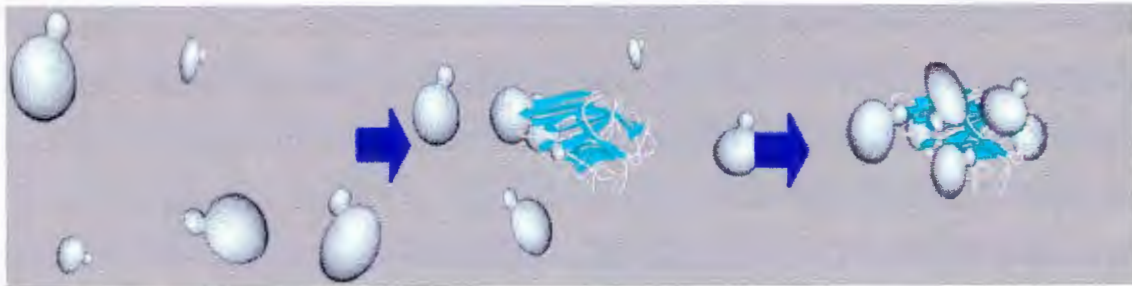


Figura 6.1. Modelo de aglutinación de *Saccharomyces cerevisiae* con concanavalina A.

La presencia de fimbrias tipo I en las células de las bacterias de *Escherichia coli* se determinó mediante pruebas de aglutinación, utilizando células de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae*⁶⁴. Las pruebas de aglutinación incluyeron un control positivo y un control negativo. El control positivo se realizó mediante la adición de concanavalina A, la cual es una lectina (proteína) que ha sido utilizada como agente aglutinante en estudios de interacción de lectinas con membranas plasmática de las células de levaduras⁶⁵. El posible modelo de aglutinación entre la molécula de CoA y las levaduras de *S. cerevisiae* se presenta en la figura 6.1.

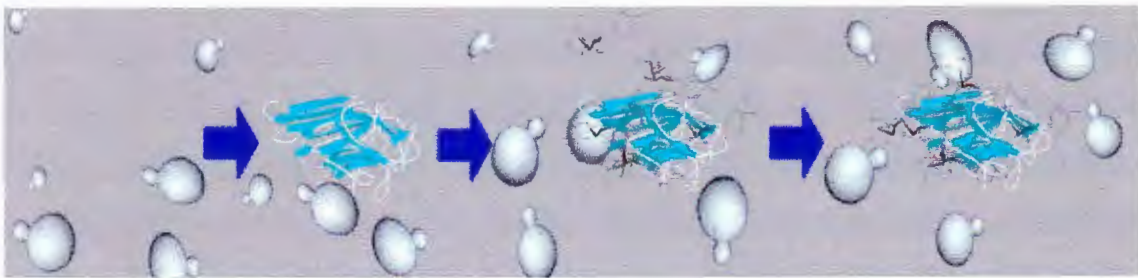


Figura 6.2. Inhibición de la aglomeración de levaduras por presencia de moléculas de manosa.

La manosa en estado libre es un inhibidor competitivo de la formación de aglomerados, ya que se interactúan, adhiriéndose a las adhesinas de las fimbrias tipo I, se unen a sus moléculas. Esta unión impide que las moléculas de concanavalina A se unan con los residuos de manosa, presentes en los tejidos de las levaduras. De esta manera se dificulta la formación de aglomerados, y se obtienen suspensiones que presentan células en estado libre⁶⁶, tal como se observa en la figura 6.2.

El cultivo de *S. cerevisiae* se obtuvo utilizando levaduras de panificación comerciales. Para su crecimiento y desarrollo, se utilizó el caldo extracto de levadura/extracto de malta (YM) como medio de cultivo cuya composición se presenta en la tabla 6.5. La peptona, el extracto e levadura y el extracto de malta se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 min. La solución de dextrosa se esterilizó por separado para evitar su precipitación, mediante filtración con ayuda de un portafiltro de teflón previamente esterilizado y un filtro de membrana de nylon de un tamaño de poro de 0.2 µm. La solución de dextrosa, se agregó al medio de cultivo esterilizado, igual que el ácido cítrico esterilizado previamente, cuya función fue regular el pH a un valor de 6.2.

Tabla 6.5. Composición del caldo YM

Compuesto	Cantidad
Peptona	250 mg
Levadura	150 mg
Malta	150 mg
Dextrosa	500 mg
Acido cítrico	450 mg
Agua	50 ml

El tiempo de incubación de las levaduras fue de 14 horas, con una agitación de 150 revoluciones por minuto (rpm) y 40 °C. Al cultivo resultante se le aplicaron lavados similares a los descritos en el punto 6.5 desarrollados con el cultivo bacteriano. De igual manera, todos los cultivos de levadura se resembraron periódicamente en medio sólido a intervalos de una semana, para mantener la cepa viable, y de esta manera poder utilizarlas cuando se requiriera. Para esto se prepararon los medios de cultivo líquidos citados anteriormente, con la diferencia de que se agregó agar-agar en una proporción de 15 gramos por litro de solución.

La suspensión de levaduras se contabilizó utilizando la técnica del recuento en placa, para determinar la concentración de células en la suspensión (células/mL). Antes de realizar las pruebas de aglutinación se aplicó ultrasonido a las muestras con el fin de minimizar la cantidad de aglomerados de células de levadura de *S. cerevisiae* que se pudieran haberse formado espontáneamente. El tiempo máximo de ultrasonido aplicado fue de 120 segundos

con una potencia de 3 W, correspondiendo a un 20 % de la potencia del sonificador. Estos parámetros se aplicaron considerando que bajo estas condiciones no ocurre pérdida de las células.

Tabla 6.6. Composición de las soluciones para las pruebas de aglutinación.

Prueba #	Cantidad en mililitros					Total
	PIBS	E. coli	Co. A	Mucosa	Exudado	
1	120	0	80	0	200	400
2	80	0	80	0	200	400
3	0	200	0	0	200	400
4	10	190	0	0	200	400
5	20	180	0	0	200	400
6	30	170	0	0	200	400
7	40	160	0	0	200	400
8	50	150	0	0	200	400
9	60	140	0	0	200	400
10	70	130	0	0	200	400
11	80	120	0	0	200	400
12	90	110	0	0	200	400
13	100	100	0	0	200	400
14	110	90	0	0	200	400
15	120	80	0	0	200	400
16	130	70	0	0	200	400
17	140	60	0	0	200	400
18	150	50	0	0	200	400
19	160	40	0	0	200	400
20	170	30	0	0	200	400
21	180	20	0	0	200	400
22	190	10	0	0	200	400
23	200	0	0	0	200	400

Los controles, tanto positivo como negativo se realizan con el fin de tener una referencia visual que permitiera determinar la formación de aglomerados a partir de células en estado libre. Con los controles también se determinó si la acción de los diferentes componentes es la adecuada. La proporción de células, solución buffer, concanavalina y manosa utilizadas para el desarrollo de las pruebas de aglutinación se describe en la tabla 6.6. El control negativo contiene los mismos componentes que el control positivo, pero se le añade una solución de manosa. A todas las pruebas se adiciona PBS en la cantidad requerida para mantener volúmenes constantes.

Las pruebas de aglutinación de *S. cerevisiae* con *E. coli* se realizaron de manera similar a las pruebas en las que se utilizó la concanavalina A, sin embargo, la función aglomerante que presenta esta lectina, la desarrollaron todas aquellas bacterias que contenían fimbrias tipo I. Las pruebas se realizaron con diferentes concentraciones de células bacterianas para determinar los parámetros óptimos y se utilizó, también PBS para mantener los volúmenes de las soluciones constantes, cuya composición aparece en la tabla 6.6.

Para determinar si las estructuras proteínicas, presentes en las bacterias, y responsables de la formación de aglomerados, son fimbrias exclusivamente del tipo I, fue necesario realizar pruebas similares al control negativo realizado entre levadura y CoA, es decir pruebas de aglutinación con células bacterianas y levaduras, pero en presencia de una solución de manosa que inhibiera la formación de aglomerados. La cantidad de manosa utilizada en las soluciones fue la misma que se utilizó en el control negativo citado. Estas cantidades están representadas en la tabla 6.7.

Tabla 6.7. Composición de las soluciones para las pruebas de inhibición.

Prueba #	Cantidad en mililitros					
	PBS	<i>E. coli</i>	Co.A	Manosa	levadura	Total
1	120	0	80	0	200	400
2	56	0	80	64	200	400
3	100	100	0	0	200	400
4	36	100	0	64	200	400

La figura 6.3 representa el modelo de aglutinación de las levaduras por efecto de la fimbria tipo I presente en las células de *E. coli*.

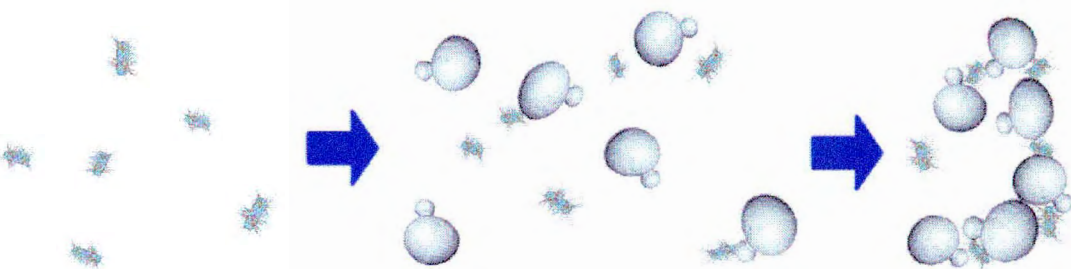


Figura 6.3. Modelo de aglutinación de *Saccharomyces cerevisiae* con *Escherichia coli*.

6.7. Caracterización de la morfología celular por microscopía

6.7.1. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Para corroborar la presencia de las fimbrias tipo I en la superficie celular de la bacteria *E. coli*, se realizaron estudios de microscopía electrónica de barrido (MEB), utilizando las técnicas de fijación, deshidratación, secado por punto crítico y recubrimiento con oro paladio descritas en la literatura⁶⁷. Como material de partida se utilizaron dos mililitros del cultivo bacteriano de *E. coli*, resultante después del segundo periodo de crecimiento de 48 horas en el caldo Luria en condiciones estáticas a 37 °C. El cultivo fue centrifugado a 6000 rpm durante 15 min y antes de resuspender las células en PBS se lavaron dos veces con una solución de Ringer ¼. Las células se resuspendieron sin agitación para evitar la pérdida de las fimbrias.

Para que una muestra de tejido permanezca intacta en el tiempo, y permita su observación al microscopio, todas las veces que se desee, es necesario fijarla. Este proceso se refiere al tratamiento que se le da a las células con sustancias químicas para preservar intactos sus organelos, conservándolos de forma que muestren el mayor parecido posible a su estado in vivo, aumentar la dureza del tejido para facilitar la preparación de películas finas, proteger a la muestra de posibles alteraciones durante los procesos de preparación y observación al microscopio electrónico, destruir bacterias y gérmenes que pudieran encontrarse en ellos, e interrumpir los procesos celulares dinámicos normales que ocurren después de la muerte de la célula, lo que se logra al inactivar ciertas enzimas que de otra manera iniciarían la autólisis y

llevarían a la degeneración post mortem⁶⁸, lo que impediría una observación objetiva. La fijación mantiene las estructuras al estimular la formación de enlaces cruzados entre las proteínas. En realidad, los fijadores introducen artefactos durante el proceso de preparación de la muestra por lo que, frecuentemente, la selección de un protocolo particular de fijación depende de la capacidad para preservar un tipo estructural determinado⁶⁹.

La fijación de las células se realizó dejándolas en contacto con glutaraldehído al 2.5 % en PBS, solución fijadora, durante 1 h a cuatro grados centígrados. Luego se eliminó la solución fijadora y se efectuaron cuatro lavados con PBS. Finalmente se efectuaron dos lavados de 10 min a 4 °C con agua destilada antes de proceder a la deshidratación⁷⁰. El glutaraldehído es un dialdehído de 5 átomos de carbono con una estructura relativamente sencilla y con un peso molecular de 100,12 g/mol. Su máximo atributo como fijador reside en su capacidad de establecer puentes de entrecruzamiento (Cross-link) con proteínas. El glutaraldehído enlaza a los grupos amino de las proteínas, específicamente el grupo aldehído reacciona con el grupo amino de la lisina ubicada en proteínas adyacentes originando los puentes de entrecruzamiento⁷¹.

Las células bacterianas se deshidratan mediante pases de 10 minutos por una serie de alcoholes, resuspendiendo y centrifugando cada vez. Se empieza con un pase en alcohol con una concentración del 50%, luego con una solución del 60%, del 70% y del 90%, dos pases en alcohol de 95%, alcanzando así de manera paulatina el alcohol absoluto, con el que se realizan dos pases, para eliminar totalmente el agua. Este procedimiento es necesario ya que si se colocara inmediatamente la muestra en una solución al 100% de alcohol, el agua saldría muy rápido del tejido y lo deformaría. Por último las células se sometieron a un secado por punto crítico en un liofilizador.

6.7.2. Microscopía fuerza atómica AFM

La muestra se tomó de una suspensión bacteriana en PBS, obtenida luego de tres lavados habituales y de centrifugación descritos en la sección 6.5. La cantidad tomada fue de 10 µL, que se depositan en un portaobjeto. La placa se dejó secar, en primera instancia, a temperatura

ambiente y al contacto con el aire, y luego se colocaron en un liofilizador hasta alcanzar el llamado punto crítico.

6.7.3. Tinciones negativas

Se realizaron técnicas que permitieran dilucidar con mayor claridad la estructura, forma y disposición de las fimbrias que pudieran presentar las células bacterianas, lo que fue posible con la aplicación de técnicas de tinción negativa⁷². Para la ejecución de las tinciones negativas, se utilizaron los cultivos desarrollados en caldo Luria bajo las condiciones descritas anteriormente. El caldo de cultivo se centrifugó a 6.000 rpm, 15 min a 10 °C y se hizo un lavado con solución Ringer ¼ dejando que las células se resuspendieran libremente, sin agitar, para evitar que los flagelos se desprendieran de la bacteria. Como soporte para preparar las tinciones negativas se utilizaron rejillas de cobre, sobre las cuales se colocaron 10 µL de la suspensión bacteriana. Después de un minuto se eliminó el exceso de líquido con un papel filtro y se dejó secar durante dos minutos. Luego se añadieron 10 µL de una solución de ácido fosfotúngstico al 2 %, con pH 7.2, que fue ajustado previamente con KOH 0.1 N. La solución se dejó durante un minuto en contacto con la preparación. El exceso se retiró también con la ayuda de un papel filtro, quedando la muestra lista para su observación al microscopio electrónico de transmisión (MET).

6.8. Reconocimiento de bacterias mediante el uso de los oligómeros y polímeros funcionalizados con manosa

En esta etapa experimental, los oligómeros funcionalizados con manosa, fueron disueltos en dimetilformamida (DMF) a una concentración de 1 g/l, mientras que el polímero funcionalizado con manosa, se disolvió en tetrahidrofurano (THF) a la misma concentración de 1 g/l. Se prepararon diferentes soluciones de prueba, en las cuales se variaron los componentes de cada una de ellas para evaluarlas de la mejor manera. La composición de las soluciones se resume en la tabla 6.8, en donde los compuestos denominados Tn (T1, T2, T3, T4) son trímeros que tienen diferentes grupos funcionales en cada uno de sus dos extremos. Así por ejemplo T1 tiene dos terminaciones en ácidos carboxílicos, T2 tiene en un extremo una

terminación metoxi-dietilenglicol y en el otro una terminación manosa, T3 tiene dos terminaciones manosa y finalmente el oligómero T4 tiene en un extremo una terminación metoxi-dietilenglicol y en el otro una terminación ácido carboxílico. El compuesto Pol, a su vez se refiere al co-polímero que se sintetizó como se describe en la sección 6.4.2.

Tabla 6.8. Composición de las soluciones para las pruebas de aglutinación con oligómeros y polímeros.

Prueba #	Cantidad en microlitros									
	T1	T2	T3	T4	Pol	<i>E. coli</i>	DMF	THF	PBS	TOTAL
1	0	0	0	0	0	0	30	0	2970	3000
2	0	0	0	0	0	0	0	30	2970	3000
3	30	0	0	0	0	0	0	0	2970	3000
4	0	30	0	0	0	0	0	0	2970	3000
5	0	0	30	0	0	0	0	0	2970	3000
6	0	0	0	30	0	0	0	0	2970	3000
7	0	0	0	0	30	0	0	0	2970	3000
8	0	0	0	0	0	120	30	0	2850	3000
9	0	0	0	0	0	120	0	30	2850	3000
10	30	0	0	0	0	120	0	0	2850	3000
11	0	30	0	0	0	120	0	0	2850	3000
12	0	0	30	0	0	120	0	0	2850	3000
13	0	0	0	30	0	120	0	0	2850	3000
14	0	0	0	0	30	120	0	0	2850	3000

Los solventes DMF y THF se adicionaron a los blancos que no contenían ni oligómeros ni polímero, para tratar de mantener en lo posible las mismas condiciones en todas las mezclas a analizar. La suspensión bacteriana de *E. coli* utilizada en la preparación de las mezclas tenía una concentración de células correspondiente a una absorbancia aproximada de 2 tomada a 625 nm de longitud de onda. Para mantener los volúmenes constantes de 3 ml en cada una de las pruebas se le agregó a cada una de ellas la cantidad necesaria de PBS.

Las soluciones 1 y 2 corresponden a los blancos de los respectivos solventes, mientras que las soluciones 3, 4, 5 y 6 fueron los blancos correspondientes a cada uno de los trímeros. La mezcla 7 fue el blanco del polímero. Las soluciones 8 y 9 representaron el blanco de la

bacteria en cada uno de los solventes. Por último las soluciones de la 10 a la 13 fueron las muestras problema que se analizaron luego de mezclar la suspensión bacteriana con cada uno de los diferentes oligómeros a evaluar. La muestra 14 fue el resultado de la mezcla de bacterias con el polímero sintetizado.

Todas las soluciones descritas anteriormente, se homogeneizaron en un agitador mecánico a una temperatura de 37 °C y una agitación de 250 rpm durante una hora. Las muestras fueron evaluadas por las técnicas de microscopía óptica, microscopía de láser confocal de barrido (LSCM), espectroscopia de absorción UV-vis y de fluorescencia.

6.9. Rendimiento cuántico

El rendimiento cuántico expresa la relación entre el número de fotones emitidos, I_F , y el número total de fotones absorbidos, I_{ab} , obteniéndose un valor entre cero y uno. Se calculó para las muestras que presentaron los mejores resultados. La fórmula para calcular el rendimiento cuántico es la siguiente:

$$\varphi_m = \varphi_s * A_s * F_m * (\eta_{sol} / \eta_s) ^2 / (A_m * F_s)$$

Donde, φ_m es el rendimiento cuántico de la muestra; A_m la absorbancia de la muestra; F_m la fluorescencia de la muestra; η_{sol} índice de refracción del solvente. Para el sulfato de quinina se tiene: φ_s rendimiento cuántico, A_s absorbancia, F_s fluorescencia y η_s índice de refracción.

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

En este trabajo se sintetizaron un trímero y un polímero portadores del grupo manosa como nuevas moléculas. Sin embargo los ensayos de reconocimiento se realizaron sólo para el polímero ya que el trímero no fue posible solubilizarlo. Además se llevaron a cabo evaluaciones de otras cuatro moléculas previamente sintetizadas en un trabajo previo y que son portadores tanto de grupos ácidos carboxílicos como de manosa, (figura 7.1). Cabe señalar que en este trabajo fue necesario sintetizar nuevamente dichas moléculas debido a que la cantidad que había era muy poca. Encontramos que la ruta de síntesis reportada por T. Méndez es totalmente reproducible.

