

Grado en Química

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Desarrollo de una metodología de aislamiento de sideróforos del
tipo hidroxámico

Desenvolvemento dunha metodoloxía para o illamento de
sideróforos do tipo hidroxámico

Development of a methodology for the isolation of hydroxamic-type
siderophores

Lucía López Coria

Curso: 2021- 2022. Convocatoria: Febrero

Jaime Rodríguez González

Carlos Jiménez González

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer, en primer lugar, a mis directores Dr. Jaime González Rodríguez y Dr. Carlos Jiménez González por ayudarme y aconsejarme en la realización del proyecto.

También a todos los compañeros de laboratorio y personas que he conocido en el CICA, con los que me he sentido muy cómoda trabajando estos meses. En especial a Lucía, por todo lo que me ha ayudado y se ha implicado en este trabajo, por los consejos y lo mucho que he aprendido trabajando con ella.

Gracias a mi familia, en especial a mis padres, por el apoyo incondicional y la confianza en mí todos estos años, sin ellos no hubiera llegado hasta aquí.

No puedo olvidarme de dar las gracias a mis amigos, un apoyo fundamental para mí desde hace muchísimos años.

Gracias a estos años en el Grado de Química he conocido a personas maravillosas, como todos los amigos que he hecho en la experiencia Erasmus en Polonia, que siguen presentes en mi vida a pesar de la distancia, y todos los compañeros de la Universidad de la Coruña que se han convertido en muy buenos amigos, por todos los momentos vividos juntos y el apoyo que me han aportado en estos últimos meses para la finalización de este trabajo. En especial, a Anabel, por estar siempre ahí desde el principio, en los buenos y en los malos momentos.

Gracias.

ACRÓNIMOS

| | |
|-----------------|--|
| μL | Microlitro |
| μM | Micromolar |
| μmol | Micromol |
| ACN | Acetonitrilo |
| ATP | Adenosín trifosfato |
| DF-Fe | Ferrioxamina |
| DFO | Deferoxamina |
| g | Gramo |
| h | Horas |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta eficiencia |
| IR | Infrarrojo |
| LC/MS | Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas |
| M | Molar |
| m/z | Relación carga-masa |
| MeOH | Metanol |
| mg | Miligramo |
| mL | Militro |
| mM | Milimolar |
| mmol | Milimol |
| nm | Nanómetros |
| OMR | Receptores de membrana externa |

| | |
|----------------|-----------------------------------|
| PBP | Proteínas de unión periplasmática |
| R ² | Correlación |
| RP | Fase reversa |
| t.a. | Temperatura ambiente |
| UV | Ultravioleta |
| V | Volumen |
| XAD-2 | Resina adsorbente Amberlite 2 |
| XAD-4 | Resina adsorbente Amberlite 4 |
| XAD-7 | Resina adsorbente Amberlite 7 |
| XAD-16 | Resina adsorbente Amberlite 16 |
| λ | Longitud de onda |

ÍNDICE

| | <i>página</i> |
|---|---------------|
| 1. Resumen del proyecto | 1 |
| 1.1. Resumen | 1 |
| 1.2. Summary | 2 |
| 1.3. Resumen | 3 |
| 2. Introducción teórica | 4 |
| 2.1. Importancia del hierro | 4 |
| 2.2. Sideróforos | 5 |
| 2.3. Tipos de sideróforos | 7 |
| 2.4. Mecanismo de captación de hierro mediado por sideróforos | 9 |
| 2.5. Aplicaciones de los sideróforos | 12 |
| 2.6. Métodos de aislamiento de los sideróforos | 15 |
| 2.6.1. Resinas lipofílicas XAD | 15 |
| 2.6.2. Cartuchos cromatográficos C18 | 17 |
| 2.6.3. Cartuchos cromatográficos HLB | 18 |
| 3. Objetivo del proyecto | 20 |
| 4. Procedimiento experimental | 21 |
| 4.1. Preparación de la ferrioxamina | 21 |
| 4.2. Recta de calibrado | 22 |
| 4.3. Retención de DF-Fe con resinas lipofílicas XAD | 23 |
| 4.4. Retención de DF-Fe con cartuchos cromatográficos C18 | 25 |
| 4.5. Retención de DF-Fe con cartuchos cromatográficos HLB | 26 |

| | |
|--|----|
| 5. Resultados y discusión | 28 |
| 5.1. Preparación de la ferrioxamina | 28 |
| 5.2. Construcción de la recta de calibrado | 29 |
| 5.3. Análisis cartuchos C18 | 33 |
| 5.4. Análisis cartuchos HLB | 34 |
| 5.5. Análisis resinas XAD | 35 |
| 6. Conclusiones del proyecto | 39 |
| 6.1. Conclusiones | 39 |
| 6.2. Conclusions | 40 |
| 6.3. Conclusións | 41 |
| 7. Anexos | 42 |
| 7.1. Cronograma | 42 |
| 8. Bibliografía | 43 |

RESUMEN

El hierro es un elemento esencial para casi todos los microorganismos, plantas y animales, debido a sus propiedades únicas. Es un metal de transición que puede presentar estados de oxidación (II) y (III), siendo esa valencia variable la que hace que tenga un papel fundamental en las reacciones de oxidación-reducción, reacciones celulares necesarias para el proceso vital. Presenta una biodisponibilidad muy baja, y debido a su importancia para los microorganismos, muchos de ellos biosintetizan unos compuestos denominados sideróforos, los cuales tienen alta afinidad por el Fe (III). Al secretarlos al medio, los sideróforos forman complejos con Fe (III) que son reconocidos por receptores de membrana del microorganismo y los introducen en las células mediante un mecanismo de transporte adecuado.

El primer objetivo de este trabajo fue sintetizar la ferrioxamina como modelo de sideróforo de tipo hidroxámico, a partir de la quelatación con hierro del mesilato de deferoxamina. Una vez sintetizado, se han estudiado diferentes técnicas cromatográficas para evaluar el aislamiento de este sideróforo realizando una comparativa entre diferentes soportes.

Se han empleado resinas lipofílicas del tipo XAD (XAD-2, XAD-4, XAD-7 y XAD-16), además de cartuchos cromatográficos del tipo C18 y HLB.

Los estudios de recuperación se han realizado mediante espectroscopía de UV-VIS, y finalmente la comparativa de dichos porcentajes de recuperación ha permitido concluir que el uso de cartuchos cromatográficos aporta una recuperación muy baja, mientras que al emplear resinas lipofílicas XAD el porcentaje de recuperación es mucho más elevado, y por tanto más apropiado para el aislamiento de los sideróforos de tipo hidroxámico.

