



Universitat
de les Illes Balears

Síntesis y caracterización de nuevas nanopartículas de hierro funcionalizadas para el reconocimiento de contaminantes con grupos carboxílicos.

Memoria presentada por

PAULINA RODRÍGUEZ GARCÍA

Memoria del Trabajo de Fin de Máster

Máster Oficial Universitario en Ciencia y Tecnología Química
de la

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS

Curso Académico: 2015-2016

Palma de Mallorca, Septiembre del 2016

*Tutor: **Jeroni Morey Salvá***

*“Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto,
y pensar lo que nadie más ha pensado”.*

Albert Szent-Györgyi

El **Dr. Jeroni Morey Salvà**, Profesor Titular del Departamento de Química, de la Universitat de les Illes Balears

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado **“Síntesis y caracterización de nuevas nanopartículas de hierro funcionalizadas para el reconocimiento de contaminantes con grupos carboxílicos”** ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Química (Área de Química Orgánica) de la Universitat de les Illes Balears por la **Sra. Paulina Rodríguez García** durante el curso académico 2015-2016, constituyendo la Memoria que presenta para optar al grado de Máster en Ciencia y Tecnología Química.

Palma de Mallorca, Septiembre 2016.



Fdo. Dr. Jeroni Morey Salvà

AGRADECIMIENTOS

***“Sentir gratitud y no expresarla
es como envolver un regalo y no entregarlo”***

-William Arthur Ward-

Este trabajo es la suma de esfuerzos de grandes personas de quienes hoy me llevo una parte de sus conocimientos y enseñanzas.

Primero, agradezco a Dios por permitirme ver realizada una más de mis metas.

Mi agradecimiento más importante, es para mis padres, a ellos les dedico el presente trabajo, el cual es fruto de su trabajo en mi formación personal, ellos me enseñaron el valor de la perseverancia y la paciencia; sus consejos me han ayudado a superar cada una de las dificultades a lo largo de esta estancia lejos de casa. A mis hermanas, a quienes debo una palabra de aliento en los momentos difíciles, pero sobretodo, su alegría para celebrar junto conmigo los momentos más importantes de mi vida.

Agradezco a mi Tutor, el Dr. Jeroni Morey por darme la oportunidad de trabajar uno de sus temas de investigación, por sus enseñanzas, por creer en mi capacidad y apoyarme en cada momento. Agradezco a la Dra. Neus Piña por su amabilidad y ayuda dentro y fuera de laboratorio. A ambos agradezco que me hayan ayudado a seguir creyendo en el maravilloso mundo de la investigación, por el tiempo dedicado a la lectura de este trabajo y por sus atinadas correcciones las cuales enriquecieron mi conocimiento y sin duda mejoraron mi trabajo.

Agradezco al Servei Científicotècnic de la UIB, a Ferran Hierro, Gabriel Martorell, Joan Cifre y Rosa Gomila, sin su ayuda no sería posible obtener los resultados que se presentan en este trabajo.

Susy y Paulino, gracias por todas sus enseñanzas, paciencia y apoyo en el desarrollo de este trabajo. Les agradezco todos los buenos momentos vividos dentro y fuera del laboratorio, sin duda un trabajo de investigación es mejor si se tiene un ambiente divertido y agradable.

Por último, agradezco de forma especial a la Fundación Carolina por la beca otorgada para la realización de este trabajo.

Paulina R. G.

INDICE

TABLA DE ABREVIATURAS	1
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA.....	3
1.2. NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE HIERRO.	3
1.2.1. ESTABILIZACIÓN Y FUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE Fe ₃ O ₄ CON MOLÉCULAS ORGÁNICAS.....	4
1.3. ESCUARAMIDAS Y DERIVADOS DEL ÁCIDO ESCUÁRICO.	5
1.3.1. PROPIEDADES Y ESTRUCTURA DE LAS ESCUARAMIDAS.	5
1.3.2. USO DE ESCUARAMIDAS COMO RECEPTORES EN QUÍMICA SUPRAMOLECULAR.	7
1.4. GLIFOSATO. UN PELIGROSO HERBICIDA.....	8
1.4.1. EFECTOS DEL GLIFOSATO SOBRE LA SALUD	9
1.4.2. EFECTOS DEL GLIFOSATO SOBRE EL MEDIO AMBIENTE.	10
1.4.3. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES QUÍMICAS	10
1.4.4. MECANISMOS DE DEGRADACIÓN DEL GLIFOSATO.....	11
2. OBJETIVOS	13
2.1. OBJETIVOS GENERALES.....	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3. METODOLOGÍA Y RESULTADOS	14
3.1. DISEÑO DE 3 NUEVOS RECEPTORES DERIVADOS DE ESCUARAMIDAS UTILIZANDO EL TRIS (2-AMINOETIL) AMINA COMO MOLÉCULA CENTRAL (TREN).....	14
3.2. SÍNTESIS ORGÁNICA Y FUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS.	15
3.2.1. SÍNTESIS DE RECEPTOR R1.....	15
3.3. SÍNTESIS ORGÁNICA SOBRE NP.....	16
3.3.1. SÍNTESIS DE RECEPTOR R2 y R3	16
3.4. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE MOLÉCULAS ORGÁNICAS....	16
3.4.1. ELECCIÓN DE GRUPO PROTECTOR.....	17
3.4.2. SÍNTESIS DE ESCUARAMIDAS.....	18
3.5. SINTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE HIERRO FUNCIONALIZADAS CON ESCUARAMIDAS	21
3.6. ESTIMACIÓN DEL NÚMERO DE MOLÉCULAS ORGÁNICAS UNIDAS POR NANOPARTÍCULA.....	25
3.7. CARACTERIZACIÓN DE NP FUNCIONALIZADAS POR IR.....	27

3.8. CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS POR SEM.....	30
3.9. ANÁLISIS DE MASAS PARA DETERMINACIÓN DE FORMACIÓN DE LOS RECEPTORES R2 y R3 SOBRE LA NP.....	33
3.10. CUATERNIZACIÓN DE LOS RECEPTORES R1-R3.....	37
3.11. ESTUDIO POR RMN DE LA COMPLEJACIÓN DE GLIFOSATO A NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS CON ESCUARAMIDAS EN AGUA. ...	37
3.12. ESTUDIO DE COMPARACIÓN POR RMN DE LA COMPLEJACIÓN DE GLIFOSATO A NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS CON ESCUARAMIDA CUATERNIZADAS EN AGUA.....	41
4. CONCLUSIONES.....	43
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	44
5.1. METODOS GENERALES.....	44
5.2. SINTESIS DE ESCUARAMIDAS.....	44
5.2.1. SÍNTESIS DE C1	44
5.2.2. SÍNTESIS DE DIESCUARAMIDAS K1 Y K2.....	45
5.2.3. SÍNTESIS DE DIESCUARAMIDA C2.....	46
5.2.4. SÍNTESIS DE DIESCUARAMIDA C3.....	46
5.2.5. SÍNTESIS DE ESCUARAMIDA C4	47
5.2.6. SINTESIS DE ESCUARAMIDA C5	48
6. RESUMEN BIBLIOGRÁFICO.....	49
COLECCIÓN DE ESPECTROS.....	52

TABLA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
^{13}C-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C
^1H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de ^1H
AMPA	Ácido aminometilfosfónico
APTS	3-aminopropiltriétoxosilano
BOC₂O	Di-tert-butil dicarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Espectrometría de masas
EtOH	Etanol
ITC	Calorimetría Isoterma de Titulación
MALDI	Desorción/Ionización Láser asistida por Matriz
MeOH	Metanol
NP	Nanopartículas
NPF	Nanopartículas funcionalizadas
RMN	Resonancia magnética nuclear
SEM	Microscopía electrónica de barrido
TGA	Análisis termogravimétrico
TREN	Tris (2-aminoetil) amina

RESUMEN

En las últimas décadas, debido al desarrollo agrícola se ha incrementado la demanda de agua y uso de suelo, reduciendo así la calidad de estos debido al creciente uso de productos químicos, especialmente por el uso indiscriminado de herbicidas utilizados con el fin de aumentar el rendimiento de las cosechas. Actualmente, a nivel mundial, uno de los herbicidas más utilizados es el glifosato [*N*-(fosfonometil) glicina],¹ siendo la sustancia activa de más de 750 productos diferentes a nivel mundial. De acuerdo con lo reportado por *Green Peace* España en el 2015, éste herbicida está autorizado en alrededor de 125 productos.

Recientemente, el glifosato ha sido clasificado por la Organización Mundial de la Salud como "Probablemente cancerígeno y tóxico".² Despertando el interés de diversos grupos de investigación para idear nuevos sistemas de detección y captura de este herbicida en agua y suelo.

De acuerdo a su estructura química (**Figura 1**), el glifosato es un ácido débil con tres grupos funcionales (amina, carboxilato y fosfonato),³ el cual posee un periodo de vida corto en el suelo y agua debido a su degradación por microorganismos produciendo diversos metabolitos los cuales han sido encontrados en intoxicaciones con este producto.⁴

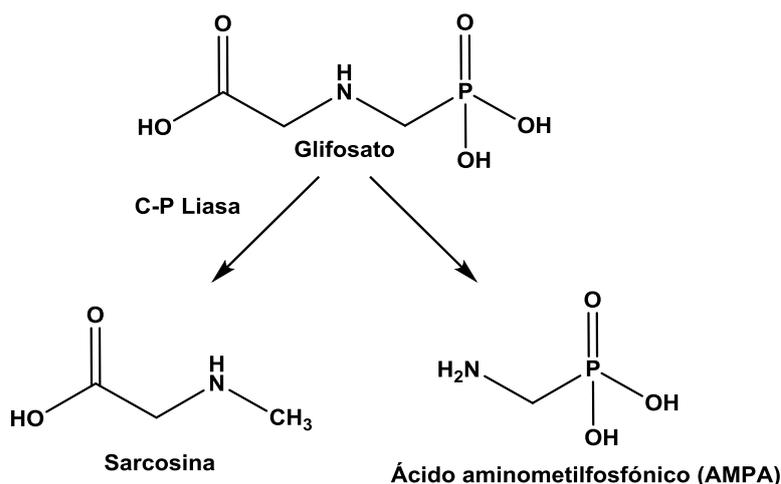


Fig. 1. Formula estructural del Glifosato y diferentes metabolitos producidos por degradación microbiana.

Actualmente las nanopartículas han comenzado a considerarse como una de las áreas de investigación más importantes dentro del área de nanomateriales. El desarrollo de nuevos materiales es hoy en día un área de oportunidad en el campo de la química supramolecular, por lo que, las nanopartículas han atraído la atención de diversos grupos de investigación debido a su facilidad de manejo y versatilidad de uso. La problemática ambiental actual, así como las sorprendentes propiedades de las nanopartículas de hierro, han despertado la necesidad de desarrollar nuevos métodos de detección de contaminantes carboxílicos-organofosforados. En el presente trabajo, se han desarrollado varios receptores con unidades escuaramídicas, dichos receptores son unidos covalentemente a nanopartículas de hierro.

La introducción de grupos funcionales orgánicos sobre la superficie de las nanopartículas, ha sugerido un comportamiento cooperativo, que no se observa en las unidades aisladas de ambos componentes.⁵ La elevada afinidad para formar enlaces de hidrogeno, su estructura rígida y plana del anillo ciclobutenediona hacen a las escuaramidas una molécula de interés para el reconocimiento de aniones y cationes, dicho comportamiento ha sido demostrado mediante estudios teóricos y experimentales.⁶

Estudios anteriores, han demostrado que el uso combinado de escuaramidas junto con restos de trimetil yoduro de amonio, producen uniones favorables entre el sal de amonio y el anión carboxilato por medio de fuerzas de tipo polar. Esta fuerza electrostática se incrementa gracias a las unidades de escuaramida que establecen interacciones complementarias con los restos carboxilato por medio de enlaces de hidrógeno.⁷ Con base en estos estudios, se ha diseñado el presente trabajo en el cual se sintetizaron 3 diferentes tipos de nanopartículas funcionalizadas, las cuales se muestran en la **Figura 2**.

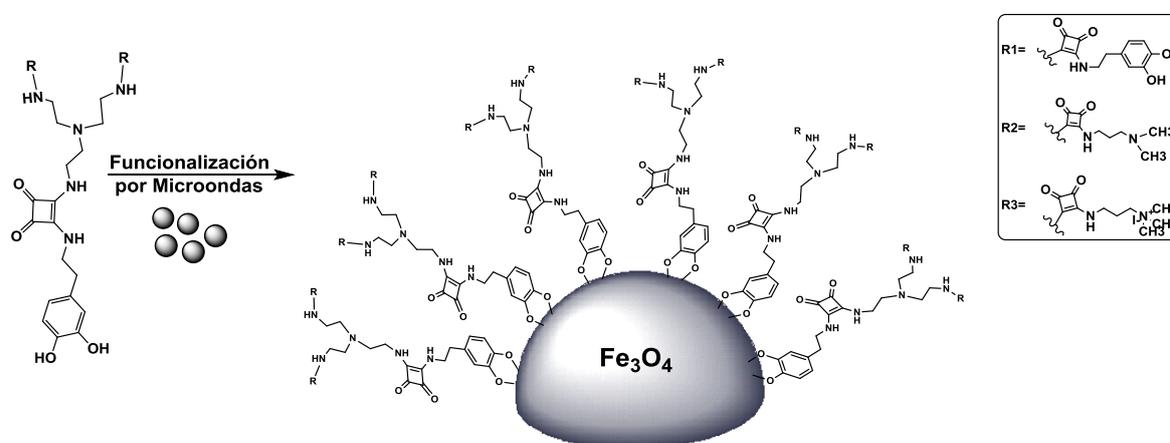


Fig. 2. Nanopartículas recubiertas con 3 diferentes tipos de receptores.

Para el acoplamiento covalente de la nanopartículas con restos escuaramídicos se requiere de la presencia de una molécula “linker”. En este trabajo, la dopamina es utilizada como unidad de conexión, debido a la presencia de dos grupos hidroxilo donde los átomos de oxígeno reaccionan de forma preferente con el hierro, además de la presencia de una amina terminal en su estructura, lo que hace de la dopamina una molécula versátil para el diseño de nuevos receptores.⁸

Este estudio ha sido apoyado por investigaciones anteriores en donde se observa que el diseño y la selectividad de receptores tripodales basados en unidades escuaramídicas han dado buenos resultados en la detección de carboxilatos, por lo que esto hace de los receptores tripodales en conjunto con nanopartículas de hierro un modelo de reconocimiento interesante para la detección de analitos, que para este trabajo se enfoca en el Glifosato, aunque es importante mencionar que podría ser utilizado para la detección de otros analitos relevantes en temas de salud y medio ambiente.^{9,10}

1. INTRODUCCIÓN

1.1. NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA

La complejidad de fabricar, observar y manipular nano estructuras, así como su potencial aplicación, demanda la colaboración de diversas disciplinas. Una de ellas es la Nanociencia. Esta ciencia se puede definir como el estudio de la materia a escala nanométrica desde el punto de vista de la Física, Química, Biología y la ciencia e ingeniería de Materiales, teniendo como objetivo principal entender los nuevos fenómenos existentes, así como la predicción de propiedades novedosas en sistemas nanométricos.¹¹

El estudio y manipulación de estas propiedades han sido foco de atención desde hace algunos años, pero no fue hasta el último cuarto de siglo que ha sido posible modificar las moléculas y estructuras dentro de este rango de tamaño de forma exitosa y reproducible. Actualmente el conocimiento de las propiedades presentadas por los materiales en escala nanométrica supone un reto dentro de la comunidad científica, ya que las propiedades exhibidas por los materiales en escala macroscópica, se ven magnificadas e incluso cambian completamente al momento de tener este mismo material en escala nanométrica; este cambio de las propiedades es generado debido a la naturaleza cuántica del sistema, el cual responde de manera diferente dependiendo de los estímulos externos. Por esta razón es necesario controlar el proceso de formación, entorno, temperatura, tamaño y forma de las nanopartículas mediante métodos fácilmente caracterizables y reproducibles.¹²

Por otro lado, la aplicación de los conocimientos básicos generados por la Nanociencia a la solución de problemas específicos o a la generación de nuevos dispositivos de utilidad diversa es la tarea fundamental de la Nanotecnología.

1.2. NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE HIERRO.

Las nanopartículas actualmente son consideradas como los nanomateriales más importantes en el mundo de la nanociencia, esto debido a su versatilidad de uso, biocompatibilidad, diversidad de tamaño y diferentes composiciones.

La versatilidad en el uso de las nanopartículas va desde aplicaciones en electrónica, marcaje para detección de células en diferentes técnicas de microscopía, administración de fármacos a través de nano estructuras funcionalizadas, hasta productos de consumo como cosméticos, filtros solares, fibras, textiles, colorantes y pinturas.¹²

Hasta el día de hoy existen sin número de tipos de nanopartículas con diferentes composiciones, algunos ejemplos son las de óxido de titanio-óxido de grafeno recientemente reportadas por su elevada actividad fotocatalítica.¹³ Por otro lado, las nanopartículas de óxido de hierro han sido ampliamente utilizadas con diversos fines, entre sus aplicaciones destacan las NP usadas en baterías de litio para aumentar su durabilidad y ciclos de vida,¹⁴ o bien para eliminar metales pesados del agua.¹⁵ Dentro de las nanopartículas de óxido de hierro, las más destacadas son las de magnetita (Fe_3O_4), de las cuales se aprovechan sus propiedades magnéticas, su elevada área superficial, reactividad química y alta coordinación de superficie.¹⁶ Dichas propiedades han sido utilizadas en estudios dentro del campo de la medicina, utilizando las nanopartículas para transporte de fármacos.¹⁷ Por otro lado, en el

campo de la Química supramolecular, estas propiedades son utilizadas con la finalidad de remover contaminantes en soluciones acuosas.¹⁸

Estas últimas investigaciones han impulsado al desarrollo y mejora de los métodos de síntesis de las nanopartículas de óxido de hierro, estos métodos varían de acuerdo al tamaño o forma que se desee obtener en las nanopartículas, aunque las principales vías de síntesis podemos resumirlas en tres categorías:

1. Métodos físicos
2. Métodos químicos.
3. Métodos microbianos.

Para el presente trabajo se utilizó el método de coprecipitación, un método químico basado en la nucleación y crecimiento de núcleos de hidróxido de hierro,^{19,16} los cuales se precipitan al adicionar una base fuerte.

Actualmente el glifosato, un herbicida ampliamente utilizado (del cual se habla más adelante) se ha clasificado como probablemente cancerígeno, por lo que la problemática ambiental actual, así como las sorprendentes propiedades de las nanopartículas de hierro, han despertado la necesidad de desarrollar nuevos métodos de detección de contaminantes carboxílicos-organofosforados. En el presente trabajo, se han desarrollado nuevas nanopartículas recubiertas con unidades escuaramídicas, con el fin de captar glifosato. Actualmente en la bibliografía se encuentran reportados sistemas de detección de glifosato basados en el uso de nanopartículas de Au o Ln³⁺, ambos con la desventaja de ser altamente costosos.^{20,21}

1.2.1. ESTABILIZACIÓN Y FUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE Fe₃O₄ CON MOLÉCULAS ORGÁNICAS.

La gran facilidad de agregación de las nanopartículas de magnetita así como su alta sensibilidad al oxígeno, el cual produce su oxidación, ha promovido el uso de diversos materiales para recubrir la superficie de las nanopartículas favoreciendo así su estabilidad física y dispersión en diferentes medios, como por ejemplo el agua.

La estabilidad de las nanopartículas se puede alcanzar utilizando diferentes materiales como recubrimiento, algunos de los materiales utilizados para la estabilización de la superficie y tamaño de las nanopartículas están el ácido oleico²² o el 3-aminopropiltriethoxisilano (APTS),²³ estos dos tipos de recubrimiento han sido utilizados en nuestro grupo de investigación para la estabilización de nanopartículas de óxido de hierro obteniendo buenos resultados.

Por otro lado, la funcionalización de las NP de magnetita con moléculas orgánicas, supone un nuevo método de recubrimiento que evita la rápida degradación de las mismas y además agrega propiedades modificables dependiendo qué tipo de molécula orgánica se utilice. Estudios anteriores han demostrado que la introducción de grupos funcionales orgánicos sobre la superficie de las nanopartículas, promueven un comportamiento cooperativo, que no se observa en las unidades aisladas de ambos componentes.⁵ Estas observaciones han llevado a pensar en modificar la superficie de las NP de hierro con unidades de escuaramidas para el presente trabajo.

1.3. ESCUARAMIDAS Y DERIVADOS DEL ÁCIDO ESCUÁRICO.

Ahora bien, una vez explicada la importancia de la nanociencia y nanotecnología así como su influencia en el desarrollo de nuevas nanopartículas de óxidos de hierro, es necesario también destacar la importancia de las escuaramidas, sus propiedades y características que las hacen moléculas atractivas para su uso como receptores.

1.3.1. PROPIEDADES Y ESTRUCTURA DE LAS ESCUARAMIDAS.

Las escuaramidas son ciclos de cuatro miembros, derivados del ácido escuárico los cuales tienen una alta capacidad de formar hasta cuatro enlaces de hidrógeno, ésta propiedad está relacionada con un aumento en la aromaticidad del sistema.

Las escuaramidas fueron sintetizadas por primera vez en 1959 por Cohen, a partir del ácido escuárico, el cual se preparó a través de la hidrólisis del 1,3-dicloro-3,3,4,4-tetrafluorociclobuteno.²⁴ Este sistema ha atraído la atención ya que tiene la capacidad de formar un dianión (**Figura 1.1**). La formación de este dianión se ve favorecido por la deslocalización de los electrones π ,²⁵ lo que explica la capacidad del ácido escuárico a tener tendencia a ser más aromático a medida que se va desprotonando. Además es importante remarcar la doble acidez que caracteriza a este sistema ($pK_{a1}=0,54$; $pK_{a2}=3,58$).²⁶

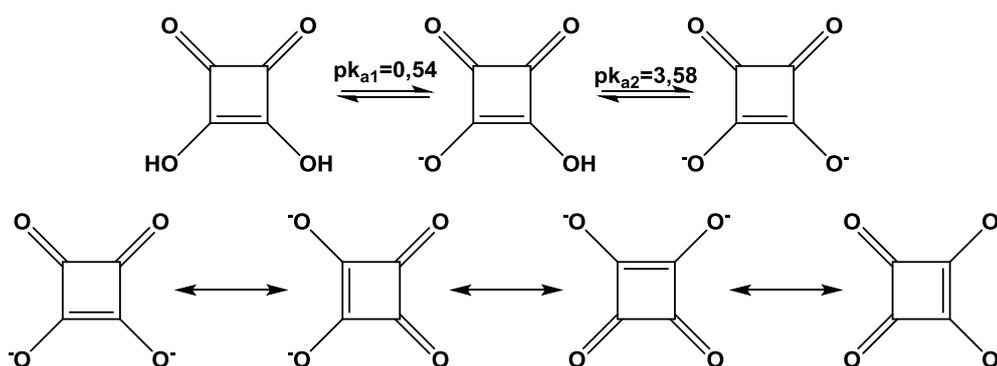


Fig. 1.1. Acidez y deslocalización de electrones del ácido escuárico.

Debido a la propiedad de las escuaramidas a formar enlaces de hidrógeno (**Figura 1.2A**), hace a las escuaramidas moléculas análogas a las amidas. Esta capacidad aceptor-donador se ve intensificada por la conjugación del grupo carbonilo con su sustituyente más alejado debido a la deslocalización del par de electrones libres del nitrógeno a través del sistema aromático ciclobutenodiona (**Figura 1.2B**). El dipolo representado por la forma zwitteriónica de las escuaramidas implica una cierta restricción en la rotación del enlace C-N.

Las escuaramidas poseen una estructura rígida y planar del anillo ciclobutenodiona que contiene dos carbonilos coplanares y dos NH que son casi coplanares. Esta estructura es estabilizada por las formas zwitteriónicas descritas en la **Figura 1.2B**, además esta disposición estructural ha inspirado a la comunidad científica a pensar que las escuaramidas pueden ser utilizadas para el reconocimiento molecular de cationes y aniones, a través de enlaces de hidrógeno. De hecho, estudios teóricos han demostrado que el carácter aromático parcial de las escuaramidas aumenta al máximo posible tras la formación de complejos con cationes y aniones.²⁷

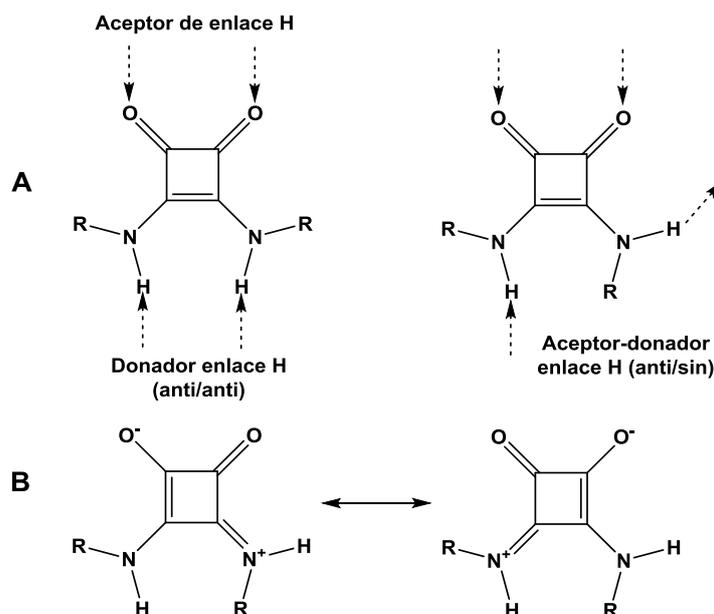


Fig. 1.2. A) Representación de los posibles enlaces de hidrógeno que pueden formar las escuaramidas según sea su conformación anti/anti o anti/sin. (B) Formas zwitteriónicas de las escuaramidas.

Estas interacciones cooperativas coinciden con la capacidad de complejación de los receptores escuaramídicos para fosfolípidos, cationes tetralquilamonio y aniones como carboxilatos, nitratos y sulfatos.

En consecuencia a la rotación interna restringida del enlace C-N de una escuaramida se produce una mezcla de conformeros (**Figura 1.3**) de los cuales sólo **1** y **2** han sido detectados por RMN, dicho estudio ha dado como resultado un valor energético en la interconversión entre ambos de ~ 63 kJ/mol; por el contrario, el conformero sin/sin **3** no ha sido observado, probablemente debido a la mayor energía libre de Gibbs causada por el impedimento estérico de los sustituyentes R.

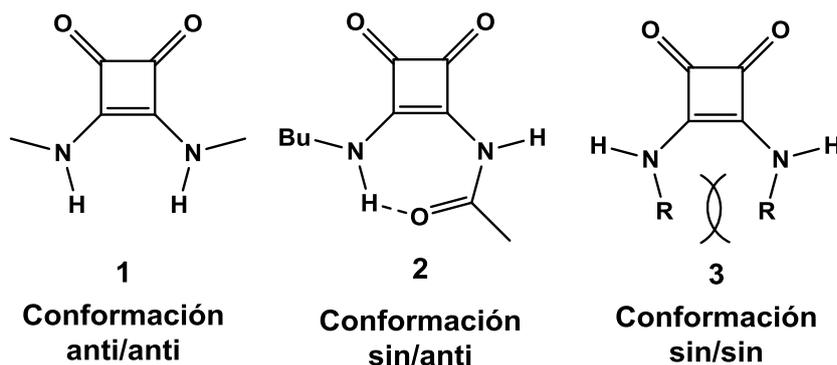


Fig. 1.3. Mezcla de conformeros de escuaramidas, de las cuales 1 y 2 han sido determinados por RMN.

Las escuaramidas al igual que las ureas tienen una gran capacidad para formar enlaces de hidrógeno, dicha capacidad ha sido medida con base en su constante de asociación (K_{as}) con diferentes aniones. Por ejemplo, se ha descrito que las K_{as} de carboxilatos con ureas en DMSO están en el rango entre 50 - 150 M^{-1} . En cambio, para las escuaramidas se ha demostrado experimentalmente que las K_{as} para complejos entre diescuaramidas y acetato de tetrametilamonio en DMSO, se encuentran entre 217 - 1980 M^{-1} .²⁷ Con base en estos resultados, se demuestra la

mayor capacidad que tienen las escuaramidas para formar enlace de H. Por otro lado, el hecho de que las escuaramidas tengan dos grupos carbonilo les permite formar interacciones más fuertes en un rango de posiciones más amplio que en las ureas, dado que éstas solo presentan un grupo carbonilo. Es importante mencionar que dicho comportamiento ha sido demostrado mediante estudios teóricos y experimentales.⁶

En definitiva la elevada afinidad para formar enlaces de hidrógeno, su estructura rígida y plana del anillo ciclobutenediona y sus constantes de asociación altas hacen a las escuaramidas una molécula de interés para el reconocimiento de aniones y cationes, promoviendo su uso como moléculas receptoras en química supramolecular.

1.3.2. USO DE ESCUARAMIDAS COMO RECEPTORES EN QUÍMICA SUPRAMOLECULAR.

Estudios anteriores, han demostrado que el uso combinado de escuaramidas junto con restos de trimetil yoduro de amonio, producen uniones favorables entre el sal de amonio y el anión carboxilato por medio de fuerzas de tipo polar. Esta fuerza electrostática se incrementa gracias a las unidades de escuaramida que establecen interacciones complementarias con los restos carboxilato por medio de enlaces de hidrógeno.⁷ Con base en estos estudios se han diseñado los dos diferentes receptores propuestos en el presente trabajo (**Figura 1.4**).