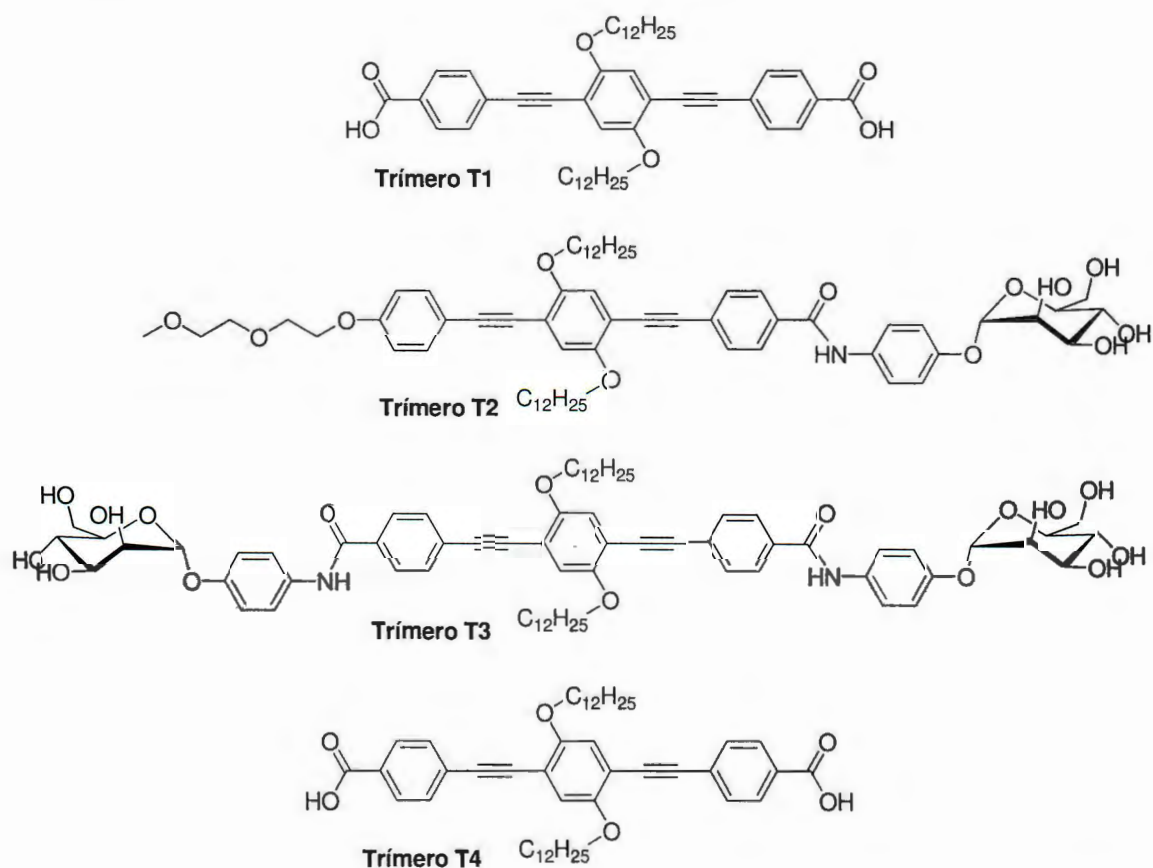


Figura 7.1. Oligómeros portadores de grupos ácido carboxílico y funcionalizados con uno y dos grupos manosa empleados en el reconocimiento de la bacteria *E. coli*.

El nuevo trímero posee tres grupos manosa, mientras que el co-polímero posee un número n . Primeramente, fue necesario sintetizar los monómeros que dieran lugar a la formación de oligómeros. El mecanismo de reacción, resultados y la caracterización de cada uno de los intermediarios se describe a continuación.

7.1. Síntesis del 4-yodo benzoato de bencilo

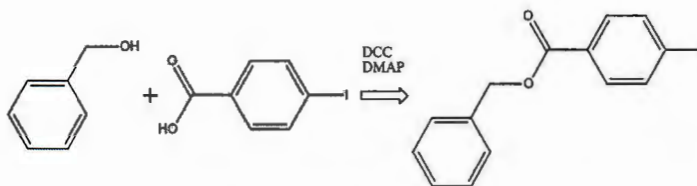


Figura 7.2. Ruta de síntesis del 4-yodo benzoato de bencilo.

La ruta de síntesis de esta molécula (figura 7.2) consiste en efectuar una esterificación entre un alcohol y una ácido carboxílico; reacción conocida como de Steglich y que se efectúa por la acción de la dicitohexilcarboxildiimida (DCC) como agente activante del grupo ácido carboxílico y de la dimetilaminopiridina (DMAP) como catalizador, la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente.

El mecanismo de la reacción se presenta en la figura 7.3 y empieza con la formación de O-aciurea EI-1; una especie intermediaria que se genera a partir del ataque nucleofílico de los electrones no enlazados del grupo $-OH$ del ácido carboxílico al carbono del agente activante. Posteriormente, la piridina DMAP reacciona con el grupo carbonilo de EI-1 dando lugar a la formación de N-acilpiridinio. EI-2, el cual es un segundo intermediario que finalmente reacciona con el grupo $-OH$ del alcohol bencílico dando como producto final de la reacción el 4-yodobenzoato de bencilo y la regeneración del catalizador.⁷³ En nuestro caso obtuvimos un rendimiento del 62 %.

El espectro de resonancia magnética nuclear de protón (RMN) del compuesto, mostró las siguientes señales: un singlete a δ 7,79 ppm correspondiente a los dos protones que deberían de presentar un sistema AB, sin embargo tanto el carácter electrónico del grupo yodo como el

bencil benzoato generan que la resonancia de los protones sea químicamente iguales. Entre 7.48 y 7.36 ppm se presenta un multiplete generado por los protones aromáticos del bencilo. Nótese que la señal más característica de esta molécula la generan los $-CH_2-$ bencílicos y que se presentan como un singlete a 5,38 ppm, figura 7.4.

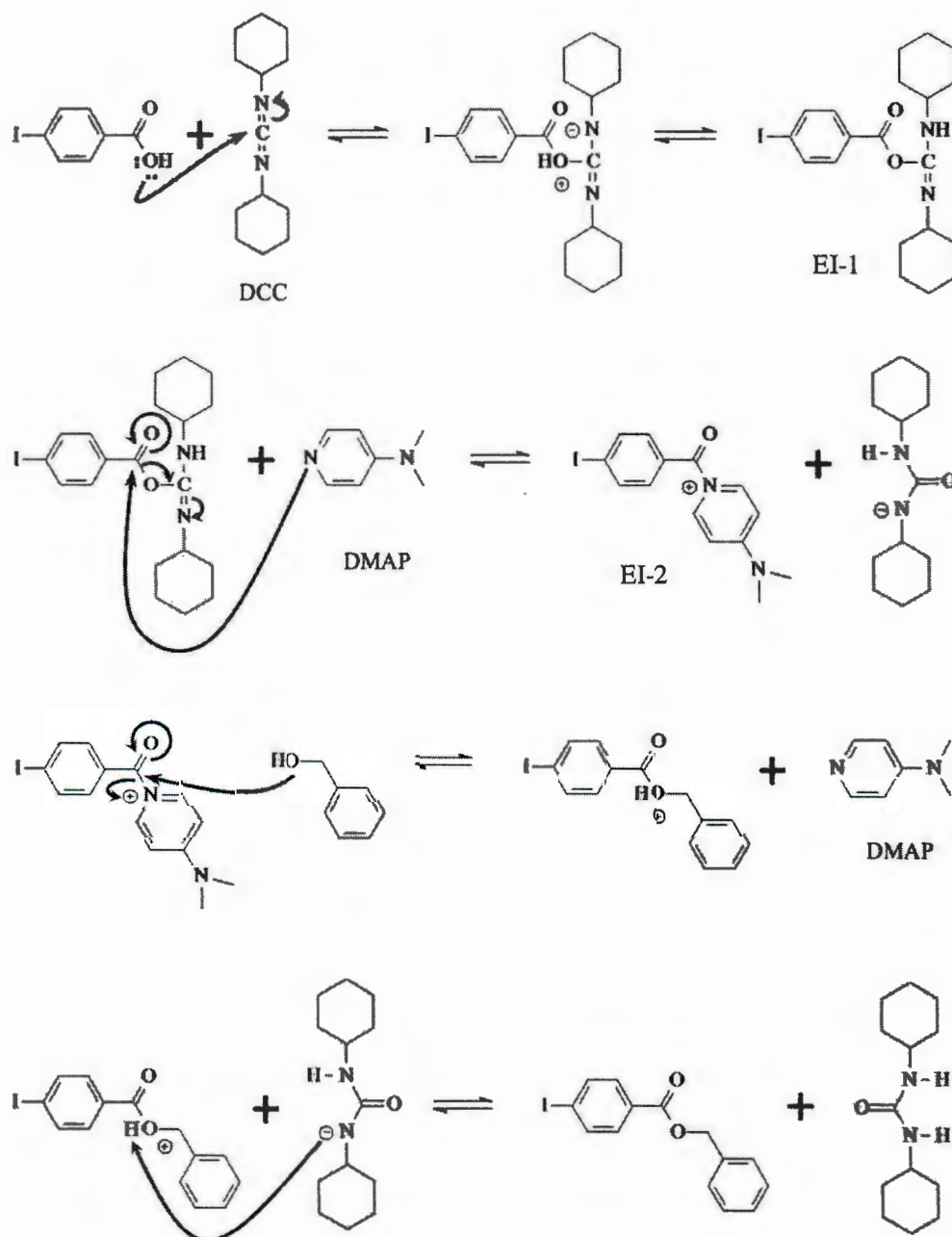


Figura 7.3. Mecanismo de reacción para obtener el 4-yodobenzoato de bencilo.

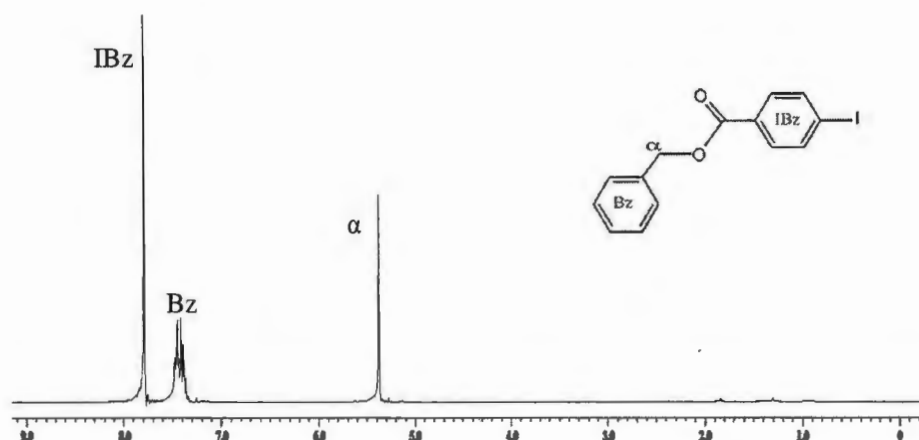


Figura 7.4. Espectro de RMN ^1H correspondiente al 4-yodobenzoato de bencilo.

7.2. Síntesis del trímero fenilnetileno con terminaciones manosa

La ruta de síntesis del trímero portador de los tres grupos manosa, se describe en la figura 7.5 y se lleva a cabo en tres etapas. La primera etapa consiste en realizar un acoplamiento de Sonogashira-Heck entre dos equivalentes del monómero 4-yodobenzoato de bencilo con un equivalente del monómero 2-(2-metoxietoxi) etil 2,5-dietinilbenzoato en trietilamina como solvente. En una segunda etapa, el trímero es sometido a una reacción de hidrólisis de los grupos bencilos en medio básico, en donde la relación de 10 equivalentes de KOH por grupo benzoato de bencilos da los resultados más favorables. Sin embargo hay dos observaciones a comentar; i) aunque los equivalentes de KOH sean más bajos a los empleados, el grupo 2-(2-metoxietoxi)etil del benzoato central también se hidroliza, por lo tanto el tipo de grupo sustituido en el benzoato es independiente y sufre hidrólisis. Dado que el (undecil) 2,5-dietinilbenzoato es más fácil de sintetizar que el anterior, entonces la reacción de acoplamiento para obtener el trímero la realizamos también con éste último monómero; ii) la reacción debe de estar libre de toda traza de oxígeno, es decir estar bien desgasificada, ya que su degradación es muy rápida debido a la presencia de la base. Para llevar a cabo la reacción de amidación entre el trímero portador de tres ácidos carboxílicos y la manosa, es necesario primeramente activar los ácidos carboxílicos con un buen grupo como con el difenil (2, 3 - dihidro - 2 - tioxo - 3 - benzoxazolil) fosfonato. La ventaja de emplear este agente activante es que los grupos OH primarios y secundarios de la manosa no tienen que ser protegidos, ya que la condensación se lleva a cabo selectivamente con la amina. El uso de otro agente activante

implicaría una esterificación de todos los grupos participantes, siendo el grupo amina el que menos intervenga en dicha reacción debido a su proporción en número con el resto de otros grupos funcionales. El resultado sería una mezcla de subproductos y un rendimiento muy bajo para el compuesto que se desea obtener. La desventaja en el uso de este agente activante es la presencia de reacciones secundarias derivadas del mecanismo de reacción.

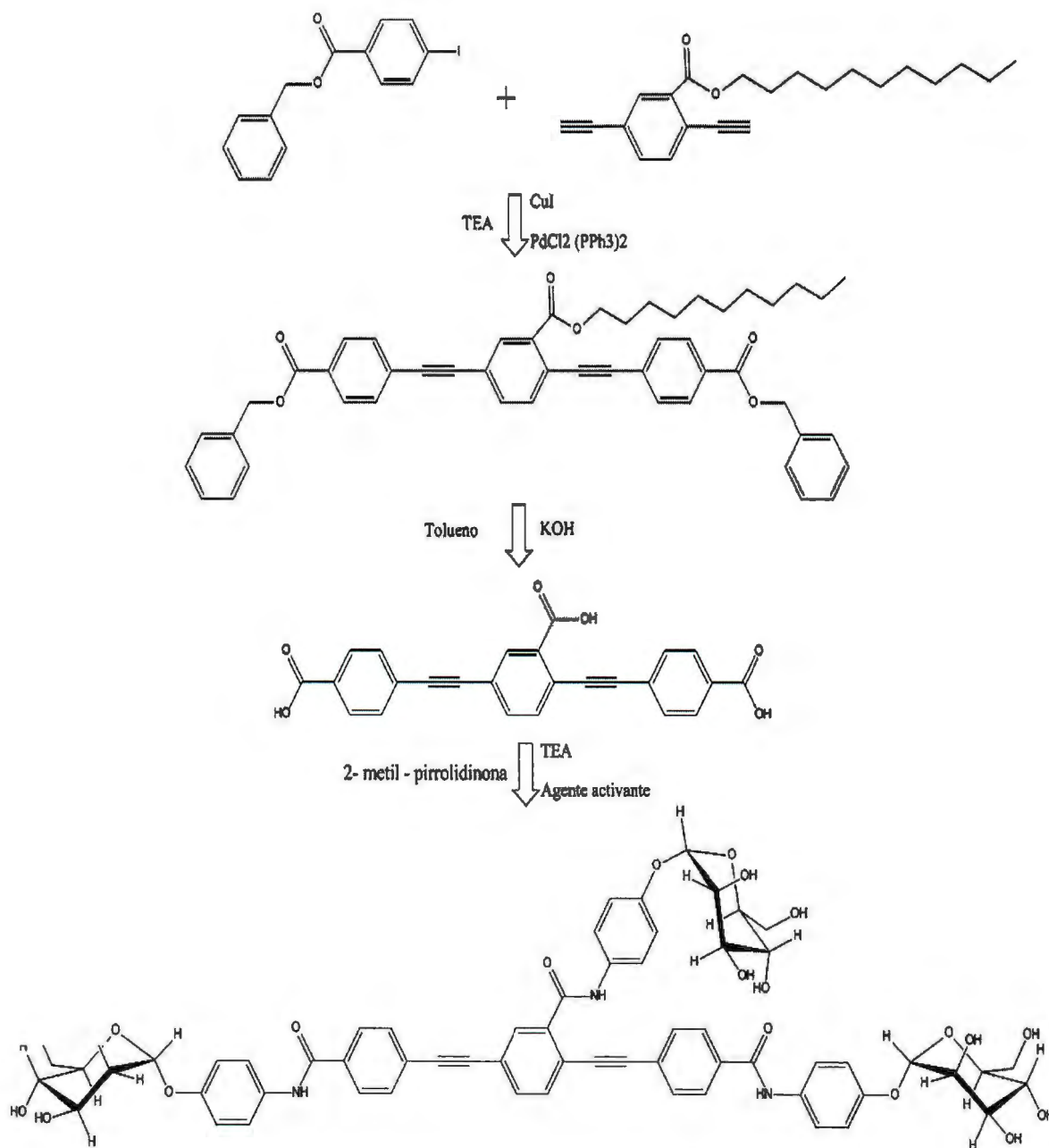


Figura 7.5. Ruta de síntesis del trímero fenilnetinileno portador de grupos manosa.

7.2.1. Síntesis del trímero con los grupos ácidos carboxílicos protegidos con benzoatos de bencilo (reacción de acoplamiento de Sonogashira - Heck)

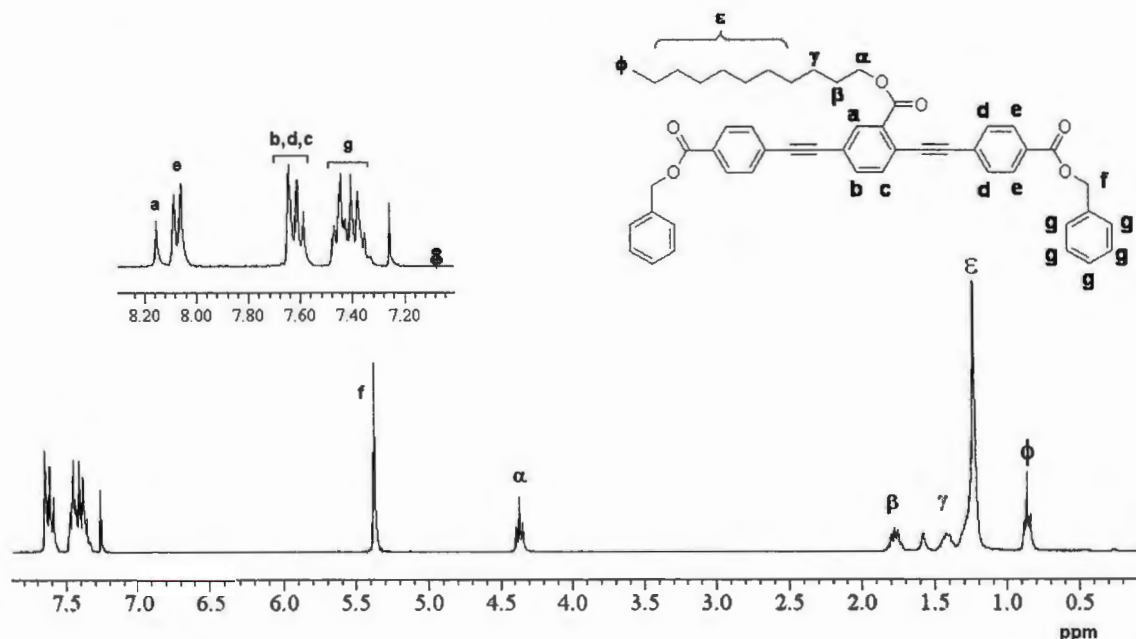


Figura 7.6. Espectro de RMN ¹H correspondiente al 4,4'-(2-(undeciloxycarbonil)-1,4-fenileno) bis (etino-2,1-diil) dibenzoato de bencilo.