Palabras clave: Hierro, ferrioxamina, sideróforos, hidroxámico, resinas lipofílicas XAD, cartuchos cromatográficos C18, cartuchos cromatográficos HLB.

SUMMARY

Iron is an essential element for almost all microorganisms, plants and animals, due to its unique properties. It is a transition metal that can present oxidation states (II) and (III), being this variable valence what justifies its fundamental role in oxidation-reduction reactions, a key cellular reactions necessary for the vital process. Iron has a very low bioavailability, and due to its importance for microorganisms, many of them are able to biosynthesise compounds called siderophores, which have a high affinity for Fe(III). When they are secreted into the medium, the siderophores feature complexes with Fe(III) that are recognised by microorganism membrane receptors of the microorganism and introduce them into the cells by an appropriate transport mechanism.

The first goal of this work was to synthesise ferrioxamine as a model hydroxamic type siderophore, from an iron chelation of deferoxamine mesylate. Once this compound was synthesised, different techniques have been studied to evaluate the isolation of this siderophore by making a comparison between different chromatographic supports.

Lipophilic resins of the XAD type (XAD-2, XAD-4, XAD-7 and XAD-16) have been used, as well C18 and HLB chromatographic cartridges.

The recovery studies were carried out using the UV-VIS spectroscopy, and finally the comparison of these recovery percentages led to the conclusion that the use of chromatographic cartridges provides a very low recovery, while the use of XAD lipophilic resins gives a much higher recovery percentage, therefore it is more appropriate for the isolation of hydroxamic type siderophores.

Keywords: *Iron, ferrioxamine, siderophores, hydroxamic, XAD lipophilic resins, C18 chromatographic cartridges, HLB chromatographic cartridges.*

RESUMO

O ferro é un elemento esencial para case todos os microorganismos, plantas e animais, polas súas propiedades únicas. É un metal de transición que pode presentar estados de oxidación (II) e (III), sendo esta valencia variable a que o fai desempeñar un papel fundamental nas reaccións de oxidación-redución, reaccións celulares necesarias para o proceso vital. Ten unha biodisponibilidade moi baixa, e pola súa importancia para os microorganismos, moitos deles biosintetizan compostos chamados sideróforos, que teñen unha gran afinidade polo Fe (III). Ao segretalos no medio, os sideróforos forman complexos con Fe (III) que son recoñecidos polos receptores de membrana do microorganismo e introdúceos nas células mediante un mecanismo de transporte axeitado.

O primeiro obxectivo deste traballo foi sintetizar ferrioxamina como modelo de sideróforo de tipo hidroxámico, a partir da quelación de ferro do mesilato de desferrioxamina. Unha vez sintetizado, estudáronse diferentes técnicas cromatográficas para avaliar o illamento deste sideróforo, facendo unha comparación entre diferentes soportes.

Utilizáronse resinas lipofílicas tipo XAD (XAD-2, XAD-4, XAD-7 e XAD-16), ademais de cartuchos cromatográficos tipo C18 e HLB.

Os estudos de recuperación realizáronse mediante a técnica UV-VIS, e finalmente a comparación de ditas porcentaxes de recuperación permitiu concluír que o uso de cartuchos cromatográficos proporciona unha recuperación moi baixa, mentres que ao utilizar resinas lipofílicas XAD a porcentaxe de recuperación é moito maior, e polo tanto máis apropiado para o illamento de sideróforos de tipo hidroxámico.

Palabras chave: *Ferro, ferrioxamina, sideróforos, hidroxámico, resinas lipofílicas XAD, cartuchos cromatográficos C18, cartuchos cromatográficos HLB.*

INTRODUCCIÓN

IMPORTANCIA DEL HIERRO

Existen elementos necesarios para los ciclos vitales de los organismos, como son el sodio, el magnesio y el potasio, que participan activamente en el metabolismo básico de las células, por lo que se consideran esenciales. Estos elementos están presentes en el organismo celular en concentraciones relativamente altas, por tanto, su obtención no supone un problema para los organismos. En cambio, otros metales como el hierro, zinc, níquel, cobre, manganeso, cobalto o molibdeno están en concentraciones mucho más bajas, pero también son necesarios para los procesos celulares.¹

El hierro es un nutriente esencial para casi todos los microorganismos, plantas y animales, debido a las propiedades únicas que este presenta, ya que tiene una elevada capacidad de coordinar y activar el oxígeno, además de una óptima química de oxidación-reducción ($\text{Fe}^{+2} \leftrightarrow \text{Fe}^{+3} \leftrightarrow \text{Fe}^{+4}$), lo cual hace que tenga una participación muy activa en procesos de transporte electrónico y procesos metabólicos necesarios para el ciclo vital de dichos organismos.²

El hierro es un elemento muy abundante en la corteza terrestre, es el cuarto por detrás del oxígeno (46.4%), silicio (28.2%) y aluminio (8.3%), representando un 5.6%. A pesar de su alta presencia en la corteza terrestre, su biodisponibilidad en condiciones aeróbicas y a pH neutro es muy baja, ya que en estas condiciones el hierro (II) se oxida a estado de oxidación (III), y en medios acuosos, debido a su baja solubilidad en agua, este precipita en forma de hidróxido férrico ($\text{Fe}(\text{OH})_3$), un polímero muy estable e insoluble.³

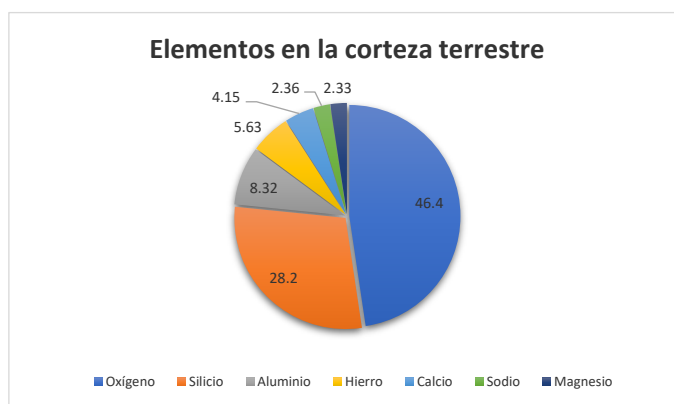


Figura 1. Porcentajes de la presencia de diferentes elementos en la corteza terrestre