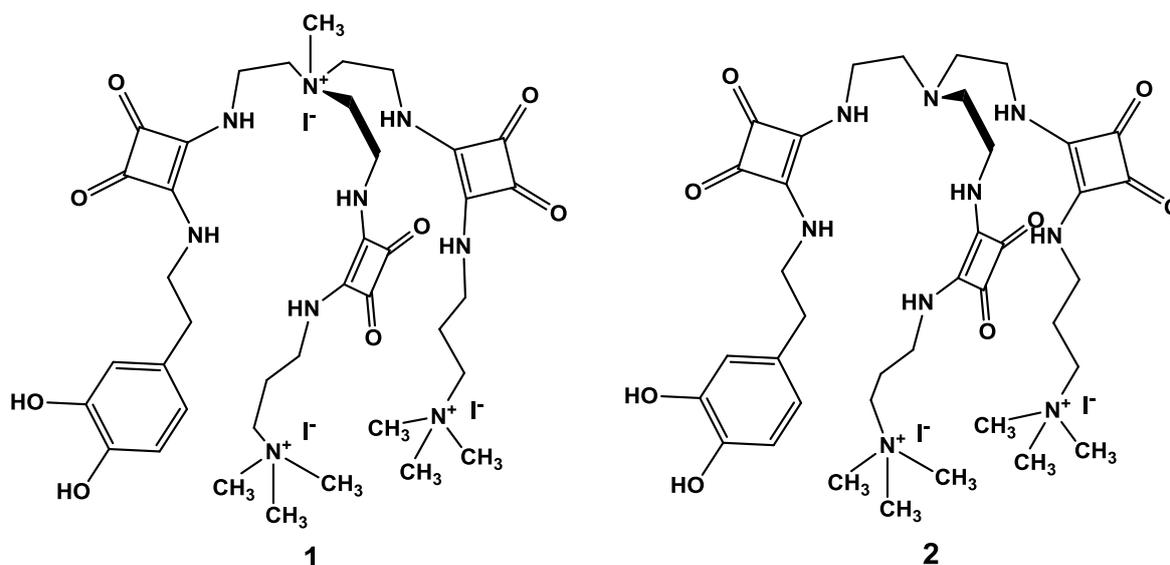


Fig. 1.4. Estructura de receptores para reconocimiento de compuestos carboxílicos-organofosforados

Para el acoplamiento covalente de la nanopartículas con estos restos escuaramídicos, se requiere de la presencia de una molécula "linker", en este caso, la dopamina es utilizada como unidad de conexión, la presencia de dos grupos hidroxilo donde los átomos de oxígeno reaccionan de forma preferente con el hierro, además de la presencia de una amina terminal en su estructura, haciendo de la dopamina una molécula versátil para el diseño de nuevos receptores.⁸

Receptores de estructura similar a la de las moléculas propuestas han sido estudiadas recientemente en el presente trabajo (**Figura 1.5**), dichos receptores se basan en unidades escuaramídicas formando receptores tripodales los cuales han

sido utilizados para el reconocimiento molecular formando complejos estables en agua.^{9,10} Estas características han llevado a diseñar un sistema junto con las nanopartículas de hierro, haciendo de los receptores propuestos un modelo de reconocimiento interesante para la detección de analitos de interés en temas de salud y medio ambiente. Recientemente se ha encontrado que la exposición continua a glifosato puede ser causante de cáncer, por lo que el diseño de un receptor capaz de reconocer esta molécula es de gran importancia para nuestro grupo de investigación.

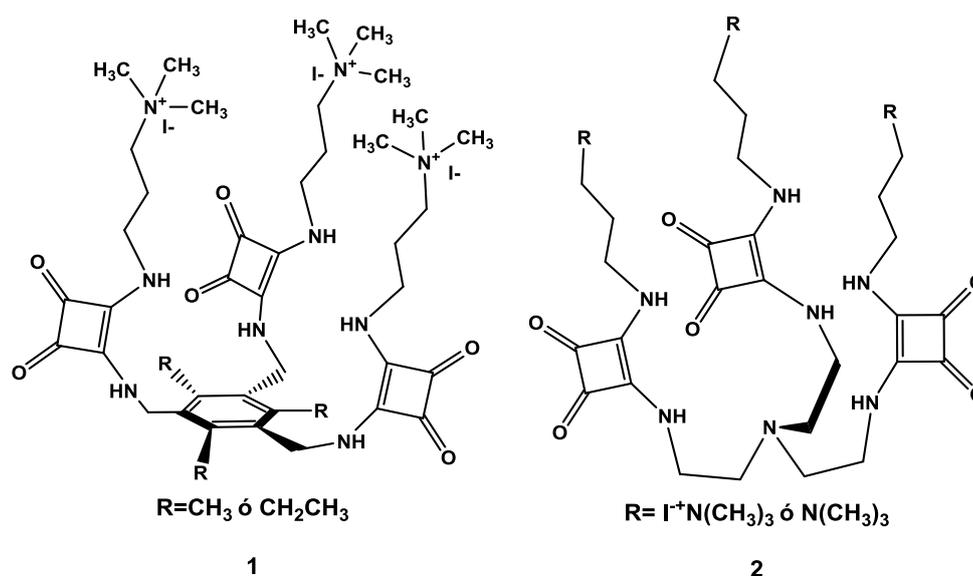


Fig. 1.5. Estructura de receptores tripodales reportados en la bibliografía.

1.4. GLIFOSATO. UN PELIGROSO HERBICIDA.

En las últimas décadas, debido al desarrollo agrícola se ha incrementado la demanda de agua y uso de suelo, reduciendo así la calidad de estos debido al creciente uso de productos químicos, especialmente por el uso indiscriminado de herbicidas utilizados con el fin de aumentar el rendimiento de las cosechas.

Actualmente, a nivel mundial, uno de los herbicidas más utilizados es el glifosato [N- (fosfometil) glicina],¹ siendo la sustancia activa de más de 750 productos diferentes en todo el mundo. De acuerdo con lo reportado por *Green Peace* España en 2015, éste herbicida está autorizado en alrededor de 125 productos. Este producto ha sido comercializado desde 1974 con diferentes nombres tales como Roundup®, Roundup Pro®, Roundup PowerMAX™, Roundup WeatherMAX®, y AquaMaster®, de acuerdo con el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos en 2005 y 2006 este producto ha sido utilizado en un 31% de los cultivos de maíz y en el 92% de los cultivos de granos de soya.

El principal problema de este tipo de herbicida es su utilización en una gran variedad de actividades no sólo en zonas agrícolas sino también en las zonas urbanizadas para evitar el crecimiento de la conocida “mala hierba” en las aceras y zonas pavimentadas, o bien, como tratamiento de tierras utilizadas de forma ilícita para el cultivo de la planta de coca y marihuana, ocasionando la contaminación de la tierra y los mantos acuíferos que estén cerca de las zonas afectadas, por lo que las principales vías de exposición que tiene el ser humano a este contaminante son de

diversos tipos, siendo las principales la alimentación y el agua de consumo humano, la **Figura 1.6** muestra las diferentes vías de exposición.



Fig. 1.6. Diferentes vías de exposición al glifosato

Este probable carcinógeno ha sido detectado en el agua y aire de las zonas cercanas de diversos cultivos; su hallazgo enciende focos de preocupación para desarrollar de manera expedita, métodos de detección eficientes para el tratamiento del suelo y aguas contaminadas.

1.4.1. EFECTOS DEL GLIFOSATO SOBRE LA SALUD

Recientemente, este herbicida ha sido clasificado por la Organización Mundial de la Salud como “Probablemente cancerígeno”. Esta clasificación se basa en la evidencia limitada en seres humanos pero en una fuerte evidencia de que es cancerígeno para los animales. También se sospecha que actúa como un disruptor endocrino y que es tóxico a nivel del aparato reproductor.²

En la actualidad, se han llevado a cabo diversos estudios en ratones revelando que este pesticida induce una tendencia positiva en la incidencia de un tumor poco frecuente que afecta a los túbulos renales, por otro lado, un segundo estudio ha encontrado una tendencia a incrementar las células cancerígenas en los islotes pancreáticos, lo que produce un hemangiosarcoma en estos animales. Como ya se ha mencionado anteriormente, existen diversas formulaciones que contienen el glifosato como principio activo, estudios realizados a varias presentaciones comerciales han demostrado promover la formación de tumores en la piel.²⁸ Por otro lado el glifosato y AMPA inducen estrés oxidativo en roedores y en células por ensayos vitro.

De acuerdo a estudios realizados en humanos, el glifosato ha sido detectado en sangre y orina de trabajadores agrícolas, indicando la absorción por diversas vías (respiratoria, tópica u oral), además, es conocido que los microorganismos del suelo

degradan el glifosato al ácido aminometilfosfórico (AMPA), este ácido ha sido detectado en la sangre después de intoxicaciones, lo que sugiere que la biota intestinal humana es capaz de metabolizar este herbicida y producir el metabolito correspondiente. Además diversos estudios han demostrado que el glifosato y sus diferentes formulaciones inducen daño cromosomal y al ADN en mamíferos y en células humanas. Otros estudios informaron un aumento en los marcadores sanguíneos de daño cromosómico (micronúcleos) en los residentes de varias comunidades después de la fumigación con formulaciones de glifosato.²⁹

Además de estos estudios existen muchos más de tipo epidemiológico observacional que ayudan a demostrar una fuerte correlación de la exposición del glifosato con diversos tipos de cáncer en adultos y niños.³⁰ Por lo que, con base en toda la evidencia recaudada, la IARC (International Agency for Research on Cancer) ha clasificado el glifosato como "probablemente cancerígeno para los seres humanos" dentro del grupo 2A, lo que significa que no se tiene suficiente evidencia de carcinogenicidad en humanos pero que existe suficiente evidencia en animales de experimentación.³¹

1.4.2. EFECTOS DEL GLIFOSATO SOBRE EL MEDIO AMBIENTE.

El uso de glifosato tiene graves impactos en el medio ambiente, afectando tanto a animales y plantas como seres humanos, además de contaminar los suelos y el agua. Existen diversos estudios que demuestran que el glifosato tiene un impacto perjudicial sobre los organismos acuáticos, desde algas microscópicas hasta peces y moluscos,³² incluso afectando también a organismos del suelo, como las lombrices de tierra, fundamentales para mantener e incrementar la fertilidad del suelo. Por otro lado, el uso del glifosato puede tener un impacto directo en plantas no-objetivo conduciendo a una pérdida de especies silvestres, por lo que el uso de este herbicida también impacta en la reducción generalizada de la diversidad y cantidad de especies y puede afectar a seres vivos cruciales en diversas cadenas que mantienen el ecosistema estable.³³

Por otro lado, el uso indiscriminado de este producto, sobretodo en cultivos transgénicos que son tolerantes a él, hace que la maleza se vuelva mucho más resistente y sea aun mas difícil de erradicar, conllevando a aumentar el uso de sustancias químicas y las concentraciones utilizadas, incrementándose con ello el coste de producción y disminuyendo las ganancias para los agricultores.

1.4.3. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES QUÍMICAS

El glifosato es un análogo aminofosfónico del aminoácido natural glicina. El glifosato posee diferentes estados iónicos en función del pH (**Figura 1.9**). Tanto el ácido fosfónico y restos de ácido carboxílico pueden ser ionizados, y el grupo amina se puede protonar. Por otro lado, su solubilidad en agua es de 12 g/L a temperatura ambiente y fue sintetizado por primera vez mediante la reacción del tricloruro de fósforo con formaldehído seguido de hidrólisis para dar un fosfonato llevado a reaccionar posteriormente con la glicina para producir glifosato, y su nombre se toma como una contracción de los compuestos usados en esta síntesis (**Figura 1.7**)

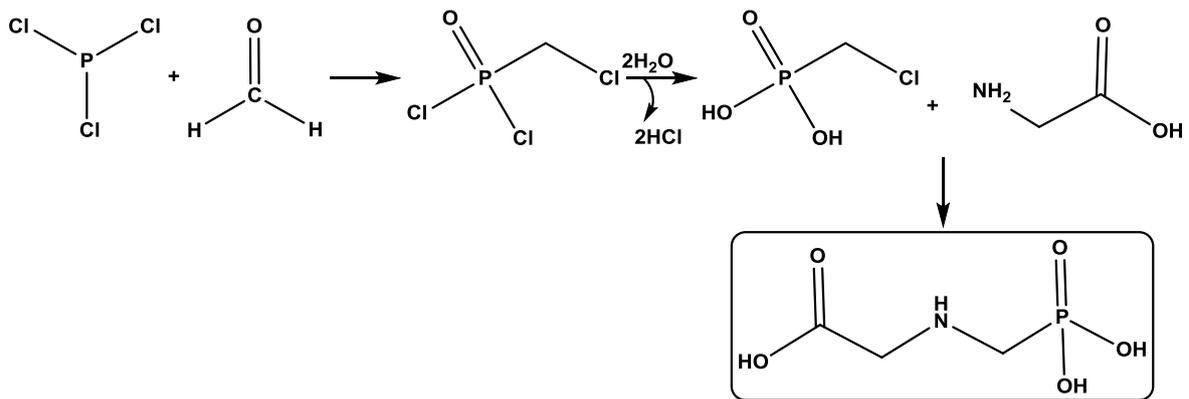


Fig. 1.7. Primer ruta sintética de glifosato

El glifosato es parte del grupo de los fosfonados, pertenecientes a un grupo de compuestos de estructura similar a la clase de los organofosfatos sólo que difieren en la sustitución de los átomos de oxígeno unidos al fósforo, por un grupo aminoácido sencillo llamado glicina, su estructura se muestra en la **Figura 1.8**

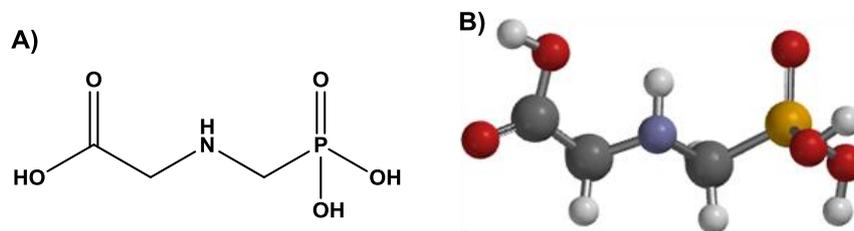


Fig. 1.8. A) Formula estructural del Glifosato y B) Representación de Glifosato por muelles y bolas (Spartan '10)

El glifosato presenta un comportamiento zwitteriónico, con diversas constantes de ionización, las cuales se muestran en la **Figura 1.8**.

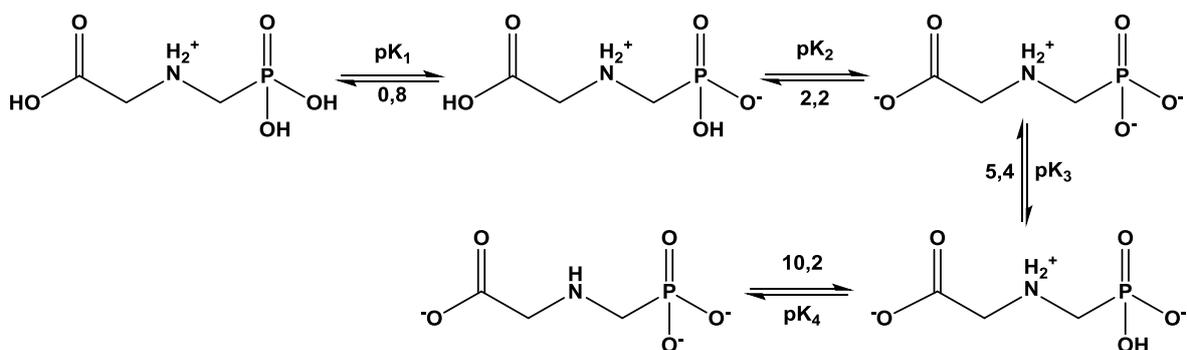


Fig. 1.9. Diferentes constantes de ionización del glifosato.

Estas diferentes constantes de ionización determinan la fuerza ácida de glifosato en solución acuosa, de acuerdo a ellas, el glifosato es un ácido débil cuando está en su forma completamente desprotonada.³

1.4.4. MECANISMOS DE DEGRADACIÓN DEL GLIFOSATO

La degradación juega un papel importante en la reducción de la concentración de diversos contaminantes en el suelo, ya que impide el transporte de estos compuestos hasta los mantos acuíferos.

La degradación de una sustancia química en el suelo puede llevarse a cabo por diversas rutas y por diversos intermediarios, algunas de estas rutas de degradación son: la química, la fotólisis o mediante catálisis bioquímica utilizando microorganismos presentes en el suelo, ésta última ruta es también conocida como ruta de biodegradación, siendo ésta la más importante en el caso de degradación de herbicidas en suelos y aguas.

La degradación de los herbicidas en el medio ambiente depende de la naturaleza del compuesto, además es importante tomar en cuenta la temperatura, el tipo de agua a tratar, la profundidad del suelo, el tipo de población microbiana (biomasa microbiana) y el contenido de oxígeno ya que por lo general las rutas de biodegradación implican procesos de oxidación.³⁴ Para la degradación del glifosato hay dos rutas de degradación microbiana, la primera implica la producción del metabolito AMPA, la segunda se produce por la ruptura de enlace C-P por acción de una enzima, produciendo sarcosina.³⁵ En la **Figura 1.9** se muestran las 2 rutas de degradación.

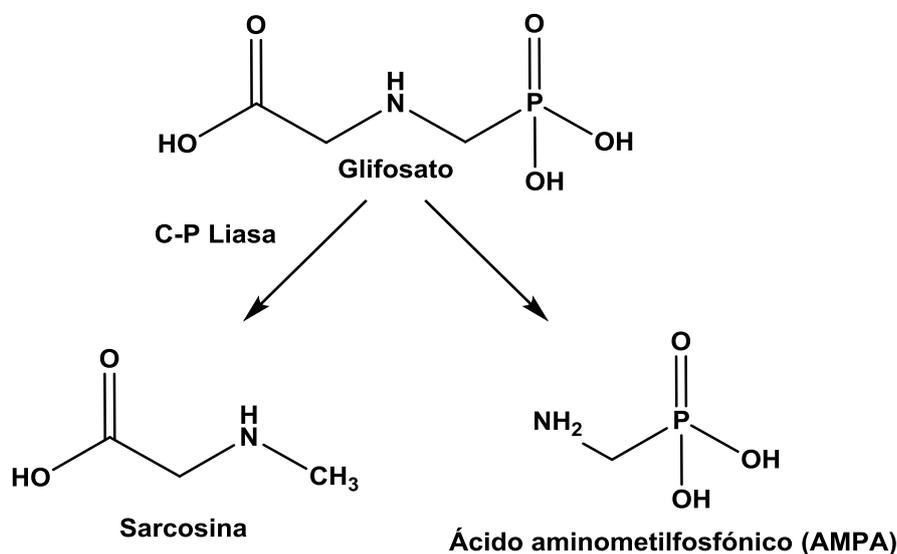


Fig. 1.9. Rutas de degradación del glifosato.

La degradación del glifosato es un proceso muy rápido y es realizado por una gran variedad de microorganismos que usan el fósforo como una fuente de energía, produciéndose con ello el principal de los metabolitos AMPA el cual tiene un tiempo de vida media de entre 119 – 958 días y es mucho mayor al tiempo de vida del glifosato que solo es de 3 días.⁴

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GENERALES

La creciente problemática ambiental así como el desarrollo cada vez más especializado del campo de las nanotecnología han hecho plantearnos los objetivos generales, los cuales se desarrollan a lo largo de este Trabajo de Fin de Máster.

- ❖ Síntesis y caracterización de moléculas orgánicas que tienen como base una estructura escuaramídica.
- ❖ Síntesis y caracterización de nanopartículas de óxidos de hierro funcionalizadas.
- ❖ Evaluación del comportamiento supramolecular de 3 diferentes tipos de nanopartículas de óxidos de hierro funcionalizadas, estudiando su capacidad para actuar como receptores de glifosato.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Dadas las características de las nanopartículas magnéticas de óxidos de hierro así como las de las escuaramidas, además de la evidencia de estudios anteriores realizados en nuestro grupo de investigación, en este trabajo se decidió estudiar la capacidad del conjunto NP-escuaramida como receptores para glifosato, planteando así los siguientes objetivos específicos.

- ❖ Síntesis y caracterización de nuevas moléculas orgánicas las cuales tienen como base estructuras escuaramídicas para el posterior acoplamiento con nanopartículas de óxidos de hierro, en el que todas las escuaramidas sintetizadas tendrán en uno de sus extremos un agente de unión o “linker” adecuado para esta reacción. La caracterización de todas las nuevas moléculas se realizará a través de las técnicas de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H (^1H -RMN), Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C (^{13}C -RMN), Espectrometría de Masas (EM) y Espectroscopía Infrarroja (IR).
- ❖ Síntesis y caracterización de nanopartículas de óxido de hierro (Fe_3O_4) funcionalizadas con las diferentes moléculas sintetizadas, donde la caracterización básica para comprobar la correcta funcionalización de las nanopartículas se realizará a través de IR, TGA (Análisis termogravimétrico), SEM (Microscopía electrónica de barrido) y Desorción/Ionización Láser asistida por Matriz (MALDI).
- ❖ Evaluación de la capacidad de reconocimiento de glifosato que presentan las nanopartículas de óxidos de hierro en disoluciones acuosas. Para ello se realizarán experimentos de Resonancia Magnética Nuclear mediante el seguimiento de las señales de integración de un patrón de referencia contra las señales de una concentración conocida de glifosato después de la interacción con las nanopartículas funcionalizadas.
- ❖ Estudio comparativo de la capacidad reconocimiento de glifosato de las nanopartículas sintetizadas y funcionalizadas en este trabajo contra nanopartículas sintetizadas previamente en nuestro grupo de investigación.

3. METODOLOGÍA Y RESULTADOS

3.1. DISEÑO DE 3 NUEVOS RECEPTORES DERIVADOS DE ESCUARAMIDAS UTILIZANDO EL TRIS (2-AMINOETIL) AMINA COMO MOLÉCULA CENTRAL (TREN).

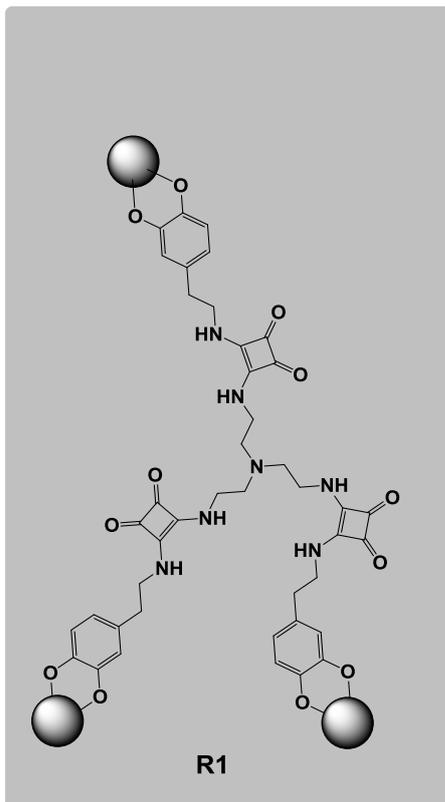
La química supramolecular es un término que fue definido por primera vez por el Dr. Jean-Marie Lehn como “La química de los enlaces intermoleculares, cubriendo las estructuras y funciones de las entidades formadas por asociación de dos o más especies químicas”.¹¹ Con base en este concepto, surge el desarrollo de sistemas químicos de alta complejidad a partir de componentes que interactúan mediante fuerzas intermoleculares no covalentes. En la literatura existen muchos ejemplos de estos sistemas químicos, pudiendo abarcar desde sistemas biológicos donde intervienen un número elevado de moléculas, hasta conjuntos de pocas moléculas que sufren un fenómeno de autoensamblaje molecular. Estos sistemas químicos son actualmente utilizados en una gran variedad de campos de investigación y de la industria, entre las diversas aplicaciones destacan los sistemas de reconocimiento que simulan a organismos biológicos, la fabricación de medicamentos y la creación de materiales para la remediación ambiental.

En consecuencia, el diseño de nuevos receptores capaces de reconocer selectivamente moléculas es una de las tareas a las que hoy se enfrenta la comunidad científica. La importancia en el desarrollo radica en la infinita cantidad de analitos que es necesario detectar de forma selectiva y sensible, logrando así sistemas que en ayuda con otras disciplinas puedan construir detectores moleculares.

En la **Figura 3.1** se muestran los 3 diferentes receptores propuestos a desarrollar en el presente trabajo. Estos receptores tienen la capacidad de reconocer glifosato, que como se ha mencionado en el apartado de introducción, es el principio activo de más del 80% de los herbicidas de venta en el mercado y que actualmente se sospecha que puede generar graves trastornos a la salud.

Para el diseño de estos receptores se ha tomado como base diversos estudios anteriores, los cuales han demostrado que el uso combinado de escuaramidas junto con restos de trimetil yoduro de amonio, producen uniones favorables entre las sales de amonio y el anión carboxilato por medio de fuerzas de tipo polar. Esta fuerza electrostática se incrementa gracias a las unidades de escuaramida que establecen interacciones complementarias con los restos carboxilato por medio de enlaces de hidrógeno.⁸ Referenciando estos estudios, se han diseñado tres diferentes receptores, los cuales han sido sintetizados por medio de dos diferentes vías: 1) Síntesis orgánica y posterior funcionalización de las NP o 2) Síntesis directamente sobre la NP.

1) Síntesis orgánica y posterior funcionalización de NP



2) Síntesis orgánica sobre NP

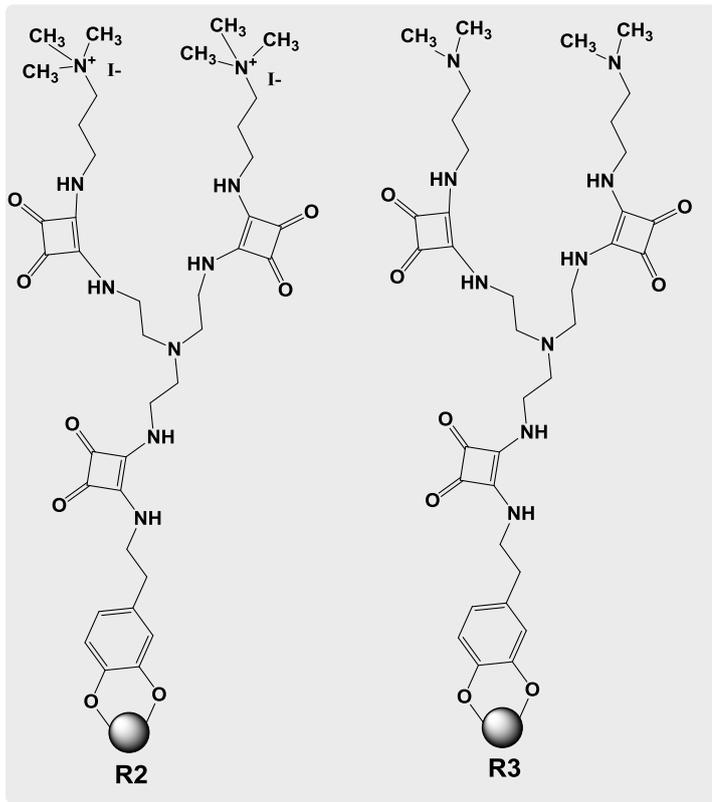


Fig. 3.1. Receptores sintetizados para la detección de glifosato.