La síntesis del trímero fenileneitileno con los grupos carboxílicos protegidos, se realizó mediante el acoplamiento de Sonogashira - Heck, el rendimiento de esta reacción alcanzó el 40,44% y su análisis por RMN de protones corroboró la estructura del producto esperado. En la región aromática, figura 7.6 ampliada, se presenta una señal con multiplicidad de singlete a 8.16 ppm correspondiente al protón vecino al undecanoxi benzoato; el duplete del sistema AB del protón vecino al benzoato de bencilo aparece a 8.09 ppm. Lo que es difícil distinguir son los dupletes tanto del sistema AB de **d** como los generados por los protones de **b** y **c**, ya que todos se muestran en la misma región, no obstante la integración coincide para 6 protones. Los protones bencílicos **g** aparecen como un multiplete centrado en, aproximadamente, 7.4 ppm. La señal más característica de la molécula, la da sin duda el -CH₂- bencílico **f** como un singlete a 5.37 ppm integrando para cuatro protones. Por último se tienen las señales características de la cadena alifática, primeramente los protones α al benzoato como un triplete

a 4,38 ppm, un quintuplete a 1.69 de los protones β , un multiplete para los protones γ , un singlete muy intenso para los 14 protones ϵ $-\text{CH}_2$ -de la cadena y por último un triplete para los protones ϕ $-\text{CH}_3$ a 0,9 ppm.

7.2.2. Desprotección de grupos carboxilo

El mecanismo de reacción involucrado para regenerar los grupos carboxílicos de los ésteres se muestra en la figura 7.7. La reacción se realiza en un medio con exceso de KOH como base e inicia con la formación de una especie intermediaria de tipo tetraédrico IT; producto de la adición nucleofílica del ión hidroxilo al carbono del grupo carbonilo. Enseguida, ocurre la eliminación del ion alcóxido de la molécula, obteniéndose de esta manera el ácido carboxílico correspondiente. Sin embargo, la reacción no termina aquí, ya que el ión alcóxido extrae el protón de la función carboxílica resultante, dando como productos finales el ión carboxilato de potasio y el alcohol bencílico. Por último, como etapa adicional, el compuesto carboxílico se regenera al ser protonado después de agregarle ácido acuoso⁷⁴ al medio de reacción, obteniéndose un rendimiento del 53,11 %.

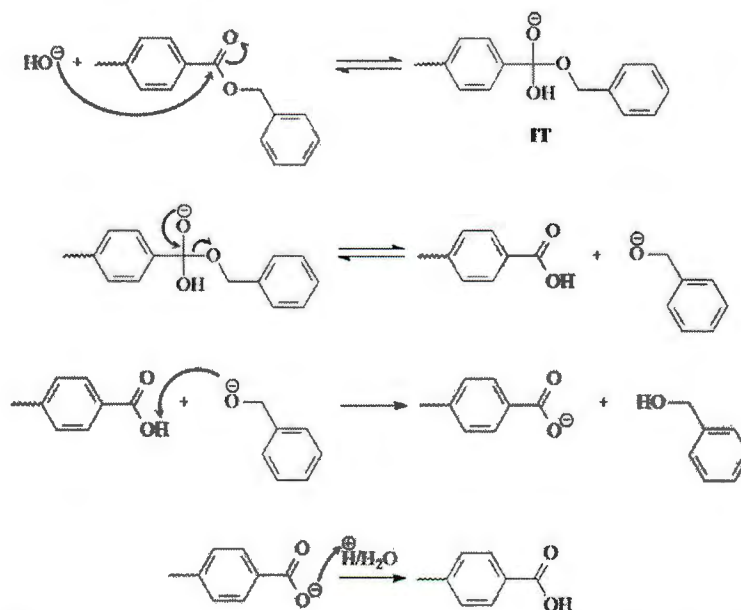


Figura 7.7. Mecanismo de reacción para la hidrólisis de ésteres bencílicos en medio alcalino (KOH).

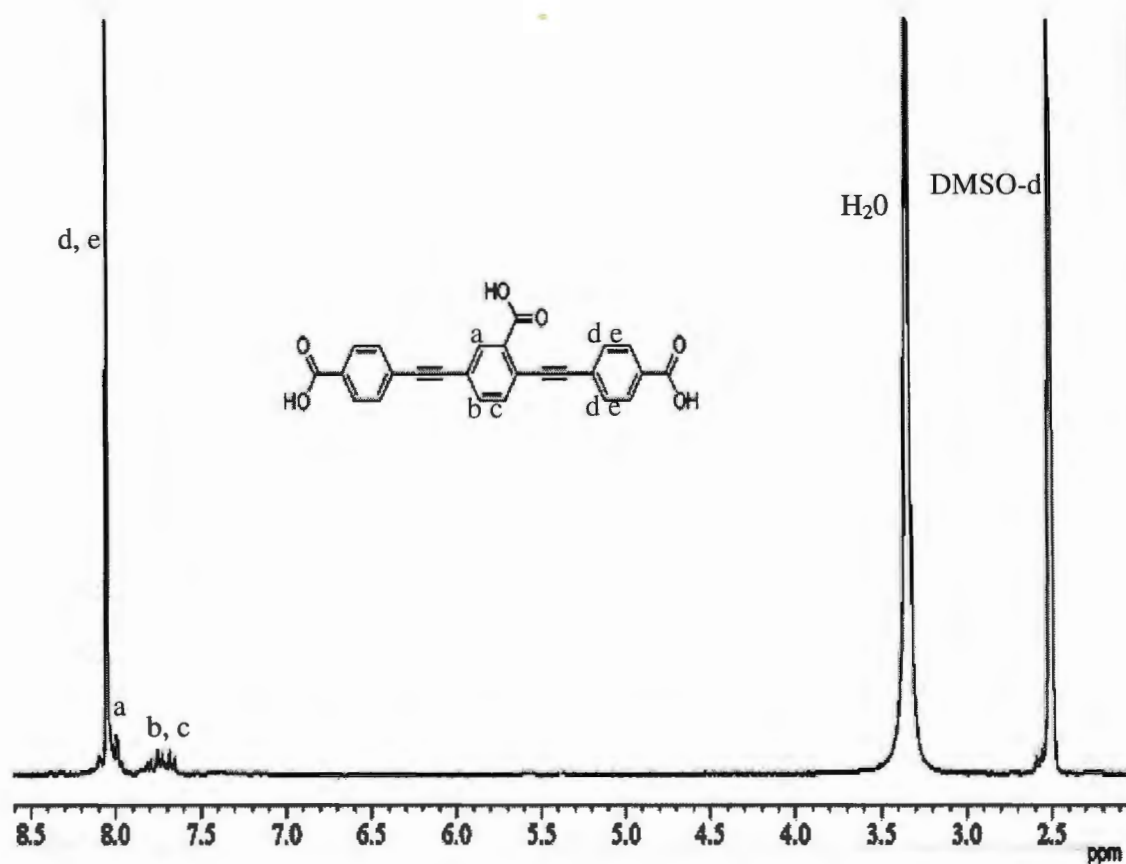


Figura 7.8. Espectro de RMN ^1H correspondiente al ácido 4,4'-(2-carboxi-1,4-fenileno) bis (etino-2,1-diil) dibenzoico.

Dada la polaridad de la molécula, ésta solo fue soluble en dimetil sulfóxido (DMSO), el espectro RMN se presenta en la figura 7.8. Es interesante observar en el espectro que los protones **d**, **e** del sistema AB de los fenilos en los extremos, se vuelven químicamente iguales dando como señal el singlete a 8.04 ppm. El protón en posición orto **a** al ácido carboxílico central se observa como un singlete a 7.98 ppm, mientras que los otros dos protones **b**, **c** del mismo ácido bencílico central dan como señal dos dupletes muy cercanos uno del otro a 7.73 y 7.60 ppm. En este espectro no fue posible identificar los protones de los grupos ácidos, ya que la ventana espectral donde aparecen es muy amplia, además que es conocido que los ácidos carboxílicos dimerizan, disminuyendo notablemente su señal. Nótese también que tanto los metilos bencílicos como los de las cadenas desaparecen indicando la total hidrólisis de los ésteres.

7.2.3. Reacción de amidación

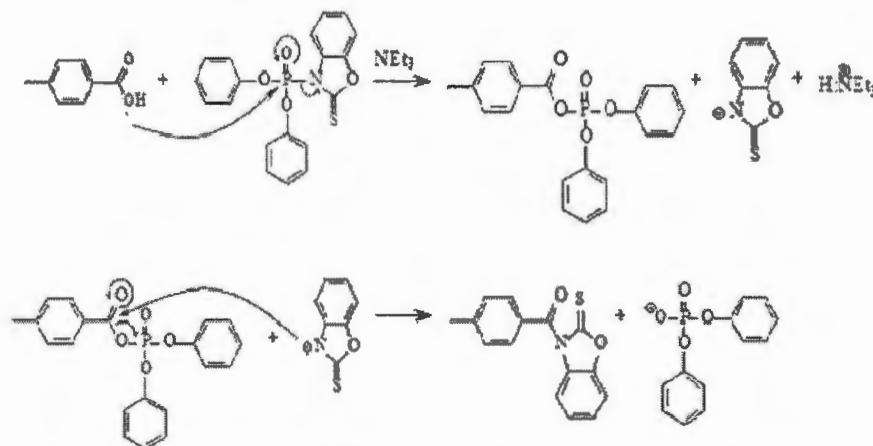


Figura 7.9. Etapa 1 del mecanismo de reacción de amidación.

La alta polaridad del trímero portador de los ácidos carboxílicos resultó ser favorable para su funcionalización con la manosa, ya que, ésta última es también muy polar y por lo tanto el medio de reacción debe de llevarse a cabo en un solvente muy polar como la N-metil pirrolidinona. La reacción consiste esencialmente en una reacción de amidación asistida por el agente activante difenil (2, 3 – dihidro – 2 – tioxo – 3 - benzoxazolil) fosfonato. Esta reacción se lleva a cabo en dos etapas, en la primera se realiza la activación de los grupos ácidos carboxílicos donde el agente activante reacciona con el grupo carboxílico, obteniéndose de este modo un primer compuesto intermediario, en donde el agente activante es un buen grupo saliente al ataque de un grupo nucleófilo, figura 7.9.

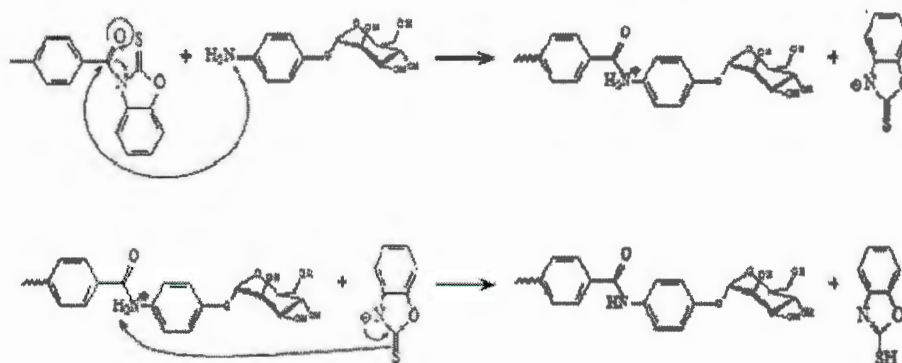


Figura 7.10. Etapa 2 del mecanismo de reacción de amidación.

En la etapa 2 del mecanismo ocurre precisamente el ataque nucleofílico de la amina formando una amida activa como segundo intermediario, la cual se adiciona al carbono del carbonilo activado⁷⁵, (figura 7.10), la cual después de una serie de protonaciones se forma el compuesto deseado.

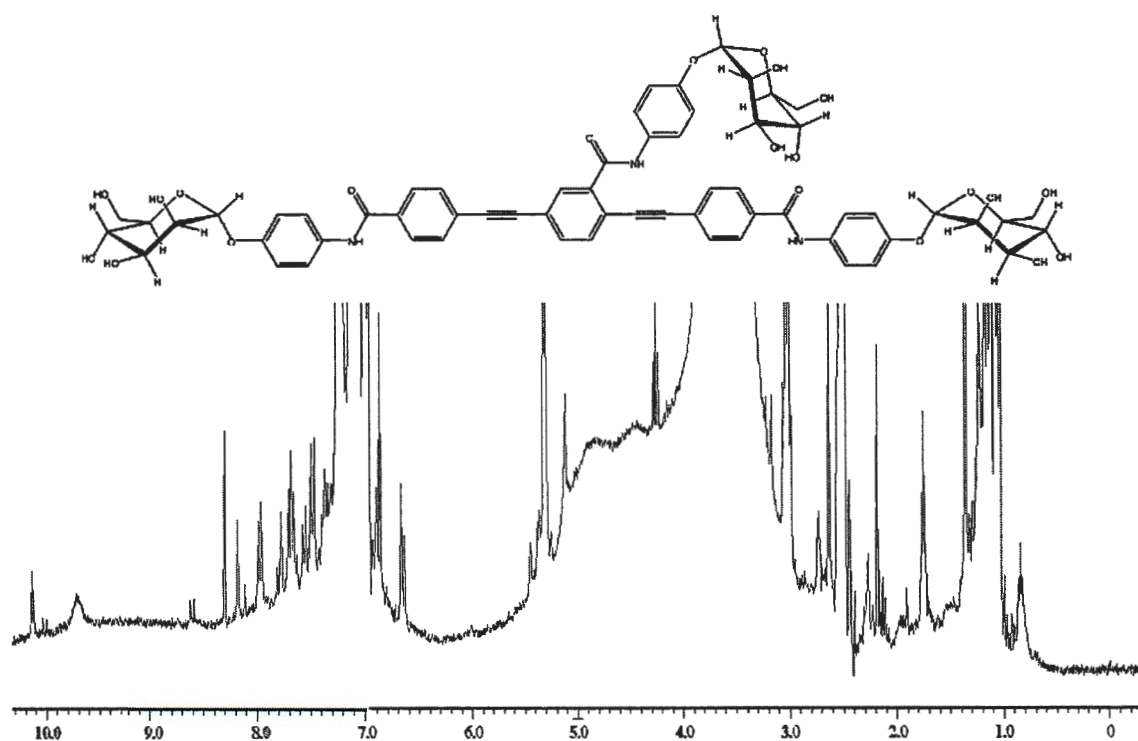


Figura 7.11. Espectro de RMN ¹H correspondiente al trímero con tres terminaciones manosa

Para la obtención del espectro mediante la técnica de RMN se tuvo el inconveniente de la baja solubilidad del producto. Esto puede ser debido a la estructura molecular del compuesto, ya que está formado por un esqueleto central lipofílico, el cual está funcionalizado con radicales altamente polares propios de los carbohidratos. El DMSO, fue el solvente más adecuado para correr el espectro a pesar de que nuestro producto precipitaba incluso al elevar la temperatura de la solución. El espectro que se pudo obtener se presenta en la figura 7.11, donde se evidencia la presencia de la manosa como parte integrante de la estructura molecular del compuesto obtenido. En el espectro RMN se pueden observar las señales propias del anillo aromático central: un singulete, a 8,32 ppm, y dos dobletes a 7,8 y 7,58 ppm. Para los anillos benzoatos se tienen dos dobletes a 7,99 y 7,7 ppm. Del anillo bencénico de la manosa se tiene

dos dobletes a 6,65 y 6,88 ppm. En 5,31 ppm se tiene la señal del protón del carbono anomérico de la manosa y entre 3,02 y 3,81 ppm las señales del resto de protones de la manosa, los cuales se solapan con la señal del agua presente tanto del dimetil sulfóxido, como de la molécula misma. Por último se tiene la señal del protón correspondiente a la amida a 9,71 ppm.

7.3. Síntesis del polímero

7.3.1. Síntesis de benzoato 2,5-dibromo con terminaciones manosa

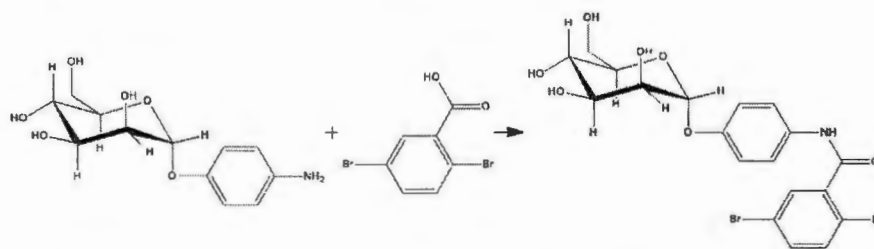


Figura 7.12. Ruta de síntesis del benzoato 2,5-dibromo con terminaciones manosa.

La ruta de síntesis del benzoato 2,5-dibromo con terminaciones manosa se muestra en la figura 7.12. Esta reacción consiste en la amidación del grupo carboxílico del dibromo benzoato, con una amina de 4-aminofenil- α -D-manopiranosida, la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente, en N - metil - 2 - pirrolidinona como disolvente. El difenil (2, 3 - dihidro - 2 - tioxo - 3 - benzoxazolil) fosfonato fue utilizado en esta reacción en calidad de agente activante del grupo ácido carboxílico.

En el espectro RMN del producto se muestra la señal del grupo amida (NH) en 10,2 ppm, también se pueden observar tres señales propias del dibromo-benzoato: un singulete a 7,67 ppm (c) y dos dobletes en 7,44 (e) y 7,16 ppm (d); el anillo bencénico adyacente a la manosa presenta un doble de dobletes a 6,78 (b) y 6,48 ppm (a). En 5,06 se observa un doblete del protón del carbono anomérico de la manosa y finalmente entre 3,17 y 3,78 ppm se tienen las señales de los otros protones de la manosa (figura 7.13), la molécula tiende a ser muy higroscópica.

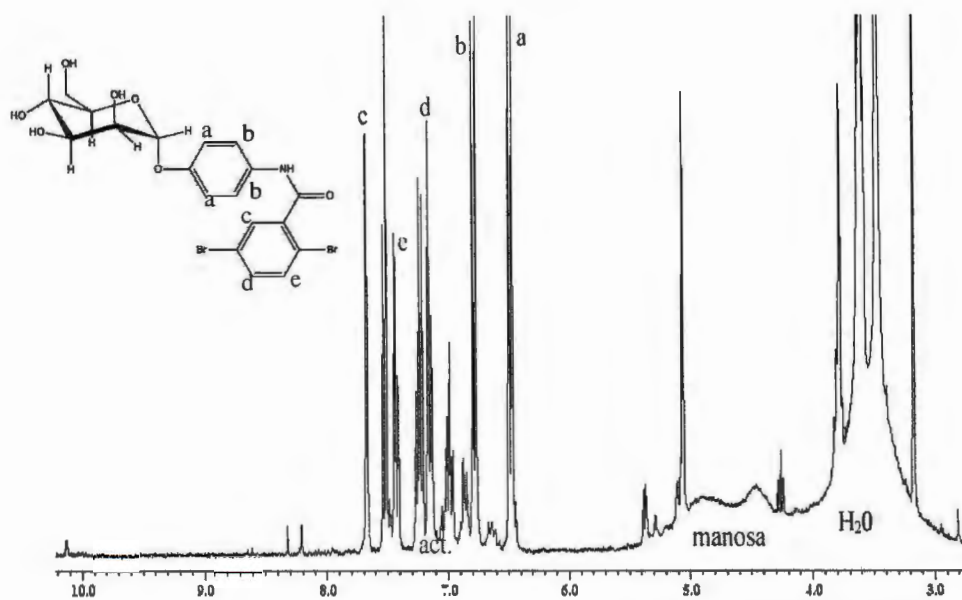


Figura 7.13. Espectro de RMN ^1H correspondiente al monómero manosa 2,5-dibromo benzoato.

7.3.2. Polimerización

La formación del polímero con terminaciones manosa consiste en una copolimerización de Sonogashira-Heck entre un equivalente del compuesto 2-(2-metoxietoxi) etil 2,5-dietinilbenzoato, con un equivalente del compuesto aromático dihalogenado, funcionalizado con manosa, Figura 7.14. La reacción se llevó a cabo en una mezcla de TEA/THF.