INTRODUCCIÓN

SIDERÓFOROS

Debido a la baja disponibilidad del hierro, las bacterias han desarrollado diversas estrategias para captar este nutriente del medio en el que habitan. Estas estrategias son consideradas factores de virulencia esenciales para la supervivencia de los microorganismos en sus organismos huéspedes. Uno de los mecanismos más comunes de las bacterias para captar el hierro es la producción de sideróforos, compuestos de naturaleza orgánica que son capaces de quelatar hierro introduciéndolo dentro de la célula a través de receptores de membrana específicos.³

Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular, entre 150 y 1500 Da, sintetizados por gran cantidad de microorganismos, mayoritariamente bacterias y hongos. Presentan átomos de oxígeno o de nitrógeno dadores de electrones, los cuales presentan alta afinidad para atraer iones de Fe (III), coordinándose a ellos tras ser sintetizados y secretados por la célula y dando lugar así a la formación de un complejo hierro-sideróforo de geometría octaédrica y con una gran estabilidad ($K_f > 10^{30} \text{ M}^{-1}$).⁴

El inicio en el estudio de sideróforos data entre 1949 y 1952, período en el cual se identificaron tres sideróforos como factores de crecimiento: *micobactina (1)*, *ferricromo (2)* y *coprogeno (3)*.

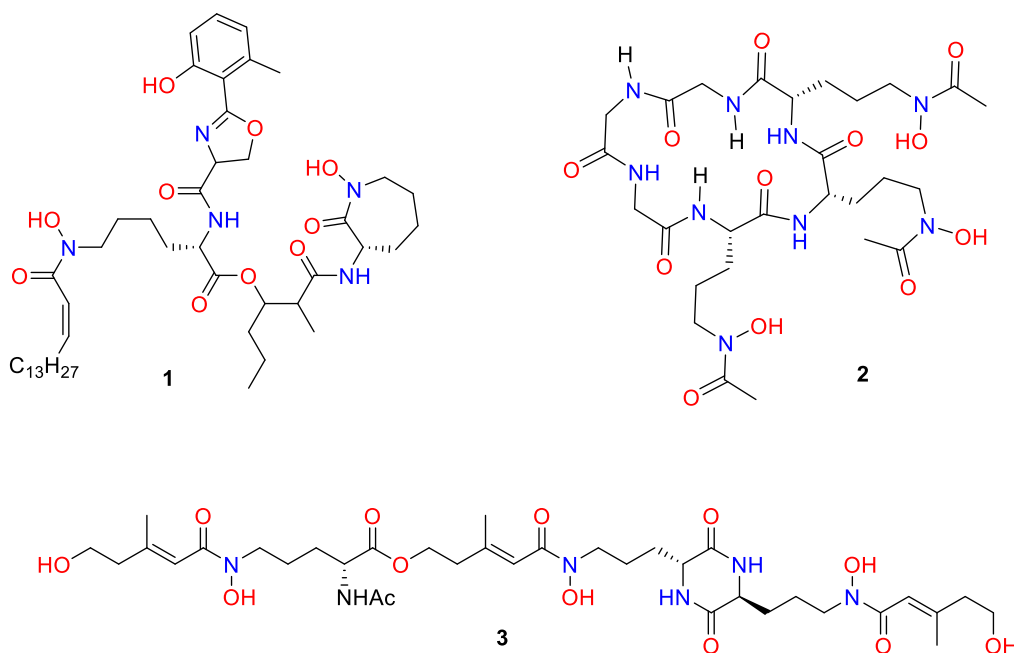


Figura 2. Estructuras de la micobactina (1), el ferricromo (2) y el coprogeno (3)

INTRODUCCIÓN

El científico Snow caracterizó la micobactina, identificando sus grupos de coordinación y demostrando la alta afinidad que posee por el Fe^{+3} . En esa misma época, el científico Burton aisló el “Factor Terregens”, factor de crecimiento de la bacteria *Arthrobacter terregens*, y demostró que formaba un complejo de hierro estable, cuya estructura (*artrobactina (4)*) se caracterizó más tarde en 1972. Por otro lado, los científicos Garibaldi y Neilands, en el año 1956, hicieron un estudio clave sobre la forma de actuación de estos sideróforos, demostrando que la formación de *ferricromo A (5)* se mejoraba al cultivar el organismo *Ustilago sphaerogena* en un medio deficiente en hierro. Las estructuras del *ferricromo* y *ferricromo A* fueron determinadas por Emery y Neilands en el año 1961.

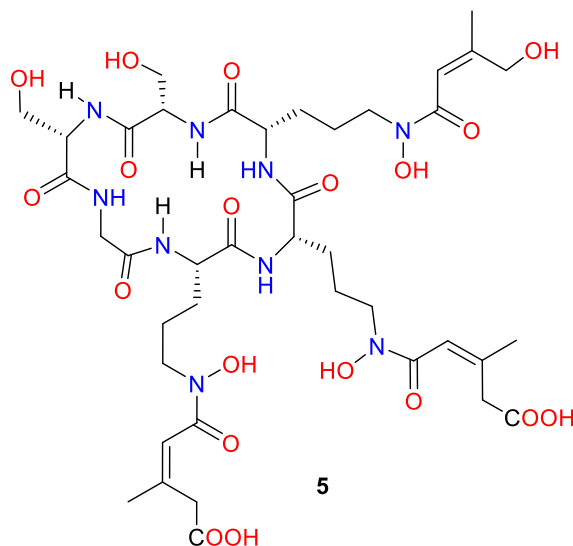
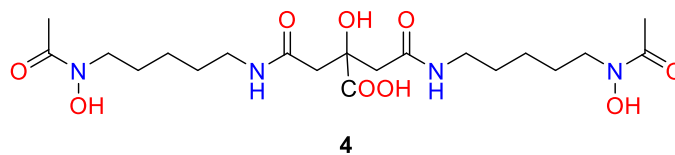


Figura 3. Estructuras de la artrobactina (4) y del ferricromo (5)

INTRODUCCIÓN

Paralelamente, en el laboratorio de Neilands se descubrieron las ferrioxaminas y la ferrimicrina, en un estudio el cual incluyó la elucidación estructural de la deferoxamina B (6). Las constantes de afinidad del grupo ferrioxamina fueron reportadas en el año 1963, por lo que a mediados de la década de los 60 numerosos hidroxamatos fueron caracterizados como complejos de hierro.²

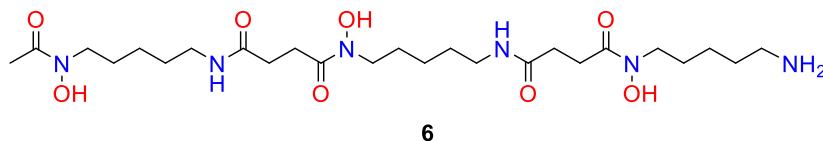


Figura 4. Estructura de la deferoxamina B (6)

Por otra parte, la caracterización de los sideróforos del tipo catecolato se inició en el año 1958 con el descubrimiento del conjugado de glicina del ácido 2,3-dihidroxibenzoico cuando se cultivaba en condiciones de deficiencia de hierro.