3.2. SÍNTESIS ORGÁNICA Y FUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS.

3.2.1. SÍNTESIS DE RECEPTOR R1.

La ruta sintética seguida para la obtención del receptor R1, ha sido la siguiente:

- 1) Síntesis y caracterización de C2.
- 2) Síntesis de C4 a partir de C2 y TREN.
- 3) Funcionalización de NP con C4

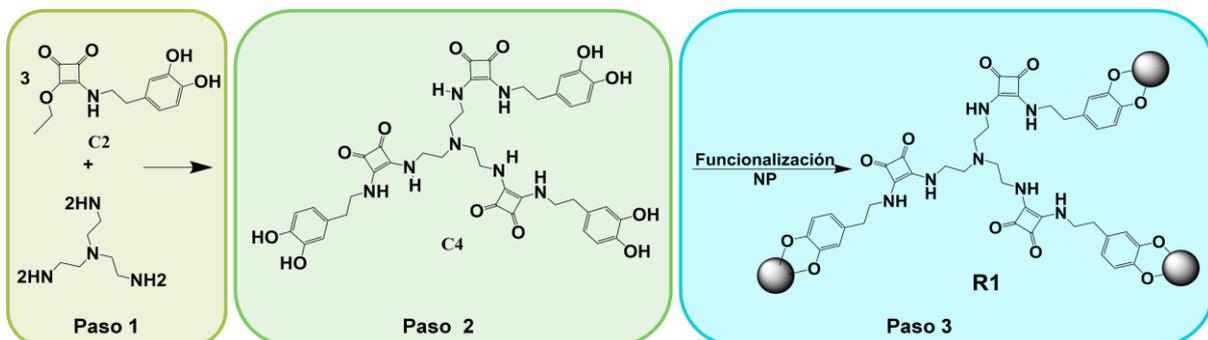


Fig. 3.2 Ruta sintética para la obtención de R1

3.3. SÍNTESIS ORGÁNICA SOBRE NP.

3.3.1. SÍNTESIS DE RECEPTOR R2 y R3

Para la obtención de los receptores R2 y R3, se han seguido la siguiente ruta sintética, la cual se divide en varias fases:

- 1) Síntesis y caracterización de las moléculas C1 y C2
- 2) Obtención de C5 a partir de C1 y C2
- 3) Funcionalización de NP con C5
- 4) Síntesis sobre NP a partir de K1 y K2

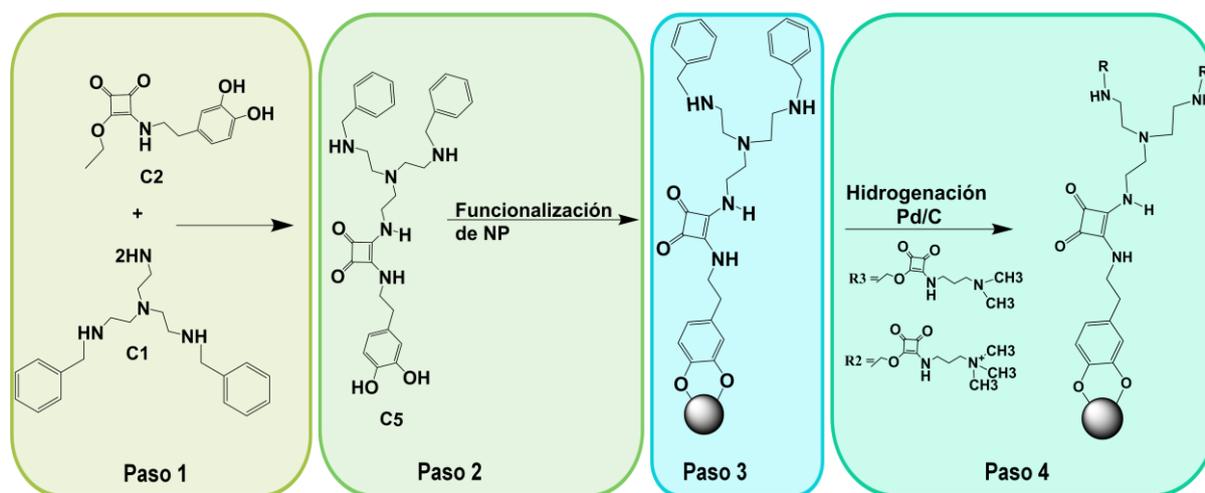


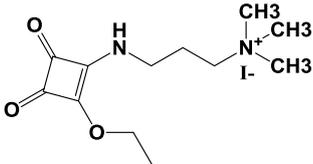
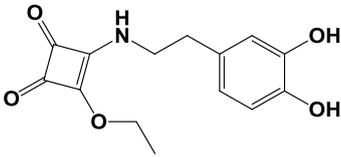
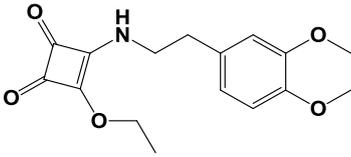
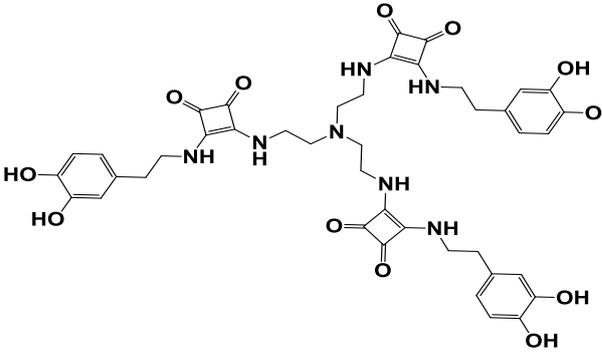
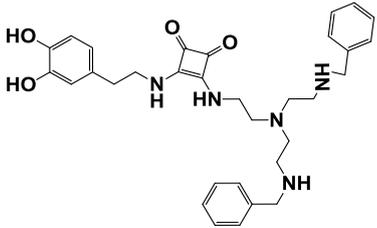
Fig. 3.3. Ruta sintética para la obtención de R2 y R3

3.4. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE MOLÉCULAS ORGÁNICAS

En la **Tabla 3.1** se muestran las estructuras y número dado a cada una de las moléculas orgánicas sintetizadas en el presente trabajo, así como su información general.

Tabla 3.1. Productos sintetizados | utilizados

Producto	Estructura	Información general
C1		Fórmula química: $C_{20}H_{30}N_4$ Peso molecular: 326,49 g/mol
K1		Fórmula química: $C_{11}H_{18}N_2O_3$ Peso molecular: 226,28 g/mol

K2		Formula química: $C_{12}H_{21}IN_2O_3$ Peso molecular: 368,21 g/mol
C2		Formula química: $C_{14}H_{15}NO_5$ Peso molecular: 277,28 g/mol
C3		Formula química: $C_{16}H_{19}NO_5$ Peso molecular: 305,33 g/mol
C4		Formula química: $C_{42}H_{45}N_7O_{12}$ Peso molecular: 839,86 g/mol
C5		Formula química: $C_{32}H_{39}N_5O_4$ Peso molecular: 557,69 g/mol

3.4.1. ELECCIÓN DE GRUPO PROTECTOR.

La protección de grupos funcionales es una estrategia sintética que se aplica cuando se desea efectuar una reacción de un grupo funcional en presencia de otros u otros grupos funcionales más reactivos. En este trabajo se realizó la mono protección de uno de los grupos amino del TREN (tris (2-aminoetil) amina) con BOC_2O (Di-tert-butil dicarbonato), siguiendo la síntesis reportada.³⁶ El producto obtenido de esta reacción se utilizó para posterior sustitución de los grupos amino no protegidos con las diescuaramidas K1 y K2, respectivamente. De esta última reacción no se logró la purificación de producto final, debido a que no se encontró una diferencia marcada en la solubilidad entre el producto y los reactivos, lo que dificultó el separar el producto final. Por otro lado, al seguir con la reacción de desprotección, con ácido trifluoroacético, y la posterior basificación del medio, el

producto se quedaba en la fase acuosa y no se logró separar de las sales formadas, por lo que se descartó esta ruta de síntesis.

En consecuencia, se propuso un cambio en el grupo protector que disminuyera la polaridad del producto final obtenido y así lograr purificarlo mediante extracción en una fase orgánica; éste cambio de polaridad se obtuvo mediante la inserción de un grupo fenilo, con el cual se realiza una di-protección de los grupos amino del TREN. Esta reacción se realizó utilizando MeOH como disolvente y NaBH₄ como agente reductor, siguiendo la metodología reportada,³⁷ seguido de una purificación por columna utilizando una mezcla de disolventes CHCl₃: MeOH: NH₄OH como fase móvil. En la **Figura 3.4** se muestran las dos diferentes rutas de síntesis seguidas para la protección del TREN.

Posteriormente, en el grupo amino desprotegido se inserta la diescuaramida C2, la cual será utilizada como molécula “linker” para su posterior unión con las NP.

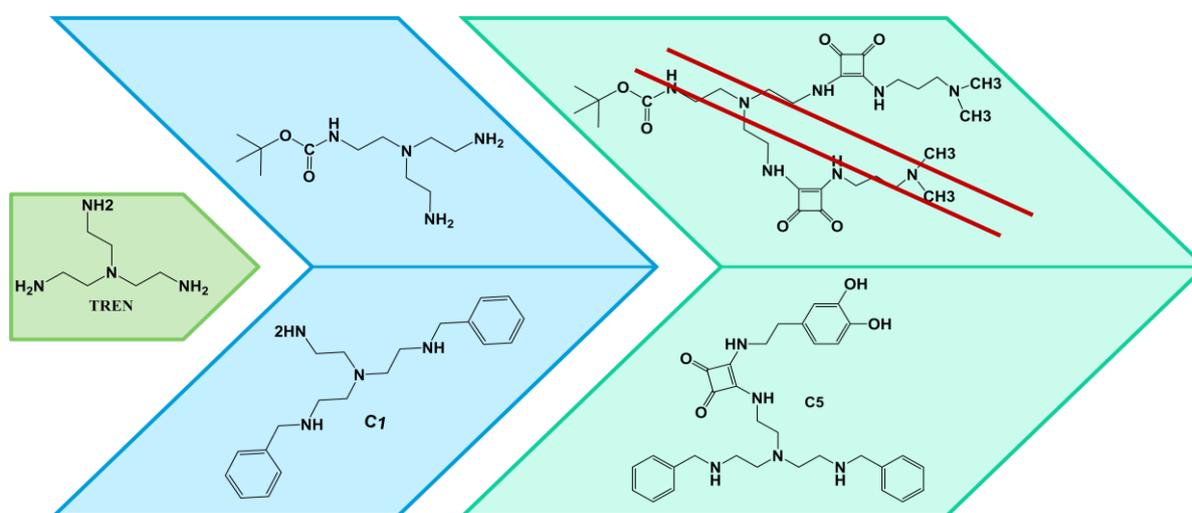


Fig. 3.4. Diferentes rutas de síntesis para la obtención de TREN mono o di protegido.

3.4.2. SÍNTESIS DE ESCUARAMIDAS.

La síntesis de escuaramidas ha sido optimizada y ampliamente investigada en los últimos años. Esta molécula orgánica es de gran interés sintético ya que los ésteres (metílico, etílico, etc.) del ácido escuárico proveen la facilidad de formar enlaces covalentes a partir de una amina alifática en condiciones suaves de reacción. Por otro lado, los rendimientos de este tipo de reacciones suelen ser elevados, esto convierte a la escuaramidas en foco de atención para diversas rutas sintéticas.

La síntesis de escuaramidas se fundamenta en la fácil condensación del escuarato de dietilo con aminas primarias o secundarias. Variando las condiciones de reacción, fundamentalmente el tipo de disolvente utilizado, permite obtener monoescuaramidas-éster o diescuaramidas.

Particularmente las monoescuaramidas-éster, también conocidas como semiescuaramidas, son las moléculas de interés en el presente trabajo.

SÍNTESIS DE SEMIESCUARAMIDAS K1 Y K2.

Para la síntesis de las semiescuaramidas K1 y K2, se siguió la metodología descrita anteriormente en nuestro grupo de investigación. Tal como se muestra en la

Figura 3.5, se emplea 1 equivalente de la amina 3-dimetilaminopropilamina, utilizando éter dietílico como disolvente a temperatura ambiente obteniéndose así K1. Posteriormente, a partir de K1 se obtiene la sal de amonio K2, utilizando 1 equivalente de yoduro de metilo en DMF/Acetona.

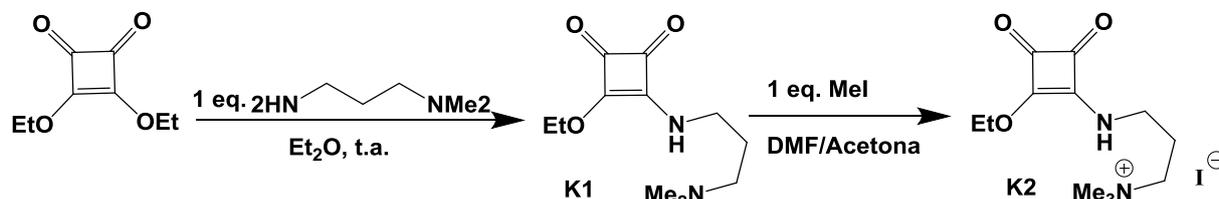


Fig. 3.5. Esquema sintético de la ruta de síntesis de las semiescuramidas K1 y K2.

SÍNTESIS DE DIESCURAMIDAS C2-C5

En la **Figura 3.6** se muestra un resumen de todas las diescuramidas sintetizadas para su posterior funcionalización con nanopartículas de óxido de hierro.

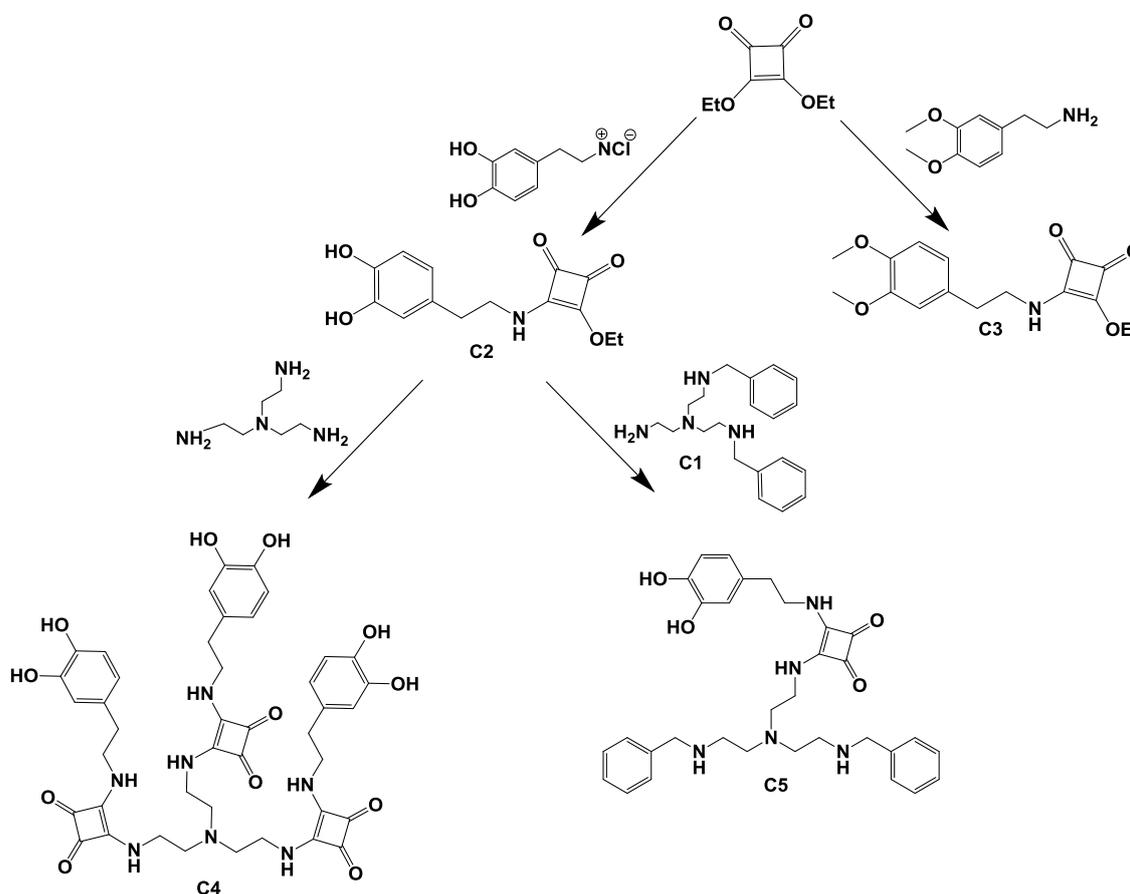


Fig. 3.6. Resumen sintético de las diescuramidas preparadas.

Para la síntesis de la diescuramidas C2 se siguió la metodología partiendo del escuarato de dietilo y el clorhidrato de dopamina, utilizando metanol como disolvente, en esta reacción uno de los grupos éter del escuarato reacciona con el grupo amino de la dopamina (**Figura 3.7**). Además, es importante la adición de carbonato de sodio Na_2CO_3 para producir la desprotonación de la amina y ditionito de sodio $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ para evitar la oxidación de la dopamina a la forma de orto-quinona (que se observa claramente con un cambio de color en la disolución de la dopamina,

que va desde rosa hasta un color café muy oscuro). La reacción transcurre durante 12 h y posteriormente el producto es precipitado con éter dietílico con rendimientos por encima del 60%. Esta reacción es necesario que este aislada del oxígeno del aire y de la luz, manteniendo la mezcla de reacción en atmosfera de argón en la oscuridad.

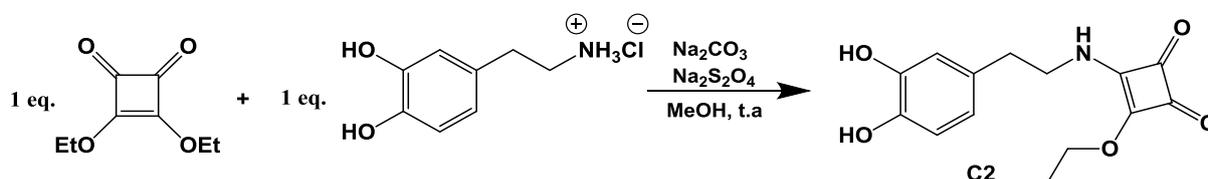


Fig. 3.7. Síntesis de diescuramida C2.

La diescuaramida **C3** es de gran interés ya que en lugar de tener los fenoles del catecol, se tienen grupos metoxi, esto proporciona una molécula precursora con la cual es posible calcular la constantes de asociación a través de una valoración por ITC (Isothermal Titration Calorimetry), en donde el equilibrio ácido-base de los fenoles no interfiere en el cálculo. Desafortunadamente, por dificultades a lo largo de la experimentación, no se obtuvo el receptor final para obtener valoraciones por ITC y estos cálculos no se realizaron.

La síntesis de **C3** se obtuvo mediante la condensación de la amina del dimetoxifenil etil amina con el escuarato de dietilo, empleando éter como disolvente (**Figura 3.8**), al final de la reacción se obtiene la diescuaramida que precipita por su insolubilidad en éter con un rendimiento del 80%.

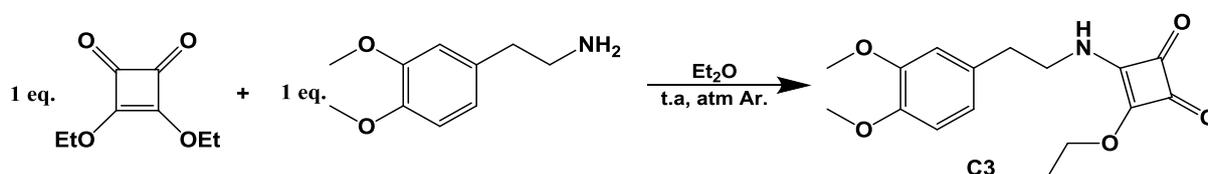


Fig. 3.8. Síntesis de diescuramida C3.

A partir del producto C2 se obtuvo la diescuaramida C5 (**Figura 3.9**) por medio de la condensación de la amina de C1 con la mono diescuaramida C2 utilizando etanol como disolvente y precipitando el producto final con éter, con un rendimiento del 43%.

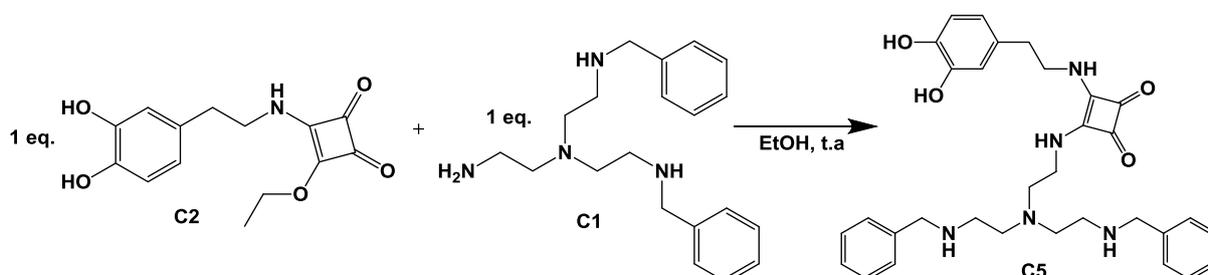


Fig. 3.9. Síntesis de diescuaramida C5.

La preparación de la escuaramida C4 se obtuvo a partir de una triple condensación de los tres grupos amino de 1 equivalente de TREN con 3.2

equivalentes de la diescuaramida C2 (**Figura 3.10**), utilizando metanol como disolvente. Esta reacción es necesario que se lleve a cabo aislada del oxígeno y de la luz, manteniendo la mezcla de reacción en atmosfera de argón en la oscuridad. Al término del tiempo de reacción se obtuvo un sólido color marrón con un rendimiento del 73%

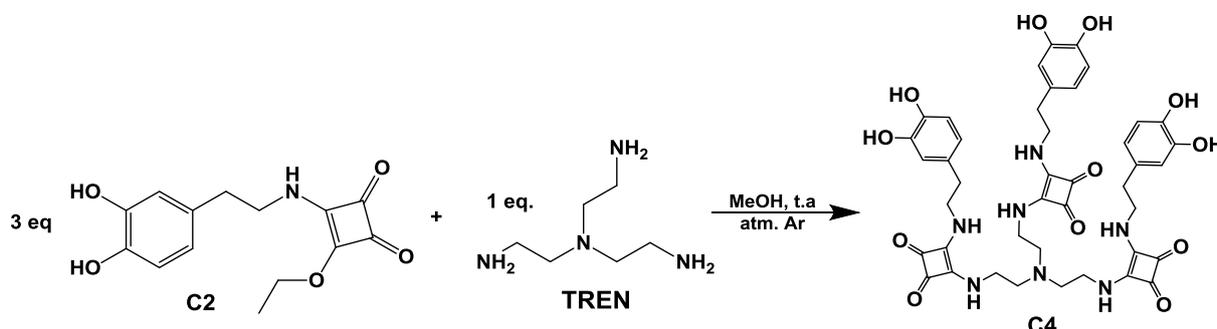


Fig. 3.10. Síntesis de escuaramida C4.

3.5. SINTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE HIERRO FUNCIONALIZADAS CON ESCUARAMIDAS

Hoy en día el uso de nanopartículas se ha intensificado debido a su amplia variedad de aplicaciones que van desde el uso en electrónicos hasta sus aplicaciones en el mundo de la biología y medicina.

Uno de los campos más importantes en los que se ha comenzado a desarrollar un sin número de investigaciones basadas en el uso de nanopartículas, es en el área medio ambiental. La creciente contaminación derivada del uso indiscriminado del suelo utilizado para cultivo, así como el uso de fertilizantes y pesticidas han comenzado a ser foco de investigación sobre los diversos impactos hacia la salud ocasionados por estos contaminantes, surgiendo de este modo la necesidad de encontrar nuevos métodos para la detección y captura de diversas moléculas presentes en diferentes productos de uso agrícola. Una de las moléculas con mayor importancia es el Glifosato.

En consecuencia, se han comenzado a utilizar las nanopartículas como medios de transporte de diferentes moléculas, las cuales recubren la nanopartículas dándole nuevas y mejores propiedades, formando así nuevos materiales híbridos altamente versátiles los cuales pueden desarrollar funciones especializadas.

En los últimos años, el número de métodos desarrollados para la síntesis de nanopartículas de óxido de hierro ha crecido sustancialmente. La síntesis de nanopartículas en este trabajo se hizo por medio del método de coprecipitación, el cual consiste en la mezcla de iones férrico y ferroso en una proporción molar 1:2 en disoluciones. El tamaño y forma de las NP obtenidas dependen del tipo de sal empleada (cloruros, sulfato, nitratos, percloratos, etc.), la proporción de iones férrico y ferroso, la temperatura de reacción, los valores de pH, la fuerza iónica del medio y de otros parámetros de reacción como la velocidad de agitación y velocidad de adicción de la disolución básica. Pequeñas modificaciones de estos parámetros, fundamentalmente en la temperatura de reacción, afectan críticamente a las propiedades físicas y químicas de las NP.

Los óxidos de hierro (Fe_3O_4 o bien $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) se preparan en una proporción estequiométrica entre sales ferrosas y férricas en medio acuoso. La reacción química que se lleva a cabo para la formación de Fe_3O_4 es la siguiente:



La completa precipitación de Fe_3O_4 se consigue a un valor de pH de entre 8-14, con una relación estequiométrica de 2:1 ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) en una atmósfera de Argón para evitar la oxidación del hierro, ya que la estabilidad de la magnetita se ve afectada por la presencia de oxígeno, convirtiéndose en maghemita ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$), según la ecuación:



Posteriormente, la funcionalización de NP con moléculas orgánicas se puede realizar por medio de dos rutas diferentes, tal como se muestra en la **Figura 3.11**. La primera de ellas (**Figura 3.11 A**) es una funcionalización por pasos, donde inicialmente se recubre la superficie de la nanopartículas con un “linker” apropiado y, a partir de los grupos reactivos libres de dicho “linker”, se procede a seguir con la síntesis sobre la nanopartículas con diferentes moléculas de interés. La segunda metodología (**Figura 3.11 B**) se basa en sintetizar primero la molécula final que se quiere unir a la nanopartícula, con el “linker” en uno de sus extremos, y finalmente realizar el acoplamiento a la superficie de la nanopartícula.

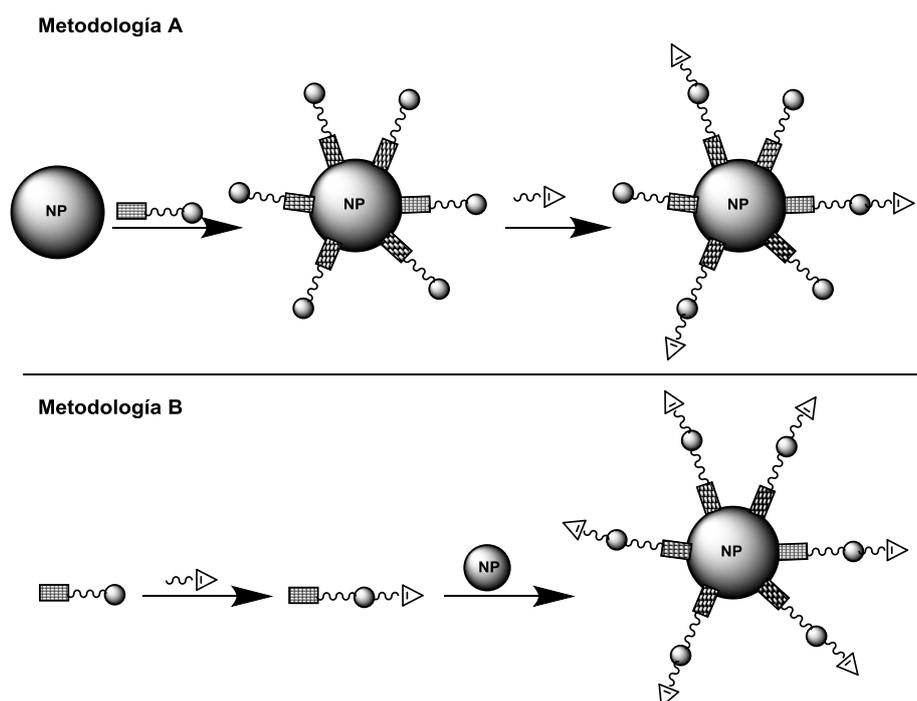


Fig. 3.11. Representación esquemática de las dos metodologías para funcionalizar nanopartículas de óxido de hierro

En el presente trabajo, se realizó la funcionalización de las nanopartículas mediante las dos metodologías existentes. Por un lado el receptor R1 fue sintetizado mediante la metodología A y en cambio los receptores R2 y R3, han sido sintetizados por medio de la metodología B, donde primero se ha insertado la molécula “linker” (C5) y posteriormente se siguió con la síntesis sobre la nanopartícula (**Figura 3.3**).

Realizar síntesis siguiendo la metodología A o B, tiene diversas ventajas y desventajas, ya que existen diversos factores que afectan el rendimiento de la reacción. En el caso de la metodología A, se logra conseguir tener el máximo número de receptores sobre la superficie, ya que el grado de funcionalización dependerá solamente del impedimento estérico que se genere entre las cadenas.

Esto por el contrario en la metodología B, si las nanopartículas se funcionalizan inicialmente con el “linker” y se hacen reaccionar con las escuaramidas en un segundo paso, el grado de funcionalización con escuaramidas dependerá del rendimiento general de la reacción de acoplamiento y del impedimento estérico que se genere.

Para la funcionalización de las nanopartículas con las diferentes escuaramidas sintetizadas se utilizaron diversos disolventes en función de la solubilidad de cada una de las escuaramidas. La reacción de funcionalización se hizo en microondas en 2 periodos de 20 minutos a 2 bares de presión. Es importante mencionar que es necesaria la previa dispersión de las nanopartículas y que las escuaramidas estén completamente solubilizadas, ya que con esto se logra una máxima funcionalización a través de los hidroxilos fenólicos de la dopamina, los cuales forman un enlace covalente con los iones Fe de la superficie de la NP. Posteriormente se realiza la purificación de las NP funcionalizadas en donde con ayuda de un imán se lavan 4 veces con el mismo disolvente en el que se realizó la reacción.

La reacción para la obtención del receptor R1, se llevó a cabo en agua, en cambio para la funcionalización con la molécula C5 se utilizó MeOH como disolvente. A continuación se muestra en la **Figura 3.12** un resumen de la ruta sintética de funcionalización con las diferentes moléculas orgánicas.

El grado de funcionalización de las nanopartículas depende directamente de la concentración del ligando utilizado, de modo que a medida que se aumenta la concentración, se obtiene un grado de funcionalización mayor así hasta llegar a un grado de funcionalización óptimo, el cual dependerá en gran parte de la naturaleza del tipo de molécula que se utilice para la funcionalización de la NP. Por otro lado, existen muchos otros factores que afectan de manera indirecta el grado de funcionalización, algunos de ellos son el grado de dispersión de las NP, la solubilidad del ligando, el tamaño de la NP, superficie específica y el impedimento estérico que se genere al ir introduciendo cada una de las moléculas “linker”.

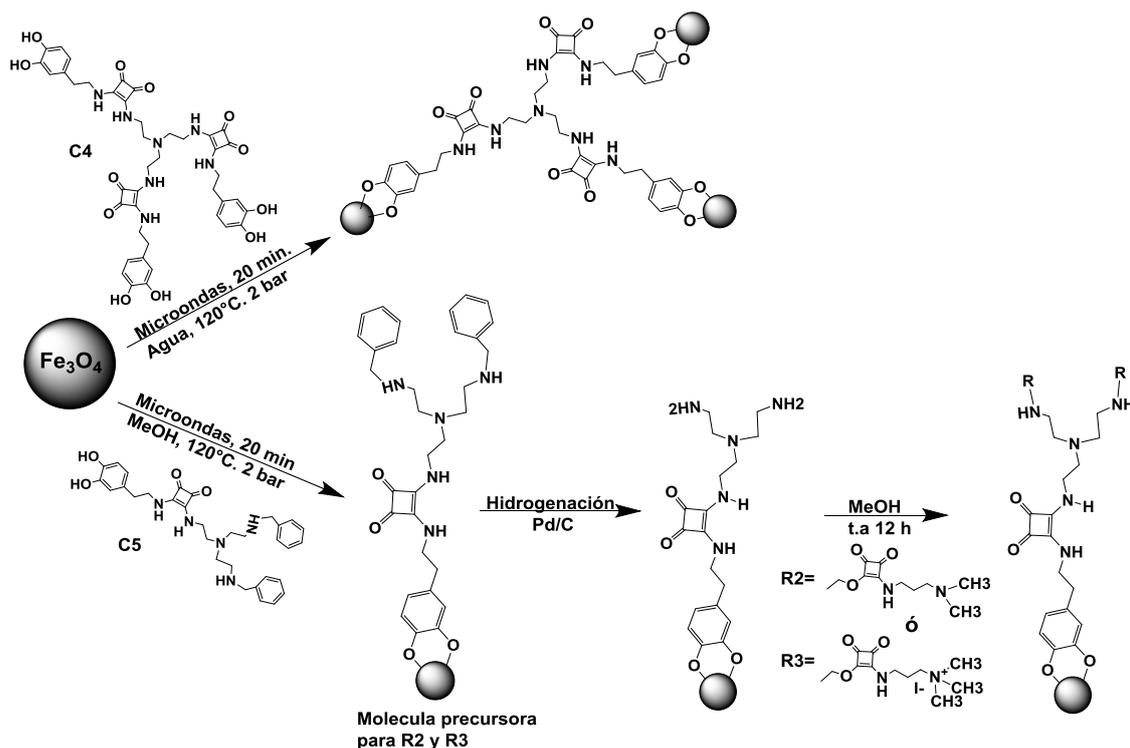


Fig. 3.12. Esquema de síntesis para funcionalización de nanopartículas con escuaramidas.