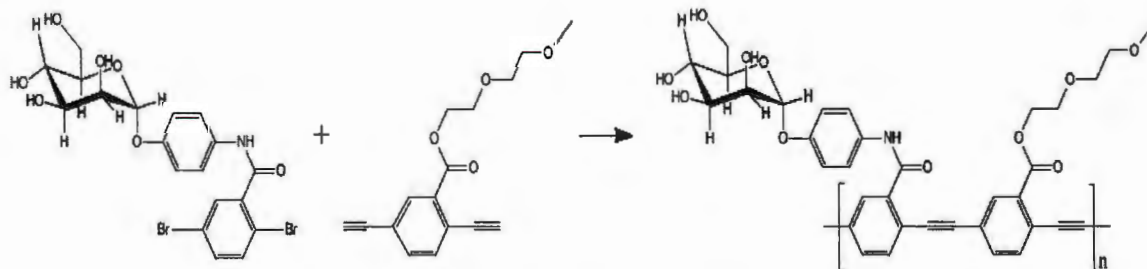


Figura 7.14. Ruta de síntesis del polímero portador de grupos manosa.

El polímero obtenido es parcialmente soluble en THF, lo que dificultó la obtención de su espectro mediante la técnica de RMN (figura 7.15). Para complementar su caracterización se

obtuvo un espectro de absorción de infrarrojo (IR), lo que permite analizar los movimientos vibracionales de los diferentes grupos (figura 7.16).

En la figura 7.15 se muestra el espectro de RMN que presenta las siguientes señales: un singlete, a 3,64 ppm, perteneciente al grupo metil del glicol; entre 3,3 y 4,3 ppm se encuentran distribuidos y solapándose mutuamente las señales correspondientes a la manosa y al glicol; en 6,96 y 7,1 ppm se tienen las señales correspondientes al doble de dobletes del grupo fenilo anexo a la molécula de manosa; en 7,25 ppm un singlete representa la señal del protón del carbono del anillo aromático de la cadena principal del polímero y que tiene como radical la terminación de manosa; entre 7,4 y 7,8 ppm se tiene las señales correspondientes a los dobletes de los anillos aromáticos de la cadena principal del polímero.

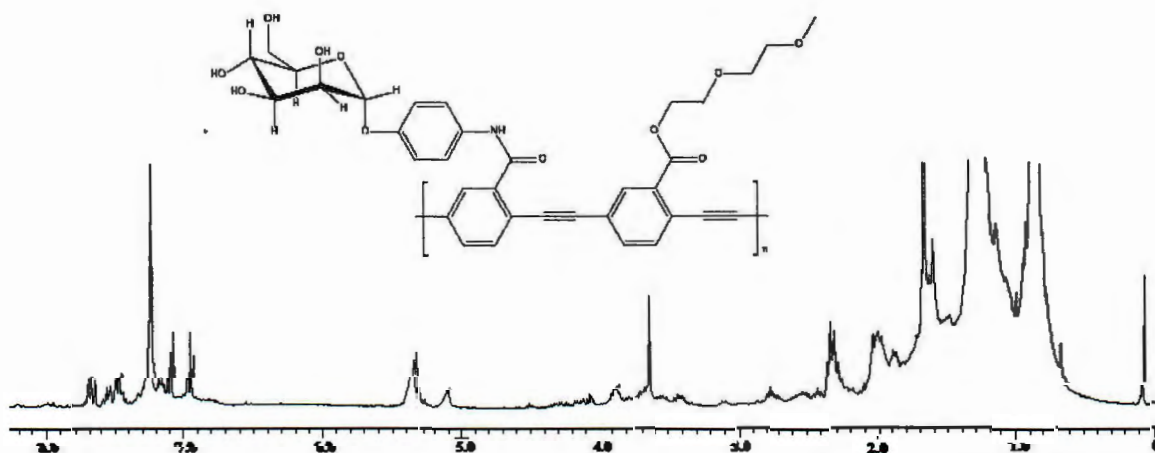


Figura 7.15. Espectro de RMN ^1H correspondiente al copolímero portador de grupos manosa.

En la figura 7.16 se muestra el espectro de IR del polímero comparado con el de la materia prima el 2-(2-metoxietoxi)etil 2,5-dietinilbenzoato. Se puede observar que muchas de las señales de ambos espectros son similares debido a que los dos compuestos tienen grupos funcionales en común. Tal es el caso de la señal en 2920, correspondiente a la tensión de los grupos C-H_2 de los alcanos también concuerdan las bandas de flexión para alcanos en 1450, flexión de los anillos aromáticos en 1600, 1300 para el grupo C-H_3 y 1190 para los éteres. El polímero, con relación al monómero, se diferencia básicamente en 3390, donde se puede observar una señal ancha propia de los grupos hidroxilo presentes en la manosa. Esta señal

indica que la reacción de amidación se llevó a cabo exitosamente; el ancho de la banda se debe a los puentes de hidrógeno que se forman, aquí se puede encontrar solapada la señal correspondiente a la tensión nitrógeno – hidrógeno del grupo amida.

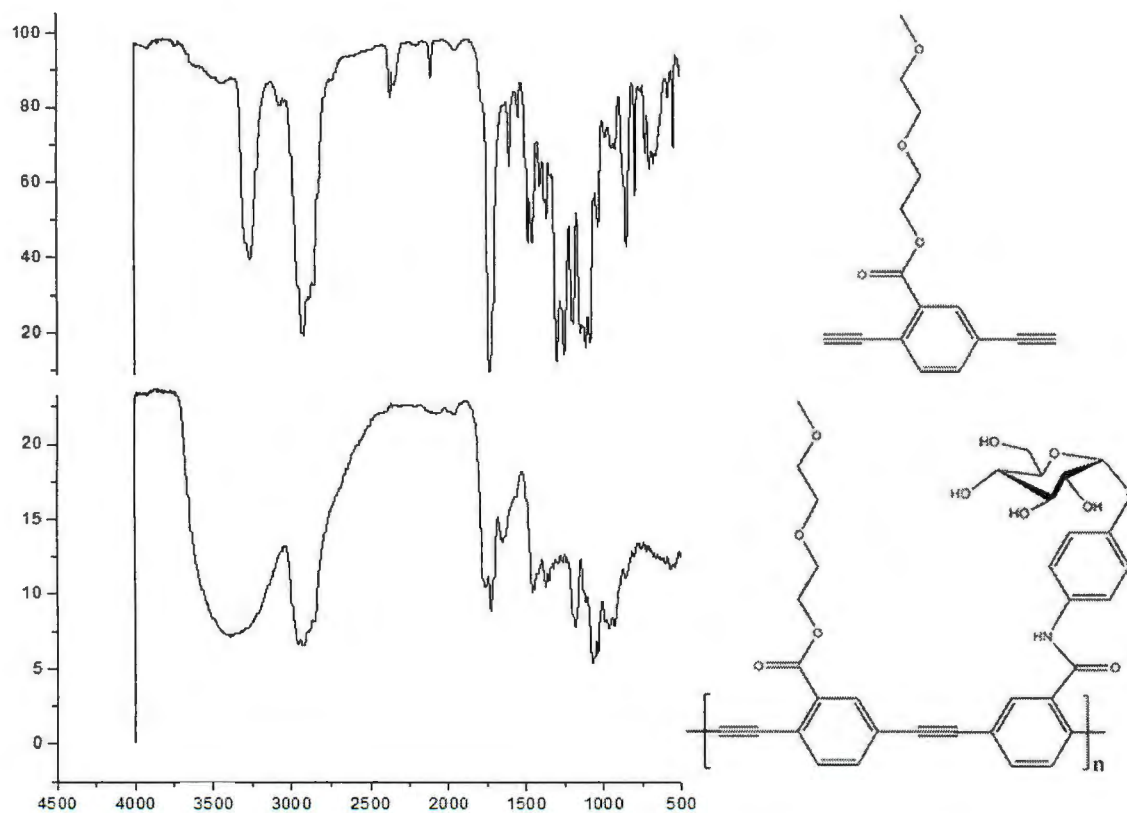


Figura 7.16. Espectros de IR del polímero comparado con el de su materia prima.

7.4. Obtención de cultivos de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*

La dispersión adecuada de las células en suspensión fue un factor determinante para el desarrollo experimental y análisis de las muestras, ya que, una concentración demasiado elevada, por un lado dificultaría la observación de la presencia de posibles aglomerados y por otro lado, los aglomerados presentes, podrían deberse a la formación de agregados celulares, debido a las diversas etapas de centrifugado. Caso contrario ocurre cuando la concentración de células es demasiado baja; en este caso se limita la formación de aglomerados por la disminución en las interacciones entre las células y los diversos receptores, además su observación se dificulta por el bajo número y su tamaño reducido.

Tanto para las células bacterianas de *E. coli*, como para las levaduras *S. cerevisiae*, el valor aproximado de la dispersión óptima para una buena observación al microscopio fue de 10^8 UFC/ml, lo que equivale a una absorbancia de 2 a 625 nm. En la figura 7.17 se presentan tres casos de dispersión de levaduras: la primera con una baja concentración celular, la segunda presenta una dispersión celular óptima y la última una concentración celular demasiado elevada. Todas las micrografías donde aparecen levaduras fueron tomadas a 200 aumentos.

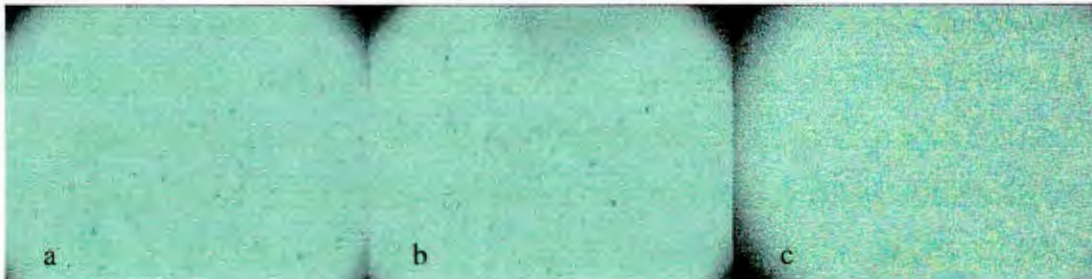


Figura 7.17. Comportamiento de la prueba de aglutinación respecto a la concentración de bacterias a 200 aumentos. a) dispersión con una concentración menor de 10^8 UFC/ml, b) dispersión con 10^8 UFC/ml, c) dispersión con una concentración mayor a 10^8 UFC/ml.

Es supremamente imprescindible verificar que la membrana de las células de levadura de *S. cerevisiae* contenga moléculas de manosa que puedan servir como sustratos en el reconocimiento molecular. Para esto se utilizó una lectina capaz de reconocer estos carbohidratos. La lectina utilizada fue la concanavalina A, cuya suspensión fue mezclada con las levaduras.

La concanavalina A (Con A) es una proteína globular de origen vegetal, se obtiene a partir del frijol *Canavalia ensiformis*, cuyo contenido varía entre 1 y 3 % en peso. Debido a sus propiedades bioquímicas, la Con A fue clasificada por Sumner y Howell en 1936 como una lectina. La preparación de reactivos especiales con esta proteína permite separar e identificar glicoproteínas y polisacáridos en el estudio de las estructuras celulares⁷⁶.

La suspensión de moléculas de CoA con levaduras mostró la formación de aglomerados, conformados por *S. cerevisiae*, unidas por las moléculas de la proteína, y que fue llamado control positivo. Una mezcla similar fue preparada, con la diferencia de que adicionalmente

contenía manosa disuelta, y fue llamada control negativo. En la figura 7.18 se muestran los controles positivo y negativo, obtenidos mediante el tratamiento de células de levadura y la proteína concanavalina A (CoA).

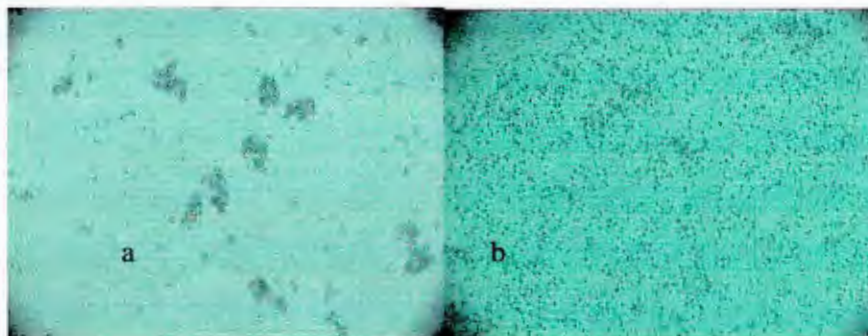


Figura 7.18. Comportamiento de la aglutinación de células de levadura tratadas con concanavalina A, a 200 aumentos. a) control positivo (CoA + PBS + levadura), b) control negativo (CoA + PBS + manosa + levadura).

El control positivo (figura 7.18 a) muestra claramente aglomerados de células, producto de la capacidad de adhesión que presenta la concanavalina A con la membrana de las células de levadura de *S. cerevisiae*. A primera vista, pareciera que hubiera mayor cantidad de células en la imagen de la derecha, donde no se presenta aglutinación; sin embargo, esto se debe a que las células se encuentran dispersas en la solución libre de aglomerados, mientras que en la solución de la izquierda las células se están aglutinando entre sí, dejando más espacio libre entre aglomerados.

La falta de aglomerados en el control negativo (figura 7.18 b) se debe a la presencia de las moléculas de manosa en estado libre que se agregaron a la solución. Estas moléculas ocupan los receptores de la CoA que permitían la adhesión con las levaduras. De esta manera se demuestra la presencia de manosa en la pared citoplasmática de las células de levadura *S. cerevisiae*. Este resultado valida la utilización de las células de levadura para que sean reconocidas por receptores que identifican la manosa, como es el caso de las fimbrias tipo I. Otra forma de identificar la presencia de manosa, puede ser con la realización de un control negativo que, en lugar de usar células normales de levaduras *S. cerevisiae*, se utilizaran sus esferoplastos (células desprovistas de su membrana celular). Esta metodología necesita la

eliminación previa de la membrana celular lo que hace más complicada a esta técnica, además de que los esferoplastos son muy susceptibles de sufrir lisis celular.

7.5. Reconocimiento de las fimbrias tipo I por aglutinación

Una mezcla de células bacterianas de *E. coli* y de levaduras *S. cerevisiae* debe formar, según lo expuesto anteriormente, aglomeraciones formadas por la interacción de sus centros de reconocimiento (fimbrias tipo I y moléculas de manosa respectivamente). Sin embargo, la formación de aglomerados puede verse influenciada por factores difíciles de cuantificar, como el número de centros de reconocimiento y la diferencia de tamaños entre bacterias y levaduras. Un parámetro que comprende estas variables, y que es fácil de cuantificar, es la concentración de células, y al ser las bacterias de menor tamaño, su cantidad podría ser la variable, mientras que la cantidad de levaduras sería constante.

La figura 7.19 muestra los resultados de las pruebas de aglutinación, con diferentes concentraciones de células de bacterias de *E. coli*. Los resultados obtenidos en estas pruebas, mostraron que la aglutinación se presentó, incluso, en bajas concentraciones de células bacterianas, lo que confirma los datos bibliográficos que sustentan la teoría sobre el poder aglutinante de las células de *E. coli*⁷⁷. Aunque el tamaño de los aglomerados formados depende en mucho del estado inicial de la suspensión de *E. coli* (las células bacterianas son capaces de aglomerarse entre sí), se puede confirmar, por las imágenes de la figura 7.19, que también depende de la concentración de estas bacterias. A mayor concentración se formará un mayor número de aglomerados pero de menor tamaño. Esto se puede explicar partiendo del hecho de que a mayores concentraciones de bacterias, las células de levaduras tendrían más puntos posibles de interacción, dispersos en la suspensión, mientras que a bajas concentraciones de bacterias habría un menor número de puntos de contacto, con lo que las células de levaduras se unirían en mayor cantidad a cada célula bacteriana, aumentando así el tamaño de los aglomerados.

La aglutinación se presenta al interactuar las moléculas de manosa, presentes en la membrana celular de las levaduras, con las adhesinas fimH, presentes en las fimbrias tipo I de las

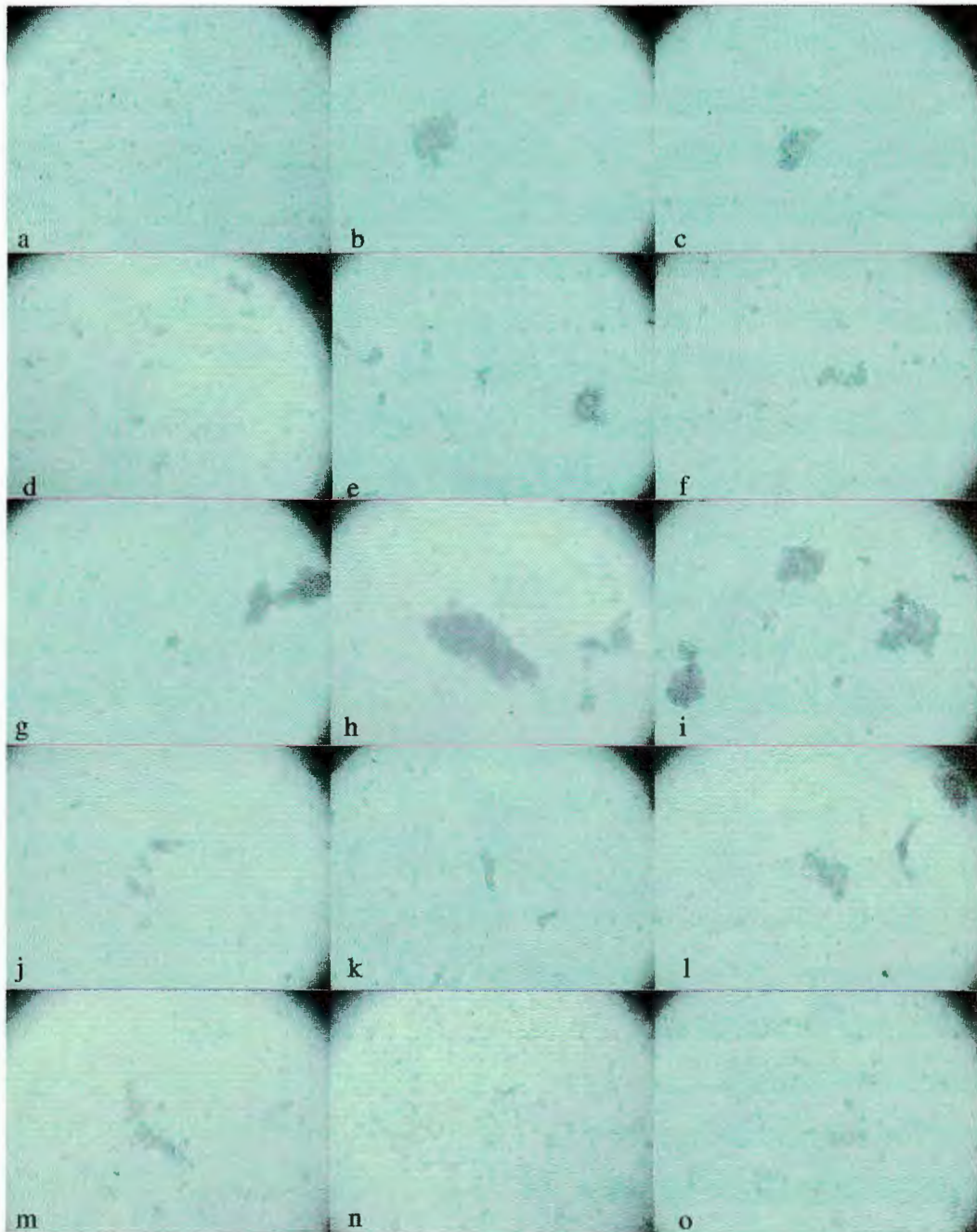


Figura 7.19. Pruebas de aglutinación de levaduras con bacterias a 200 aumentos.