Análogos de serina y treonina se aislaron posteriormente, pero fue en 1970 cuando se identificó el primer sideróforo triccatecolato.

Desde el año 1970 fueron caracterizados un gran número de sideróforos, la mayoría de tipo hidroxamato, catecolato o α -hidroxicarboxilato, en forma de complejos hexadentados.²

INTRODUCCIÓN

TIPOS DE SIDERÓFOROS

Los sideróforos son un grupo muy diverso de compuestos, que atendiendo a sus estructuras podríamos agrupar en tres grupos principales basándonos en la disposición de sus átomos donantes de coordinación con el catión Fe^{+3} :

- **Catecolatos:** Este tipo de sideróforos son producidos principalmente por bacterias. Cada grupo catecolato está constituido por dos átomos de oxígeno que se unen al Fe^{+3} para formar un complejo octaédrico hexadentado. La mayoría de las bacterias producen sideróforos únicamente del tipo catecolato, pero hay algunas que pueden formar sideróforos mixtos, que son aquellos en los que existe el grupo catecolato y otro hidroxamato. Dentro de este grupo de sideróforos, la *enterobactina (7)* es el más destacado, producido por cepas de *E. coli* y otras enterobacterias.^{5,6}

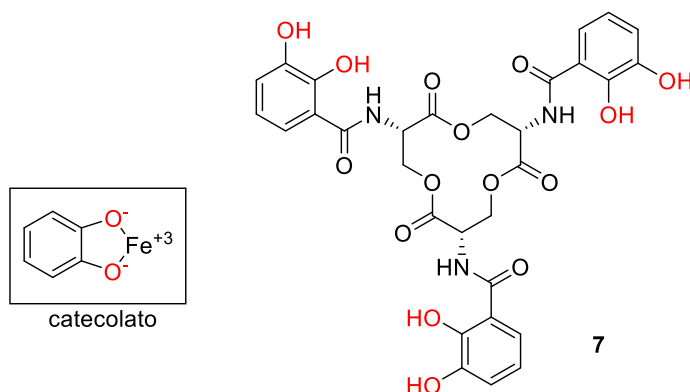


Figura 5. Sideróforos tipo catecolato y estructura de la enterobactina (7)

El complejo enterobactina-Fe (III) presenta la constante de formación mayor de todos los sideróforos estudiados hasta el momento: $K_f = 10^{49} \text{ M}^{-1}$.

- **Ácidos α -hidroxicarboxilatos:** Este tipo de sideróforos es producido por bacterias y por hongos. Se unen al hierro a través de los grupos carboxilo e hidroxilo. Siendo el más destacado la *acromobactina (8)*, producida por la bacteria *Erwinia chrysanthemi*.^{5,6}

INTRODUCCIÓN

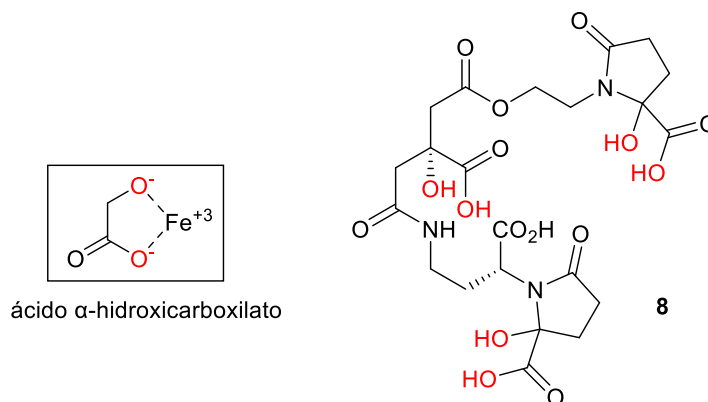


Figura 6. Sideróforos tipo ácido α -hidroxicarboxilato, y estructura de la acromobactina (8)

- **Hidroxamatos:** Este tipo de sideróforos es común en la naturaleza, siendo también producidos por bacterias y hongos. Están formados por un grupo $\text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{-OH})$, donde R es un aminoácido o un derivado. Dos átomos de oxígeno de cada grupo hidroxamato forman un ligando bidentado con el hierro, de modo que cada sideróforo puede formar un complejo octaédrico. Destacan por la deslocalización de carga entre sus formas resonantes, lo cual provoca una gran densidad electrónica entorno al oxígeno del grupo carboxílico, la cual genera gran afinidad por el ion $\text{Fe}(\text{III})$. El sideróforo más destacado en este grupo es la *anfibactina T* (9), producida por las bacterias del género *Salmonella*.^{5,6}

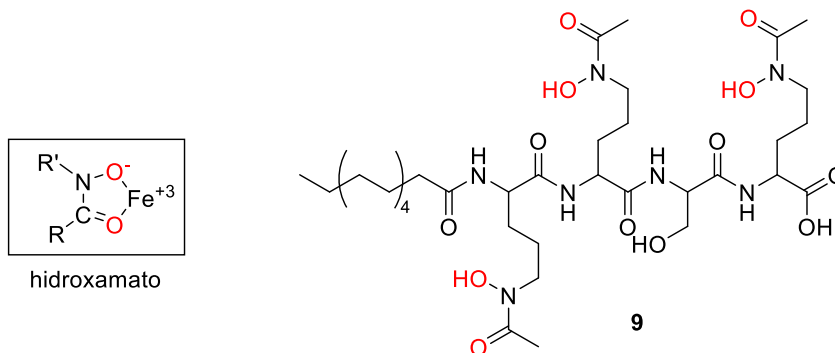


Figura 7. Sideróforos tipo hidroxamato, y estructura de la anfibactina T (9)

INTRODUCCIÓN

Otros sideróforos que quelatan hierro (III) y son menos comunes son la hidroxifeniloxazolona, el α -aminocarboxilato y el α -hidroxiimidazol.