Estudios anteriores en nuestro grupo de investigación han demostrado que al utilizar una concentración de 2.5×10^{-5} moles de producto por cada mL de NP se obtiene un grado de funcionalización de entre 40-60%, por lo que se utilizó este dato para hacer el cálculo de la cantidad de molécula "linker" que se debe de utilizar, dando buenos resultados en el grado de funcionalización. El grado de funcionalización de las nanopartículas se midió por medio de la técnica TGA (Thermogravimetric analysis or thermal gravimetric analysis). En la **Figura 3.13** se muestran los análisis termogravimétricos obtenidos de la funcionalización de NP con C4 y C5, así como el obtenido después del proceso de hidrogenación de C4, de estos análisis se obtiene como resultado un porcentaje en cambio de peso, en donde se toma como rango de temperatura 100-800 °C (que se muestra en color gris), con la finalidad de solo cuantificar la pérdida de peso de la materia orgánica, ya que por debajo de 100 °C, se puede considerar que la pérdida es debido a agua o volátiles y por encima de los 800°C un cambio en el peso es debido a la descomposición de la magnetita.

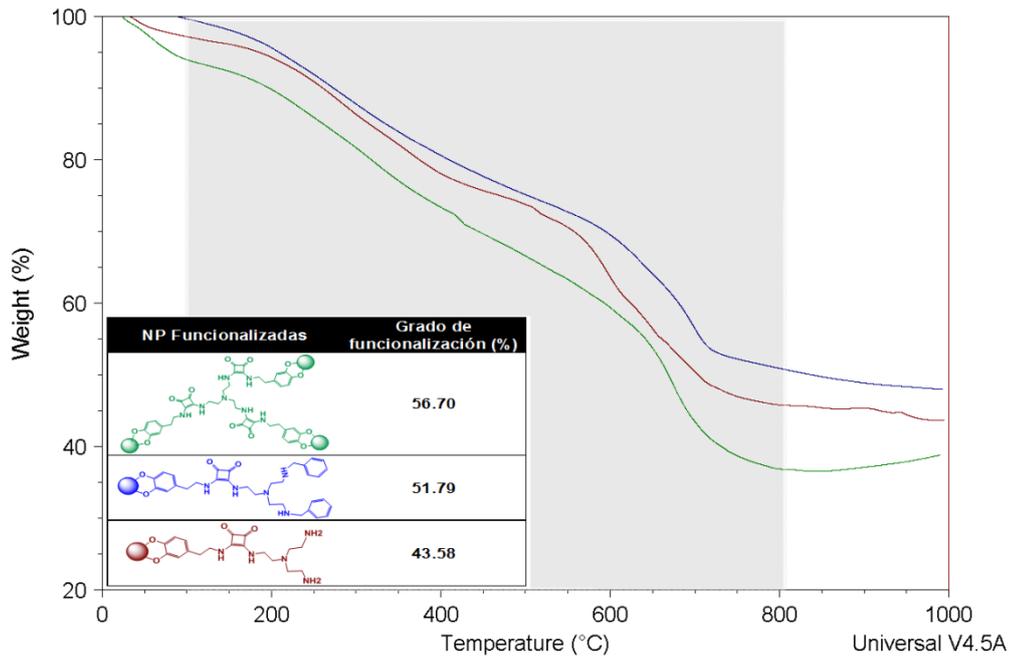


Fig. 3.13. Análisis termogravimétrico de NP funcionalizadas.

En el análisis termogravimétrico se pueden observar las dos caídas típicas las cuales corresponden a los dos diferentes tipos de adsorción presentadas en las nanopartículas. La fisorción es la forma más simple de adsorción, y es debida a débiles fuerzas atractivas, generalmente fuerzas de Van der Waals; por el contrario, la quimisorción ocurre cuando un enlace químico se forma, definido en este caso como un intercambio de electrones, por lo que el proceso de quimisorción está asociado a pérdidas de peso a temperaturas más altas, mientras que las uniones débiles asociadas a la fisorción se ven reflejadas como pérdidas de temperatura a temperaturas más bajas.³⁹

Usando estos valores de porcentaje de pérdida de peso, es posible cuantificar el número de moléculas orgánicas (fisorbidas y quimisorbidas) por nanopartícula.

3.6. ESTIMACIÓN DEL NÚMERO DE MOLÉCULAS ORGÁNICAS UNIDAS POR NANOPARTÍCULA

Para calcular el número de moléculas por NP, existen diferentes aproximaciones: para los fines de este trabajo, se eligió la Ecuación 1, la cual ha sido previamente reportada.⁴⁰ En la ecuación 1, D es el diámetro de las NP (valor conocido a partir de las SEM), PM es el peso molecular del Fe_3O_4 y δ es la densidad del Fe_3O_4 . De esta ecuación se obtuvo un valor $1/N$, el cual se refiere al número de nanopartículas por mol de Fe_3O_4 , el cual para las NP sintetizadas sin funcionalizar tiene un valor de $2,6315 \times 10^{18}$ NP/mol.

$$D = 31,86 \text{ nm}$$

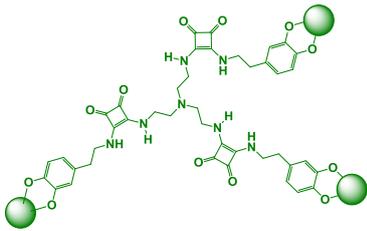
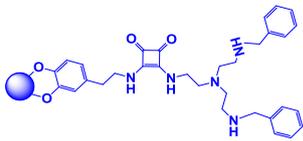
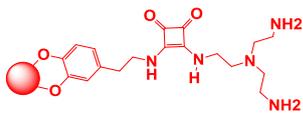
$$\delta_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 5,196 \text{ g/cm}^3$$

$$PM_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 231,53 \text{ g/mol}$$

$$\frac{1}{N\text{Fe}_3\text{O}_4} = \left(\frac{\pi}{6}\right) \left(\frac{D^3 \delta_{(\text{Fe}_3\text{O}_4)}}{PM_{(\text{Fe}_3\text{O}_4)}}\right) \quad \text{Ec. 1}$$

A partir de este dato, se calcula el número de moléculas por NP, tomando en cuenta los datos obtenidos del TGA de cada una de las NPF, para este cálculo se utilizan los cambios en peso, obteniendo así la cantidad de Fe_3O_4 y la cantidad de producto orgánico en la superficie. Los valores obtenidos se muestran en la **Tabla 3.2**.

Tabla 3.2. Análisis de porcentaje de funcionalización, moléculas/ NP y coeficiente de inserción superficial de NPF.

NPF	% Funcionalización (TGA)	Moléculas/NP	$\xi \left(\frac{\text{moléculas}}{D^3}\right)$
	56,70	82 462	2,54
	51,79	90 866	2,81
	43,58	108 171	3,34

El coeficiente de inserción superficial o “grafting” (ξ) proporciona la densidad de las moléculas orgánicas por nm^2 y puede proporcionar información adicional acerca de la disposición de las moléculas. Si bien este dato es un valor que se calcula para medir el grado de recubrimiento de NP con un surfactante como por ejemplo el ácido oleico, es válido también para el cálculo de moléculas orgánicas. Este valor está calculado teóricamente para nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con ácido oleico con un valor del $3.5 \text{ moléculas/ nm}^2$, lo que nos indica que los valores obtenidos para las NP funcionalizadas con las diferentes moléculas son valores aceptables, ya que en este caso diversos factores como el impedimento estérico y la disposición de los hidroxilos de la dopamina juegan un papel fundamental.³⁹

3.7. CARACTERIZACIÓN DE NP FUNCIONALIZADAS POR IR

El espectro vibracional de una molécula se considera una propiedad física única y por tanto característica de ésta molécula. Una de las grandes ventajas de la utilización de la espectroscopia IR es su versatilidad, ya que permite estudiar prácticamente cualquier muestra con independencia del estado en que se encuentre. Así, entre otras aplicaciones, el espectro IR se puede usar como “huella dactilar” en la identificación y seguimiento a la hora de funcionalizar NP, ya que teniendo el IR de la molécula orgánica y el de las NP, podemos determinar si una muestra de NP ha sido funcionalizada con alguna molécula de interés. Lo que hace a la espectroscopia IR en conjunto con la espectrometría de masas y la resonancia magnética nuclear, la base del análisis orgánico.

Todas las moléculas sintetizadas fueron caracterizadas por FT-IR, así como por ^1H -RMN y ^{13}C -RMN. Sin embargo, la espectroscopia infrarroja (FT-IR) es la forma más adecuada para caracterizar la unión entre las moléculas sintetizadas y las NP.

En la **Figura 3.14** se muestran los espectros de **A)** NP de Fe_3O_4 , **B)** la escuaramida C4 y **C)** el espectro las NP funcionalizadas. Las bandas más destacadas para el espectro de la escuaramida C4, son primero una banda poco intensa a 1799 cm^{-1} que corresponde a la vibración de tensión C=O del anillo de escuarato, una banda muy intensa a 1655 cm^{-1} que se asocia a vibraciones de tensión de C=O de amida y una última banda de mayor intensidad a 1588 cm^{-1} que se relacionan con las vibraciones de deformación de tipo N-H de amidas.

El espectro de las NP sin funcionalizar presenta las bandas típicas a 616 y 460 cm^{-1} las cuales corresponden a las vibraciones de tensión de Fe-O, además de presentar una banda intensa a 3000 cm^{-1} la cual es debida a vibración de las moléculas de agua adsorbidas en la muestra.

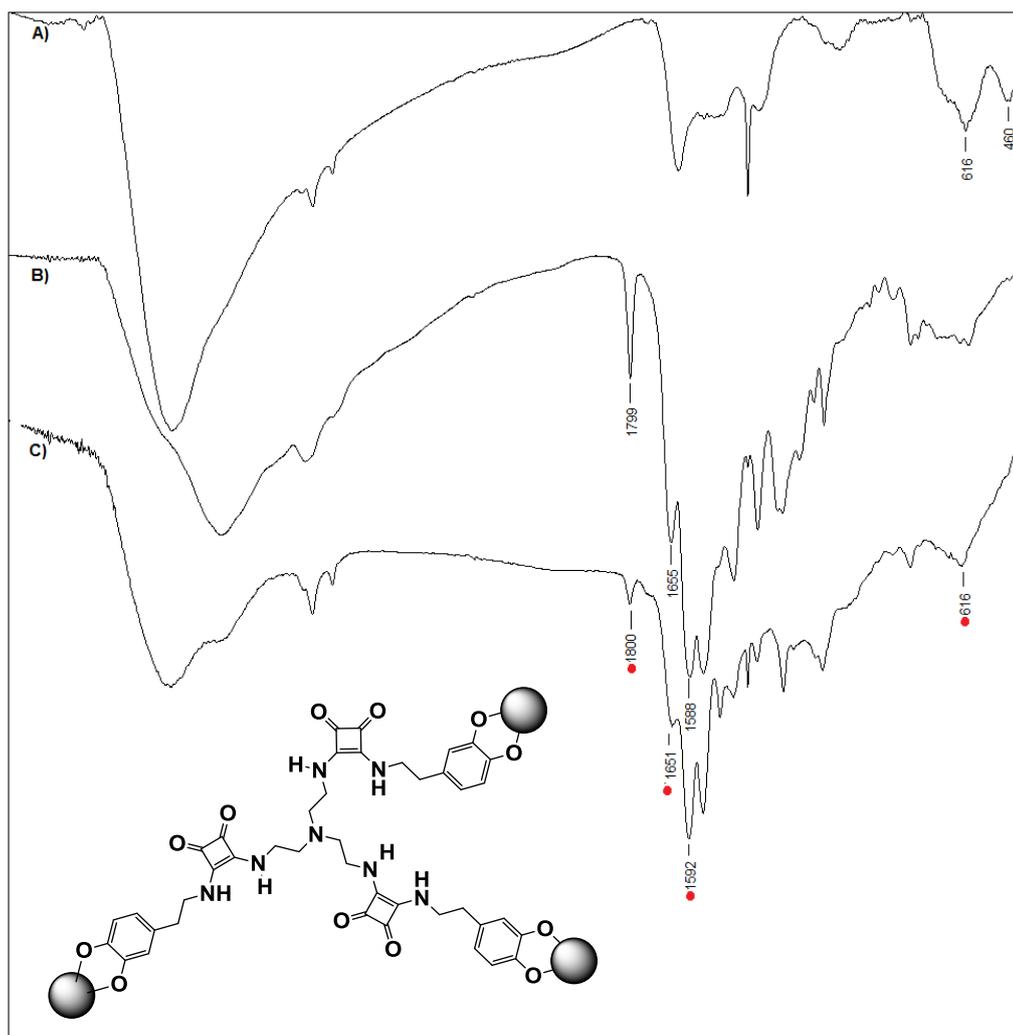


Fig. 3.14. Espectro de FT-IR de NPF con C4. A) NP de Fe_3O_4 , B) la escuaramida C4 y C) el espectro las NP funcionalizadas

Como se observa en la **Figura 3.14**, el espectro de FT-IR de las NPF con C4 presenta las bandas típicas de las nanopartículas de óxido de hierro, así como las correspondientes a las escuaramidas, por lo que se determina que las nanopartículas se han funcionalizado correctamente. Es importante mencionar que la intensidad de las bandas es directamente proporcional al grado de funcionalización, en este caso se observa que las bandas correspondientes a las vibraciones del anillo de escuarato son intensas, lo que sugiere un elevado grado de funcionalización, que ha sido comprobado mediante el análisis de TGA. Para promover el mayor grado de funcionalización se deben tener en cuenta dos puntos importantes:

1. Cuidar que el disolvente elegido como medio de reacción facilite la solubilidad de las moléculas orgánicas con las que se funcionalizará la NP.
2. Procurar que exista un exceso de ligando para favorecer el intercambio en la superficie de la NP.

En la **Figura 3.15** se muestran los espectros de **A)** las NP de Fe_3O_4 , **B)** las NPF con C5 después del proceso de hidrogenación y **C)** el espectro las NP funcionalizadas después de la síntesis con la escuaramida K2. Las bandas más destacadas para el espectro de la las NP de magnetita son las mismas que para el

receptor 1, ya que se utilizaron NP de la misma síntesis. Por otro lado, las NPF con C5, las cuales poseen una banda poco intensa a 1796 cm^{-1} que corresponde a la vibración de tensión C=O del anillo de escuarato presente en la molécula, encontrándose también las bandas asociadas a la tensión de C=O y de N-H. En rojo se muestran las bandas que se conservan y con las cuales se ha ido siguiendo la reacción, mientras que en verde, se señalan bandas nuevas que se generaron después de la reacción de síntesis con la escuaramida K2. Todas estas bandas sugieren la formación del receptor R2.

En la **Figura 3.16**, se muestra al igual que los espectros anteriores **A)** las NP de magnetita, **B)** las NPF después de hidrogenar y **C)** el espectro de la formación del R3, tomándose en cuenta las mismas bandas asociadas en las moléculas anteriores.

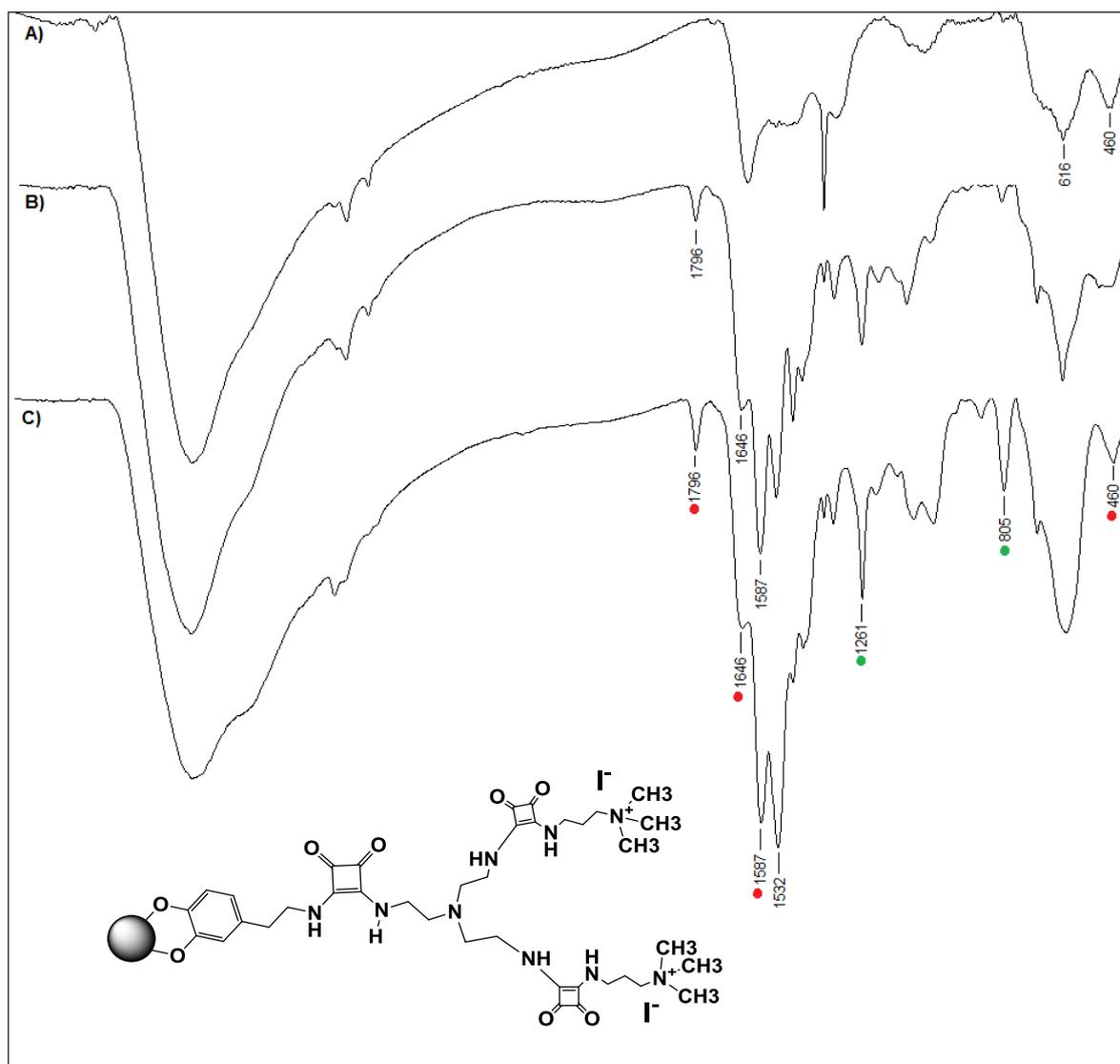


Fig. 3.15. Espectros de FT-IR A) NP de Fe_3O_4 , B) NPF con C5 después de proceso de hidrogenación, C) NPF después de la síntesis con escuaramida K2.

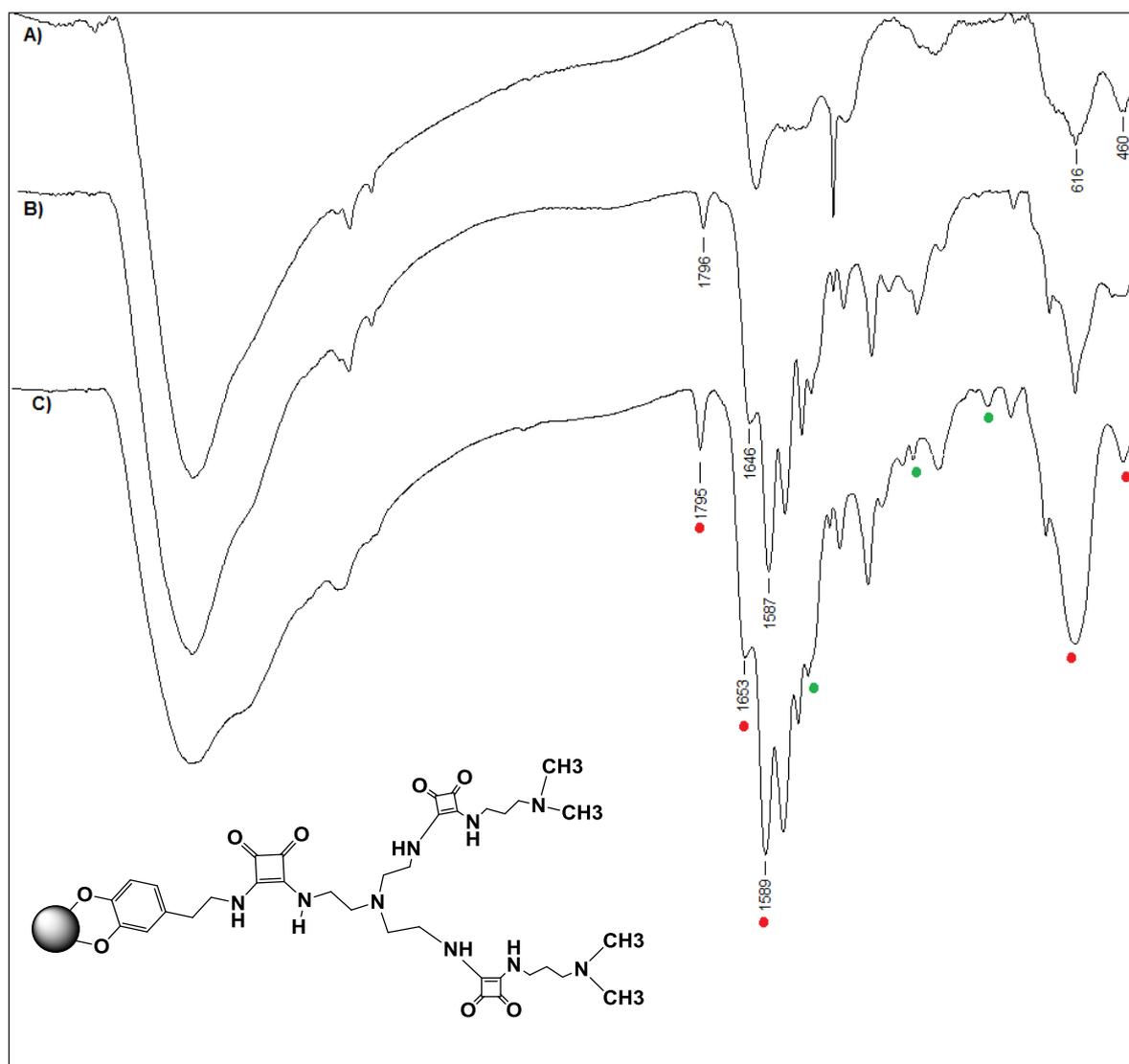


Fig. 3.16. Espectros de FT-IR A) NP de Fe_3O_4 , B) NPF con C5 después de proceso de hidrogenación, C) NPF después de la síntesis con escuaramida K1.

3.8. CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS POR SEM.

La microscopía electrónica de barrido SEM (Scanning Electron Microscope) es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, brindando información morfológica del material analizado y es capaz de producir imágenes de alta resolución de la superficie utilizando las interacciones electrón-materia.

Esta técnica ha sido utilizada para la caracterización de las nanopartículas sintetizadas antes y después de haber sido funcionalizadas. En la **Figura 3.17** se muestran las imágenes obtenidas de las nanopartículas sin funcionalizar.

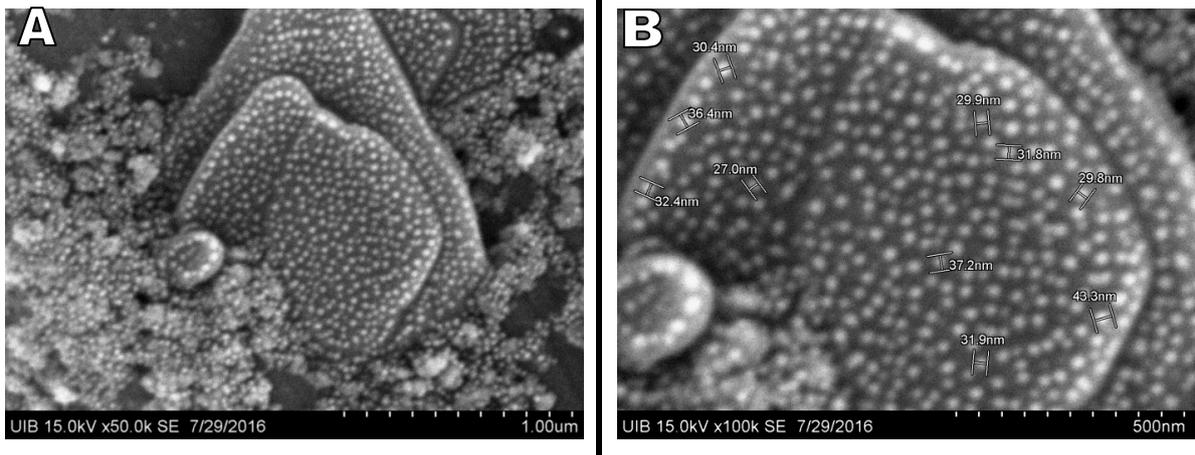


Fig. 3.17. A) SEM de Nanopartículas de óxido de hierro. B) Detalle del tamaño de las NP antes de la funcionalización.

De la imagen 3.17 se puede observar que los tamaños de las nanopartículas están homogéneamente distribuidos teniendo un promedio de ≈ 32 nm (valor utilizado para el cálculo de número de moléculas por NP), además de apreciarse la forma esférica de los núcleos de magnetita. Por otro lado, se observa aglomeramiento de las NP causado por el agua en el que se dispersaron y se prepararon las muestras, ya que al evaporarse, la mayor parte de las NP tienden a aglomerarse en las orillas, debido a la tensión superficial que genera el agua.

En la **Figura 3.18** se muestran las imágenes obtenidas para las NPF con C4. En la imagen A) se puede observar que el conjunto de NP tienden a formar esferas de diferentes tamaños variando entre 5-10 μm . La figura B es un acercamiento de la superficie de las esferas en donde se puede apreciar que está formada por NP distribuidas formando pequeñas cavidades o “poros” de aproximadamente 0.5 μm marcados con flechas rojas.

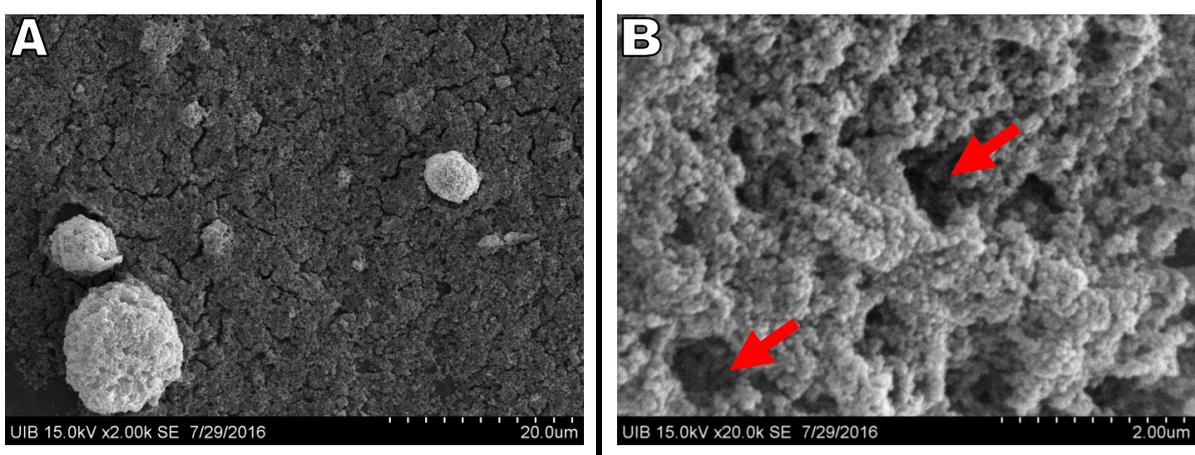


Fig. 3.18. A) SEM de Nanopartículas funcionalizadas con C4. B) Detalle de la forma de entrelazamiento y formación de cavidades de las NPF.

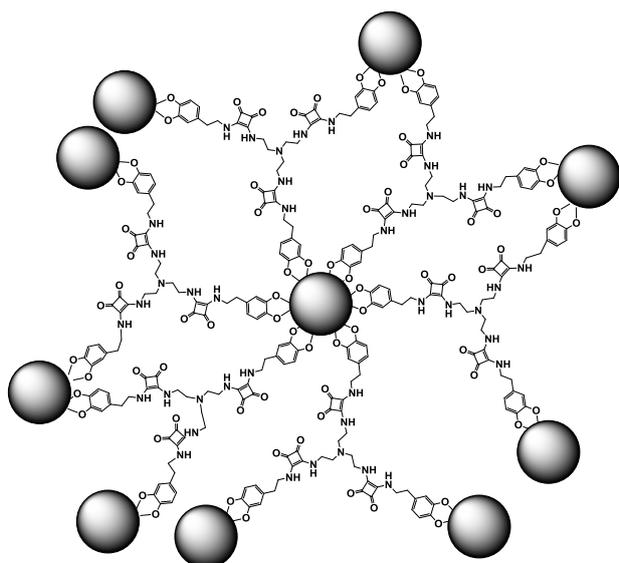


Fig. 3.19. Representación esquemática de la unión de las NPF con C4 para la formación de poros.