Concentración de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* constante a 10^8 células/mL, concentración de células de *Escherichia coli* variable (células/mL): a. 0; b. $2,5 \times 10^5$; c. 5×10^5 ; d. $7,5 \times 10^5$; e. 10^6 ; f. $1,25 \times 10^6$; g. $1,5 \times 10^6$; h. $1,75 \times 10^6$; i. 2×10^6 ; j. $2,25 \times 10^6$; k. $2,5 \times 10^6$; l. 3×10^6 ; m. $3,75 \times 10^6$; n. $4,25 \times 10^6$ o. 5×10^6 .

bacterias. En los casos de bajas concentraciones, puede esperarse que las células bacterianas no se encuentren aglutinadas entre sí, por lo que el tamaño de los aglomerados de levaduras debería ser menor, pero incluso en estos casos el tamaño supera a los aglomerados que se presentan en concentraciones de células bacterianas elevadas. La aparición de aglomerados en todas las muestras con bacterias no es prueba suficiente de la presencia de fimbrias tipo I. Para confirmar esta presencia fue necesario el desarrollo de pruebas de inhibición con moléculas de manosa. Los resultados de estas pruebas demostraron que la solución de manosa es capaz de inhibir el proceso de aglutinación de las células de levaduras al interactuar con las fimbrias tipo I, ocupándola e impidiendo, de esta manera, que la manosa presente en las levaduras pueda adherirse a las bacterias (figura 7.20).

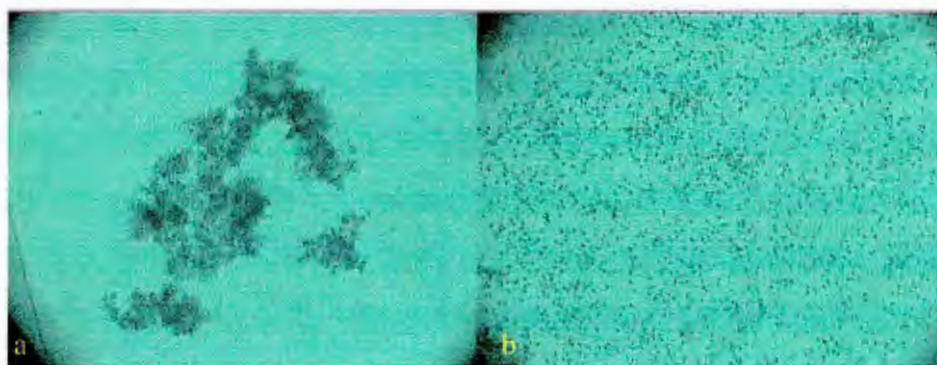


Figura 7.20. Inhibición de la interacción entre células de *E. coli* y células de *S. cerevisiae* en presencia de manosa a 200 aumentos. a) suspensión celular de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*. b) suspensión celular de *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de manosa.

En la figura 7.20 a se observan aglomerados de tamaño apreciable, producto de la interacción de las moléculas de manosa, presentes en la membrana citoplasmática de las levaduras con las fimbrias tipo I de las bacterias. La figura 7.20 b, a su vez, corresponde a una solución que contiene la misma concentración de células bacterianas y levaduras, pero a diferencia de la anterior, contiene además moléculas de manosa en estado libre. Se puede apreciar que no se formó ningún tipo de aglomeración, lo que es debido a que la manosa inhibió la interacción entre las células, indicando la presencia inequívoca de fimbrias tipo I de las células de *E. coli*, con las cuales se une.

7.6. Caracterización de la morfología celular de *E. coli* por microscopía

La caracterización de la morfología celular de *E. coli*, se llevó a cabo utilizando tres técnicas diferentes: microscopía electrónica de barrido (MEB), microscopía electrónica de transmisión (MET) y microscopía de fuerza atómica (AFM). Estas técnicas complementaron los resultados anteriormente expuestos; además permitieron evaluar su efectividad y su potencialidad en trabajos de naturaleza similar al presente proyecto.

7.6.1. Caracterización de células de *E. coli* por microscopía electrónica de barrido (MEB)



Figura 7.21. Aglomerado de células de *E. coli* observado por microscopía electrónica de barrido (MEB) a 10000x.

A pesar de que se logró observar, con relativa claridad, el perfil de las bacterias de *E. coli*, esta técnica presentó algunas limitantes. Una de ellas fue la presencia de aglomerados (figura 7.21), lo que dificultó la observación de células aisladas. Los aglomerados de células fueron producto de la formación necesaria de pellets de las células, luego de los tratamientos continuos de centrifugación a los que se expuso el material; este paquete celular, no podían ser dispersado por agitación ya que se corría el riesgo de desprender las fimbrias de la membrana celular, por esta razón el paquete celular se dejó en la suspensión hasta que las células se dispersaran lentamente.

La obtención de imágenes de células aisladas (figura 7.22 a) se logró disminuyendo la concentración de la suspensión celular. A pesar de esto no se lograron acercamientos muy elevados, ya que al intentarlo la muestra comenzaba a deteriorarse, como se muestra en la parte superior derecha de la bacteria de la figura 7.22 b.

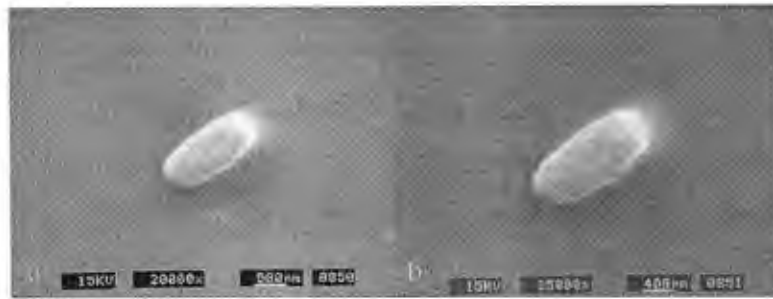


Figura 7.22. Micrografías de células aisladas de *E. coli* observadas mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). a) célula de *E. coli* vista a 20,000x, b) célula de *E. coli* vista a 25000x.

El deterioro originado al tratar de amplificar las imágenes, impidió observar con claridad la superficie celular y detectar las fimbrias presentes en la membrana. Por tal razón se intentó observar la interacción entre las células de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*, con el fin de observar los puntos de contacto existentes entre ambos tipos de células. En las imágenes que se muestran en la figura 7.23 solamente fue posible apreciar con este intento la presencia de aglomerados amorfos, donde no se distinguen ni bacterias ni levaduras.

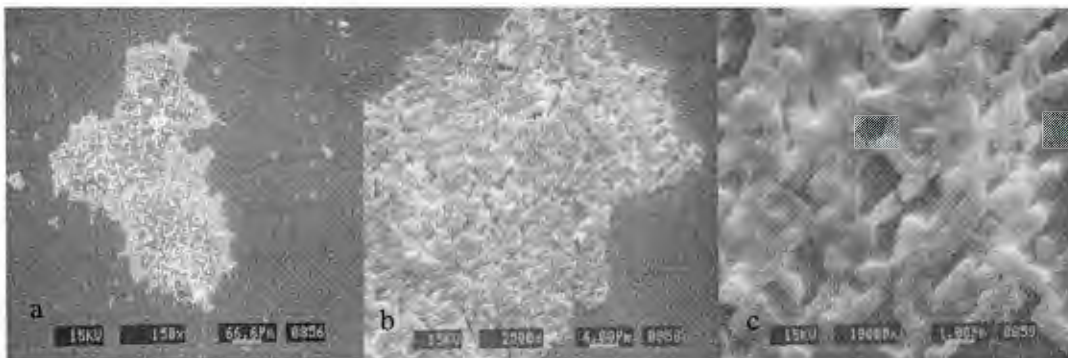


Figura 7.23. Interacción entre las células de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* observado en MEB a) 150x, b) 2500x, c) 10000x.

7.6.2. Caracterización de células de *E. coli* por microscopía de fuerza atómica (AFM)

Un microscopio AFM se basa en la detección de fuerzas de interacción a nivel atómico entre la superficie de la muestra y una pequeña sonda montada en el extremo de una barra llamada

cantiléver. Las fuerzas que intervienen en el proceso son de distinto origen, pero todas ellas dependen de la distancia entre la sonda y la muestra y pueden ser repulsivas o atractivas⁷⁸.

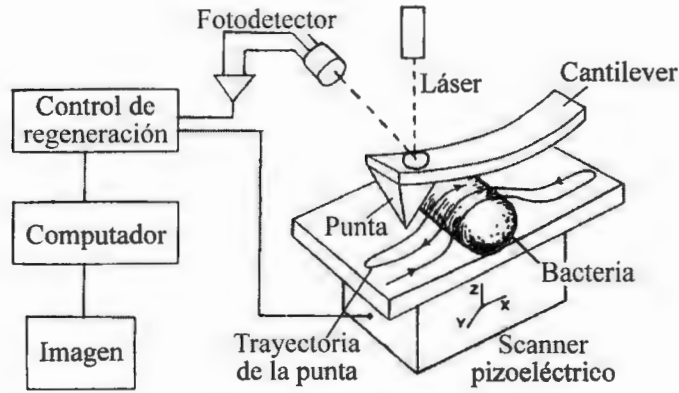


Figura 7.24. Modo de muestreo del AFM.

El modo utilizado para tomar las muestras se denomina tapping-AFM, es similar al modo no contacto, con la sola diferencia de que en tapping - AFM la amplitud es un poco mayor de forma que la sonda toca la superficie de la muestra en cada oscilación. La oscilación del cantiléver se logra mediante el estímulo de un piezoeléctrico montado en el soporte de la sonda y la detección de la oscilación se logra reflejando un láser sobre el lomo del cantiléver el cual ilumina un fotodetector que detecta el corrimiento del haz del láser debido a la oscilación del cantiléver (figura 7.24).



Figura 7.25. Imagen de una célula de *E. coli* en AFM.

Estudios previos han mostrado la posibilidad de detectar estructuras externas a la membrana celular; tal es el caso del trabajo realizado por Braga y Ricci⁷⁹, en el que se obtuvieron imágenes de la superficie celular (figura 7.25).

En nuestro caso, la aplicación del AFM para el estudio de células de *E. coli* presentó un inconveniente, inherente al mismo principio de esta técnica: la punta del equipo, al irse desplazando, arrastraba consigo la célula, con lo que la imagen de la misma se veía desplazado tras cada barrido, como se puede observar en la figura 7.26.

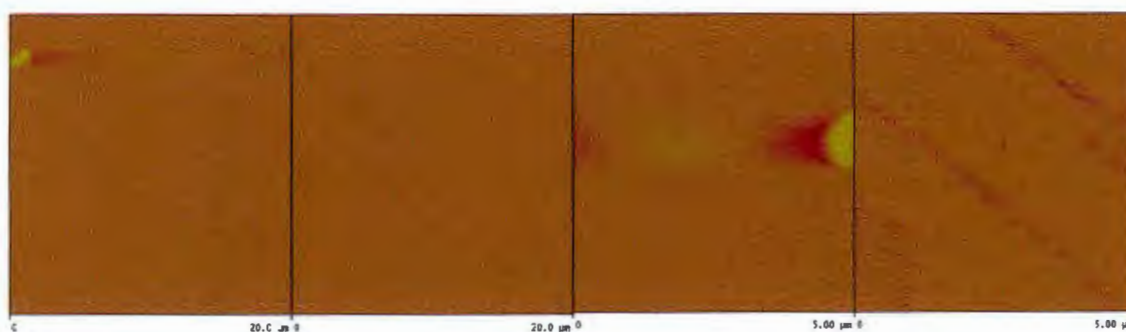


Figura 7.26. Caracterización de células de *E. coli* por AFM.

Para superar esta limitante, se procedió a disminuir la velocidad de escaneo y de esta manera tratar de minimizar el movimiento de las células, lo que permitió obtener imágenes con mejor resolución, como se muestra en la figura 7.27.

De esta manera se pudo establecer las ventajas de esta técnica respecto a la caracterización efectuada mediante microscopía electrónica de barrido. En primer lugar, considerando que la preparación de las muestras no es tan compleja, ya que se pueden obtener observaciones directas en frotis realizados sobre simples portaobjetos. Por otro lado la muestra no se deteriora con las observaciones, por muy altas que sean las ampliaciones.

Las imágenes obtenidas (figura 7.27) permitieron observar la diferencia de alturas (izquierda), como también la diferencia de fases (derecha). Además se puede observar que es posible alcanzar un alto grado de resolución en la superficie de la membrana celular, lo que no se había logrado con ninguna de las técnicas descritas anteriormente. A pesar de lo anterior no se

logró apreciar en la superficie, ni alrededor de ella, ningún tipo de organelos tales como flagelos o fimbrias. Esto se puede deber a la mecánica de la técnica en sí, que consiste en un barrido con una punta, la cual puede desplazar los mencionados organelos sin describir su morfología.

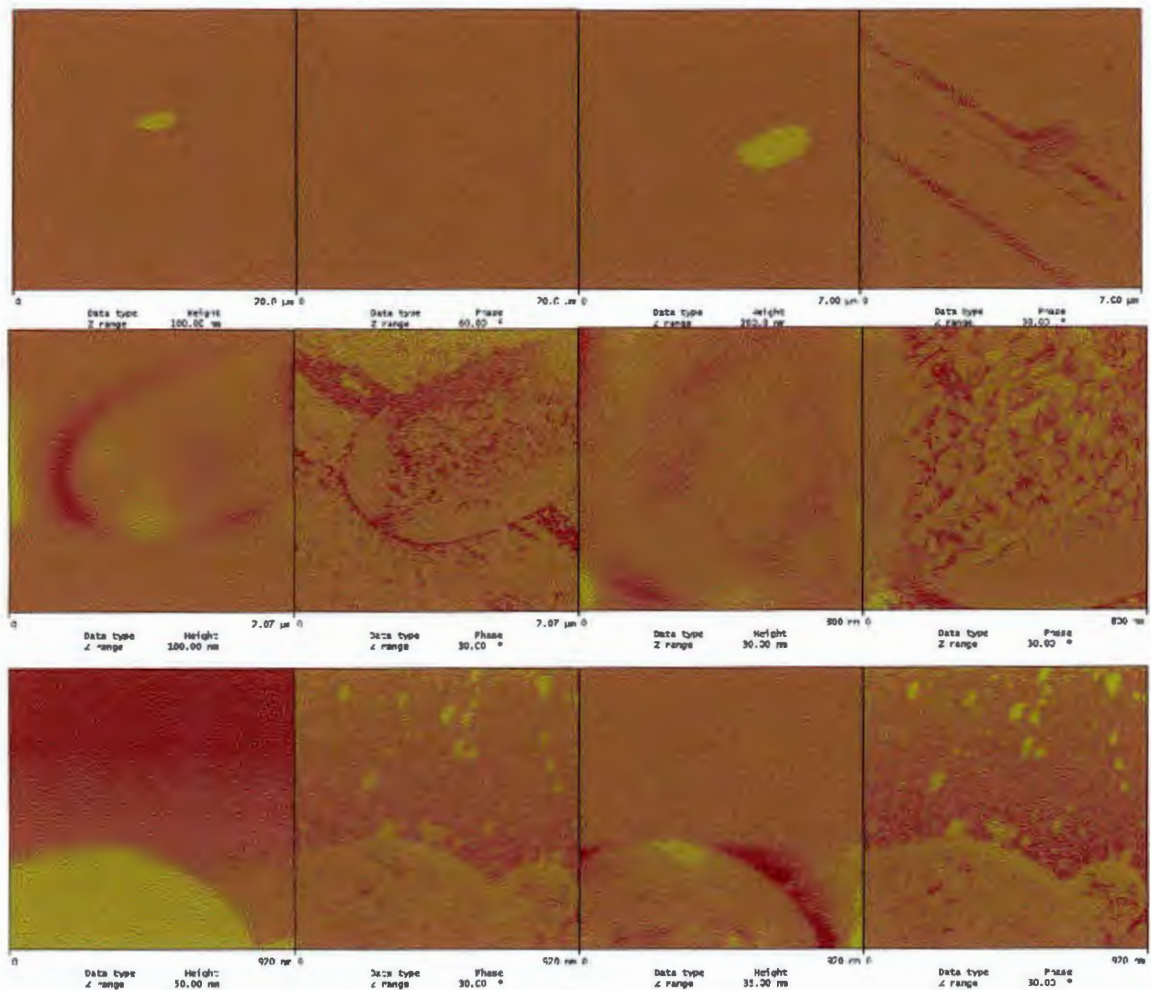


Figura 7.27. Caracterización de células de *E. coli* por AFM a velocidad baja de escaneo.

Para que la célula no sea arrastrada por la punta después de cada barrido, se intentó, entre otras técnicas, la aplicación de agar en la superficie del portaobjeto, con el fin de inmovilizar también las estructuras que sobresalieran de la membrana celular, sin embargo este tratamiento no ayudó en gran medida, ya que si bien la célula resultaba inmóvil posiblemente el agar recubrió parcialmente esas mismas estructuras, dificultando su observación.

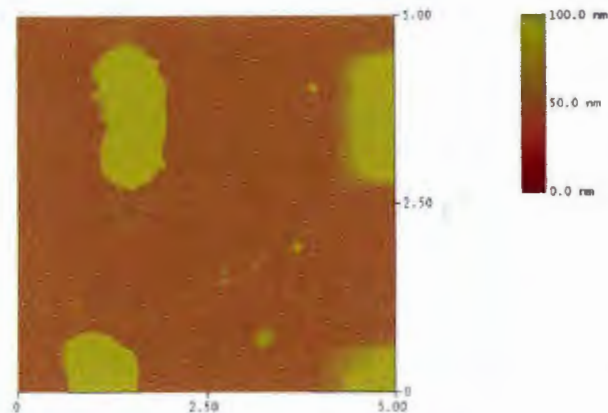


Figura 7.28. Caracterización de *E. coli* por AFM mediante el montaje de células sobre portaobjetos de vidrio.

Otro intento consistió en modificar algunos parámetros del equipo, disminuyendo la altura de observación, de tal manera que si bien la superficie celular no queda muy definida, las estructuras de mucho menor tamaño o diámetro que se encuentran alrededor de la célula pudieran ser reconocidas y observadas. Así se lograron imágenes, como la observada en la figura 7.28, cuya ampliación no fue posible. Aquí, alrededor de la célula, se observan claramente unos filamentos que posiblemente pudieran ser fimbrias o flagelos, aunque no haya la certeza absoluta de lo enunciado, ya que no se puede diferenciar las estructuras mencionadas.

7.6.3. Caracterización de células de *E. coli* por microscopía electrónica de transmisión (MET)

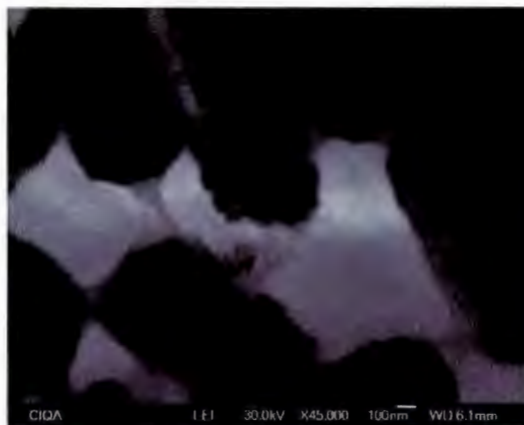


Figura 7.29. *E. coli* mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) a 45000x.

De las técnicas utilizadas en el estudio, la que permitió dilucidar con mayor claridad las estructuras que se encuentran en la membrana citoplasmática, fue la aplicación de tinciones negativas^{72c}. Para la observación de los resultados que arrojó esta técnica, fue preciso el uso de la microscopía electrónica de transmisión (MET). Esta técnica exigió una preparación muy sencilla de las muestras, permitiendo la obtención de imágenes muy claras de las fimbrias tipo I. Sin embargo, se presentaron aglomerados (figura 7.29), de manera similar a las muestras observadas en MEB, lo que también se trató de evitar, disminuyendo la concentración de la solución bacteriana.