La mayoría de los sideróforos son hexadentados, formados por tres ligandos bidentados entorno al metal, formando así un compuesto de geometría octaédrica que presenta una elevada estabilidad.

Los sideróforos también pueden formar complejos con otros cationes como el Al(III), Zn(II), Ga(III), etc., lo cual se debe a la presencia de grupos funcionales dadores de electrones en los grupos de unión que muestran alta afinidad por otros iones de metales pesados. Esto hace que estos complejos sean más selectivos con el hierro, ya que con otros metales no son reconocidos por la bacteria, lo cual impide así la entrada por otras vías de absorción de metales tóxicos que pueda haber en el medio. ⁶

En este trabajo de fin de grado nos centraremos en los sideróforos del tipo hidroxámico, concretamente en uno de ellos, el más conocido y sobre el que hay más estudios realizados: la deferroxamina (DFO) (6).

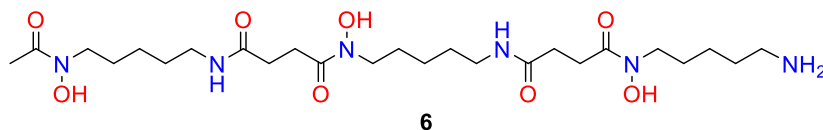


Figura 8. Estructura de la deferroxamina B (6)

MECANISMO DE CAPTACIÓN DE HIERRO MEDIADO POR SIDERÓFOROS

Una vez formado el complejo hierro-sideróforo, este debe ser internalizado nuevamente en la célula por un mecanismo de transporte adecuado.

El mecanismo de entrada en la célula varía dependiendo del microorganismo del que se trate, pero la mayoría de estudios realizados hasta ahora se centran en bacterias Gram-negativas, en concreto en las bacterias entéricas como la *E.coli*.

Los elementos que intervienen en dicho mecanismo de entrada de los complejos a las bacterias Gram-negativas son: Los receptores de membrana externa (OMR), las proteínas de unión periplásmica (PBP), el complejo TonB y proteínas de transporte que contienen un transportador de casetes de unión a ATP (ABC). ⁷

INTRODUCCIÓN

La membrana externa de las células está constituida por porinas, proteínas que permiten el paso a través de dicha membrana a iones y moléculas hidrofílicas pequeñas, actuando como barrera que impide el paso a aquellas que superan el tamaño de 600 Da.

La mayoría de los complejos hierro-sideróforo tienen un tamaño mayor, por lo que necesitan un sistema para atravesar dicha membrana externa. Este sistema específico se basa en la participación de los receptores de membrana externa (OMR), que son proteínas con estructuras tipo barril β , que permite el paso de dichos complejos, ensanchando el espacio con respecto al establecido por las porinas.⁴

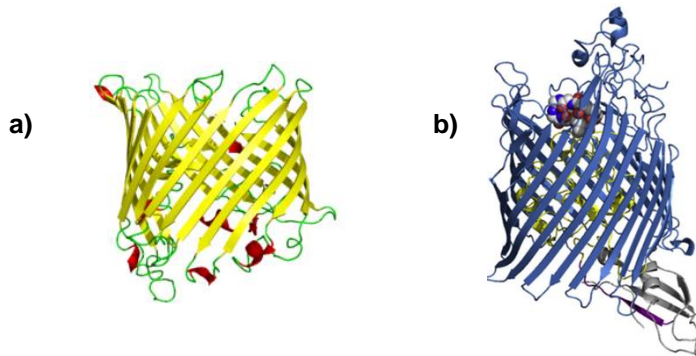


Figura 9. Diferencia estructural entre las porinas (a) y los OMR (b)

En la figura 9 se aprecia las diferencias estructurales entre los receptores de membrana externa y las porinas propias de la membrana externa de la célula. Entre sus diferencias destaca que el *loop* de las porinas provoca un estrechamiento en el canal que impide el paso de moléculas con un tamaño mayor al establecido por dicho estrechamiento, mientras que las proteínas de membrana específicas presentan *loops* periplasmáticos cortos y *loops* extracelulares largos, los cuales tienen gran afinidad por los complejos hierro-sideróforo y que también son importantes debido a que impiden la entrada de especies no deseadas. Por tanto, el OMR reconoce el complejo hierro-sideróforo y se une a este.

En el extremo inferior del barril se sitúa la caja TonB, constituida por un extremo N-terminal unido a dicho barril y otro extremo C-terminal el cual atraviesa el periplasma y se une a las proteínas ExbB y ExbD, situadas en la membrana interna. La función de estas proteínas es proporcionar la fuerza necesaria desde la membrana citoplasmática a la membrana externa para realizar el transporte del complejo a través de la membrana externa hacia el citosol.⁴

INTRODUCCIÓN

Una vez en el periplasma, el complejo es reconocido por las proteínas de unión periplasmáticas, formándose así un complejo hierro-sideróforo-PBP, el cual es transportado a través de la membrana citoplasmática hacia el citoplasma bacteriano gracias a un transportador ABC, localizado en la membrana interna. Estos conjuntos de proteínas utilizan la energía de la hidrólisis de ATP para que el sustrato atraviese la membrana interna.

Una vez que el sideróforo ha llegado al citoplasma, el hierro es liberado mediante una reacción de reducción, pasando de Fe^{+3} a Fe^{+2} . Otro método para la liberación del hierro consiste en la hidrólisis del complejo. Una vez que se ha producido la separación del sideróforo y el hierro, el sideróforo se elimina empleando bombas de eflujo.