Esta curiosa forma de entrelazamiento puede ser atribuida a que la molécula C4 tiene 3 moléculas “linker” las cuales se unen a NP, posiblemente formando redes. A continuación, en la **Figura 3.19**, se muestra un modelo esquemático de la posible forma de unión de las NP para formar estas estructuras. Es importante mencionar que la formación de este tipo de cavidades únicamente se observó en las NPF con C4, ya que no se observó en las NP R2 y R3.

Por lo que se sugiere que esta molécula tiene la capacidad de reconocimiento no sólo de glifosato, sino también de otro tipo de moléculas que cumplan con las características de tamaño. Estos estudios no se realizan en este trabajo y quedan para investigaciones posteriores.

En la **Figura 3.20**, se muestran las imágenes obtenidas para los receptores R2 y R3, en ellas, se observa que las NP se encuentran aglomeradas lo que dificulta su visualización y determinación de tamaño de NP. La imagen **A)** corresponde a las NPF con el receptor 2 y la imagen **B)** es de las NPF con receptor 3. En las cuales no se observa una diferencia significativa entre ambas.

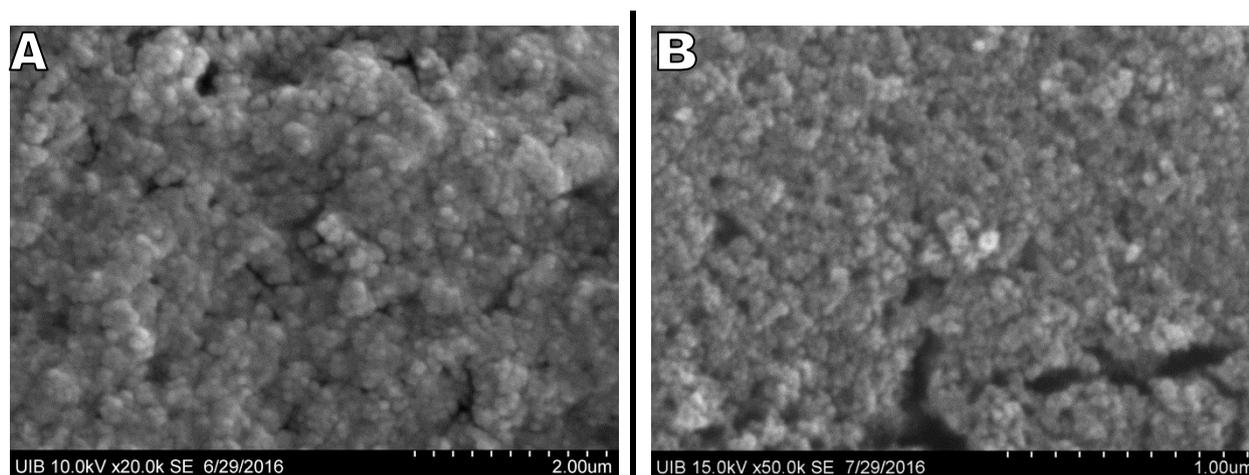


Fig. 3.20. Imágenes de SEM de A) NPF con receptor R2 y B) NPF con receptor R3

3.9. ANÁLISIS DE MASAS PARA DETERMINACIÓN DE FORMACIÓN DE LOS RECEPTORES R2 y R3 SOBRE LA NP.

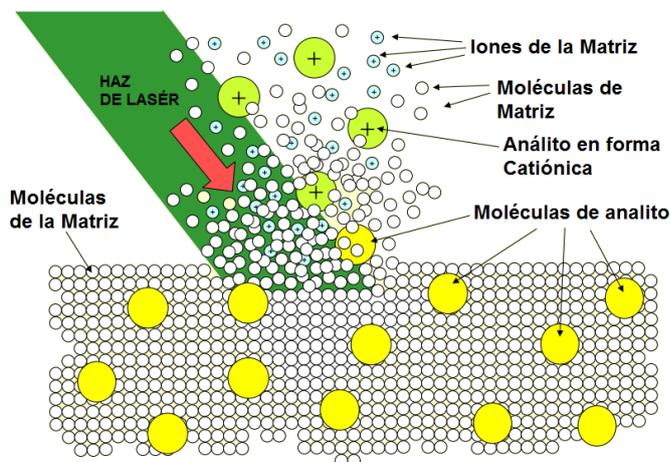


Fig. 3.21. Fundamento del análisis de masas por Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI)

Como una prueba confirmativa de la formación de los receptores R2 y R3 se llevó a cabo un análisis de espectrometría de masas MALDI. Este análisis se hace mediante una digestión con ácido clorhídrico de las NPF previamente dispersadas en MeOH, en donde posteriormente se analiza el sobrenadante obtenido después de la filtración de las nanopartículas digeridas y previamente diluidas. Posteriormente, con base en el fundamento de esta técnica, la muestra se mezcla con la matriz en exceso sobre una superficie de metal de tal forma que ambas

cocrystalizan cuando se evapora el solvente. Esta preparación es sometida a pulsos cortos de láser en alto vacío lo que provoca que la absorción de energía por parte de la matriz sea convertida en energía de excitación y en transferencia de H^+ a la muestra (ionización) dando lugar, a especies monocargadas. La **Figura 3.21** muestra un dibujo del fundamento de esta técnica.

A continuación, la **Figura 3.22**, muestra la estructura química y la distribución isotópica de la probable molécula que recubre la NP. Por otro lado la **Figura 3.23**, muestra el espectro obtenido de la digestión de las NPF para la formación de R2. El espectro no muestra ninguna señal a 10021.2419 m/z que es el pico que correspondería a la masa de la molécula buscada, únicamente se encontraron picos de mayor intensidad a 558,097 y 789,204 m/z. En la **Tabla 3.3** se observan las moléculas atribuidas estos picos.

Exact Mass: 1021,2419
m/z: 1021,2419 (100,0%)
1022,2453 (41,1%)
1023,2487 (8,2%)
1022,2390 (3,3%)
1023,2462 (1,6%)
1023,2423 (1,4%)
10242520 (1,1%)

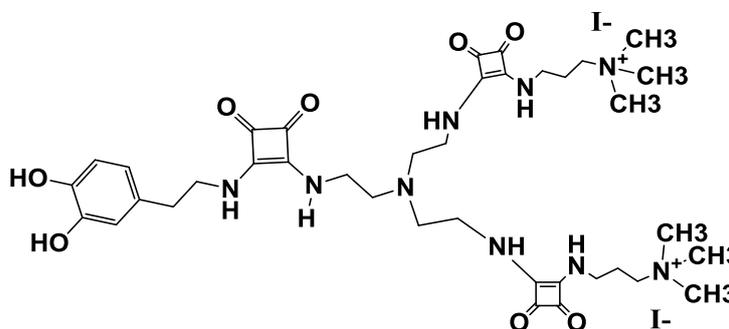


Fig. 3.22. Estructura de la molécula y porcentaje de distribución isotópica

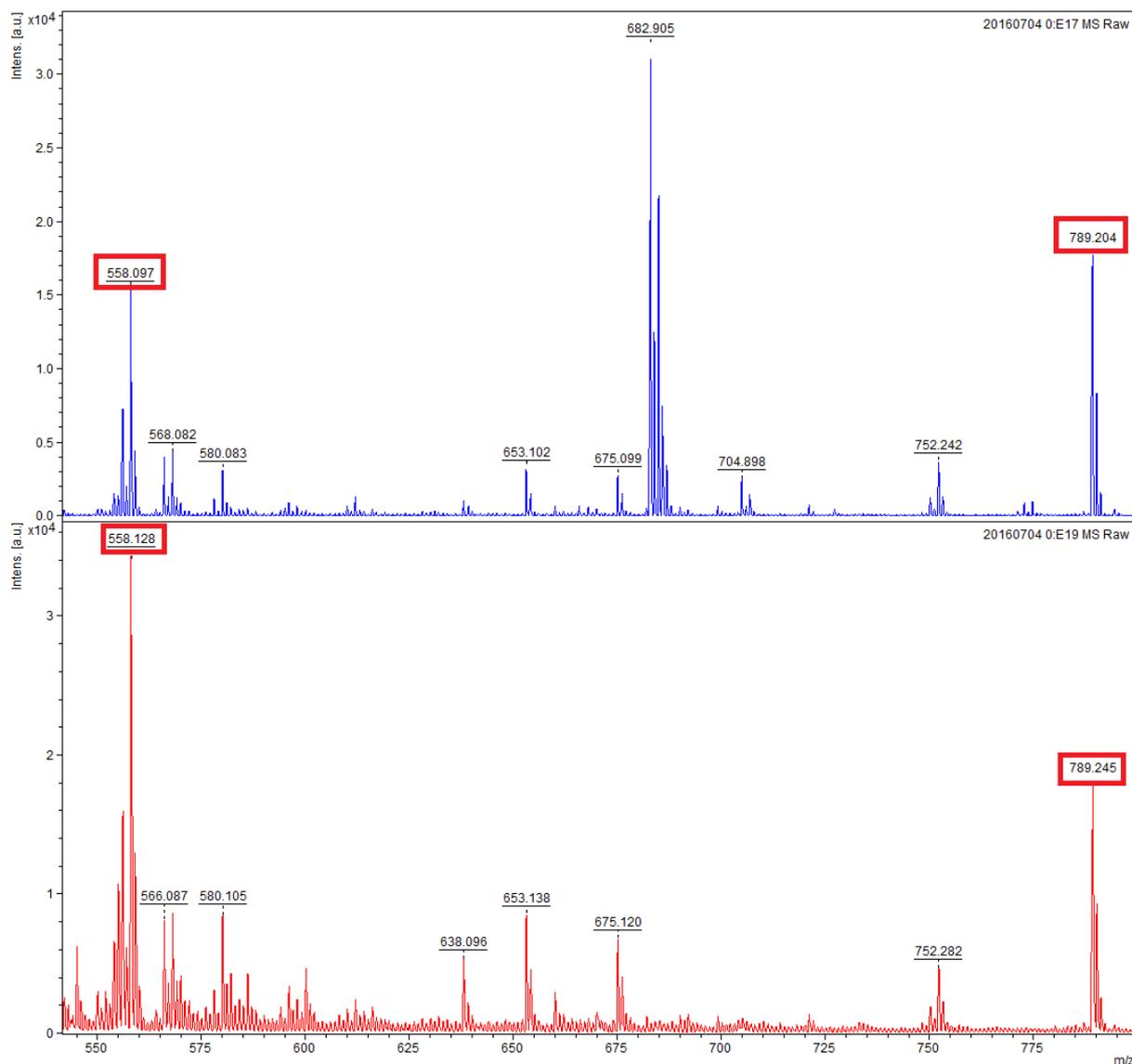
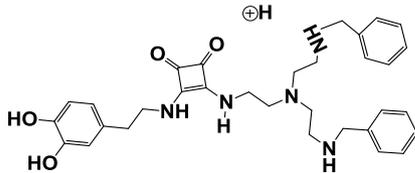


Fig. 3.23. Espectro de masas de la digestión de NPF con R3

Tabla 3.3. Moléculas encontradas en espectro de masas.

No.	Señal (m/z)	Molécula	m/z teórico
1	558,097		m/z: 558,3075 (100,0%) 559,3109 (34,6%) 560,3142 (5,8%) 559,3046 (1,8%)
			[M+H] ⁺ = 558, 3075

2	789,204		m/z: 789,2711 (100,0%)	[M]= 789, 2711
			790,2744 (37,9%)	
			791,2778 (7,0%)	
			790,2681 (2,6%)	
			791,2753 (1,2%)	

Con base en los resultados obtenidos se observa que el proceso de hidrogenación no fue un proceso completo y que sólo se logró hidrogenar parcialmente la molécula, lo que dió como resultado que en la etapa de síntesis sobre las NPF sólo se insertara una molécula de K2, obteniendo así la molécula 2 mostrada en la tabla anterior.

A partir de estas observaciones se repitió el proceso de hidrogenación de las NPF con C5 aumentando el tiempo y la presión, ahora durante 18 h a 50 psi de presión, posteriormente las NP hidrogenadas son digeridas siguiendo el mismo procedimiento anterior (**Figura 3.24**) y se obtiene el espectro de masas MALDI (**Figura 3.25**).

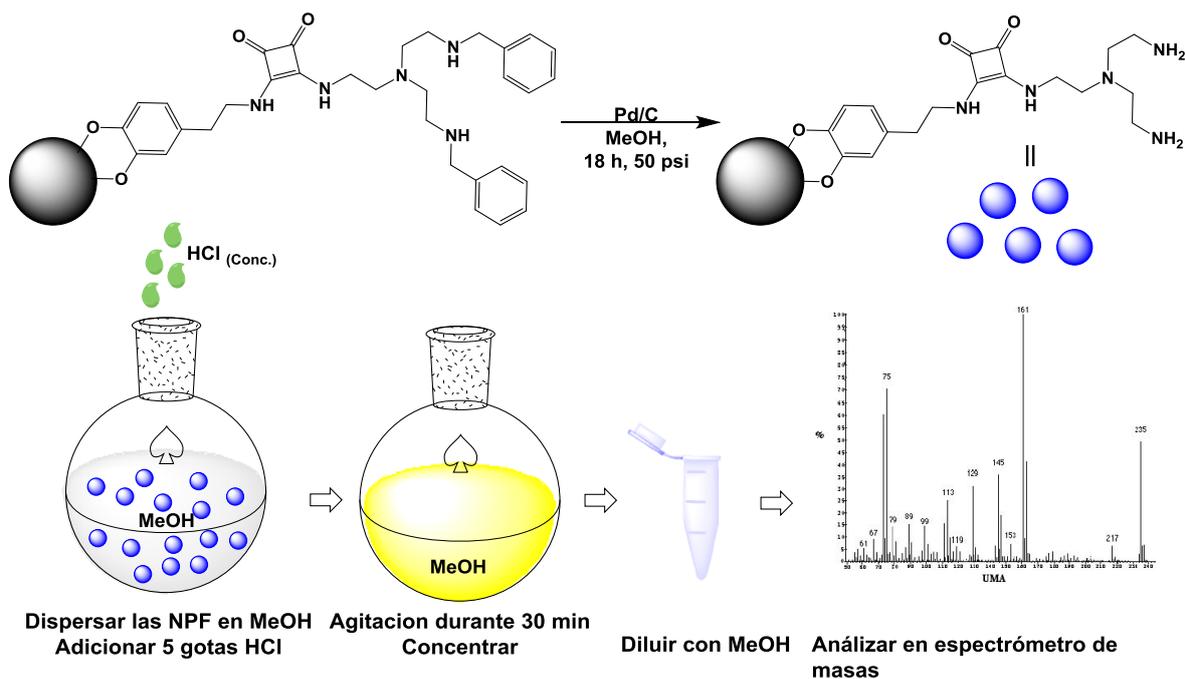


Fig. 3.24. Proceso de hidrogenación y digestión de las NPF para la obtención del receptor R2 y R3.

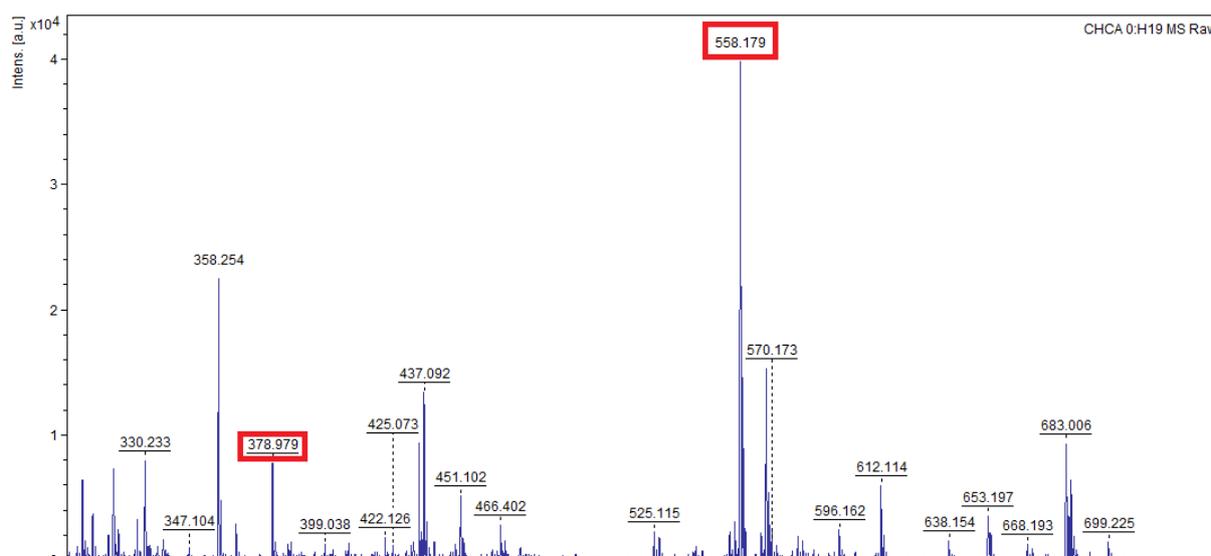


Fig. 3.25. Espectro de masas de NPF con C5 después de proceso de hidrogenación.

En el espectro de masas indica que el proceso de hidrogenación no se ha completado en su totalidad, ya que es posible observar un pico intenso a 558,179 atribuido a restos del producto de partida y otro pico de menor intensidad a 378,979 del producto hidrogenado, en la **Tabla 3.4** se muestran las moléculas a las que se asignan cada uno de los picos.

Tabla 3.4. Moléculas encontradas en análisis de masas

No.	Señal	Molécula	m/z Teórico
1	558,179	 m/z: 558,3075 (100,0%) 559,3109 (34,6%) 560,3142 (5,8%) 559,3046 (1,8%)	[M+H] ⁺ = 558,3075
2	378,979	 m/z: 378,2136 (100,0%) 379,2170 (19,5%) 379,2107 (1,8%) 380,2203 (1,8%)	[M+H] ⁺ = 378,2136

Posteriormente, la síntesis con K1 y K2 se llevo a cabo, ya que no fue posible hidrogenar en su totalidad el producto. Por falta de tiempo se decidió seguir trabajando aun cuando no se obtuvieron los receptores R2 y R3 como se planteó desde el inicio.

3.10. CUATERNIZACIÓN DE LOS RECEPTORES R1-R3

Trabajando con las moléculas obtenidas y en consecuencia del poco grado de hidrogenación para la posterior obtención de R2 y R3, se estudió la posibilidad de cuaternizar estas moléculas en la amina terciaria central de las moléculas, con el fin de obtener las sales de amonio correspondientes, ya que estudios anteriores han demostrado la capacidad de las sales de amonio de diescuaramidas y bis-diescuaramidas en el reconocimiento molecular de aniones inorgánicos, como sulfato, hidrógeno fosfato y tricarboxilatos.⁴¹

Este proceso ayudaría a favorecer el reconocimiento de glifosato, el cual es un aminofosfonato con la siguiente estructura:

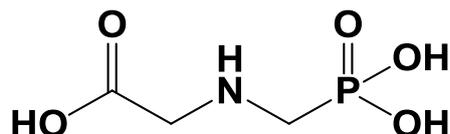


Fig. 3.26. Estructura de una molécula de glifosato.

La reacción de cuaternización se llevó a cabo para la molécula C4 siguiendo el protocolo de la **Figura 3.26**. Al término de la reacción, no se logró obtener el producto metilado.

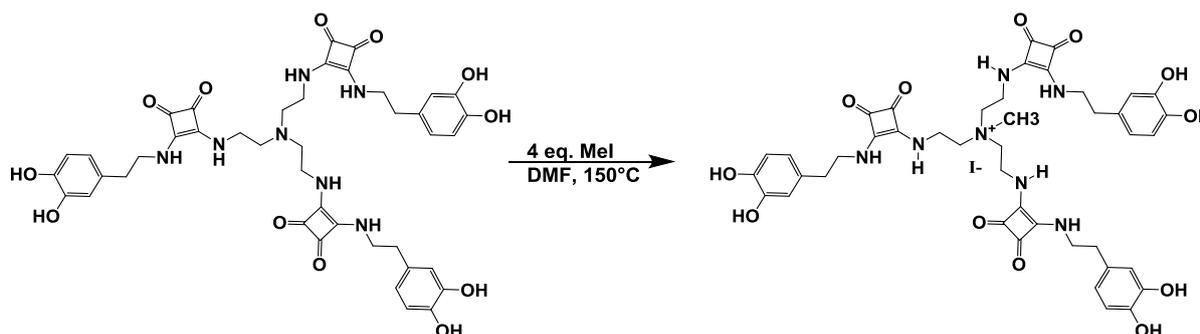


Fig. 3.25. Reacción de metilación para obtención de sales cuaternarias.

En consecuencia se realizó un estudio de seguimiento de la reacción de metilación por resonancia, al cabo de 24 h y calentamiento del tubo en baño de agua, no se observó la aparición del desplazamiento de la señal del Ioduro de metilo. La reacción se repitió en diferentes condiciones de temperatura y disolvente sin lograr obtener la sal de amonio cuaternaria probablemente debido a que la molécula está impedida estéricamente y el Ioduro de metilo no logra entrar al centro de la molécula.

3.11. ESTUDIO POR RMN DE LA COMPLEJACIÓN DE GLIFOSATO A NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS CON ESCUARAMIDAS EN AGUA.

Estudios anteriores han demostrado la capacidad de las sales de amonio de diescuaramidas y bis-diescuaramidas en el reconocimiento molecular de aniones inorgánicos, como sulfato e hidrógeno fosfato y tricarboxilatos.⁴² Es importante señalar que en el presente estudio únicamente se tiene una molécula con sales de amonio cuaternarias, R2, la cual lo está completamente sustituida con las mismas.

Con base en estos estudios, se plantea la detección de la molécula de glifosato con el uso de las NPF con los 3 diferentes receptores R1, R2 y R3. Este estudio se lleva a cabo en agua deuterada, pH básico (con la adición de NaOD) y temperatura ambiente. Primero, es necesaria la elaboración de una recta de calibrado en donde se utiliza un patrón interno de referencia de 2 μL de acetonitrilo por cada 500 μL de disolvente, se utiliza el acetonitrilo ya que su señal en RMN es un singlete que no interfiere con ninguna de las señales del glifosato. En la **Figura 3.27**, se muestra el espectro de resonancia del glifosato con el patrón de referencia en D_2O . Para la elaboración de la recta de calibrado se prepara una disolución de glifosato en agua deuterada con concentración inicial de $2,4 \times 10^{-2}$ M la cual ya incluye el patrón de referencia (acetonitrilo) y NaOD (la concentración del patrón de referencia permanece constante en todo el experimento), se genera el espectro de RMN y posteriormente se diluye con adiciones de 120 μL de D_2O , entre cada adición se obtiene el espectro de RMN. Para el tratamiento de los datos, se obtiene un total de 11 espectros, en los cuales la señal de acetonitrilo se calibra a 3 y se toman los valores de las 2 integrales del glifosato. Al final se obtiene una recta de calibrado para cada una de las integrales, en la **Figura 3.28**, se muestran las rectas de calibrado obtenidas.

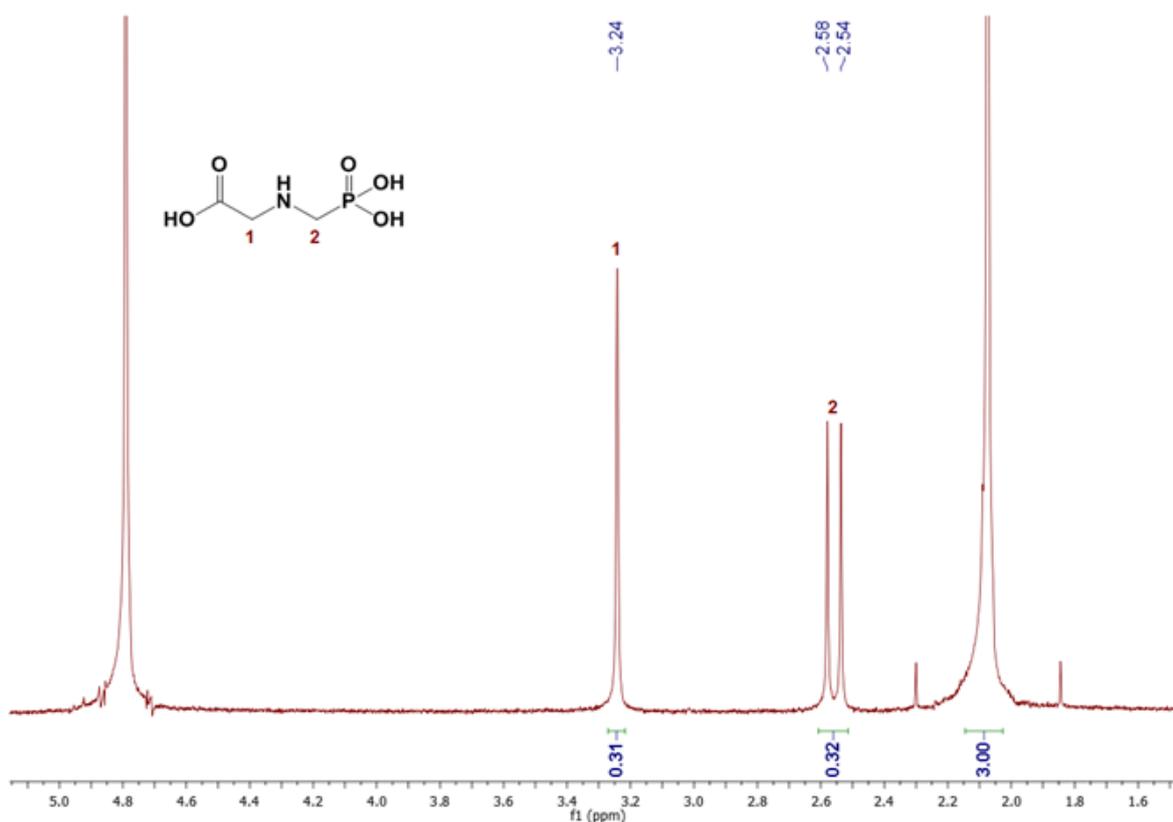


Fig. 3.27. Espectro RMN de glifosato en D_2O , Acetonitrilo y NaOD.

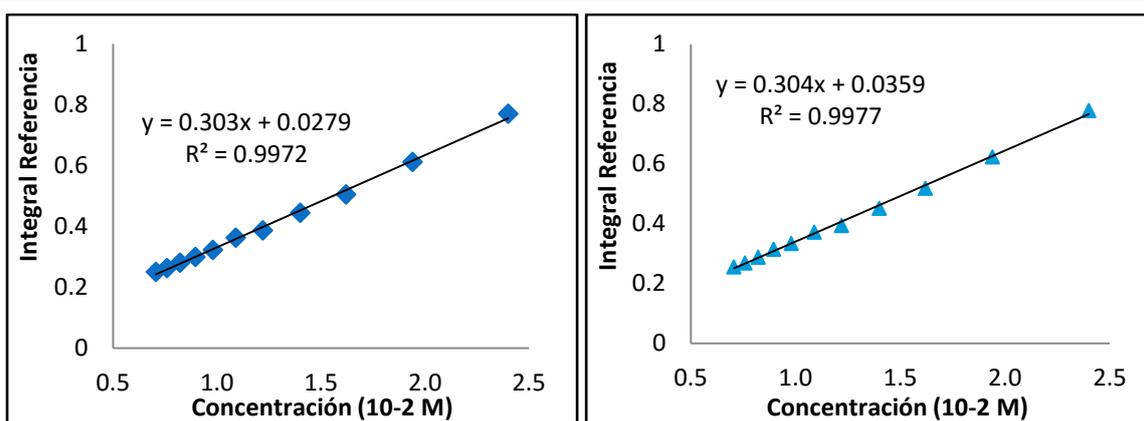


Fig. 3.28. Rectas de calibrado obtenidas por RMN para diferentes concentraciones de glifosato, a la izquierda Integral 1 y a la derecha Integral 2.

Para la cuantificación de la cantidad de glifosato retenida por las NPF con cada uno de los receptores R1-R3, se preparan 6 mL una disolución de glifosato de concentración $1,96 \times 10^{-2}$ M en las mismas condiciones anteriores; posteriormente se toman 1,5 ml y se ponen a reaccionar con 1 mg de NPF con cada uno de los receptores durante 1 hora. Las NP son decantadas con ayuda de un imán y el sobrenadante es filtrado y monitorizado por resonancia obteniéndose los resultados mostrados en la **Tabla 3.5**.

Tabla 3.5. Concentración de glifosato retenida por 1 mg de NPF

NPF	Valor de la integral 1	Valor de la integral 2	Glifosato retenido (mM)	Glifosato retenido (%)
NP _{Fe3O4}	0,5594	0,5406	2,03	10,39
R1	0,5581	0,5548	2,08	10,61
R2	0,6331	0,6379	Sin cambio	-
R3	0,6282	0,6365	Sin cambio	-

Los valores obtenidos indican que las NPF con el R1 y las NP sin funcionalizar capturaron glifosato, aunque en muy bajas concentraciones. Este resultado es debido a que las NPF con el R1 y R3 en sus estructuras no tienen sales cuaternarias que son las que favorecerían el reconocimiento del glifosato, en el caso de R2, como se demostró en los estudios de masas, la cantidad de amina cuaternaria es poca, lo que no permite ver cambios significativos entre la concentración de glifosato inicial y final.