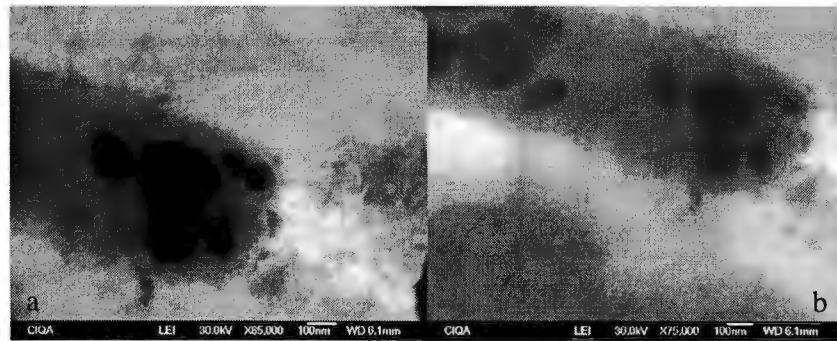


Figura 7.30. Células de *E. coli* con fimbrias y flagelos obtenidas mediante MET. a) 85000x b) 75000x.

También se descartó la posibilidad de realizar acercamientos muy elevados por el deterioro que sufría la muestra, aunque en este caso el acercamiento era más que suficiente, ya que los flagelos y fimbrias se pueden observar claramente en la figura 7.30.

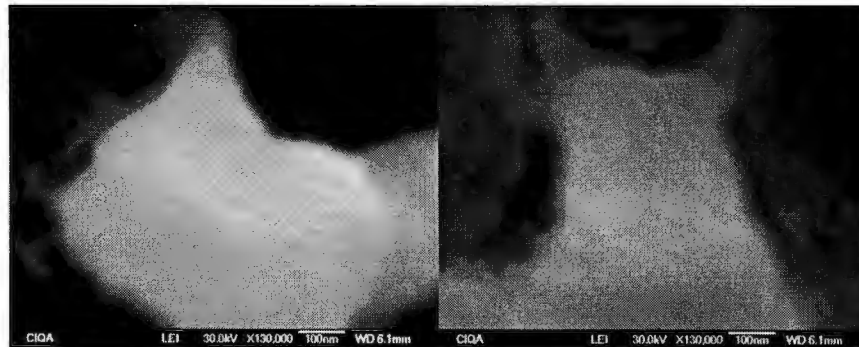


Figura 7.31. Micrografías de células de *E. coli* con flagelos y fimbrias obtenidas a 130000x mediante MET.

Aunque el perfil de la membrana citoplasmática no se observa tan claramente como en las imágenes obtenidas en AFM, no cabe duda que la tinción negativa es la mejor de las técnicas utilizadas, para la observación de flagelos y fimbrias (figura 7.30). Mediante su aplicación se lograron ampliaciones de las imágenes hasta la observación clara de flagelos y fimbrias (figura 7.31), sin llegar al deterioro absoluto de la muestra.

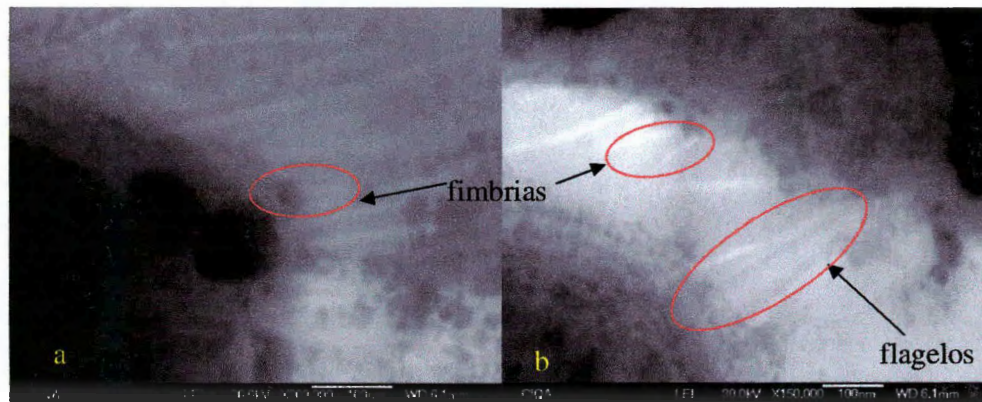


Figura 7.32. Caracterización por MET de células de *E. coli* con flagelos y fimbrias. Las fimbrias son las estructuras de menor tamaño a) a 200000x, b) a 150000x.

En la figura 7.32 se presenta una pequeña parte de la célula, de la cual se desprenden fimbrias y flagelos. De la imagen puede observar que las fimbrias son de menor tamaño que los flagelos, siendo el tamaño la diferencia básica entre las dos estructuras.

Luego de evaluar las diferentes técnicas de microscopía utilizadas, se pudo comprobar que la factibilidad de observar las fimbrias tipo I de *E. coli* uropatógena, depende en mucho de la propia naturaleza de las bacterias.

De acuerdo a los estudios de hemoaglutinación, se seleccionaron dos cepas de la bacteria *E. coli*, una de las cuales mostró la capacidad de aglutinar eritrocitos de una manera más notoria al mostrar aglomerados de mayor tamaño y en mayor número. Por otra parte una diferente cepa seleccionada presentó propiedades hemoaglutinantes de menor calidad, ya que formaba aglomerados más pequeños y en menor número. Las imágenes que se muestran en la figura 7.32, pertenecen a la primera cepa seleccionada. De la segunda cepa fue imposible obtener

imágenes de las fimbrias, lo que puede deberse al diferente número de fimbrias que rodean a la membrana celular, dependiendo de la cepa. Así, en el segundo caso se puede asegurar que la cepa tendría un número mínimo de fimbrias, suficiente para interactuar con las moléculas de manosa, formando pocos aglomerados de pequeño tamaño, pero imperceptibles a las técnicas de microscopía al ser superadas en número y tamaño por otras estructuras celulares presentes en la membrana citoplasmática, tales como los flagelos.

7.7. Evaluación de oligómeros y del polímero funcionalizados con manosa para el reconocimiento molecular de las fimbrias tipo I de *Escherichia coli*

La evaluación de los cuatro oligómeros y del polímero funcionalizados con manosa para reconocimiento molecular de las fimbrias tipo I de *Escherichia coli*, se realizó aplicando las pruebas de aglutinación descritas en el apartado 6.6. La interacción de los oligómeros y el polímero con las fimbrias presentes en las células de *E. coli* se analizó utilizando microscopía óptica y microscopía de láser confocal de barrido (LSCM). Esta metodología se aplicó también a suspensiones de *E. coli* con moléculas de CoA como control positivo. Los resultados se desglosan a continuación para cada tipo de suspensión.

7.7.1. Evaluación de la interacción de concanavalina A con células de *E. coli*

La evaluación de la aglutinación celular debida a la interacción de la lectina (CoA) con las fimbrias presentes en la membrana de las células de *E. coli* se desarrolló a manera de control positivo, previo a la evaluación de la interacción de los oligómeros y polímero funcionalizados con manosa. De la misma forma, para el establecimiento de un control negativo se desarrolló la prueba de aglutinación celular, adicionando manosa para bloquear la aglutinación. La figura 7.33 muestra el comportamiento de la aglutinación celular del control positivo y del control negativo, observado mediante microscopía óptica a 200 aumentos.

En la figura 7.33 a se evidencia la formación de aglomerados de las células de *E. coli* debido a la interacción de la CoA con las fimbrias presentes en la membrana celular, mientras que la adición de manosa inhibe y bloquea dicha interacción, impidiendo la formación de

aglomerados, tal como se observa en la figura 7.33 b. En las dos imágenes, y con mayor énfasis en la figura 7.33 b, se aprecian células de *E. coli*, formando una especie de cadenas lineales que, erróneamente, pudieran ser tomadas como aglomerados. La estructura simétrica no continua pudiera deberse a imperfecciones en la superficie del portaobjeto, tales como grietas sobre las cuales se depositarían las células. Esto se evidencia en la figura 7.33 a, donde como fondo de los aglomerados se observan líneas paralelas demasiado rectas y alineadas para ser producto de una interacción casual, como es la del reconocimiento molecular entre fimbrias tipo I y moléculas de manosa, distribuidas aleatoriamente en las superficies celulares de las membranas citoplasmáticas de las bacterias y las levaduras respectivamente, lo que descarta una interacción físico - química.

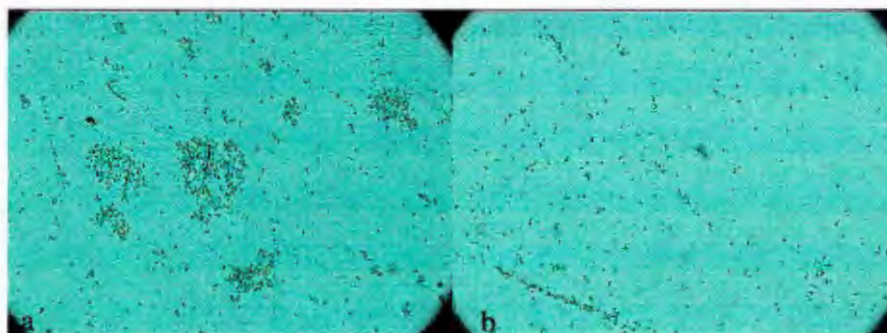


Figura 7.33. Suspensiones de bacterias de *Escherichia coli* en microscopía óptica a 800 aumentos. a) 40 μ l de bacterias *E. coli*, 10 μ l de CoA y 950 μ l de PBS. b) 40 μ l de bacterias *E. coli*, 10 μ l de CoA, 20 μ l de solución de manosa (1 mg/ml) y 930 μ l de PBS.

Estos aglomerados, al estar conformados por CoA y bacterias, no deberían presentar propiedades fluorescentes. Para comprobarlo se utilizó la técnica de microscopía de láser confocal (LSCM), con la cual se obtienen imágenes de fluorescencia y de reflexión, lo que permite determinar si una muestra presenta o no propiedades fluorescentes. Las imágenes del control positivo en esta técnica (figura 7.34) permitieron identificar las regiones donde se encontraban los aglomerados. La evaluación se realizó comparando la imagen de reflexión con la imagen de fluorescencia.

Se observa en la imagen de reflexión (figura 7.34 b) un aglomerado de bacterias, similar al observado en microscopía óptica (figura 7.33), y que es producto de la interacción de la CoA

con las fimbrias tipo I. Sin embargo en la figura 7.34 a, no se muestra una imagen clara de fluorescencia que permita definir al aglomerado, lo que indica que no tiene propiedades fluorescentes, ya que ni las bacterias ni la CoA, individualmente, las poseen. La figura 7.34 c muestra el resultado de la combinación de las imágenes mostradas en las figuras 7.34 a y 7.34 b. La imagen resultante, como se puede observar, es muy similar a la de reflexión, por lo que se puede asegurar que el aporte de la imagen de fluorescencia es prácticamente nulo.

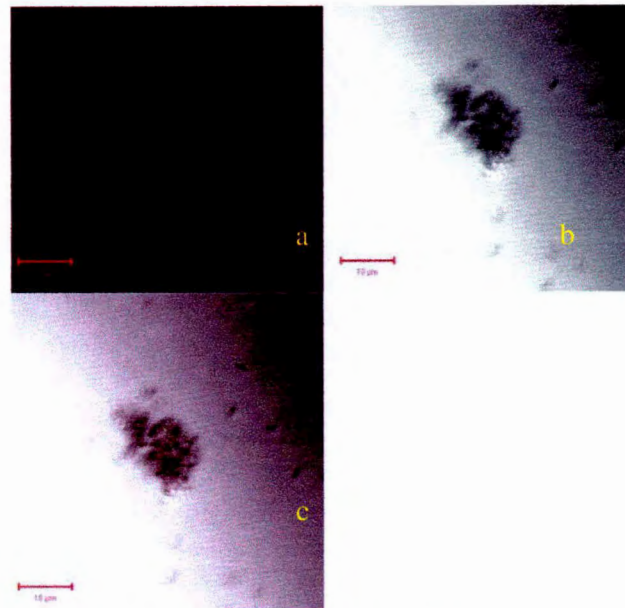


Figura 7.34. Suspensión de bacterias obtenida por LSCM: *Escherichia coli*. (40 μ l), Concanavalina A (10 μ l) y PBS (950 μ l). a) modo de fluorescencia, b) modo de reflexión, c) combinación de las imágenes de fluorescencia y de reflexión.

El resultado de esta técnica fue el que se esperaba, partiendo de los antecedentes teóricos y de los resultados previos. Por un lado, la interacción entre moléculas de CoA y células de *E. coli*, visto ya en microscopía óptica, se presenta nuevamente en la imagen de reflexión. Por otro lado, al no presentar propiedades fluorescentes ni las bacterias ni las moléculas de CoA se esperaba que los aglomerados formados tampoco presentarían esta propiedad, lo que se evidencia en la imagen de fluorescencia, en la cual no se observa el aglomerado visto en la imagen de reflexión. Por último la imagen resultante de las dos anteriores es idéntica a la imagen de reflexión lo que indica que el aporte dado por la imagen de fluorescencia es nulo.

Con base en estos resultados se procedió a evaluar los oligómeros y el polímero de fenilenoetileno funcionalizados con manosa para determinar su capacidad para reconocer las fimbrias tipo I de las células de *E. coli*.

7.7.2. Evaluación de la interacción de células de *E. coli* con oligómeros fenilenoetileno funcionalizados con grupos terminales carboxilo (Trímero 1)

La evaluación de la interacción de células de *E. coli* con oligómeros fenilenoetileno con grupos terminales carboxilo, se desarrolló aplicando la metodología descrita para el control positivo y control negativo descrito en el apartado 7.7.1. Previo al estudio de la interacción célula - oligómero, se preparó una solución del trímero 1 en PBS y en ausencia de bacterias, esto con la finalidad de observar su comportamiento en una solución acuosa. La figura 7.35 muestra el análisis mediante microscopía óptica de una solución preparada con el trímero 1 en ausencia de bacterias. En esta figura se observa la formación de una proporción de aglomerados formados espontáneamente y que no fue posible desintegrar o dispersar incluso después de someter la solución con el oligómero a un tratamiento de ultrasonido.

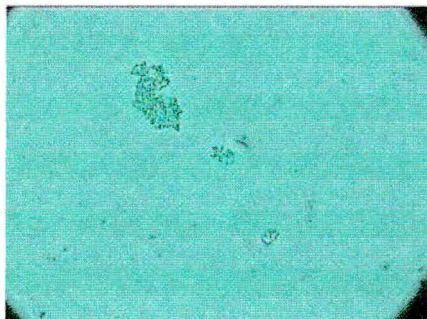


Figura 7.35. Aglomerados formados espontáneamente por el trímero 1 sin presencia de bacterias de *E. coli* a 800 aumentos.

Con el fin de establecer si los aglomerados observados estaban constituidos por las moléculas del trímero 1, y no por algún tipo de contaminante, la solución fue expuesta a la radiación de la luz ultravioleta visible con el fin de determinar la presencia de partículas fluorescentes. La figura 7.36 muestra el análisis de la solución del oligómero en presencia de luz ultravioleta, donde es posible observar la presencia de partículas suspendidas fluorescentes.



Figura 7.36. Solución del trímero 1 bajo la lámpara UV.

La formación de aglomerados del trímero 1 en PBS se explica considerando que el trímero puede formar micelas debido a la dimerización de los grupos carboxilo, lo que disminuye la polaridad del compuesto y lo hace poco miscible en agua. Debido a que el trímero 1 no posee moléculas de manosa, se podría esperar que no formara aglomerados con las células de *E. coli*, al no tener sitios de reconocimiento, sin embargo al evaluar el oligómero en presencia de células de *E. coli* se observó bajo el microscopio óptico la presencia de una serie de aglomerados y células dispersas tal como se registra en la figura 7.37.

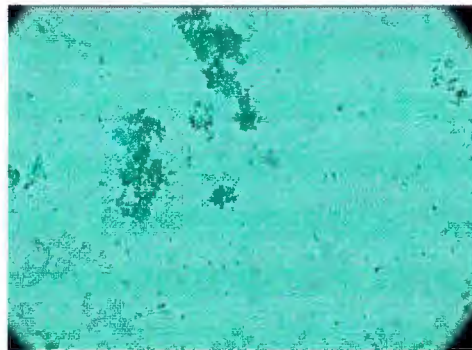


Figura 7.37. Mezclas del trímero 1 con *Escherichia coli* y PBS a 800 aumentos.

Para determinar si estos agregados son producto de la interacción entre las células y el trímero 1, se realizaron análisis de las muestras mediante microscopía confocal. Como se puede observar se en la figura 7.38, las micrográficas correspondientes a la fluorescencia muestran imágenes claras, como lo hacen también las imágenes correspondientes a la reflexión. La imagen resultante, al mezclar las dos anteriores, resulta muy similar a ambas. Por esto y con el fin de minimizar posibles errores de observación se realizó un aumento en la imagen (figura

7.38 b) equivalente a 3,4 veces el tamaño del original, tomando como centro el aglomerado que aparenta mayor tamaño en la imagen de la figura 7.38 a.

Las dos imágenes de la figuras 7.38, a pesar de su diferencia en magnificaciones, muestran prácticamente un mismo resultado y que es la extrema similitud entre las imágenes de fluorescencia y de reflexión, lo que indica que el aglomerado que se observa en la imagen de reflexión tiene propiedades fluorescentes en la totalidad de su estructura. Esto descarta la posibilidad de que la muestra presente un aglomerado formado por la interacción del oligómero con las bacterias presentes en la solución, ya que como se ha mencionado, las bacterias carecen de propiedades fluorescentes. Lo anterior confirmaría la posibilidad de que los aglomerados están formados estrictamente por el trímero 1 y que no se presenta una interacción de las células de *E. coli* con los oligómeros fenilnetinilenos funcionalizados con grupos terminales carboxilo.

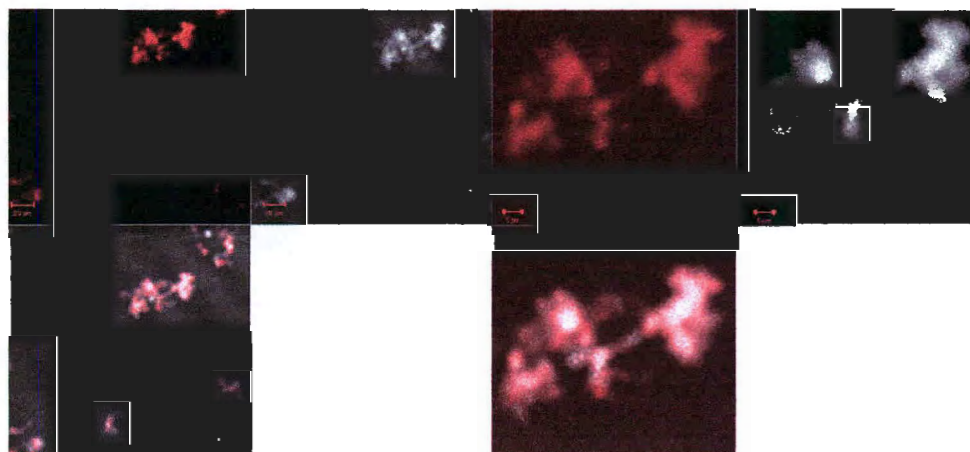


Figura 7.38. Suspensión de células bacterianas de *E. coli*, el trímero 1 y PBS obtenida por LSCM. a) magnificación 1. B) magnificación 3,4.