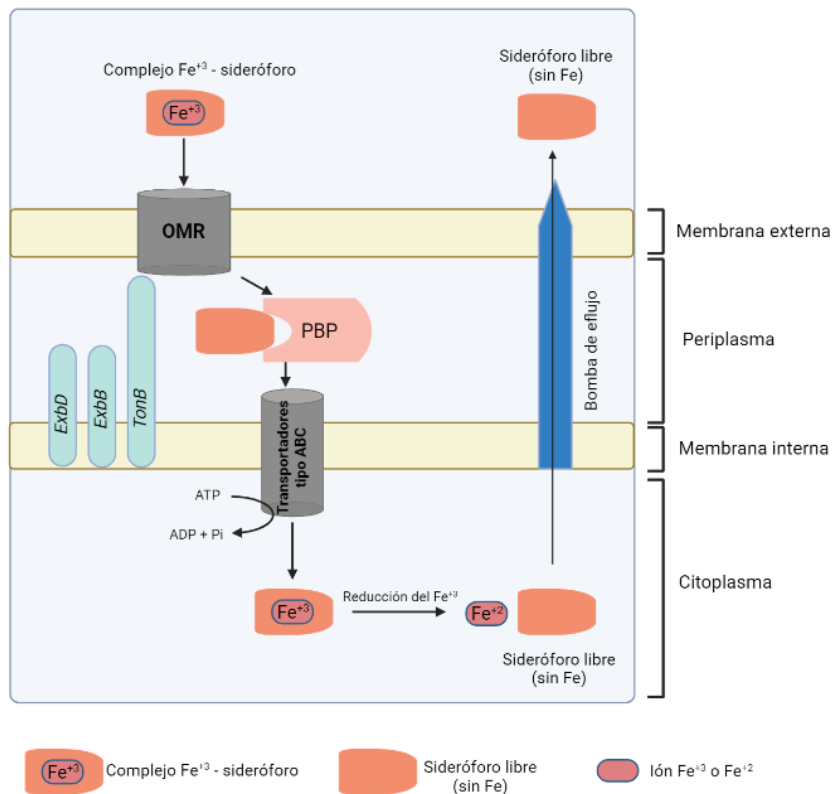
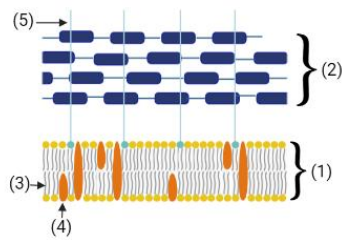


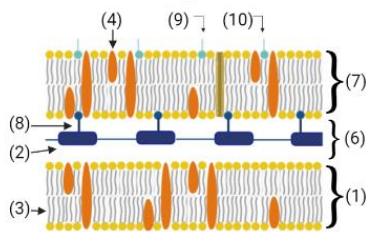
Figura 10. Mecanismos de entrada del complejo hierro-sideróforo a la célula

INTRODUCCIÓN

Bacteria Gram-positiva



Bacteria Gram-negativa



- (1). Membrana citoplasmática
- (2). Peptidoglicano
- (3). Fosfolípidos
- (4). Proteínas
- (5). Ácido lipoteicoico
- (6). Espacio periplasmático
- (7). Membrana externa
- (8). Lipoproteína
- (9). Lipopolisacáridos
- (10). Porinas

En el caso de las bacterias Gram-positiva, el mecanismo es distinto, ya que estas no poseen una membrana externa o zona periplásmica. El proceso presenta similitudes con el explicado anteriormente, ya que también están presentes los receptores PBP y el transportador ABC, que, al igual que en las bacterias Gram-negativas, transporta el sideróforo de hierro al lado citoplasmático de la membrana plasmática. Este tipo de bacterias carecen de proteína TonB. ⁷

Las diferencias clave entre los dos tipos de bacterias a nivel estructural son el grosor en la capa de peptidoglicano, claramente mucho mayor en el caso de las bacterias Gram-positivas, y la presencia de la membrana lipídica externa, que en las bacterias Gram-positivas está y en las Gram-negativas no está presente.

Figura 11. Diferencias estructurales entre bacterias Gram-negativas y Gram-positivas

APLICACIONES DE LOS SIDERÓFOROS

Una aplicación muy destacada de los sideróforos es su uso en el desarrollo de fármacos, siendo el primer caso reportado el del sideróforo deferoxamina B para el tratamiento de intoxicaciones de hierro agudas y crónicas. Este sideróforo capta el exceso de Fe (III) en sangre, formando el complejo DF-Fe, que al ser soluble en agua es eliminado fácilmente por los riñones.

Actualmente hay 43 antibióticos que están en fase de desarrollo clínico, pero ninguno de ellos se considera efectivo frente a los problemas de farmacorresistencia de las bacterias más peligrosas del mundo, por lo que esta resistencia a los antibióticos supone cada vez una amenaza mayor. Además, la mayor parte de los antibióticos nuevos son variaciones de los descubiertos en la década de los 80, es decir, no ha habido un gran avance en esta rama de investigación.

INTRODUCCIÓN

La OMS realiza un informe en el que evalúa los antibióticos en fase de desarrollo, prestando una mayor atención a su posible efecto ante las bacterias farmacorresistentes más amenazantes que existen. El último estudio realizado llega a la conclusión de que todos estos antibióticos en fase de desarrollo más los que han sido aprobados recientemente no son suficientes para hacer frente a dicho avance en la resistencia a los antimicrobianos.

La situación vivida en el año 2020 por la COVID-19 ha creado una conciencia social sobre las consecuencias sanitarias y económicas que provoca una pandemia incontrolada, en concreto la escasez y necesidad que hay de medicamentos antimicrobianos y vacunas en este terreno. También esta pandemia ha ayudado a ver como de rápido puede ser el avance cuando hay una unión política y económica entre varios países a la hora de acelerar el desarrollo de fármacos nuevos, como ha sido en este caso la producción de diferentes vacunas para controlar esta pandemia.⁸

En el desarrollo de antibióticos basados en sideróforos destaca la estrategia del caballo de Troya, concepto que consiste en conectar un fármaco a un sideróforo a través de un espaciador, para así conseguir su entrada en la célula. La necesidad que tienen las bacterias por captar hierro del exterior celular es el factor que determina el uso del “caballo de Troya”. Esta estrategia tiene diferentes aplicaciones, pero para este caso concreto consiste en la introducción de antimicrobianos disfrazados de nutrientes esenciales, es decir, las bacterias captan el hierro, lo cual hace que el sideróforo sea fácilmente absorbido por las células microbianas, pero este sideróforo está ligado a un antimicrobiano, con lo cual este entra fácilmente al interior celular y consigue matarla.



Figura 12. Caballo de Troya

Esta estrategia consiste en la síntesis de un conjugado entre el sideróforo y el antibiótico que interesa introducir en la célula bacteriana, permitiendo traspasar la membrana externa de las bacterias, que tiene una permeabilidad muy baja. El conjugado resultante consta de tres partes: un sideróforo, un espaciador (linker) y el fármaco. La función del sideróforo es captar el hierro, la del espaciador es unir el sideróforo con el antibiótico

INTRODUCCIÓN

y controlar la liberación de este último una vez que está dentro de la bacteria, ya que el antibiótico solo presenta actividad antibacteriana en muchos casos en su forma libre.