Como prueba confirmatoria de la unión del glifosato a las NPF, las NP decantadas con imán de la prueba anterior son lavadas (3 x 1,5 mL) con agua destilada y secadas. Posteriormente se hace una prueba de FT-IR con cada una de las NPF en donde es posible detectar las bandas del glifosato en las NPF con R1, la **Figura 3.29** muestra A) las NPF con R1 antes de estar en contacto con el glifosato, B) NPF después de 1 hora en presencia de glifosato.

De los espectros A) y B) se observa un claro cambio en los picos del espectro de las NPF después de estar en contacto con el glifosato, destacando la aparición de una banda a 2955 cm^{-1} , además de que la banda a 1799 cm^{-1} correspondiente a la vibración C=O de la molécula de escuarato se ve mucho más definida después de estar en interacción con el glifosato. Por otro lado se observa la desaparición de dos bandas muy intensas a 1113 y 1189 cm^{-1} , por otro lado se puede observar la banda del fosfato sobre 1000 cm^{-1} . En la **Figura 3.29 C**, se muestra el espectro de IR del glifosato reportado en la base de datos de Science finder.

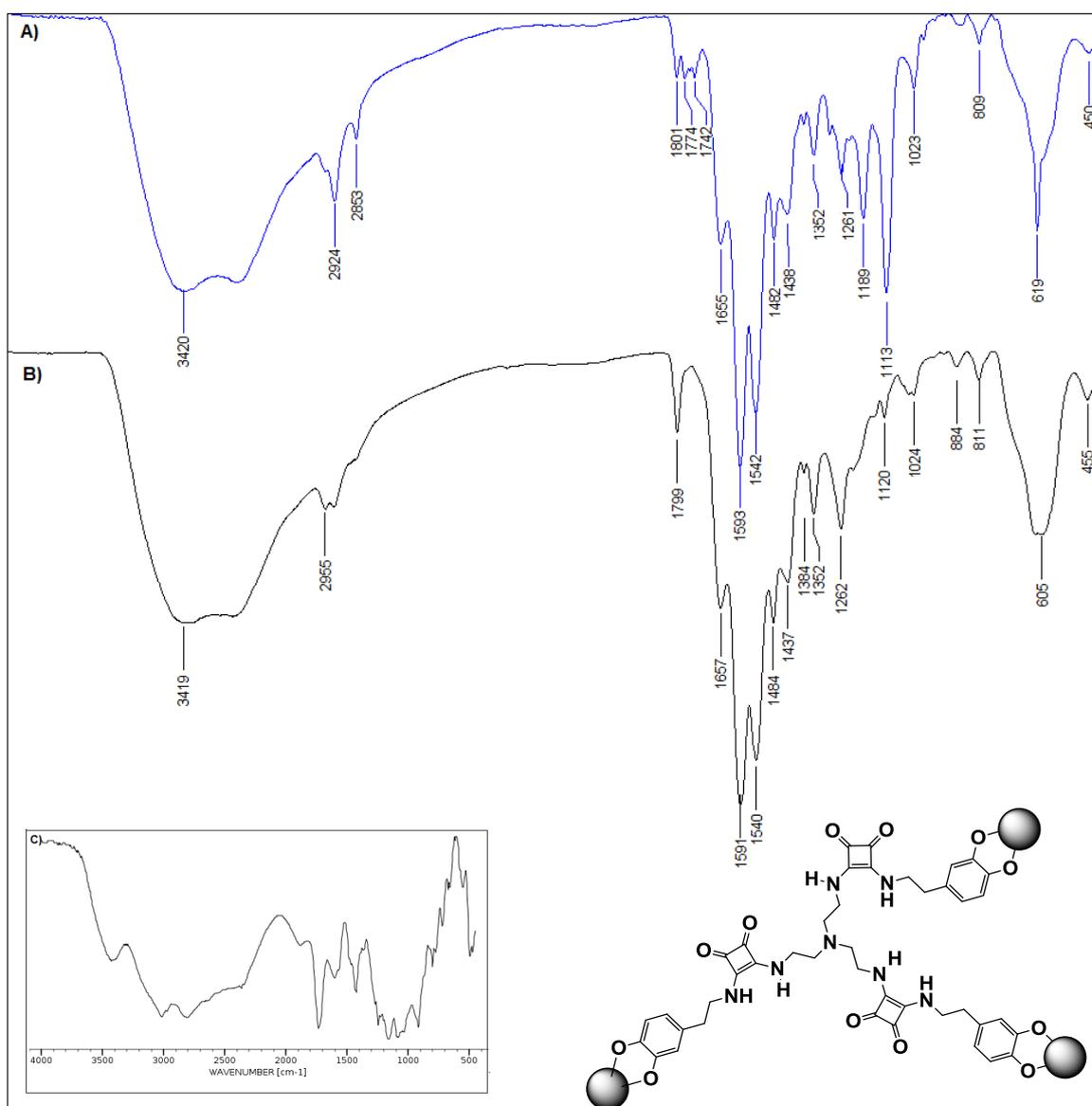


Fig. 3.29. Espectro de FT-IR de A) NPF con C4 antes de estar en contacto con el glifosato, B) NPF con C4 después de 1 hora en reacción con glifosato y C) Glifosato.

3.12. ESTUDIO DE COMPARACIÓN POR RMN DE LA COMPLEJACIÓN DE GLIFOSATO A NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS CON ESCUARAMIDA CUATERNIZADAS EN AGUA

Con el fin de determinar si la cuaternización de las moléculas es directamente proporcional a la cantidad de glifosato retenido por las NPF, se llevó a cabo el mismo estudio anteriormente descrito utilizando 3 muestras de NPF previamente sintetizadas en nuestro grupo de investigación, la **Figura 3.30** muestra los espectros de IR de A) la diescuaramida probada y B) NPF. Es importante mencionar que estas NP son de un tamaño de entre 6-8 nm, siendo un tamaño diferente al de las NP estudiadas en el presente trabajo, por otra parte, su grado de funcionalización es de 364 moléculas/NP, este valor es mucho más bajo que el de las NPF con los receptores R1-R3. El estudio se hizo con tres diferentes muestras (M1-M3) ya que estas variaban en el tiempo de almacenamiento, por lo que se decidió probar tres NPF con la misma molécula pero con diferente tiempo de almacenaje.

Las NP utilizadas han sido probadas en estudios anteriores para el reconocimiento de diferentes carboxilatos.²⁷

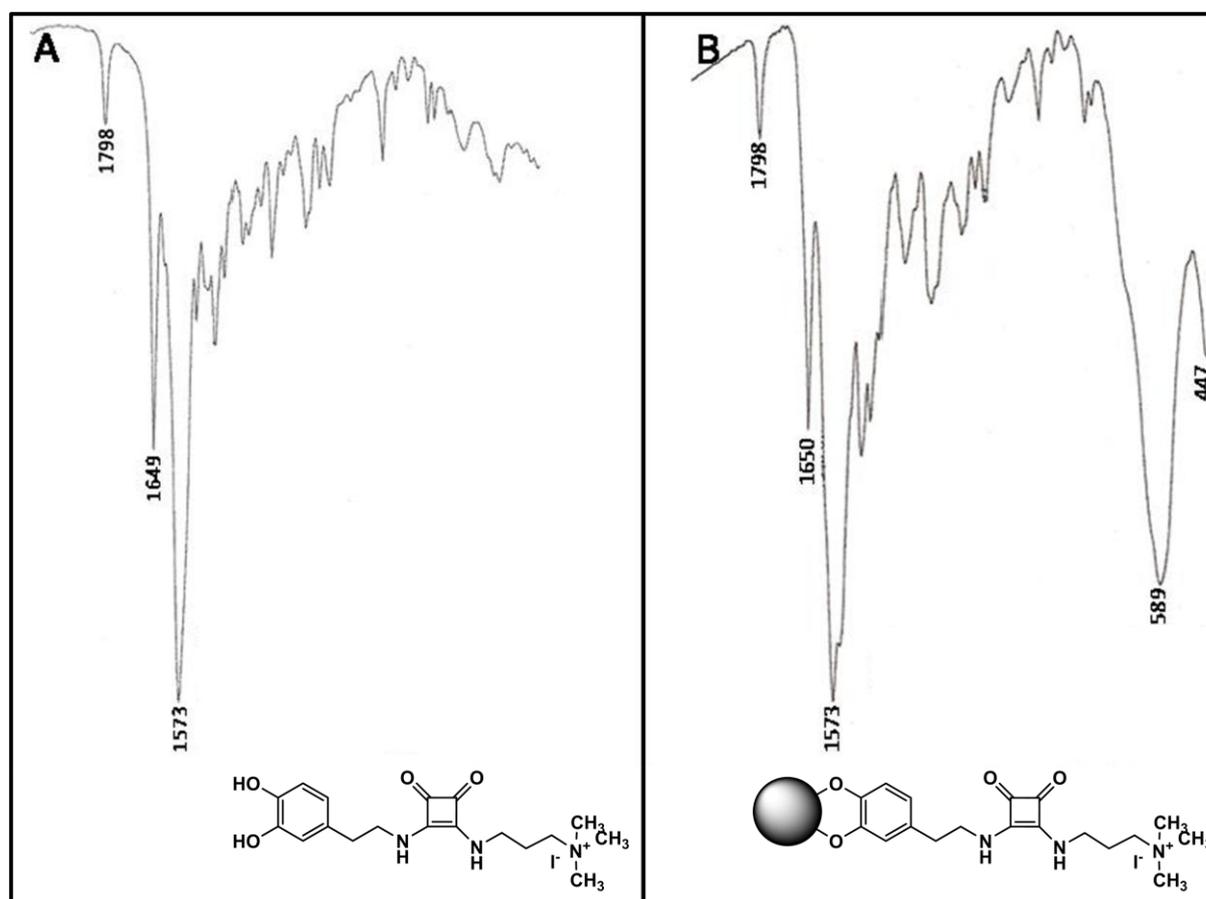


Fig. 3.30. Espectros de IR de A) la diescuaramida probada y B) NPF con la misma diescuaramida cuaternizada

El estudio de cuantificación de retención de glifosato se hizo siguiendo la misma metodología anterior y utilizando la misma recta de calibrado obtenida con anterioridad y siguiendo el mismo patrón de referencia de acetonitrilo. Se preparó una disolución de glifosato con una concentración inicial de $1,95 \times 10^{-2}$ M, posteriormente se pone a reaccionar durante 1 h con 1 mg de NP, las NP son

filtradas y el sobrenadante se monitoriza por RMN, obteniéndose los resultados que se presentan en la **Tabla 3.6**.

Tabla 3.6. Concentración de glifosato retenida por 1 mg de NPF

NPF	Valor de la integral 1	Valor de la integral 2	Glifosato retenido (mM)	Glifosato retenido (%)
M1	0,5701	0,5656	1,85	9,46
M2	0,5507	0,5485	2,45	12,54
M3	0,5897	0,5940	1,06	5,42

De acuerdo a los resultados obtenidos se observa que la capacidad de captura de glifosato está directamente relacionada con la presencia de aminas cuaternarias en la estructura de la molécula con la que se funcionalizan las NP; es importante mencionar que el valor obtenido para la M2 es mayor con respecto a M1 y M3, probablemente debido a que estas NP tienen un tiempo menor de almacenamiento traduciéndose en un grado de degradación menor por el oxígeno del medio ambiente.

Por otro último, es importante mencionar que el grado de funcionalización de estas NP es mucho menor que el de las sintetizadas en el presente trabajo, deduciendo que de haber obtenido las NPF con las sales cuaternarias como se planteo al inicio de la investigación, estas NP serian capaces de capturar una cantidad mayor de glifosato.

4. CONCLUSIONES

En resumen del presente trabajo, se presentan las siguientes conclusiones:

1. Se han sintetizado y caracterizado nuevas diescuaramidas para la construcción de tres diferentes receptores, la síntesis fue llevada a cabo por condensación en condiciones suaves de reacción obteniéndose rendimientos de entre el 50-70%.
2. Se han sintetizado y caracterizado tres diferentes tipos de nanopartículas de óxidos de hierro funcionalizadas con escuaramidas que poseen como molécula "linker" la dopamina uniéndose así covalentemente con las nanopartículas, la síntesis de las NP se hizo por el método de coprecipitación y la funcionalización se realizó en microondas. La caracterización de las NP se realizó por IR observando las bandas típicas de las escuaramidas y se comprobó el grado de funcionalización mediante análisis termogravimétrico (TGA) obteniéndose valores altos de coeficiente de inserción superficial o "grafting" (ξ) de entre 2.5-3.3.
3. Se ha sintetizado un nuevo receptor C4 no reportado en la bibliografía.
4. Se ha evaluado el comportamiento supramolecular de las 3 nanopartículas funcionalizadas frente al glifosato comprobando un grado muy bajo de reconocimiento de este análogo únicamente con el receptor R1.
5. Se ha demostrado la correlación que existe entre la presencia de sales cuaternarias presentes en las moléculas y el reconocimiento y captura de glifosato.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. METODOS GENERALES

Los disolventes utilizados para la síntesis de las moléculas orgánicas y nanopartículas, así como los experimentos de determinación de glifosato fueron adquiridos de las casas comerciales Scharlau y Panreac.

Los reactivos comerciales como: escuarato de dietilo, clorhidrato de dopamina, 3,4-dimetoxifenetilamina y Glifosato fueron suministrados por Sigma-Aldrich. El carbonato de sodio, sodio ditionito y el hidróxido de sodio fueron adquiridos en la casa comercial Fluka. El agua utilizada para lavados en síntesis se purificó por electroósmosis con un equipo ELIX10 (Millipore) y, posteriormente, por tratamiento a través de un equipo MilliQ (Millipore) hasta alcanzar una resistividad máxima de 18,2MΩ. Los disolventes deuterados utilizados para los experimentos de resonancia, se compraron con calidad espectroscópica RMN con una riqueza del 99,98% y se usaron sin purificar posteriormente.

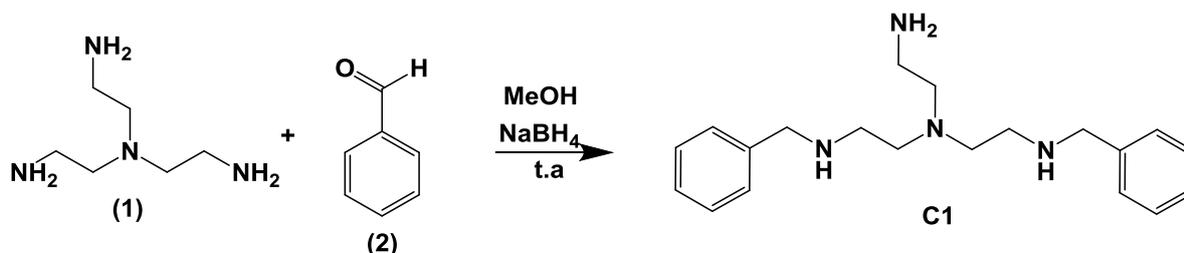
Los espectros de RMN (^1H , ^{13}C) se registraron en un instrumento Bruker AVANCE-300. Los desplazamientos químicos están expresados en ppm y referenciados a la señal residual del disolvente utilizado. Los espectros de FT-IR se registraron con un espectrofotómetro Bruker Tensor 27 usando pastillas de KBr. Los análisis termogravimétricos (TGA) se realizaron en un equipo simultáneo de termogravimetría y análisis térmico diferencial de la casa comercial TA Instruments modelo SDT Q600. Las fotografías de microscopía fueron adquiridas con un Microscopio electrónico de barrido (SEM): HITACHI S-3400N, resolución de 3 nm y voltaje de aceleración entre 0.5 a 30 kV.

Los espectros de masas, fueron adquiridos con un espectrómetro de masas MALDI-TOF BRUKER Autoflex III Smartbeam para el análisis de digestión de NP y un espectrómetro de masas Micromass Autospec 3000 el cual cuenta con un sistema de fuentes de ionización por electrospray (ESI) positivo y negativo para la caracterización de las moléculas orgánicas sintetizadas.

5.2. SINTESIS DE ESCUARAMIDAS

5.2.1. SÍNTESIS DE C1

*N*¹-(2-aminoetil)-*N*²-bencil-*N*¹-(2-(bencilamino) etil)etano-1,2-diamina.



En un matraz redondo de fondo plano, se adicionan 2 g (13,67 mmol) de TREN (1), disuelto en 40 mL de Metanol y se deja en agitación durante 10 minutos, posteriormente se adicionan gota a gota, con ayuda de un embudo de presión compensada, 1,45 g (13,67 mmol) de benzaldehído (2) disuelto previamente en 30 mL de Metanol. La mezcla de reacción se deja en agitación durante 30 minutos a

temperatura ambiente y a continuación se adiciona 1,0 g de NaBH_4 (26,43 mmol) en porciones pequeñas y se deja en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente.

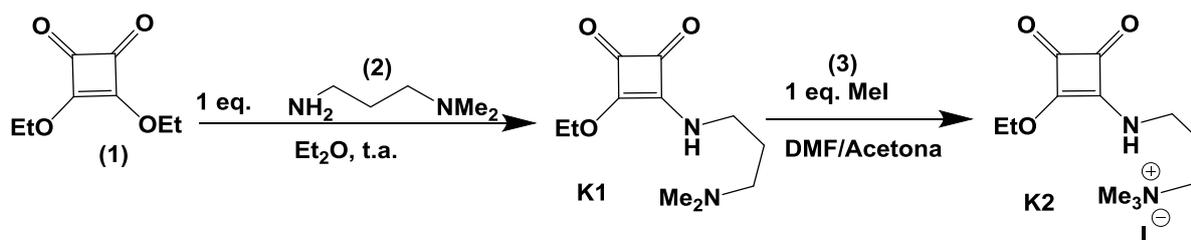
Al término de la reacción se acidifica el medio con 5 mL de HCl 1M y se deja a reflujo 95°C durante 1 hora y media. Posteriormente, se ajusta el pH a 10 con NaOH 1M. Se disminuye el volumen con ayuda de rotavapor hasta obtener un producto color blanco viscoso, el cual se disuelve en 20 mL de agua y se hace una extracción con CH_2Cl_2 (4x15 mL), se adiciona Na_2SO_4 para quitar cualquier traza de agua. Se evapora sequedad. Finalmente se obtiene un líquido color amarillo intenso.³⁷ Rendimiento 41%.

El producto se purifica por columna de sílica, utilizando como fase móvil una mezcla de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ en proporción 10:4:1 respectivamente.

$^1\text{H-RMN}$ (DMSO-d_6) δ : 2,36 (t, 2H); 3,66 (s, 4H); 7,21 (t, 2H); 7,27 (t, 8H). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ : 1,54 (s, 4H); 2,47 (t, 2H); 2,67 (m, 10H); 3,76 (s, 4H) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3) δ : 39,97; 47,11; 54,04; 54,42; 57,75; 126,91; 128,12; 128,41; 140,42 ppm.

5.2.2. SÍNTESIS DE DIESCUARAMIDAS K1 Y K2.



SÍNTESIS DE K1

N,N-dimetil-*N'*-(2-etoxi-3,4-dioxo-1-ciclobutenil)-propilamina

En un matraz redondo de fondo plano se disuelven 2 g (11,8 mmol) de escurato de dietilo (**1**) en 20 mL de éter dietílico. Por otro lado, se disuelve 1 g (9,8 mmol) de *N,N*-dimetilpropilendiamina (**2**) en 30 mL éter dietílico y se adiciona muy lentamente gota a gota con ayuda de un embudo de presión compensada a la mezcla de reacción de (**1**). La reacción se deja transcurrir por 12 horas en atmosfera inerte de Argón. Al término de la reacción se observa la formación de un precipitado amarillo muy fino. Filtrar y lavar con una mezcla de pentano: éter (10:1).²⁷

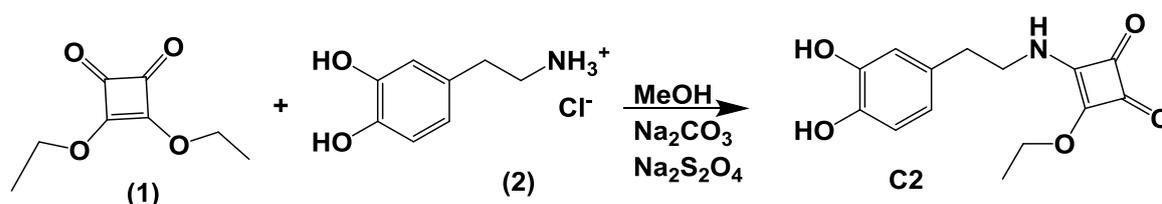
Se obtienen 1,68 g de un producto sólido amarillo muy fino con un rendimiento del 76%.

$^1\text{H-RMN}$ (DMSO-d_6) δ : 8,77(br, NH); 8,58 (br, NH); 4,63 (q, 2H); 3,5 (dq, 2H); 2,22 (q, 2H); 2,11 (s, 6H); 1,63 (m, 2H); 1,36 (t, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3) δ : 189,2; 188,47; 182,03; 176,91; 172,47; 68,63; 54,99; 43,64; 42,63; 26,59; 15,44 ppm.

5.2.3. SÍNTESIS DE DIESCUARAMIDA C2.

3-(3,4-dihidroxifeniletilamino)-4-etoxiciclobut-3-en-1,2-diona.



En un matraz redondo de fondo plano se disuelven 0,99 g (5,24 mmol) de clorhidrato de dopamina (2) en 40 mL de metanol, se deja en agitación 5 minutos y se adiciona 400 mg de Na_2CO_3 para producir la desprotonación de la amina y 200 mg de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ para evitar la oxidación de la dopamina a la forma de orto-quinona (que se observa claramente con un cambio de color en la disolución de la dopamina, que va desde rosa hasta un color café muy oscuro). Posteriormente se adicionan 7 gotas de NaOH 1 M; es necesario esperar 5 segundos entre cada gota. Continuando, se disuelven 1,13 g (6,64 mmol) de escurato de dietilo (1) en 20 mL de MeOH y se adicionan gota a gota con ayuda de un embudo de presión compensada sobre la mezcla de reacción de la dopamina. Se deja reaccionar durante 16 horas a temperatura ambiente y atmosfera de Argón. Al finalizar la reacción, se filtran las sales y se reduce el volumen con ayuda del rotavapor; se precipita con 30 mL de éter di etílico. Se realizan 2 lavados con éter, con la finalidad de eliminar restos de producto de partida.

Se obtienen 927,8 mg de producto sólido color amarillo muy fino, con un rendimiento del 63,98%.

$^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6) δ : 1,35 (t, 3H); 2,62 (t, 2H); 3,39 (d, 1H); 3,59 (d, 1H); 4,61 (m, 2H) 6,42 (m, 1H); 6,62 (m, 2H); 8,0 (br, NH); 8,70 (t, 1H); 8,84 (t, 1H) ppm.

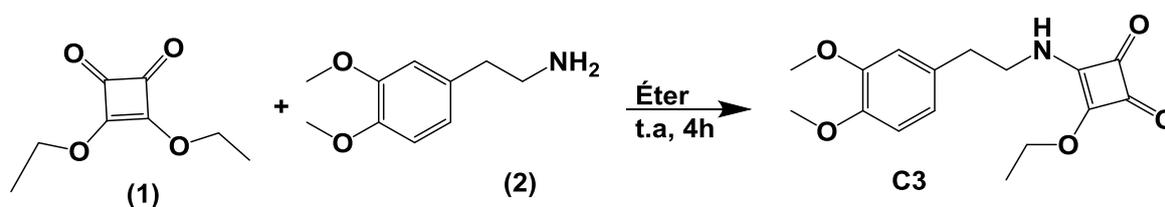
$^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6) δ : 15,52; 35,62; 45,51; 68,60; 116,11; 119,28; 128,77; 143,65; 144,98; 172,43; 176,43; 181,91; 189,06 ppm.

IR (KBr): 816; 1029; 1079; 1120; 1172; 1236; 1282; 1334; 1382; 1421; 1518; 1537; 1597; 1690; 1814; 3060; 3245; 3492 cm^{-1}

EM (HRMS-ESI(+)) m/z (%) calculada para $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{O}_5\text{N}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 300,0848; encontrada 300, 0842.

5.2.4. SÍNTESIS DE DIESCUARAMIDA C3.

3-(3,4-dimetoxifeniletilamino)-4-etoxiciclobut-3-en-1,2-diona.



En un matraz redondo de fondo plano se disuelven 1 g (5,88 mmol) de escurato de dietilo (1) en 40 mL de éter dietílico. Por otro lado, se disuelve 1,12 g (6,22 mmol) de 3,4-dimetoxifenetilamina (2) en 25 mL éter dietílico y se adiciona muy lentamente y gota a gota con la ayuda de un embudo de presión compensada a la mezcla de

reacción de **(1)**. La reacción se deja transcurrir por 4 horas en atmosfera inerte de Argón. Al término de la reacción se observa la formación de un precipitado blanco muy fino. Filtrar y lavar con éter.

Se obtienen 1,43 g de un producto sólido blanco muy fino con un rendimiento del 80%.

¹H-RMN (DMSO-d₆) δ : 1,32 (m, 3H); 2,74 (t, 2H); 3,46 (m, 2H); 3,72 (d, 6H); 4,59 (m, 2H); 6,71 (d, 1H); 6,84 (m, 2H); 8,82 (dt, 2H) ppm.

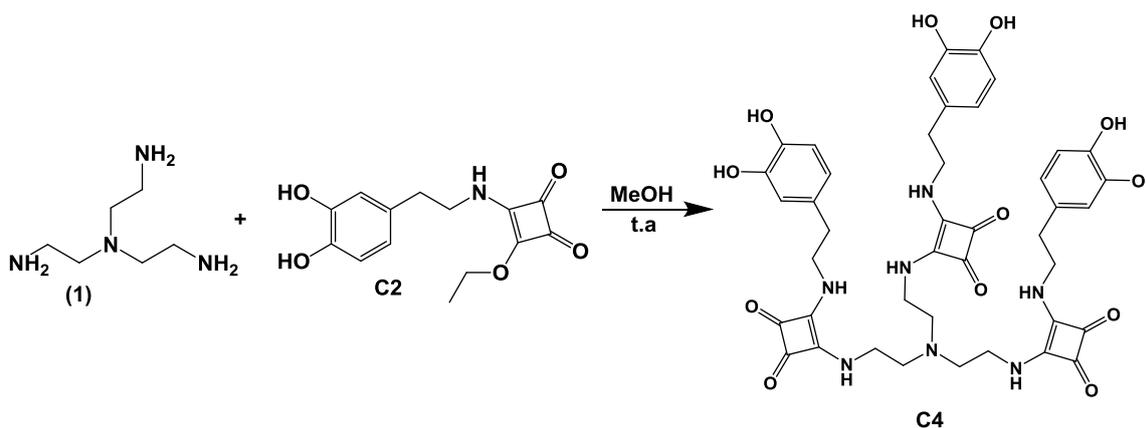
¹³C-RMN (DMSO-d₆) δ : 15,09; 35,32; 45,02; 54,85; 68,25; 112,09; 120,27; 130,13; 146,87; 148,10; 172,14; 176,10; 181,99; 188,71 ppm.

IR (KBr): 768; 794; 1030; 1104; 1143; 1157; 1234; 1268; 1354; 1385; 1454; 1501; 1598; 1697; 1798; 2830; 2937; 3080; 3206 cm⁻¹

EM (HRMS-ESI(+)) m/z(%) calculada para C₁₆H₁₉O₅N [M+Na]⁺: 328,1162; encontrada 328,1155.

5.2.5. SÍNTESIS DE ESCUARAMIDA C4

N,N',N''-Tris(3-(3,4-dihidroxifeniletilamino)-4-etoxiciclobut-3-en-1,2-diona)-Tris(2-aminoetil)amina



En un matraz redondo de fondo plano, se disuelven 313 mg (1,13 mmol) de **C2** en 30 mL de MeOH. Por otro lado, se disuelven 52 mg (0,35 mmol) de TREN **(1)** en 10 mL de MeOH y se adiciona lentamente con ayuda de un embudo de presión compensada sobre la mezcla **C2**. La reacción se deja transcurrir por 3 horas en atmosfera inerte de Argón y 50°C, posteriormente se deja a temperatura ambiente durante 12 horas. Al término de la reacción se observa la formación de un precipitado color marrón, filtrar y lavar con 10 mL de MeOH. Para finalizar, secar con 5 mL de éter.

Se obtienen 300 mg de producto sólido color marrón muy fino, con un rendimiento del 73%.

¹H-RMN (DMSO-d₆) δ : 2,64 (t, 12H); 3,64 (dt, 12H); 6,46 (d, 3H); 6,64 (m, 9H) ppm.

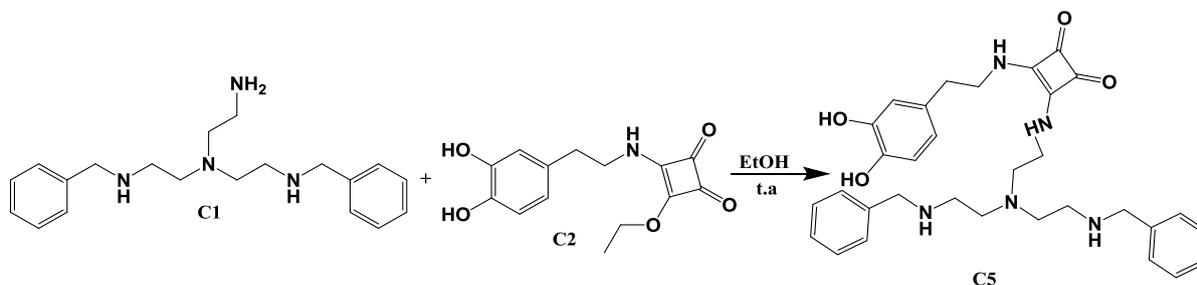
¹³C-RMN (DMSO-d₆) δ : 36,46; 41,49; 44,97; 54,64; 115,51; 119,34; 129,17; 143,73; 145,16; 167,90; 182,52 ppm.

IR (KBr): 635; 783; 810; 1115; 1262; 1349; 1433; 1541; 1588; 1655; 1799; 2949; 3244 cm^{-1} .