7.7.3. Evaluación de la interacción de células de *E. coli* con oligómeros fenilnetinileno funcionalizados con grupos terminales manosa y éter (Trímero 2)

Para la evaluación de la interacción de células de *E. coli* con oligómeros fenilnetinilenos funcionalizados con grupos terminales manosa y éter, también se preparó una solución inicial

del trímero 2 en PBS y en ausencia de bacterias para analizar mediante microscopía óptica su comportamiento en solución acuosa. Como se muestra en la figura 7.39, se observó la presencia de aglomerados de forma similar a los observados cuando se utilizó el trímero 1 aunque en este caso son de menor tamaño.



Figura 7.39. Aglomerados formados espontáneamente por el trímero 2 en PBS y en ausencia de células de *E. coli* a 800 aumentos.

El análisis de la solución en presencia de luz ultravioleta no mostró partículas fluorescentes tan evidentes como en el caso del trímero 1, sin embargo se aprecia que la solución no es totalmente homogénea (figura 7.40).



Figura 7.40. Solución del trímero 2 bajo la lámpara UV.

El análisis mediante microscopía óptica del comportamiento de la solución del oligómero en presencia de células de *E. coli* se muestra en la figura 7.41. La imagen muestra la presencia de células dispersas y aglomerados, en menor escala que los formados por el trímero 1. En este caso la aglomeración, aunque también pueda ser el resultado de la depositación de las células

de *E. coli* sobre los oligómeros ya formados, puede deberse a la interacción de las células con la única molécula de manosa que posee el trímero 2 en su estructura.

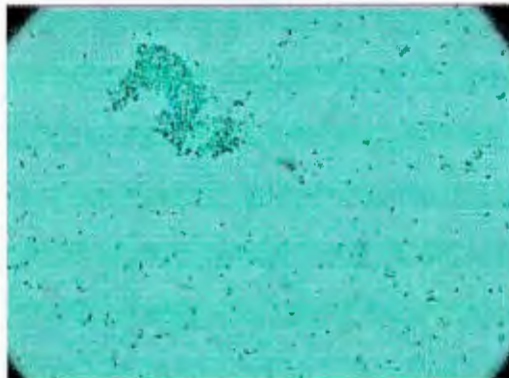


Figura 7.41. Mezclas del trímero 2 con *Escherichia coli* y PBS a 800 aumentos.

Si el oligómero no estuviera aglomerado, teóricamente las moléculas del trímero tenderían a adherirse a la superficie de las células por el reconocimiento entre la manosa y las fimbrias tipo I presentes en la membrana celular, por lo que se localizarían rodeando a la célula, tal y como se propone en el mecanismo de interacción que se muestra en la figura 7.42.

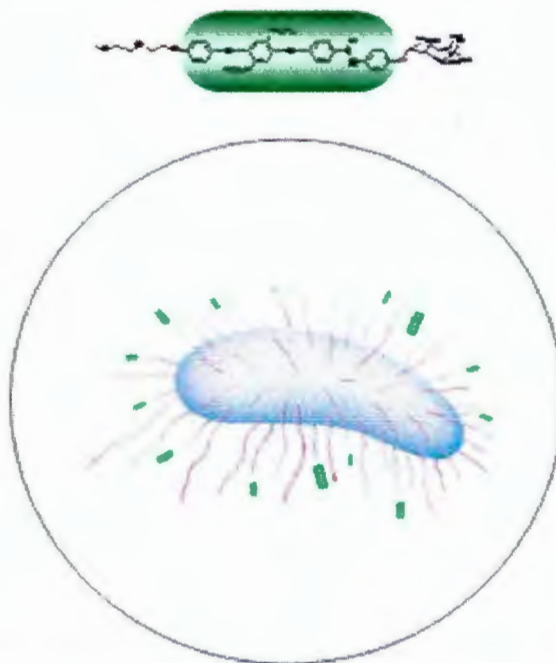


Figura 7.42. Mecanismo propuesto de la interacción entre el trímero 2 y las bacterias.

La figura 7.41 presenta las imágenes correspondientes a la caracterización mediante microscopía confocal de la mezcla de la suspensión bacteriana en PBS y el trímero 2 disuelto en DMF. En esta figura se aprecia que las imágenes de fluorescencia y de reflexión aportan formas definidas, sin embargo, a diferencia del trímero 1, se pueden distinguir diferencias muy marcadas entre ambas imágenes. Así la figura 7.43 a muestra fragmentos fluorescentes, posibles aglomerados, dispersos alrededor de uno de mayor tamaño e intensidad. La imagen de la figura 7.43 b muestra los mismos fragmentos pero de tamaño mayor. La figura 7.43 c, resultado de la combinación de las dos anteriores, muestra una imagen similar a la 7.43 b, con la diferencia de que las zonas centrales de los aglomerados presentan mayor consistencia, precisamente las zonas correspondientes a la imagen de la figura 7.43 a. Esto podría indicar la presencia de aglomerados formados únicamente por el trímero 2, que estarían representadas por aquellas zonas fluorescentes, pero a diferencia del caso anterior, las células bacterianas no se depositan, sino que se unen por la interacción fimbria – manosa, rodeando a los aglomerados, dando como resultado una imagen de reflexión de mayor tamaño. La formación de aglomerados formados por interacciones trímero - trímero impide mostrar en la figura 7.43 una célula única con límites fluorescentes al estar rodeada de moléculas del trímero, como se propone en el mecanismo descrito en la figura 7.42. En su lugar se presenta un aglomerado fluorescente rodeado de bacterias.

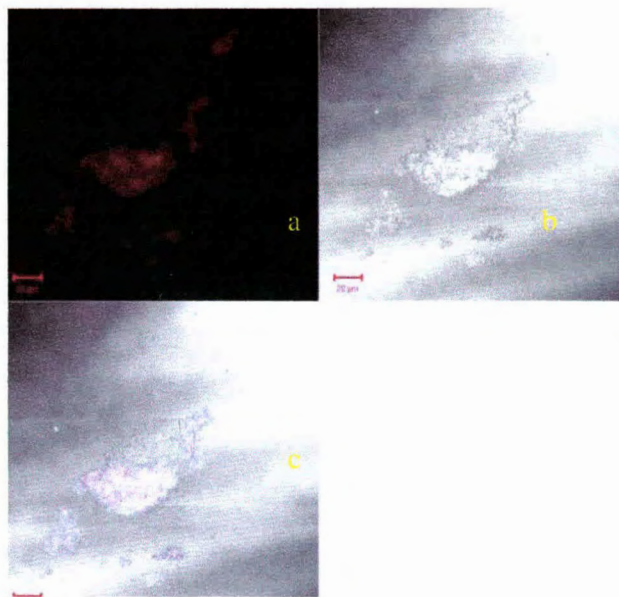


Figura 7.43. Suspensión de células de *E coli* en PBS, y trímero 2 obtenida por LSCM (zoom 1)

7.7.4. Evaluación de la interacción de células de *E. coli* con oligómeros fenilnetinileno funcionalizados con grupos terminales manosa (Trímero 3)



Figura 7.44. Solución del trímero 2 bajo la lámpara UV.

La evaluación del comportamiento del trímero 3 en PBS y en ausencia de células de *E. coli* no mostró ningún resultado en las imágenes de microscopía óptica, lo que indica una ausencia de aglomerados que puedan ser observados con esta técnica, por otra parte el análisis de la solución en presencia de luz ultravioleta mostró una solución mucho más homogénea que las anteriores, ya que no se observaron partículas suspendidas, lo cual fue un indicio de que el material es altamente soluble en solventes polares como el agua (figura 7.44).

La evaluación del oligómero fenilnetinileno funcionalizado con dos manosas y en presencia de células de *E. coli* se muestra en la figura 7.45.

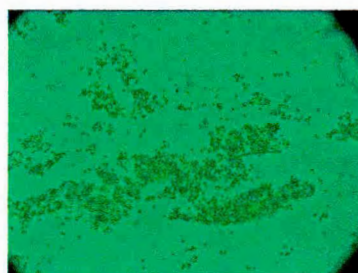


Figura 7.45. Mezclas del trímero 3 con *Escherichia coli* y PBS a 800 aumentos.

En la figura se puede apreciar la formación de aglomerados de células. En este caso si es posible establecer que la formación de los aglomerados se debe a la interacción de las células con los oligómeros fenilnetinileno considerando que en ausencia de las células el oligómero

se dispersa totalmente en la solución de PBS. Este comportamiento se puede explicar, considerando que un compuesto con dos moléculas de manosa debería facilitar la formación de aglomerados, ya que las células bacterianas, por su multiplicidad de fimbrias tipo I en su membrana celular, pueden unirse a varios receptores y estos a su vez solo podrán unirse a una cantidad de células igual al número de moléculas de manosa que tengan en su composición. Tomando como base lo anterior, el oligómero con dos moléculas de manosa se unirían a dos células bacterianas quienes, a su vez, se unirían a otras moléculas del trímero, lo que sucesivamente formaría un aglomerado. La figura 7.46 describe esquemáticamente el posible mecanismo de interacción de células de *E. coli* portadoras de fimbrias tipo I y el oligómero fenilenoetileno funcionalizado con 2 moléculas de manosa.

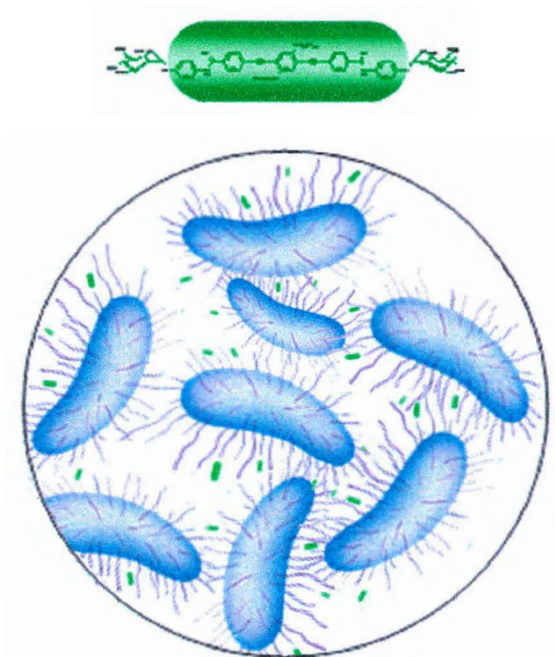


Figura 7.46. Mecanismo propuesto para la formación de aglomerados de un compuesto con dos de moléculas de manosa en su composición.

La caracterización mediante microscopía confocal de la mezcla de las células de *E. coli* suspendidas en PBS y el trímero 3 disuelto en DMF se muestra en la figura 7.47. En este caso se aprecia con claridad un aglomerado fluorescente, que a diferencia del formado por el trímero 2 tiene una consistencia relativamente homogénea en toda su extensión. Para una mejor visualización de la muestra, se realizó una magnificación, y poder, de esta forma,

determinar con mayor claridad las propiedades del aglomerado formado (figura 7.47 b). En esta imagen se puede observar la presencia de células en estado libre, que no aparecen en la imagen de fluorescencia. Además la similitud entre la imagen de fluorescencia con la de reflexión apunta a que la aglomeración de las bacterias se debe a la presencia de un compuesto fluorescente, lo que sugiere una interacción entre bacterias y trímero. Por otro lado las dos imágenes, tanto de fluorescencia como de reflexión, no son idénticas a pesar de su parecido, como sucedía con el trímero 1, lo que indica que no provienen de la misma fuente, sin contar como se ven las células que rodean al aglomerado central.

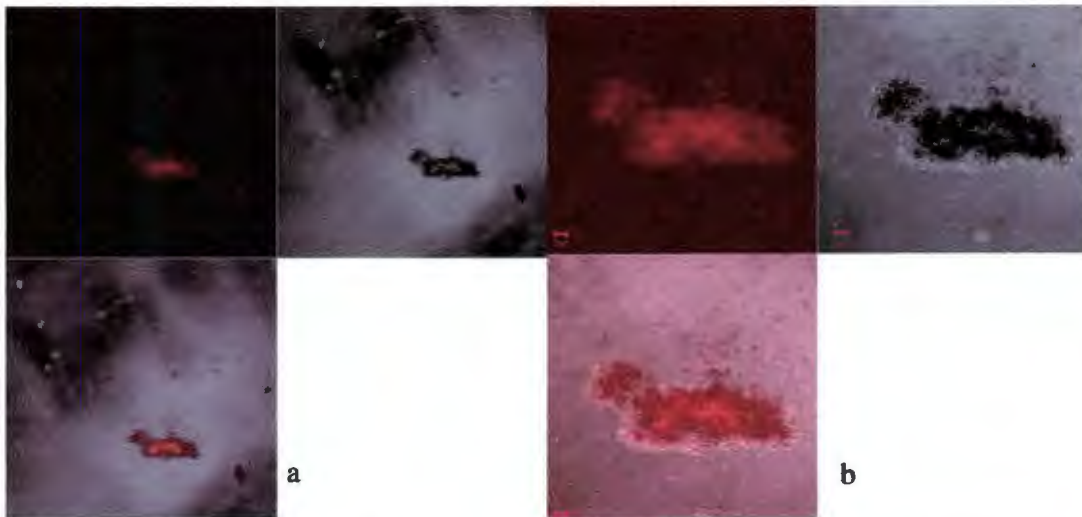


Figura 7.47. Suspensión de células bacterianas de *E. coli* en PBS y trímero 3 obtenida por LSCM. a) magnificación 1. b) magnificación 2.

7.7.5. Evaluación de la interacción de células de *E. coli* con oligómeros fenilenoetileno funcionalizados con grupos terminales carboxilo y glicol (Trímero 4)

La evaluación del comportamiento del trímero 4 en PBS, tanto en ausencia de células de *E. coli*, como en su presencia, no mostró ningún resultado en las imágenes de microscopía óptica, y obviamente en la de confocal tampoco, lo que indica la ausencia de aglomerados y la inexistencia de interacción entre polímeros y bacterias. Esto indica que los grupos funcionales glicol y carboxilo no pueden interactuar con las fimbrias tipo I ni con ninguna otra estructura presente en la membrana celular de las bacterias *E. coli*. El análisis de la solución en presencia

de luz ultravioleta mostró una solución fluorescente homogénea en la cual no se aprecian partículas suspendidas, lo cual fue un indicio de que el material es altamente soluble en solventes polares como el agua (figura 7.48). A juzgar por la diferencia con las imágenes de los otros trímeros se puede decir que al tener las terminales diferentes glicol y carboxilo el quenching generado por ellos es mínimo.



Figura 7.48. Solución del trímero 4 bajo la lámpara UV.

Con estos resultados se pudo concluir que de los trímeros analizados es el trímero 3 el que mejor comportamiento demuestra, ya que el tamaño del aglomerado formado es mayor a los otros, además la claridad de su imagen no permite que aparezcan las dudas enunciadas tras el análisis de las imágenes de las otras muestras, es decir, no se presenta asentamiento de bacterias sobre una superficie formada por el trímero, ya que no hay espacios vacíos sobre esa superficie y no se presentan fragmentos con mayor intensidad en la fluorescencias.

7.7.6. Evaluación del polímero fenilenoetileno funcionalizado con moléculas de manosa

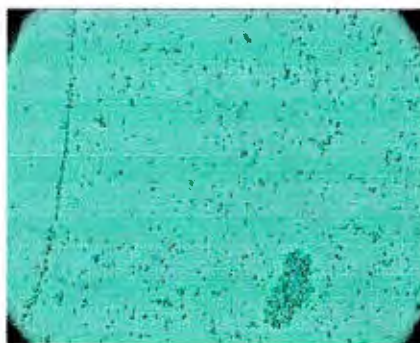


Figura 7.49. Mezcla del polímero disuelto en THF con una suspensión de *Escherichia coli* y PBS, mediante microscopía óptica a 800 aumentos.

La figura 7.49 muestra el resultado de la evaluación de la interacción de células de la bacteria *E. coli* con el polímero fenilnetileno disuelto en THF. En esta figura se muestra el análisis mediante microscopía óptica, donde es posible observar la aglutinación de las células debida a la interacción de éstas con el polímero. Se aprecia la formación de un aglomerado de mayor proporción ubicado en la base de la micrografía así como una gran cantidad de pequeños aglomerados dispersos en todo el campo analizado.

Las muestras obtenidas a través del estudio de interacción polímero-célula se analizó mediante microscopía confocal; esto con el fin de determinar la característica del aglomerado celular formado, respecto al comportamiento observado con los oligómeros estudiados. La figura 7.50 muestra los resultados obtenidos de este análisis.

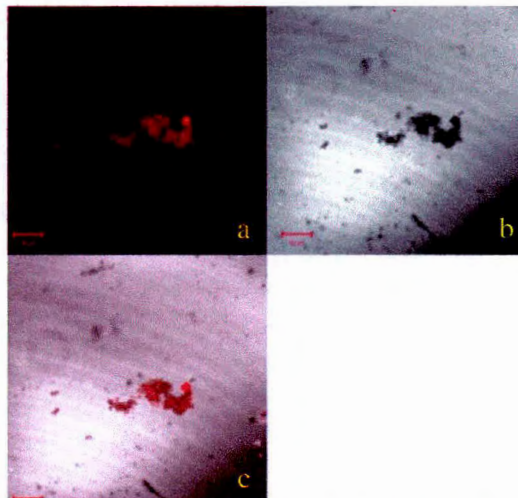


Figura 7.50. Interacción del polímero, disuelto en THF, con células de *E. coli*, suspendidas en PBS, obtenida por LSCM.

La imagen tiene muy poca magnificación en comparación con la de los trímeros, lo que indica que el tamaño relativo del aglomerado es mucho mayor, incluso que el presentado por el trímero 3, por esta razón no se aprecian células en estado libre. Además la imagen de fluorescencia es clara y coincide en forma con la imagen obtenida por reflexión, aunque en esta escala no se pueda tener la certeza de que el aglomerado este constituido por células bacterianas, ya que puede repetirse la misma situación que se vio con el trímero 1. Para

desechar cualquier duda se tomó otra muestra de la misma mezcla pero a una magnificación 4 veces mayor para poder observar células en estado libre. La imagen obtenida se puede apreciar en la figura 7.51.

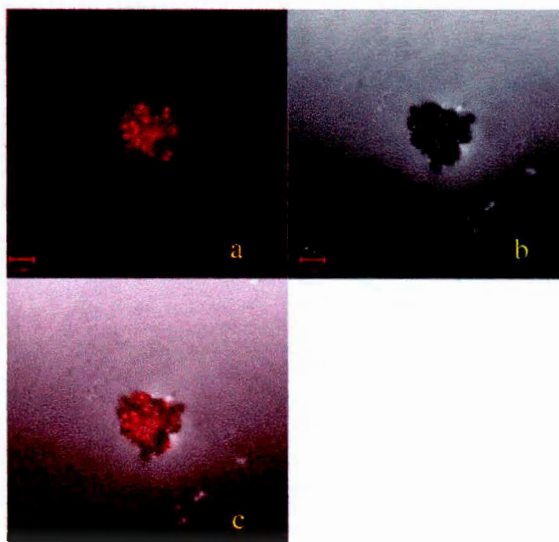


Figura 7.51. Suspensión de células bacterianas de *E coli* en PBS y polímero disuelto en THF (magnificación 4, obtenida por LSCM).

Existe mucha similitud en el perfil de las imágenes centrales de las figuras 7.51 a y 7.51 b, aunque también presentan algunas leves diferencias, que se hacen obvias al comparar ambas imágenes con la de la figura 7.51 c. En la figura 7.51 b se miran claramente pequeñas imágenes que sugieren la presencia de bacterias en estado libre, estas imágenes no aparecen en la figura 7.51 a, lo que indica que son materiales sin propiedades fluorescentes. La imagen de la figura 7.51 c muestra los mismos espacios vacíos dentro de la imagen central que la de la figura 7.51 b, lo que sugiere que no están cubiertos por otro material diferente a las bacterias. No existe material fluorescente que forme aglomerados pues las dos imágenes (de fluorescencia y reflexión) difieren. En la imagen de la figura 7.51 a se observan puntos que tienen mayor intensidad que el resto de las imágenes; estos puntos se muestran también en la figura 7.51 c y se pueden deber a algún reacomodo espacial que sufra la cadena polimérica, fuente de esa fluorescencia. Además los mencionados puntos no se presentan en la imagen de la figura 7.51 b, lo que indica que no pertenecen a algún material ajeno al aglomerado formado por las células bacterianas.