Centrándonos en la deferroxamina, el sideróforo que se va a estudiar en detalle, destaca su capacidad de eliminar el exceso de hierro del cuerpo humano. Nuestro organismo carece de mecanismos para eliminar el exceso de hierro, quedando depositado en el hígado, el corazón y las células de los órganos endocrinos, por lo que la deferroxamina, sideróforo producido por la bacteria *Streptomyces pilosus*, ha demostrado ser eficaz para combatir las enfermedades producidas por la deposición del exceso de hierro en estos órganos. La estrategia que utiliza la DFO para entrar en las células afectadas es la del caballo de Troya, ya que se une a los cationes libres de Fe^{+3} y forma la ferroxamina (DF-Fe), soluble en agua, que luego es eliminada por los riñones.⁷

Se han hecho diversos estudios en los cuales se ha concluido la eficacia de la deferroxamina contra diversas enfermedades, tales como:

- Talasemia
- Prevención de lesiones pancreáticas
- Anemia sideroblástica
- Cardiopatía por sobrecarga de hierro
- Hematoma retrobulbar
- Isquemia del músculo esquelético
- Ensayos clínicos en pacientes con neuroblastoma, recurrente en niños, pacientes con cáncer de próstata avanzado refractario a las hormonas; DFO combinada con CECaT para pacientes con neuroblastoma avanzado y tumor neuroectodérmico primitivo; DFO combinada con interferón A (Roferon), adriamicina, tamoxifeno, ácido ascórbico para pacientes con carcinoma hepatocelular inoperable; DFO combinada con doxorubicina o régimen CHOP citrato de hierro para pacientes con enfermedades malignas refractarias ⁷

MÉTODOS DE AISLAMIENTO DE LOS SIDERÓFOROS

En este trabajo utilizaremos resinas lipofílicas Amberlite XAD-2, XAD-4, XAD-7 y XAD-16, y cartuchos cromatográficos C18 y HLB.

1. RESINAS LIPOFÍLICAS XAD

1.1. RESINA XAD-2:

Con el nombre comercial Amberlite® XAD®-2,⁹ es una resina polimérica macroreticular constituida por polímeros orgánicos no iónicos, no polares e hidrofóbicos. Es estable en un rango de pH muy amplio y presenta una apariencia de esferas sólidas blancas. Está constituida por una matriz de estireno y divinilbenceno, y sus propiedades de adsorción se deben a su estructura macroreticular formada por una fase polimérica continua y otra sólida porosa.

Algunas de sus características físicas son: ¹⁰

- Área superficial: 300 m²/g
- Volumen medio del poro: 0.65 mL/g
- Tamaño medio del poro: 90 Å
- Tamaño medio de las partículas: 20-60 mesh
- Densidad: 1.02-1.08 g/cm³

1.2. RESINA XAD-4:

La resina XAD-4 empleada tiene el nombre comercial Amberlite® XAD4,¹¹ es un copolímero macroreticular rígido, formado por estireno y divinilbenceno. Estructuralmente consta de polímeros orgánicos no iónicos, no polares e hidrofóbicos. Presenta una estabilidad física, química y térmica muy buena. Sus poros tienen una distribución característica, lo cual hace que sea muy buen adsorbente para sustancias orgánicas de bajo peso molecular. Esta resina adsorbe y libera especies iónicas a través de interacciones hidrofóbicas y polares.

Algunas de sus características físicas son: ^{10, 12, 11}

- Área superficial: 750 m²/g
- Volumen medio del poro: 0.98 mL/g
- Tamaño medio del poro: 100 Å
- Densidad: 1.08 g/cm³
- Tamaño medio de las partículas: 20-60 mesh

INTRODUCCIÓN

1.3. RESINA XAD-7:

La empleada en este proyecto es la del modelo Amberlite® XAD7HP.¹³ Es un polímero acrílico no iónico, con estructura de fase polimérica continua y una fase de poros continua (estructura macroreticular), lo cual junto a su elevada área superficial y su naturaleza alifática hace que tenga unas propiedades de adsorción muy buenas. Tiene una estructura más hidrofílica que la resina XAD-4. Presenta una estabilidad física y térmica muy buena y es también estable en todo el rango de pH en una disolución acuosa.

Algunas de sus características físicas son: ^{12, 13}

- Área superficial: 380 m²/g
- Volumen medio del poro: 0.5mL/g
- Tamaño medio del poro: 300-400 Å
- Tamaño medio de las partículas: 20-60 mesh

1.4. RESINA XAD-16:

Empleamos la Amberlite® XAD16N,¹⁴ la cual consta de una matriz formada por estireno y divinilbenceno. Es macroreticular, no iónica y adsorbe y libera especies iónicas a través de interacciones hidrofóbicas y polares.

Algunas de sus características físicas son:¹⁴

- Tamaño medio del poro: 200 Å
- Tamaño medio de las partículas: 20-60 mesh
- Tamaño de partícula: 560-710 μm
- Densidad: 1.015-1.025 g/mL
- Área superficial: 800 m²/g
- Volumen medio del poro: 0.55 mL/g

INTRODUCCIÓN

2. CARTUCHOS CROMATOGRÁFICOS C18



Utilizaremos cartuchos cromatográficos de fase reversa (RP) C18 de la marca Thermo Scientific™ 60108-305, en los que la fase estacionaria consiste en un hidrocarburo lineal formado por 18 carbonos, unido a gel de sílice.

Figura 13. Cartuchos C18 empleados en el proyecto ¹⁵

Para determinar que compuestos serán retenidos más fácilmente por la fase estacionaria C18 se debe conocer la naturaleza hidrofóbica de estos. Para ello se cuenta con el parámetro logP (coeficiente de reparto). Cuanto más positivo sea este valor mayor será su naturaleza hidrófoba, y cuanto más negativo mayor será su naturaleza hidrofílica.

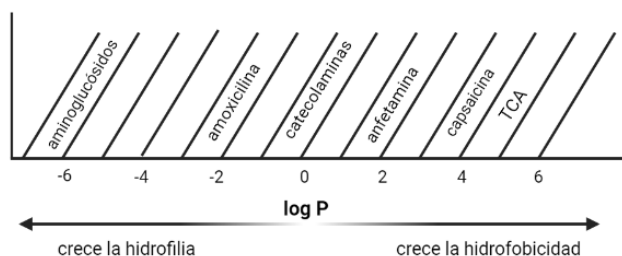


Figura 14. Variación de la hidrofobicidad/hidrofilia dependiendo del logP

Por tanto, para retener un compuesto en el cartucho C18 el compuesto debe ser lo más neutro o hidrófobo posible.