EM (HRMS-ESI(+)) m/z(%) calculada para $\text{C}_{42}\text{H}_{45}\text{O}_{12}\text{N}_7$ [M-H]⁻: 838,8510 encontrada 838,3030.

5.2.6. SINTESIS DE ESCUARAMIDA C5

N-(3-(3,4-dihidroxifenil)etilamino)-4-etoxiciclobut-3-en-1,2-diona)-*N'*,*N''*bis(2-bencil)tris(2-aminoetil) amina



En un matraz redondo de fondo plano, se disuelven 251 mg de C2 en 30 mL de EtOH y con ayuda de un embudo de presión compensada, adicionar 0,3 g de C1 previamente disueltos en 20 mL de EtOH. Dejar reaccionar durante 16 horas a temperatura ambiente y en atmosfera inerte de argón. Al término de la reacción se observa la formación de un precipitado color blanco, eliminar el exceso de EtOH y precipitar con 30 mL de éter. Filtrar y lavar con una mezcla de EtOH/ Éter (3 gotas de EtOH por cada 10 mL de éter).

Se obtienen 213 mg de un producto sólido color gris tenue, con un rendimiento del 44%.

¹H-RMN (DMSO-d₆) δ : 3,51 - 3,66 (m, 16H); 6,43 (t, 1H); 6,60 (m, 2H); 7,28 (m, 10H); 7,90 (br, NH) ppm.

¹³C-RMN (DMSO-d₆) δ : 36,18; 44,68; 45,96; 52,42; 53,24; 54,22; 115,20; 118,92; 126,20; 127,72; 128,86; 140,09; 143,37; 144,79; 167,45; 182,09 ppm.

IR (KBr): 605; 700; 749; 1043; 1117; 1210; 1261; 1352; 1453; 1539; 1592; 1655; 1797; 2850; 2949; 3250; 3441 cm^{-1} .

EM (HRMS-ESI (+)) m/z (%) calculada para $\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{O}_4\text{N}_5$, 557,3002, encontrada 611,21.

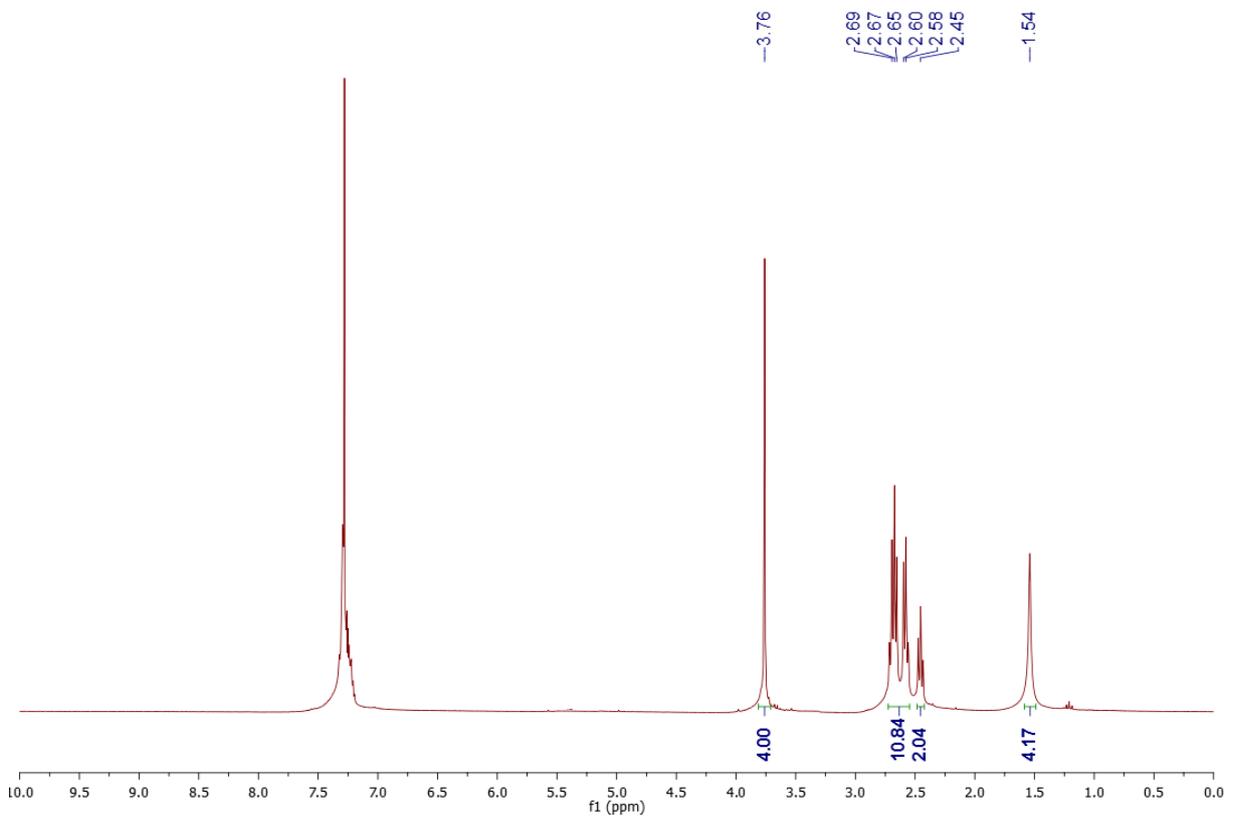
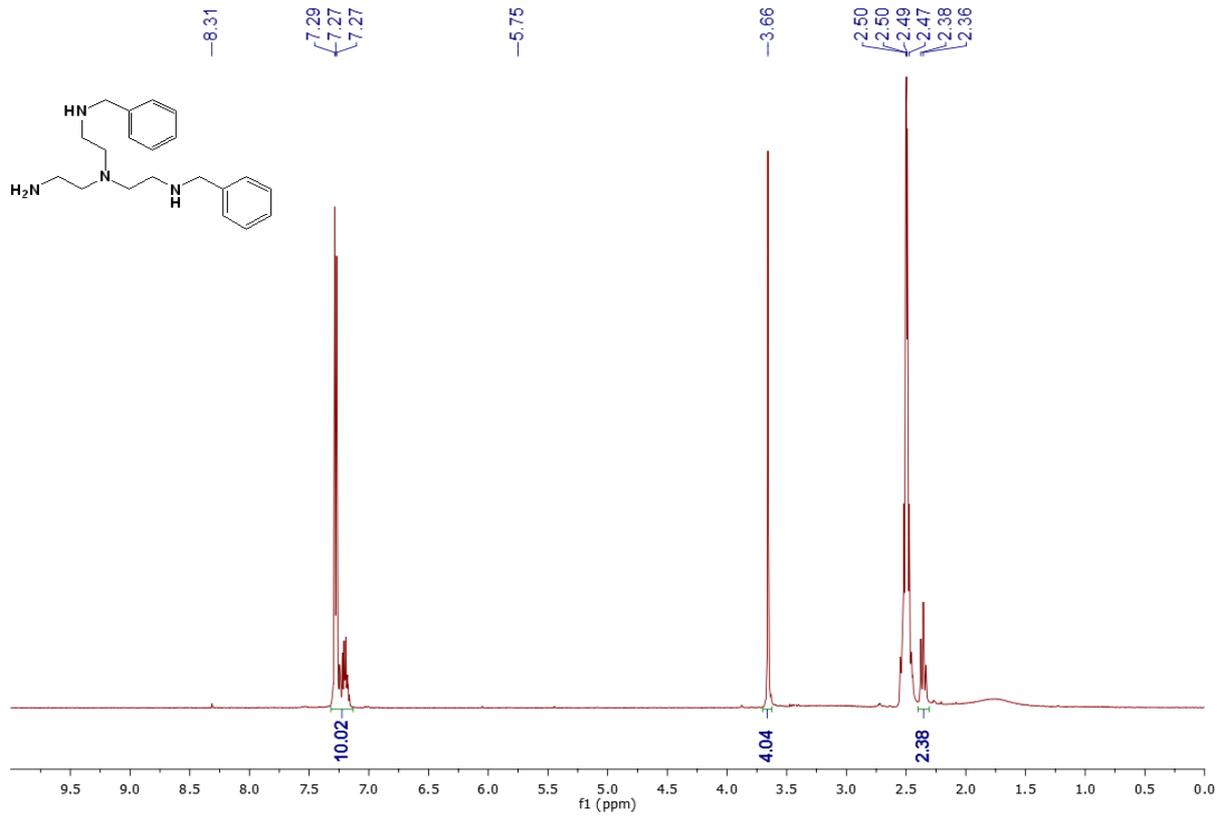
6. RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

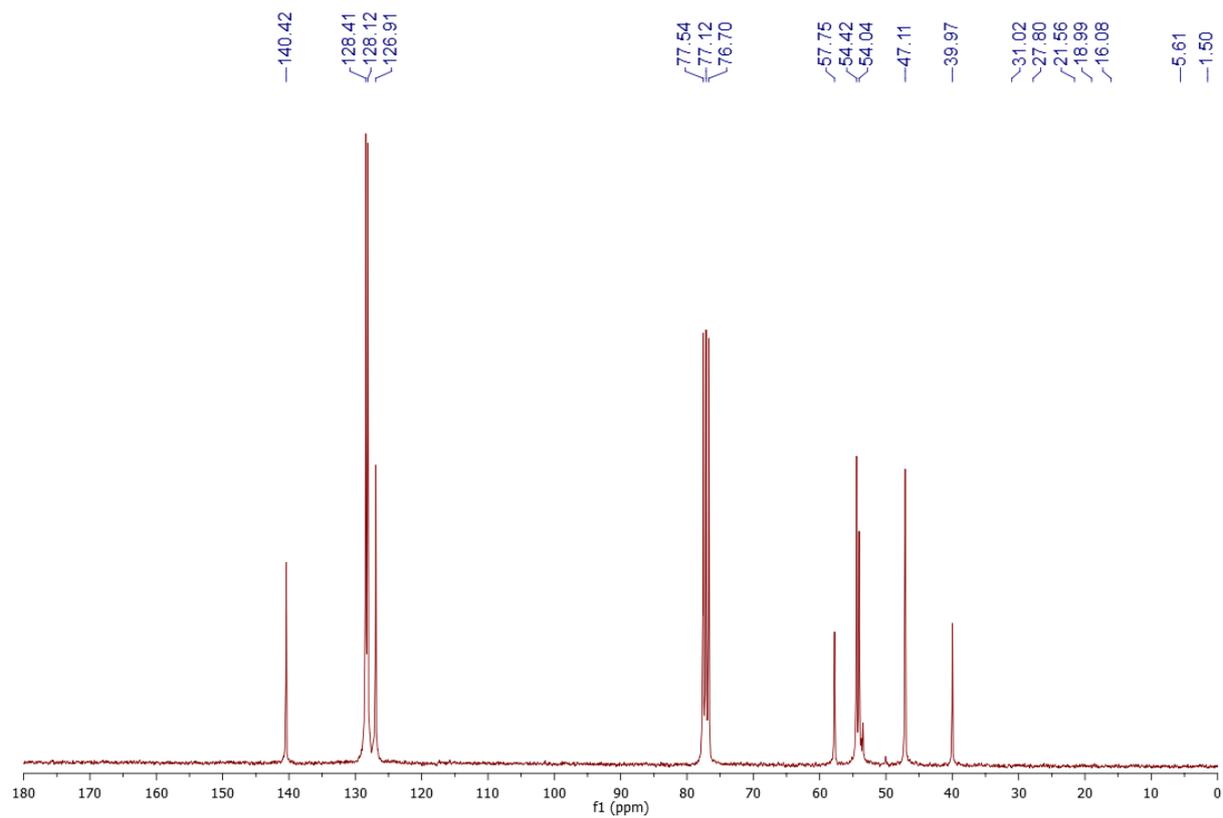
- [1] M. A. González-Martínez, E. M. Brun, R. Puchades, A. Maquieira, K. Ramsey, and F. Rubio, "**Glyphosate immunosensor. Application for water and soil analysis**". *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 13, pp. 4219–4227, 2005.
- [2] K. Z. Guyton, D. Loomis, Y. Grosse, F. El Ghissassi, L. Benbrahim-Tallaa, N. Guha, C. Scoccianti, H. Mattock, K. Straif, A. Blair, L. Fritschi, J. McLaughlin, C. M. Sergi, G. M. Calaf, F. Le Curieux, I. Baldi, F. Forastiere, H. Kromhout, A. 't Mannetje, T. Rodriguez, P. Egeghy, G. D. Jahnke, C. W. Jameson, M. T. Martin, M. K. Ross, I. Rusyn, L. Zeise, "**Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate**," *Lancet Oncol.*, vol. 16, no. 5, pp. 490–491, 2015.
- [3] B. Liu, L. Dong, Q. Yu, X. Li, F. Wu, Z. Tan, S. Luo, "**Thermodynamic Study on the Protonation Reactions of Glyphosate in Aqueous Solution: Potentiometry, Calorimetry and NMR spectroscopy**," *J. Phys. Chem. B*, vol. 120, no. 9, pp. 2132–2137, 2016.
- [4] T. Alves De Souza, M. Helena De Rizzo Da Matta, É. Montagner, "**Estudo de recuperação de glifosato e ampa derivados em solo utilizando se resinas nacionais**," *Quim. Nov.*, vol. 29, no. 6, pp. 1372–1376, 2006.
- [5] S. Tomas, R. Prohens, M. Vega, M. C. Rotger, P. M. Deya, P. Ballester, A. Costa, "**Squaramido-Based Receptors: Design, Synthesis, and Application to the Recognition of Tetraalkylammonium Compounds**," *J. Org. Chem.*, vol. 61, no. 13, pp. 9394–9401, 1996.
- [6] D. Quiñonero, C. Garau, A. Frontera, P. Ballester, A. Costa, P. M. Deyà, "**Quantification of aromaticity in oxocarbons: The problem of the fictitious 'nonaromatic' reference system**," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 8, no. 2, pp. 433–438, 2002.
- [7] M. Nieves Piña, K. A. López, A. Costa, J. Morey, "**Critical solvent thermodynamic effect on molecular recognition: The case of the complex formation of carboxylates and ammonium-squaramido based receptors**," *Thermochim. Acta*, vol. 569, pp. 104–111, 2013.
- [8] K. A. López, M. N. Piña, J. Morey, "**Squaramide-coated Fe₃O₄ nanoparticles and their selective complexation with carboxylate anions in water**," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 181, pp. 267–273, 2013.
- [9] D. Quiñonero, K. A. López, P. M. Deyà, M. N. Piña, J. Morey, "**Synthetic tripodal squaramido-based receptors for the complexation of antineoplastic folates in water**," *European J. Org. Chem.*, no. 31, pp. 6187–6194, 2011.
- [10] A. Metzger, V. M. Lynch, E. V. Anslyn, "**A synthetic receptor selective for citrate**," *Angew. Chemie, Int. Ed. English*, vol. 36, no. 8, pp. 862–865, 1997.
- [11] J.-M. Lehn, "**Toward complex matter: Supramolecular chemistry and self-organization**," *PNAS*, vol. 99, pp. 4763–4768, 2001.
- [12] D. Williams, J. Bridges, W. De Jong, T. Jung, and K. Rydzynski, "**The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies**," *Toxicology*, vol. 246, no. 2–3, p. 79, 2006.
- [13] M. Rezaei, S. Salem, "**Optimal TiO₂ -Graphene Oxide Nanocomposite for Photocatalytic Activity under Sunlight Condition: Synthesis, Characterization, and Kinetics**," *Int. J. Chem. Kinet.*, pp. 1–11, 2016.
- [14] K. Lee, S. Y. Shin, Y. S. Yoon, "**Communication Fe₃O₄ Nanoparticles on MWCNTs Backbone for Lithium Ion Batteries**," *J. Korean Ceram. Soc.*, vol. 53, no. 3, pp. 376–380, 2016.

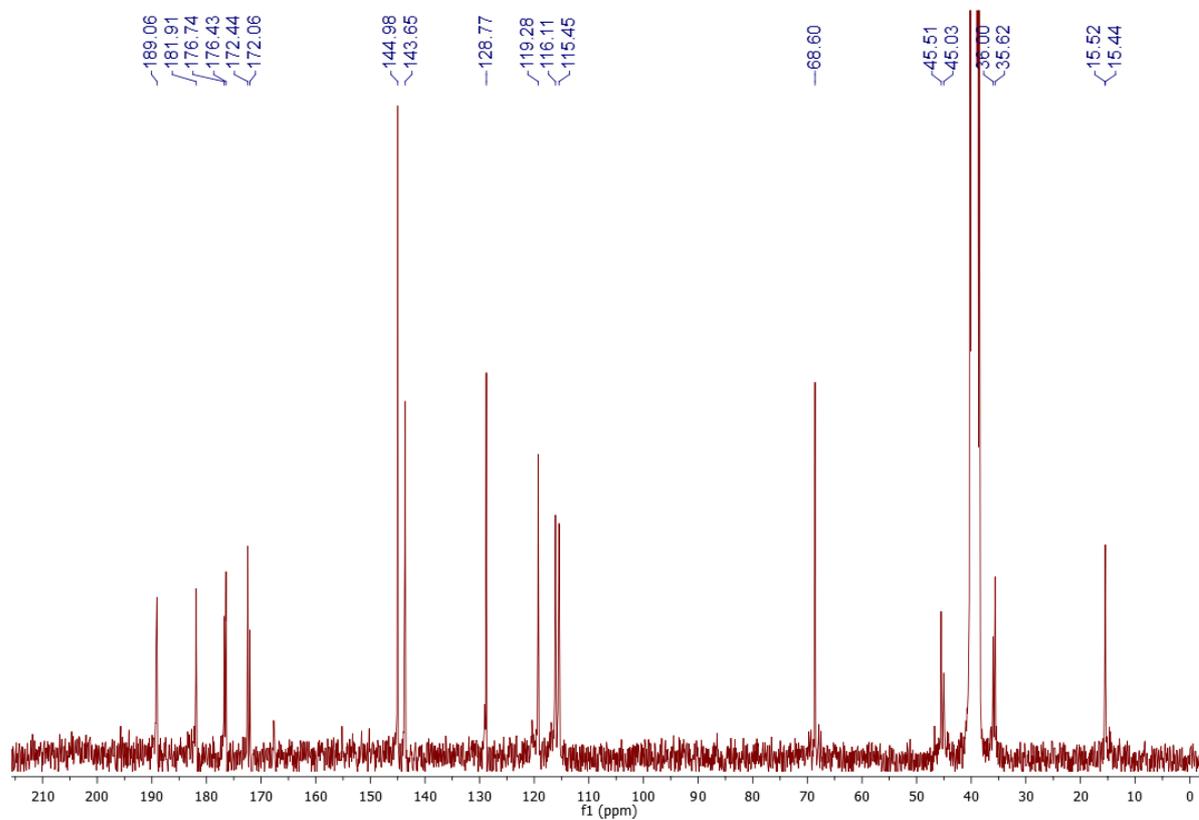
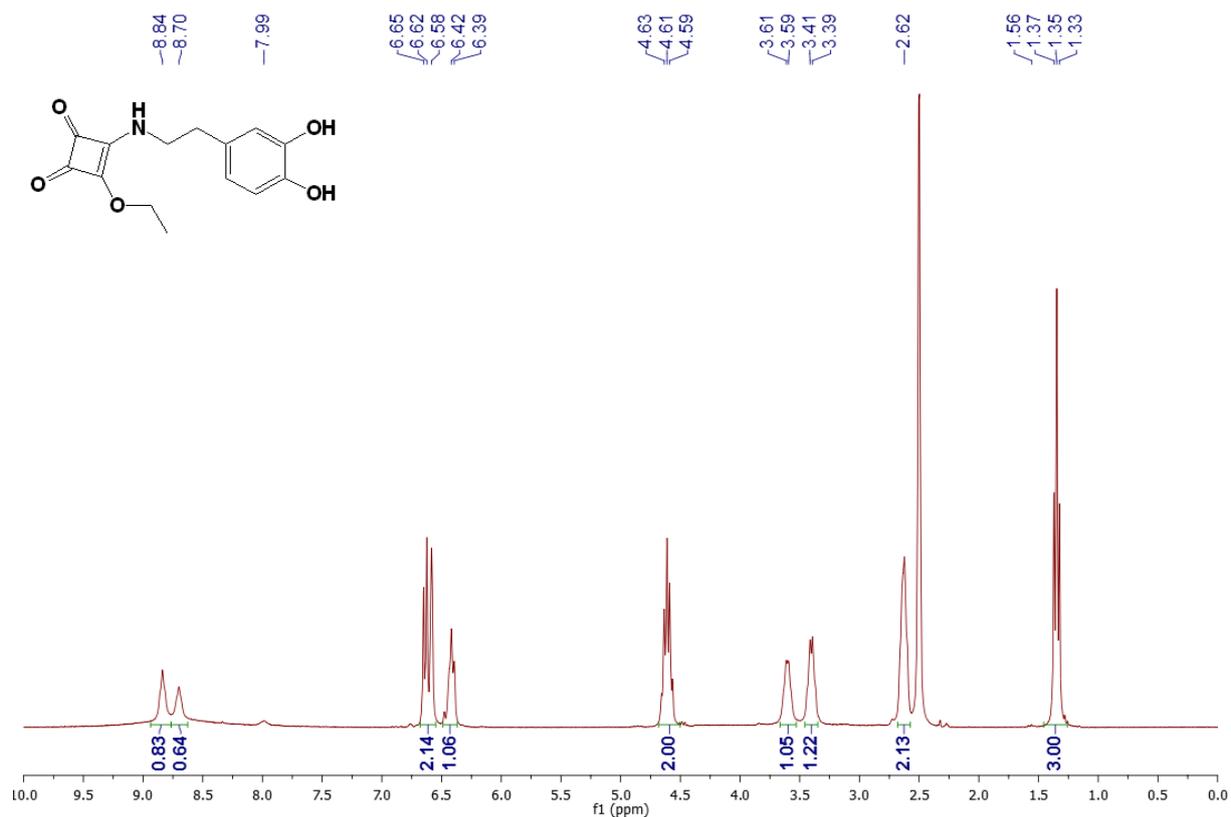
- [15] Y. F. Shen, J. Tang, Z. H. Nie, Y. D. Wang, Y. Ren, L. Zuo, **"Preparation and application of magnetic Fe_3O_4 nanoparticles for wastewater purification,"** Sep. Purif. Technol., vol. 68, no. 3, pp. 312–319, Aug. 2009.
- [16] J.-D. Hu, Y. Zevi, X.-M. Kou, J. Xiao, X.-J. Wang, Y. Jin, **"Effect of dissolved organic matter on the stability of magnetite nanoparticles under different pH and ionic strength conditions,"** Sci. Total Environ., vol. 408, pp. 3477–3489, 2010.
- [17] J. D. G. Durán, J. L. Arias, V. Gallardo, A. V. Delgado, **"Magnetic Colloids As Drug Vehicles,"** J. Pharm. Sci., vol. 97, no. 8, pp. 2948–2983, Aug. 2008.
- [18] K. A. López, M. N. Piña, D. Quiñonero, P. Ballester, J. Morey, **"Highly efficient coordination of Hg^{2+} and Pb^{2+} metals in water with squaramide-coated Fe_3O_4 nanoparticles,"** pp. 1–11, 2014.
- [19] J. L. Viota, J. D. G. Dura, F. González-Caballero, A. V. Delgado, **"Magnetic properties of extremely bimodal magnetite suspensions,"** J. Magn. Mater., vol. 314, pp. 80–86, 2007.
- [20] J. Zheng, H. Zhang, J. Qu, Q. Zhu, X. Chen, **"Visual detection of glyphosate in environmental water samples using cysteamine-stabilized gold nanoparticles as colorimetric probe,"** Anal. Methods, vol. 5, no. 4, pp. 917–924, 2013.
- [21] M. Wang, H. Ye, L. You, X. Chen, **"A Supramolecular Sensor Array Using Lanthanide-Doped Nanoparticles for Sensitive Detection of Glyphosate and Proteins,"** ACS Appl. Mater. Interfaces, vol. 8, no. 1, pp. 574–581, 2016.
- [22] S. Sun, H. Zeng, **"Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles,"** J. Am. Chem. Soc., no. 31, pp. 8204–8205, 2002.
- [23] M. Zahmakıran, K. Philippot, S. Ozkar, B. Chaudret, **"Dalton Transactions Size-controllable APTS stabilized ruthenium(0) nanoparticles catalyst for the dehydrogenation of dimethylamine–borane at room temperature,"** vol. 41, 2012.
- [24] S. Cohen, S. G. Cohen, **"Preparation and reactions of derivatives of squaric acid. Alkoxy-, hydroxy-, and aminocyclobutenediones,"** J. Am. Chem. Soc., vol. 88, no. 7, pp. 1533–1536, Apr. 1966.
- [25] R. West, D. L. Powell, **"New Aromatic Anions. III. Molecular Orbital Calculations on Oxygenated Anions,"** J. Am. Chem. Soc., vol. 85, no. 17, pp. 2577–2579, Sep. 1963.
- [26] L. M. Schwartz, L. O. Howard, **"Conductance study of squaric acid aqueous dissociation,"** J. Phys. Chem., vol. 75, no. 12, pp. 1798–1803, Jun. 1971.
- [27] K. A. López, **"Síntesis de compuestos híbridos nanoestructurados y evaluación de su comportamiento supramolecular y actividad biológica,"** Universitat de les Illes Balears, 2013.
- [28] **"Pesticide residues in food WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues Guidance document for WHO monographers and reviewers."**
- [29] C. Bolognesi, G. Carrasquilla, S. Volpi, K. R. Solomon, E. J. P. Marshall, **"Biomonitoring of Genotoxic Risk in Agricultural Workers from Five Colombian Regions: Association to Occupational Exposure to Glyphosate Biomonitoring Genotoxic Risk in Agricultural Workers,"** J. Toxicol. Environ. Heal. Part A, vol. 72, pp. 986–997, 2009.
- [30] P. J. Mink, J. S. Mandel, B. K. Scurman, J. I. Lundin, **"Epidemiologic studies of glyphosate and cancer: A review,"** Regul. Toxicol. Pharmacol., vol. 63, pp. 440–452, 2012.
- [31] International Agency for Research on Cancer, IARC Monographs Volume 112: **"Evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides,"** vol. 112, no. 1. 2014, pp. 425–433.