Al comparar las imágenes de los aglomerados formados por la acción del polímero funcionalizado con moléculas de manosa, se puede concluir que, tanto en tamaño como en fluorescencia, muestra mejores resultados en cuanto a la interacción con las células de *E. coli* que los oligómeros evaluados, incluyendo al trímero 3 que de los últimos fue el que mejores resultados mostró.

7.8. Rendimiento cuántico

Para el cálculo del rendimiento cuántico fue necesario determinar la absorbancia y la fluorescencia de los compuestos a analizar, como también del sulfato de quinina, que es el compuesto estándar base para realizar dichos cálculos. Dado que el trímero 3 presenta mejores resultados que los otros trímeros, e incluso que el mismo polímero (según las pruebas de aglutinación), fue seleccionado para determinar su rendimiento cuántico y compararlo con el del polímero:

$$\Phi_{t3} = \varphi_s * A_s * F_m * (\eta_{dmf} / \eta_s)^2 / (A_m * F_s)$$

Donde $\varphi_s = 0,54$; $A_s = 0,09$; $F_m = 1335,92$; $\eta_{dmf} = 1,4305$; $\eta_s = 1,3342$; $A_m = 0,0139$; $F_s = 51651,56$. El resultado para el trímero 3 es $\varphi_{t3} = 0,1042$

Para el polímero se tiene: $F_m = 33211,65$; $\eta_{THF} = 1,407$; $A_m = 0,0197$. El resultado para el polímero es $\varphi_p = 0,189$

El valor del rendimiento cuántico del polímero supera en casi dos veces en comparación con el del trímero, a pesar de que tiene una absorbancia que presenta el polímero es mayor a la del trímero, lo que indica una mayor fluorescencia del polímero.

8. CONCLUSIONES

- El uso del compuesto dihidrotioxobenzoxazolil fosfonato es efectivo en la síntesis de amidas para moléculas con presencia de grupos hidroxilo.
- La evaluación de las técnicas de aglutinación con levaduras, realizado por microscopía óptica, permite el determinar la presencia de las fimbrias tipo I en las cepas uropatógenas de *E. coli*, al presentarse la formación de aglomerados.
- La microscopía de fuerza atómica AFM a pesar de la dificultad para inmovilizar las muestras a analizar, proporcionó las mejores imágenes de la superficie de la membrana citoplasmática de las bacterias de *E. coli*, aunque la calidad de las imágenes no fue suficiente para detectar las fimbrias presentes.
- La aplicación de la técnica de tinción negativa a las células de *E. coli* permite la observación de las fimbrias tipo I en microscopía electrónica de transmisión, lo que a su vez permite la posibilidad de observar la presencia o ausencia de fimbrias tipo I.
- A la luz de los resultados obtenidos en este trabajo se puede considerar que los polímeros del tipo fenilnetileno portadores de derivados aromáticos de la manosa pueden funcionar mejor que los oligómeros como moléculas de reconocimiento molecular selectivo para *E. coli* uropatógena, ya que poseen un mayor número de receptores por molécula, mayor rendimiento cuántico y su síntesis es mucho más sencilla.

9. TRABAJO A FUTURO

- - Aislamiento de las fimbrias tipo I mediante técnicas de cromatografía
- Identificación de las fimbrias tipo I con los marcadores PE, mediante electroforesis
- Caracterización espectroscópica del complejo proteína - marcador
- Síntesis de moléculas con mayor rendimiento cuántico (dendrímeros)
- Evaluación de eficiencia y efectividad en películas como dispositivo en el diagnóstico de fluidos corporales

10. REFERENCIAS

-
- ¹ Pumarola A. Microbiología y Parasitología Médica. 1987. 916 p.
 - ² Johnson, J. R. Clin. Microbiol. Rev. 1991; 4: 80-128.
 - ³ Hultgren, S. J.; Normark. S.; Abraham, S. N. Annu. Rev. Microbiol. 1991; 45: 383-415
 - ⁴ Disney, M. D.; Zheng, J.; Swager, T. M.; Seeberger, P. H. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 13343-13346
 - ⁵ Gellman, S. H., ed. Chem. Rev. 1997; 97: 1231-1734.
 - ⁶ Lehn, J. M. "Supramolecular Chemistry, Concepts and Perspectives", VCH, New York, 1995.
 - ⁷ Kroghfelt K. A. Rev Infect Dis 1991; 13: 721-35.
 - ⁸ Savage DC. In: Beachey EH, ed. Bacterial adherence. New York: Chapman and Hall, 1980;31-59.
 - ⁹ (a) Beachey E.. J Infect Dis 1981; 143: 325-45. (b) Beachey E, Giampapa C, Abraham S. Am Rev Respir Dis 1988; 138: S45-S48.
 - ¹⁰ (a) Hultgren S, Abraham S, Caparon M, Falk P, Normark S. Cell 1993; 73: 887-901. (b) Jenkinson H, Lamont R. Crit Rev Oral Biol Med 1997; 8: 175-200. (c) Ofek I, Sharon N. Immunol 1990; 151: 91-113. (d) St GJ, III. Adv Pediatr 1997; 44: 43-72.
 - ¹¹ Beachey E, Giampapa C, Abraham S. Am Rev Respir Dis 1988; 138: S45-S48.
 - ¹² Neidhardt FC. 2nd edition. ASM Press, Washington, 1999.
 - ¹³ Ewing WH. Edwards and Ewing 's Identification of Enterobacteriaceae. 4th. Edition, Elsevier, 1985.
 - ¹⁴ Drasar BS, Hill MJ. Human intestinal flora. Academic Press, London, UK., 1974.
 - ¹⁵ Nataro JP, Kaper JB. Clin. Microbiol. Rev. 11: 142-201, 1998.
 - ¹⁶ Nowicki B, Truong L, Moulds J, Hull R. Am J Pathol 1991;133:1-4.
 - ¹⁷ Howes DS, Henry SM. Urinary Tract Infection, Female. 2005. Emedicine: <http://www.emedicine.com/EMERG/topic626.htm>. 20/05/08. 13:26
 - ¹⁸ Cohn EB, Schaeffer AJ. Urinary Tract Infections in Adults. Digital Urology. <http://www.duj.com/Article/Schaeffer/Schaeffer.html>. 20/05/08. 13:26
 - ¹⁹ (a) Kunin CM, White LV, Hua TH. Ann Intern Med. 1993;119:454-560. (b) Stamm WE, Counts GW, Running KR, Fihn S, Turck M, Holmes KK. N Engl J Med. 1982; 307:463-468.

- (c) Komaroff AL. *Ann Intern Med.* 1986; 104:212-218. (d) Hooton TM, Scholes D, Stapleton AE. *N Engl J Med.* 2000; 343(14):1037-1039.
- ²⁰ Patton JP, Nash DB, Abrutyn. *Med Clin N Am.* 1991; 75:495-513.
- ²¹ (a) Stamm WE, Hooton TM. *N Engl J Med.* 1993; 329(18):1328-1334. (b) Rushton HG. *Pediatr Clin North Am.* 1997; 44:1133-1169. (c) Panaretto K, Craig J, Knight J. *J Paediatr Child Health.* 1999;35:454-459.
- ²² Hoepelman AIM, Tuomanen E. *Infect Immun* 1992; 60: 1729-33.
- ²³ Shibl, A.M. *Rev. Infect. Dis.* 1985. 7: 51-65.
- ²⁴ Beachey E.H. Courtney H.S. 1989. (55): Suppl 1: 33-40. Review
- ²⁵ Hultgren SJ, Abraham S, Caparon M, Falk P, St GJ, III, Normark S. *Cell* 1993; 73: 887-901.
- ²⁶ Gaastra, W., and F. K. de Graaf. 1982. *Microbiol. Rev.* 46:129-161.
- ²⁷ (a) Little JS, Klee LW, Hoover DM, Rink RC. *J Urol* 1994; 152: 720-4. (b) Sauter SL, Rutherford SM, Wagener C, Shively JE, Hefta SA. *J Biol Chem* 1993; 268: 15510-6.
- ²⁸ Duguid, J. P., Smith, I, W., Dempster, G., Edmunds P, N. 1955. *J. Pathol.: Bacteriol.* 70:335-48
- ²⁹ Normark, S., Baga, M., Goransson, M., Lindberg, F. P., Lund, B. 1986.
- ³⁰ (a) Brinton CC, Jr. *Trans N Y Acad Sci* 1965; 27: 1003-54. (b) Jones CH, Pinkner JS, Roth R, Heuser J, Nicholes AV, Abraham SN, Hultgren SJ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 2081-5.
- ³¹ Choudhury, D.; Thompson, A.; Stojanoff, V.; Langermann, S.; Pinkner, J.; Hultgren, S. J.; Knight, S. D. *Science* 1999, 285, 1061-1066
- ³² Russell PW, Orndorff PE. *J Bacteriol* 1992; 174: 5923-35.
- ³³ Krogfelt KA, Bergmans H, Klemm P. *Infect Immun* 1990; 58: 1995-8.
- ³⁴ (a) Langermann S, Palaszynski S, Barnhart M, Auguste G, Pinkner JS, Burlein J, Barren P, Koenig S, Leath S, Jones CH, Hultgren SJ. *Science* 1997; 276: 607-11. (b) Thankavel K, Madison B, Ikeda T, Malaviya R, Shah AH, Arumugam PM, Abraham SN. *J Clin Invest* 1997; 100: 1123-36.
- ³⁵ Duguid, J. P. & Campbell, I. 1969. *J. Med. Microbiol.* 2, 535-553.
- ³⁶ Reis MH, Guth BE, Gomes TAT, Murahovschi J, Trabulsi L. R. 1982 *J. Clin. Microbiol.* 15: 1062-1064.
- ³⁷ Balish MJ, Jensen J, Uehling DT. *Bladder M. J Urol.* 1982;128:1060-3.

-
- ³⁸ Hung CS, Bouckaert J, Hung D, Pinkner J, Widberg C, DeFusco A. *Mol Microbiol.* 2002;44:903-15.
- ³⁹ Mulvey MA, López-Boado YS, Wilson CL, Roth R, Parks WC, Heuser J. *Science.* 1998;282:1494-7.
- ⁴⁰ Andreson GG, Palermo JJ, Schilling JD, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ. *Science.* 2003;301:105-7.
- ⁴¹ Struve C, Krogfelt KA. *Microbiology* 1999; 145 (Pt 10): 2683-90.
- ⁴² Silverblatt FJ, Ofek I. *J Infect Dis* 1978; 138: 664-7.
- ⁴³ (a) Alkan ML, Wong L, Silverblatt FJ. *Infect Immun* 1986; 54: 549-54. (b) Hultgren SJ, Porter TN, Schaeffer AJ, Duncan JL. *Infect Immun* 1985; 50: 370-7.
- ⁴⁴ Evans, M., G. Waxler, J. Newman. 1986. *Am. J. Vet. Res.* 47: 2431-2434.
- ⁴⁵ Esquive, G. R.; González, G. V.; Arias, M. E. 2007. *Ingenierías, Vol. X, No. 34.*
- ⁴⁶ (a) Beildeck, C.; Lucht, B. L.; Euler, W. B. *Polymer Preprints* 2001, 42(2), 211. (b) Heeger, P. S.; Heeger, A. J. *PNAS* 1999, 96, 12219-1222.
- ⁴⁷ (a) Shirakawa H. *Chem. Int. Ed.* 2001. 40. 2575; (b) McDiarmid A.G. *Chem. Int.* 2001. Ed. 40. 2581; (c) Heeger A.J. *Chem. Int. Ed.* 40. 2591.
- ⁴⁸ Arias M., E. ; Arnault, J. C. ; Guillon, D. ; Maillou, T. ; Le Moigne, J. ; Geffroy, B. ; Nunzy, J. M. *Langmuir* 2000, 16, 4309-4318.
- ⁴⁹ Méndez M.T. Síntesis de oligómeros del tipo fenilnitetinileno funcionalizados con 4-aminofenil- α -D-manopiranosida para el reconocimiento biomolecular de la bacteria *Escherichia coli*. 2006. Tesis de grado de maestría. Centro de Investigaciones en Química Aplicada CIQA.
- ⁵⁰ Gerard, M.; Chaubey, A.; Malhotra, B. D. *Biosens. Bioelectron.* 2002, 17, 345.
- ⁵¹ Borole, D. D.; Kapadi, U. R.; Mahulikar, P. P.; Hundiwale, D. G. *J. Appl. Polym. Sci.* 2004, 94, 1877.
- ⁵² Nishizawa, M.; Matsue, T.; Uchida, I. *Anal. Chem.* 1992, 64, 2642-2644.
- ⁵³ Englebienne, P. *J. Mater. Chem.* 1999, 9, 1043-1054.
- ⁵⁴ (a) J. Campbell y G. G. Malliaras. *The Chemistry, Physics and Engineering of Organic Light-Emitting Diodes*, En: "Conjugated Polymers", Edit. por: G. Hadziioannou y P. F. Van Hutten, Wiley-VCH, New York, 1999, pp.411-461. (b) Friend, R. H.; Gymer, R.W.; Holmes, A.B.; Burroughes, J.H.; Marks, R.N.; Taliani, C.; Bradley, D.D.C.; Dos Santos, D.A.; Brédas, J.L.; Lögdlund, M.; Salaneck, W.R. *Nature* 1999, 397, 121.
- ⁵⁵ Giesa, R. *Synthesis and Properties of Conjugated Poly(Aryleneethynylene)s*. En: "J. M. S.- Rev. Macromol. Chem. Phys." 1996, C36(4), pp. 631-670.

-
- ⁵⁶ (a) Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N. *Tetrahedron Lett.* 1975, 50, 4467-4470. (b) H. Dieck, R.F. Heck; *J. Organomet. Chem.* 1975, 93, 259
- ⁵⁷ Amatore, C.; Jutand, A.; Suárez, A. *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 9531-9541.
- ⁵⁸ Spevak, W.; Nagy, J. O.; Charych, D. H.; Schaefer, M. E.; Gilbert, J. H.; Bednarski, M. *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 1146-1147.
- ⁵⁹ Baek, M. G.; Stevens, R. C. and Charych, D. H. *Bioconjugate Chem.* 2000, 11, 777-788
- ⁶⁰ Panda B. R., Singh A. K., Ramesh A. Chattopadhyay A. 2008. *Langmuir.* 24 (20), pp 11995-12000
- ⁶¹ Kim, I.K Wilson J.N. Bunz H.F. 2005. *Chem. Commun.* 1273-1275. DOI:10.1039/b416587j
- ⁶² Kunin, C. M. 1979. 3rd ed. Lea & Febiger, Philadelphia, p. 123-126.
- ⁶³ Schaeffer, A. J. Amundsen, S. K. Schmidt, L.N. *Infection and Immunity*, 1979, p. 753-759
- ⁶⁴ Korhonen, T.K. Leffler, H. Svanborg Edenn, C. *Infection and Immunity*, 1981, p. 796-804.
- ⁶⁵ Goldstein I. J. Hayes, C. E. 1978. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 35:127-340.
- ⁶⁶ So, L. L. Goldstein, I. J. 1968. *J. Biol. Chem.* 243:2003-2007.
- ⁶⁷ (a) Anderson, T. F. 1951. *Trans. N.Y. Acad. Set.* 13, 130-133. (b) Guttman, H. N. Styskal, R. C. 1971. 4th A. *Proc. IIT Res. Inst.*, Chicago, 111., pp. 265-271. (c) Humphreys, W. J., Spurlock, B. O. Johnson, J. S. 1974. 7th A. *Proc. IIT Res. Inst.*, Chicago, 111., pp. 275-282. (d) Humphreys, W. J. & WODZICKI, T. J. 1972. *30th A. Proc. Electron Microsc. Soc. Am.* (ed. C. J. Arceneaux), pp. 238-239, Los Angeles, California. (e) Kelley, R. O., Dekker, R. A. Bluemink, J. G. 1973. *J. Ultrastruct. Res.* 45, 254-258. (f) Lim, D. J. 1971. *Scanning Electron Microscopy/1971*, 4th A. *Proc. IIT Res. Inst.*, Chicago, 111., pp. 257-264. (g) Luft, H. J. 1961. *J. biophys. biochem. Cytol.* 9, 409-414. (h) Panessa, B. J. Gennaro, J. F. 1972. *30th A. Proc. Electron Microsc. Soc. Am.* (ed. C. J. Arceneaux), pp. 208-209. Los Angeles, California. (i) Panessa, B. J. Gennaro, J. F. 1973. *Scanning Electron Microscopy/1973*, 6th A. *Proc. IIT Res. Inst.*, Chicago, 111., 395-402. (j) Porter, K. R., Kelley, D. Andrews, P. M. 1972. *5th A. Stereoscan Colloquium*, Kent Cambridge Scientific Co., Morton Grove, 111., pp. 1-19. (k) Seligman, A. M., Wasserkrug, H. L. Hanker, J. S. 1966. *J. Cell Biol.* 30, 424-432. (l) Tanaka, K. Iino, A. 1972. In *30 A. Proc. Electron Microsc. Soc. Am.* (ed. C. J. Arceneaux), pp. 408-409. Los Angeles, California. (m) Woods, P. S. Ledbetter, M. C. 1974. *32nd A. Proc. Electron Microsc. Soc. Am.* (ed. C. J. Arceneaux), pp. 122-123. St Louis, Missouri.
- ⁶⁸ Porter, K. R., Claude, A., Fullam, E. F., *J. Exp. Med.*, 1945, 81, 233
- ⁶⁹ PALADE, G. E., 1952. *J. exp. Med.*, qg, 285
- ⁷⁰ Sabatini, D.D. Bensch, K. Barnett, R. 1963. *J. Cell Biol.* 17 :19-59.

-
- ⁷¹ Bozzola, J.J. & Russell, L.D. 1992. Jones and Bartlett, Boston.
- ⁷² (a) Glauert, A. M.;Kerridge, D.; Horne, R. W. 1963 Cell Biol. 18(2):327-336. (b) Duguid J.P. 1959 J Gen Microbiol; 21:271-86; (c) Thornley MJ, Horne RW. 1962. J Gen Microbiol; 28: 51-56; (d) Brenner S, Horne, RW. 1959. Biochim Biophys; 34: 103-110.
- ⁷³ Vanhaecht, B.; Teerenstra, M. N.; Suwier, D. R.; Koning, C. E. *Pure Appl. Chem.* 2000, A37(6), 633-643.
- ⁷⁴ (a) Carey, F. A. Organic Chemistry, MacGraw-Hill 2003, 5a ed. (b) Smith, M. B.; March, J. Advanced Organic Chemistry, Wiley Interscience, 5a. ed.
- ⁷⁵ Ueda, M.; Kameyama, A.; Hashimoto, K. *Macromolecules* 1988, 21, 19-24.
- ⁷⁶ (a) Sumner, J.B, Howell, S.F. A J Bacteriol. 1936;32:227-37 (b) Toftager, L. K, Norgaard, P. B. Biochemistry. 1981. Clinical Biochemistry. Editor T.C Bog-Hansen, vol. 1, 293. (c) Lis H, Sharon N. 1986. London Academic Press. 294-370
- ⁷⁷ Duguid, J. P., S. Clegg, and M. I. Wilson 1979. J. Med. Microbiol. 12:213-227.
- ⁷⁸ Binnig, G. Quate, C.F. Gerber, Ch. 1986. Phys. Rev. Lett. 56, 93.
- ⁷⁹ Braga, P. C. Ricci. 1998. D. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. p. 18-22, Vol. 42, No. 1