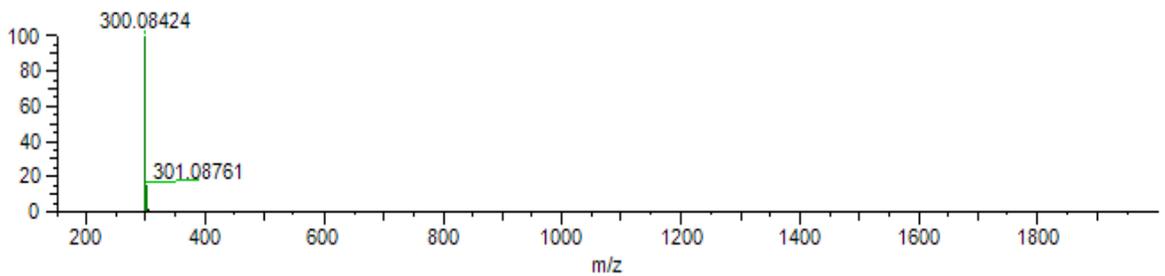
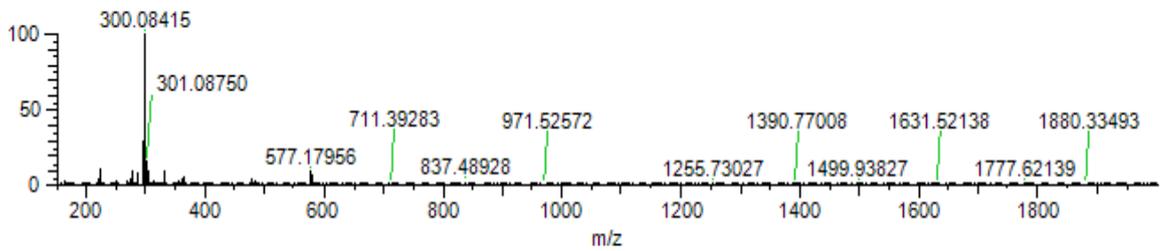
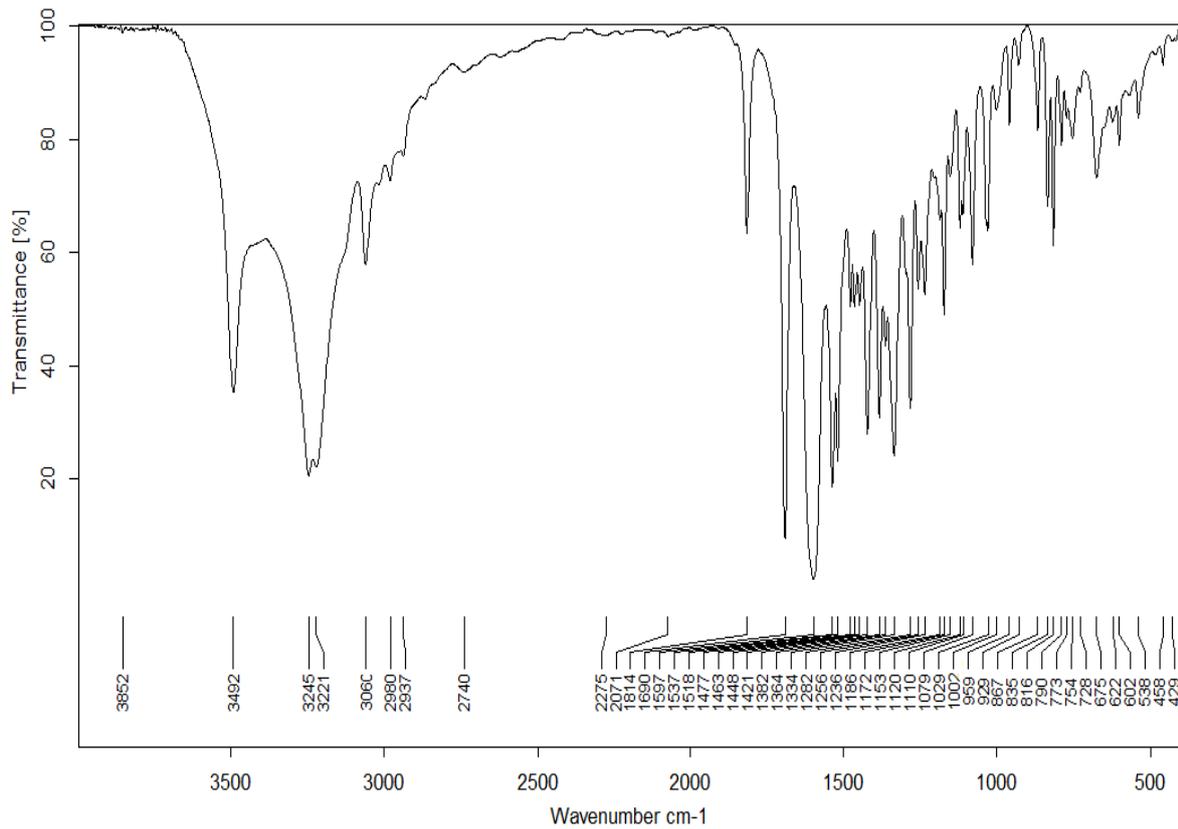
- [32] M. T. K. Tsui, L. M. Chu, **“Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: Comparison between different organisms and the effects of environmental factors,”** *Chemosphere*, vol. 52, no. 7, pp. 1189–1197, 2003.
- [33] M. D. Busse, A. W. Ratcliff, C. J. Shestak, R. F. Powers, **“Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities,”** *Soil Biol. Biochem.*, vol. 33, no. 12–13, pp. 1777–1789, 2001.
- [34] J. P. Giesy, S. Dobson, K. R. Solomon, **“Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide,”** *Rev. Environ. Toxicol.*, vol. 167, pp. 35–120, 2000.
- [35] L. Liu, Z. K. Punja, J. E. Rahe, **“Effect of *Phytium spp.* and glyphosate on phytoalexin production and exudation by bean (*Phaseolus vulgaris L.*) roots grown in different media,”** *Physiol. Mol. Plant Pathology*, vol. 47, no. 6, pp. 391–405, 1995.
- [36] J. M. Benito, M. Gómez-garcía, C. O. Mellet, J. Defaye, J. M. G. Fernandez, M. Go, I. Baussanne, M. García, **“Optimizing Saccharide-Directed Molecular Delivery to Biological Receptors: Design , Synthesis , and Biological Evaluation of Glycodendrimer – Cyclodextrin Conjugates Optimizing Saccharide-Directed Molecular Delivery to Biological Receptors : Design , Syn,”** *Nature*, pp. 10355–10363, 2004.
- [37] S. Gou, M. Qian, Z. Yu, C. Duan, X. Sun, W. Huang, **“Synthesis, molecular structure and magnetic properties of tetranuclear copper(II) complexes with pendant-arm macrocyclic ligands,”** *J. Chem. Soc. Dalt. Trans. Inorg. Chem.*, pp. 3232–3237, 2001.
- [38] S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst, R. N. Muller, **“Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications,”** *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 6, pp. 2064–2110, Jun. 2008.
- [39] O. Pascu, E. Carenza, M. Gich, S. Estradé, F. Peiró, G. Herranz, A. Roig, **“Surface reactivity of iron oxide nanoparticles by microwave-assisted synthesis; Comparison with the thermal decomposition route,”** *J. Phys. Chem. C*, vol. 116, no. 28, pp. 15108–15116, 2012.
- [40] K. Parekh, R. V Upadhyay, L. Belova, K. V Rao, **“Ternary monodispersed $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ ferrite nanoparticles: preparation and magnetic characterization,”** *Nanotechnology*, vol. 17, no. 24, pp. 5970–5975, 2006.
- [41] M. N. Piña, B. Soberats, C. Rotger, P. Ballester, P. M. Deyà, A. Costa, **“Selective sensing of competitive anions by non-selective hosts: the case of sulfate and phosphate in water,”** *New J. Chem.*, vol. 32, no. 11, p. 1919, 2008.
- [42] M. N. Piña, C. Rotger, B. Soberats, P. Ballester, P. M. Deyà, A. Costa, **“Evidence of anion-induced dimerization of a squaramide-based host in protic solvents,”** *Chem. Commun.*, no. 9, pp. 963–965, 2007.



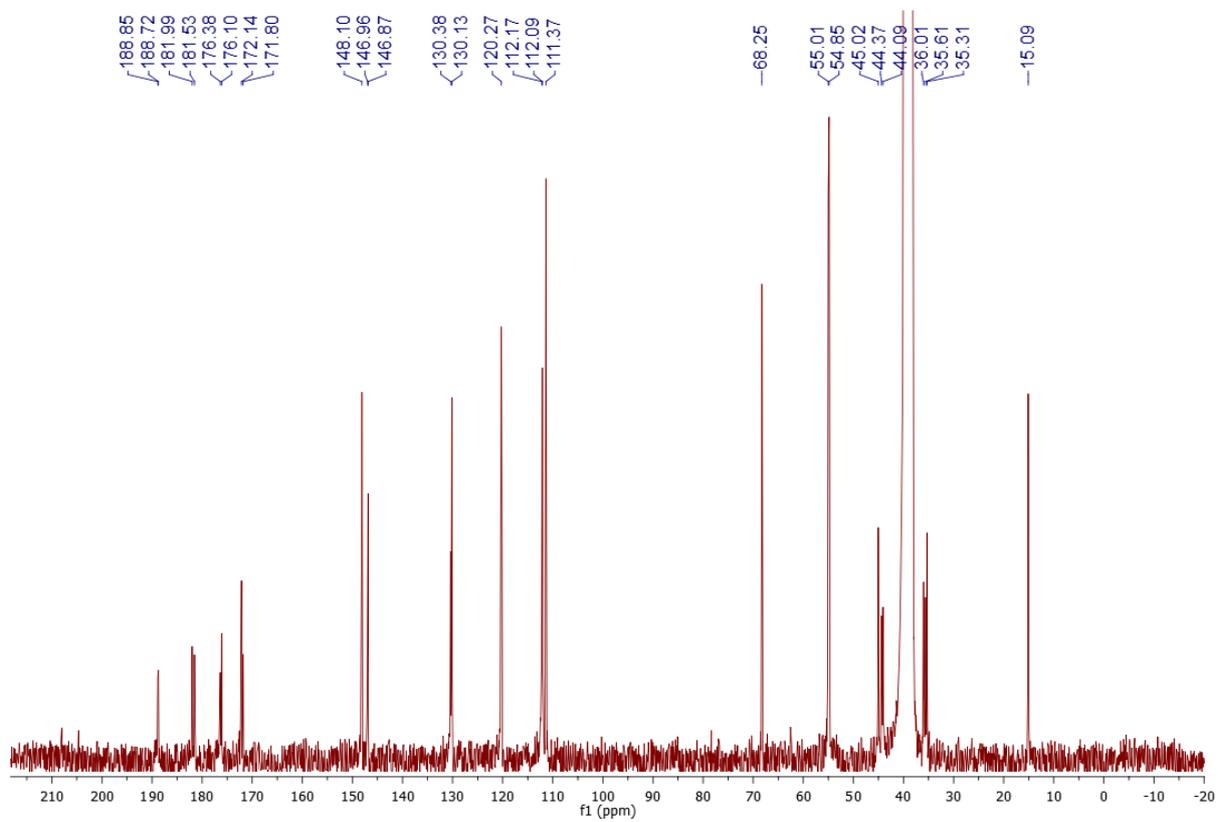
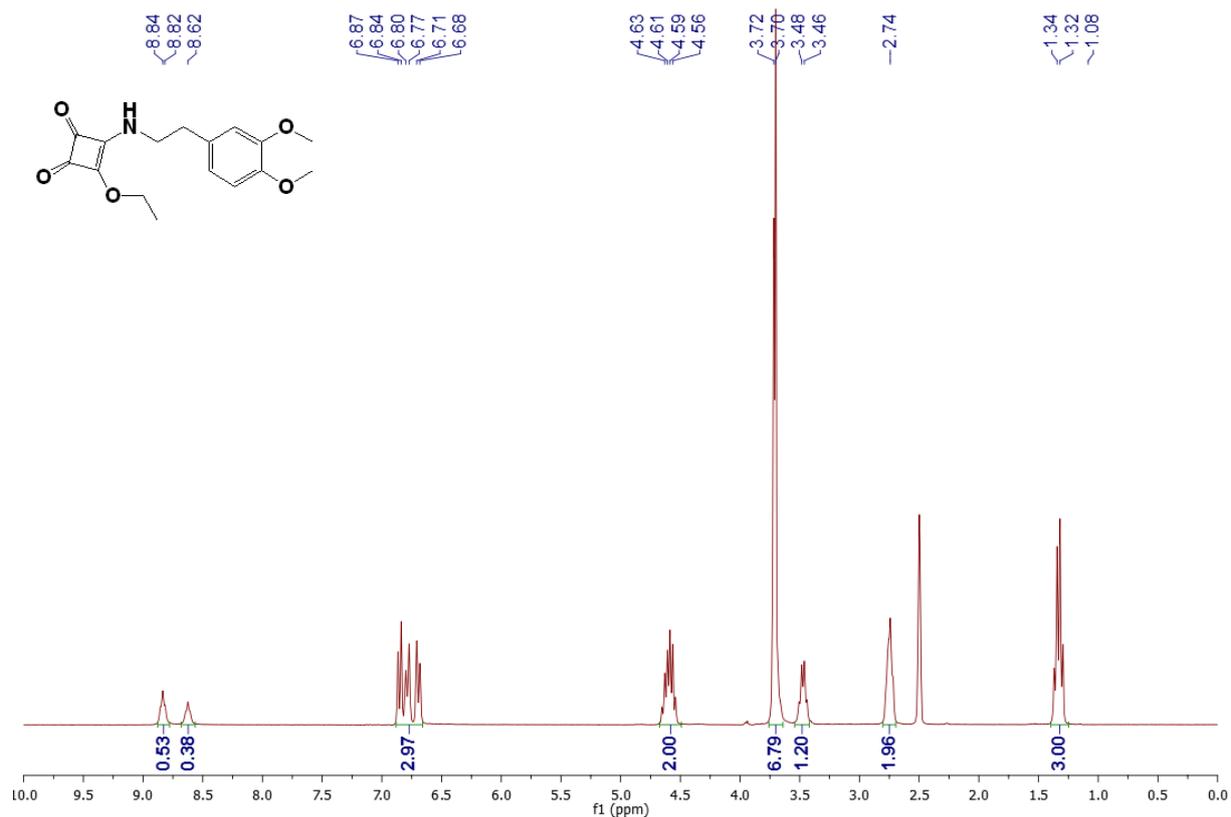


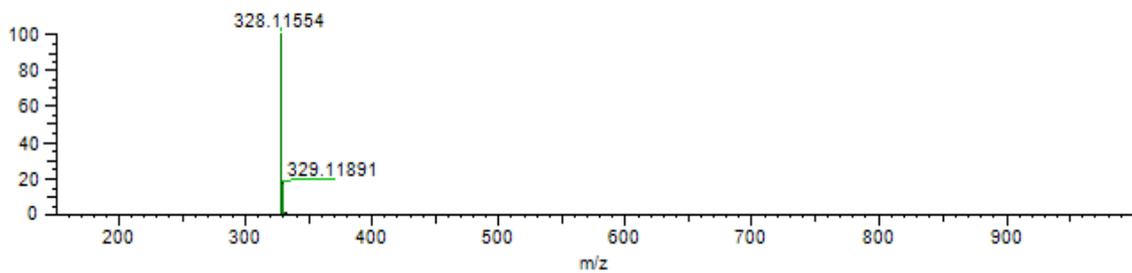
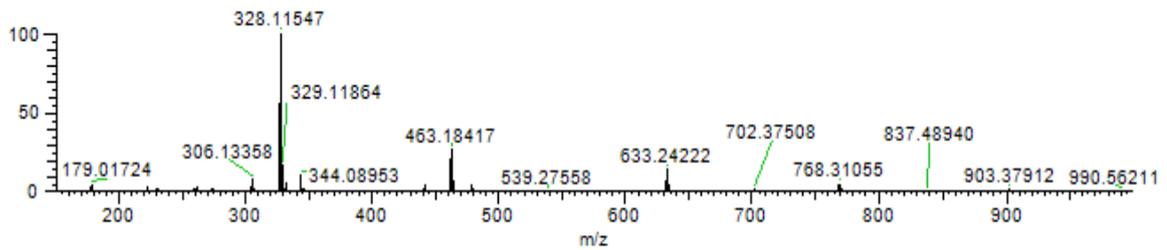
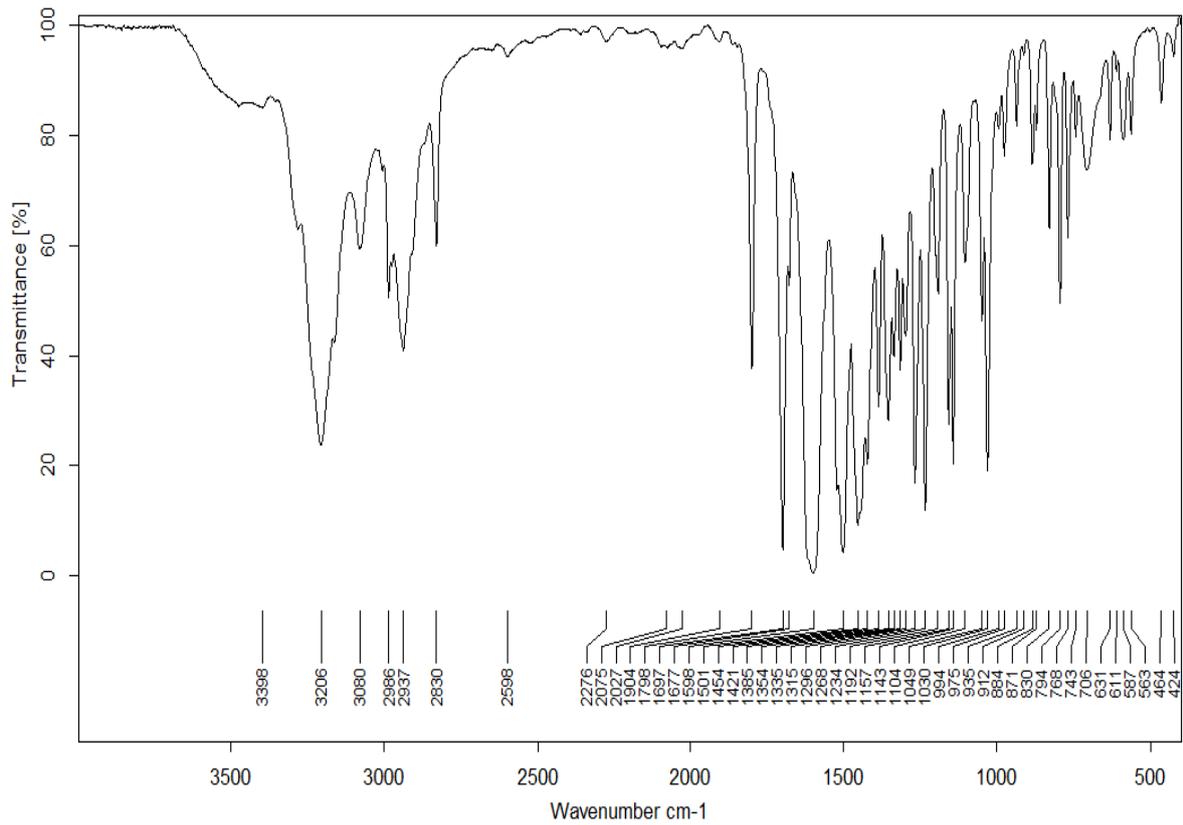




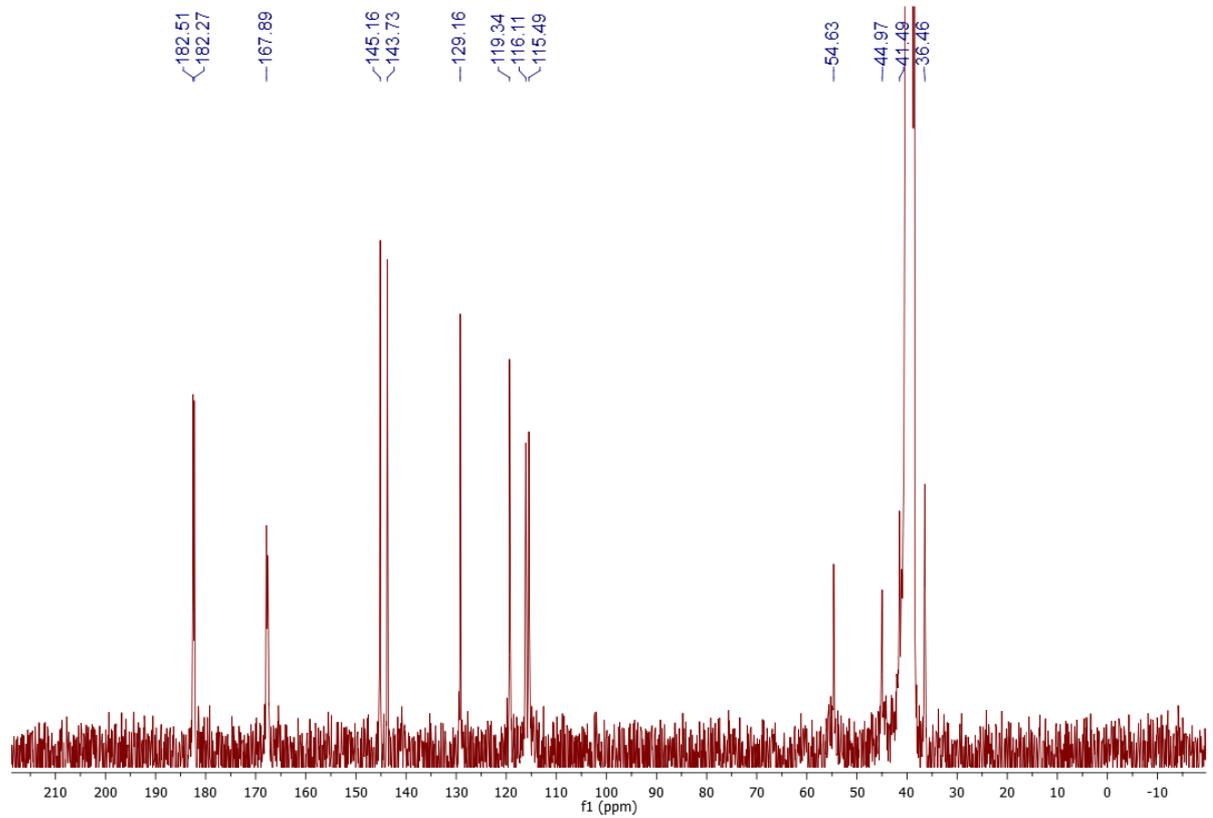
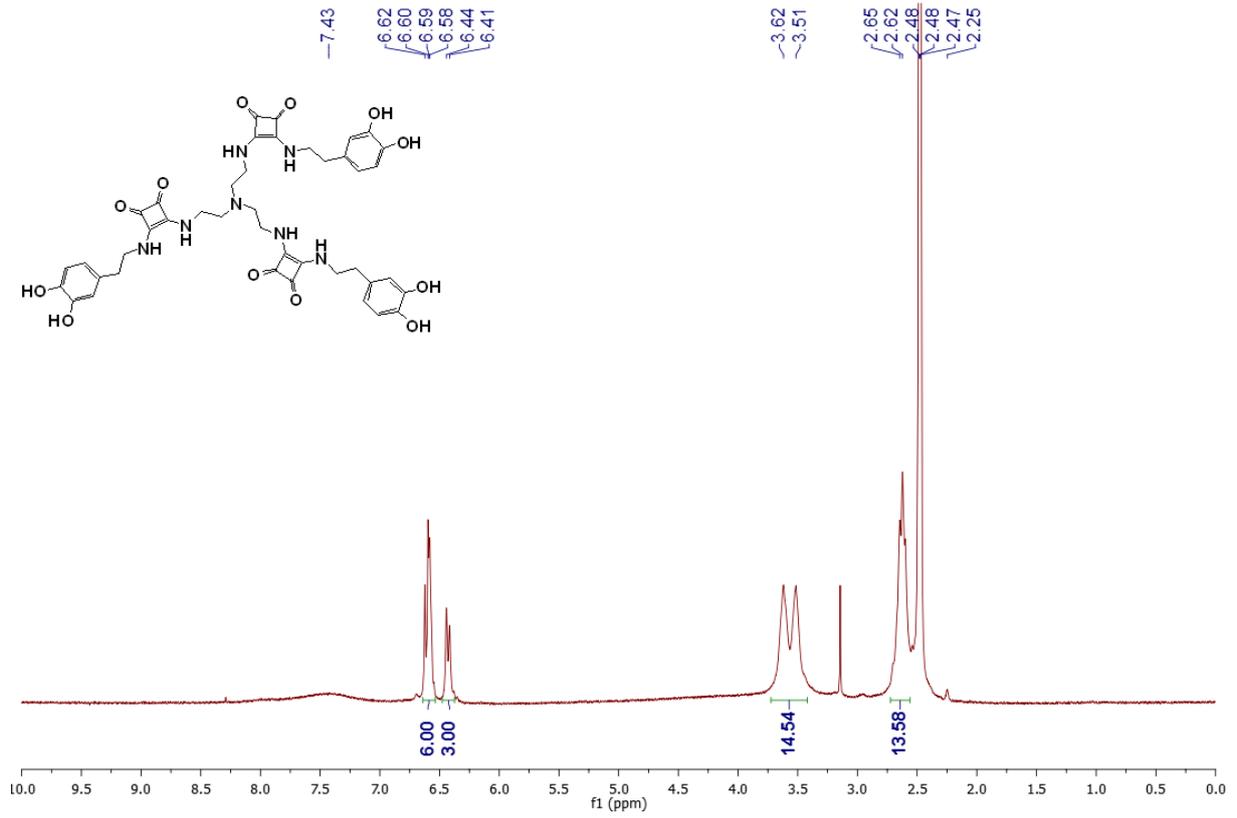


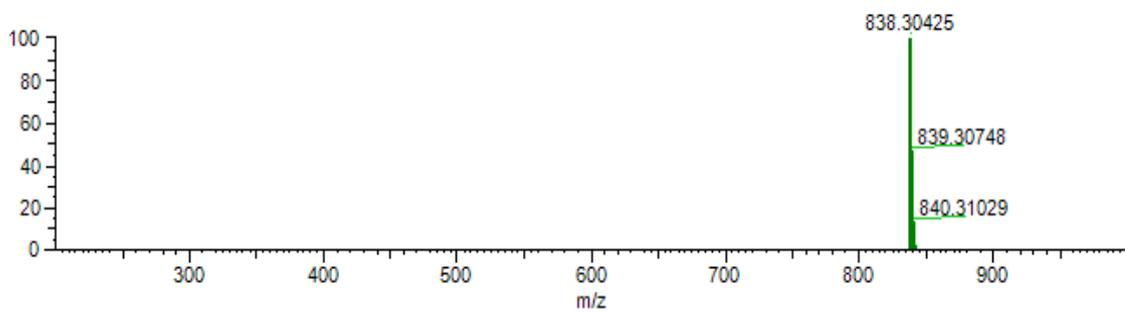
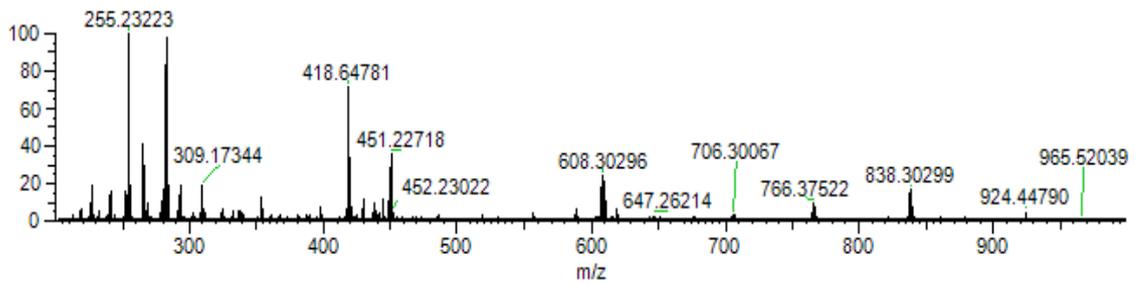
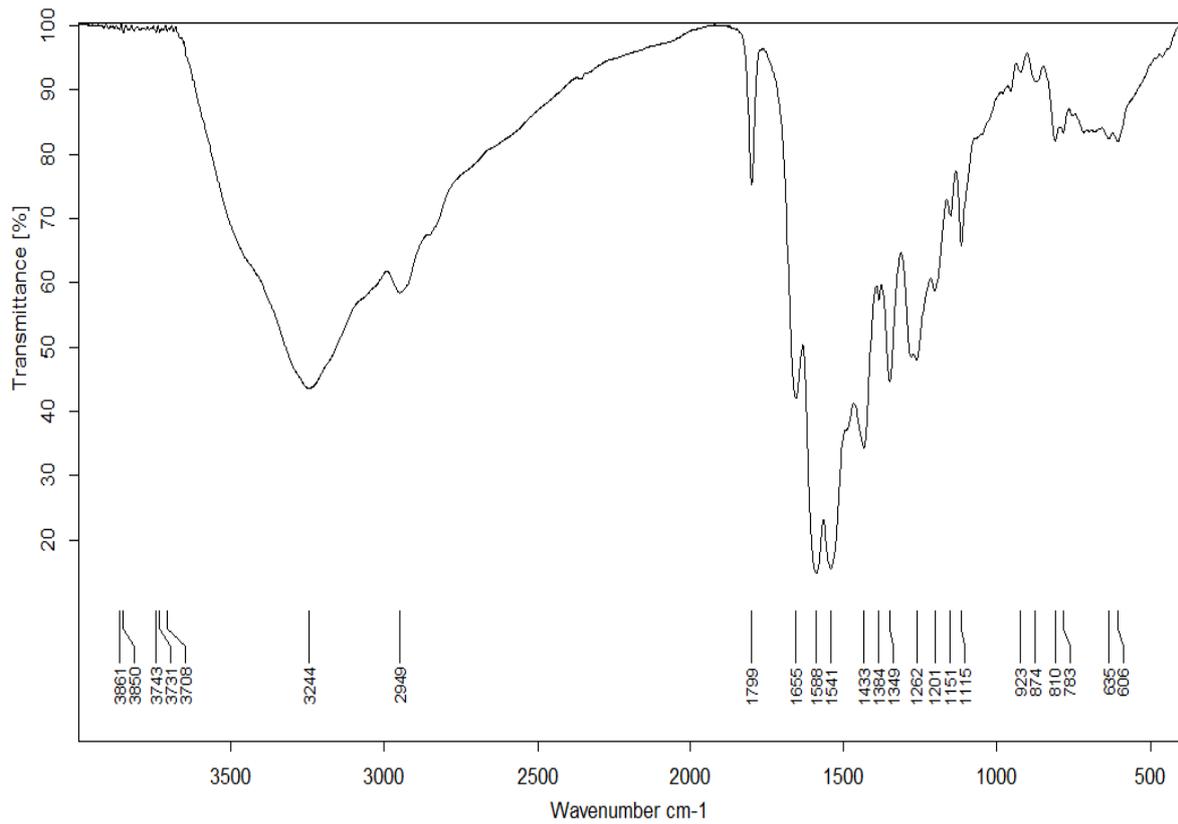
Index	m/z	Formula	Score	RDB	Delta ppm	OriginalFormula	Theo. Mass
1	300.08415	C ₁₄ H ₁₅ O ₅ N ²³ Na	100	7.5	-0.31	C14H15O5N[23]Na	300.08424
2		C ₁₂ H ₁₀ O ₃ N ₇	85.1664487530757	11.5	0.62	C12H10O3N7	300.08396
3		C ₁₃ H ₁₂ ON ₅ ²³ Na ₂	59.8627524757478	9.5	3.25	C13H12ON5[23]Na2	300.08318
4		C ₁₅ H ₁₁ ON ₅ ²³ Na	32.6461464817897	12.5	-4.77	C15H11ON5[23]Na	300.08558
5		C ₃ H ₁₄ O ₂ N ₉ ²³ Na ₄	24.2260676399862	-0.5	-4.75	C3H14O2N9[23]Na4	300.08558





Index	m/z	Formula	Score	RDB	Delta ppm	OriginalFormula	Theo. Mass
1	328.11547	C ₁₆ H ₁₉ O ₅ N ²³ Na	100	7.5	-0.21	C16H19O5N[23]Na	328.11554
2		C ₁₄ H ₁₄ O ₃ N ₇	93.5932240724125	11.5	0.64	C14H14O3N7	328.11526
3		C ₁₅ H ₁₆ ON ₅ ²³ Na ₂	69.3535902585607	9.5	3.04	C15H16ON5[23]Na ₂	328.11448
4		C ₁₇ H ₁₅ ON ₅ ²³ Na	43.3150443834534	12.5	-4.29	C17H15ON5[23]Na	328.11688
5		C ₁₃ H ₁₈ O ₇ N ₃	38.7785988066958	6.5	4.72	C13H18O7N3	328.11393





Index	m/z	Formula	Score	RDB	Delta ppm	OriginalFormula	Theo. Mass
1	838.30299	C ₄₂ H ₄₄ O ₁₂ N ₇	81.4945644353353	24.5	-1.5	C42H44O12N7	838.30425
2		C ₃₇ H ₄₄ O ₁₁ N ₆	42.8106807557099	20.5	3.3	C37H44O11N6	838.30022
3		C ₄₆ H ₄₈ O ₁₄ N	38.6544790860291	23.5	-4.7	C46H48O14N	838.30693