Los disolventes más empleados en este tipo de estudios son el metanol (MeOH), el acetonitrilo (ACN) y el tetrahidrofurano (THF).¹⁶

Algunas características físicas de los cartuchos HyperSep C18 son:

- Grupo funcional: C18
- Tamaño de partícula: 40-60 μm
- Tamaño de poro: 120 \AA
- Capacidad de columna: 6 mL
- Mecanismo de retención: Fuerte retención hidrofóbica con ligeras interacciones secundarias polares de grupos silanol activos ¹⁷
- Área de la superficie: 420 m^2/g

INTRODUCCIÓN

- Aplicación: Extracción de compuestos no polares a moderadamente polares
- Presentan problemas al secarse
- Tienen baja retención para compuestos polares

3. CARTUCHOS CROMATOGRÁFICOS HLB



Son cartuchos con un relleno polimérico en los que la separación se basa en un balance hidrofílico-lipofílico, de fase reversa y son adecuados para la extracción de todo tipo de compuestos.

Figura 15. Cartuchos HLB empleados en el proyecto ¹⁸

La composición interna de estos cartuchos consiste en dos monómeros: N-vinilpirrolidona (hidrófilo) y divinilbenceno (lipófilo), lo cual aumenta la capacidad de retención de compuestos polares con respecto a la de los cartuchos con relleno de sílice-C18.

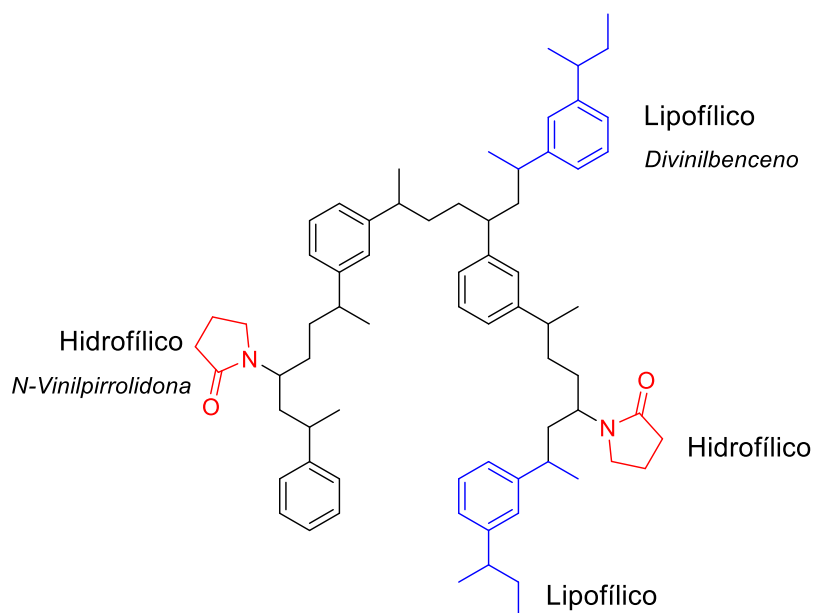


Figura 16. Relleno polimérico de los cartuchos HLB

INTRODUCCIÓN

Algunas características físicas de los cartuchos Oasis HLB son: ¹⁸

- Tamaño de partícula: 30 μm
- Tamaño de poro: 80 Å
- Capacidad de columna: 60 mL

Presentan una alta retención para compuestos polares, y una capacidad de carga mucho mayor que la de los cartuchos C18, además de un área superficial también mayor: 810 m^2/g .

La gran desventaja que supone el uso de estos cartuchos es su elevado coste, ya que el cartucho debido a su tamaño no se puede purificar en un cartucho una muestra mayor a 1 g, por lo que habría que usar varios cartuchos por muestra, y estos son desechables, por tanto, el coste aumenta aún más. ⁴

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es la búsqueda de un método de aislamiento adecuado que se pueda aplicar a sideróforos del tipo hidroxamato, empleando como modelo la ferrioxamina (DF-Fe), es decir la deferoxamina (DFO) quelatada con hierro.

Para ello, se emplearán las resinas lipofílicas XAD (XAD-2, XAD-4, XAD-7 y XAD-16) y los cartuchos cromatográficos C18 y HLB.

Del estudio comparativo de la recuperación de DF-Fe con cada una de estas estrategias, se concluirá cuál de ellas es la mejor para la extracción de este sideróforo o para sideróforos tipo hidroxamato en general.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. PREPARACIÓN DE LA FERROXAMINA

Se hacen reaccionar, durante 24 horas, 46,6 mg de mesilato de deferoxamina con 26,8 mg de acetilacetato de hierro (III) en presencia de 2,5 mL de agua destilada.

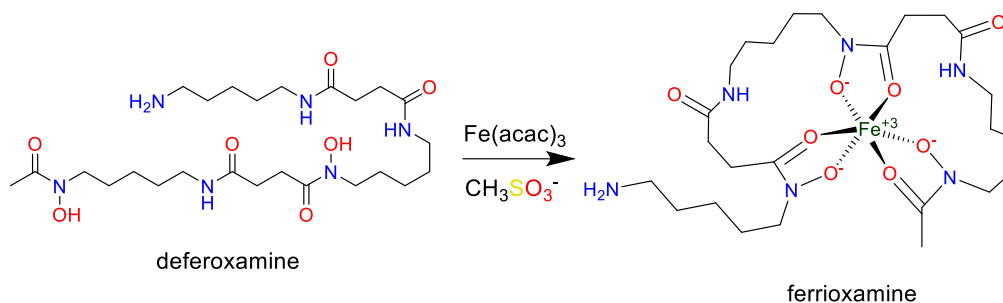


Figura 17. Reacción de síntesis de la ferrioxamina a partir de mesilato de deferoxamina con acetilacetato de Fe(III)

La mezcla de reacción se vierte en un embudo de decantación y se extrae con AcOEt (3x10 mL). La fase acuosa que contiene la DF-Fe se concentra en un rotavapor para eliminar los restos de disolvente orgánico, y a continuación el agua se elimina en un liofilizador durante 24 h.

Se obtiene 53 mg de sólido granular de color rojo intenso.

El sólido obtenido se purificó empleando una columna Sephadex LH20 de 65 mL de volumen, utilizando el MeOH como fase móvil. Las fracciones recogidas de la columna se analizaron mediante un módulo de HPLC acoplado a un espectrómetro de masas obteniéndose así 44,6 mg de DF-Fe pura, lo que supuso un 82 % de rendimiento.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2. RECTA DE CALIBRADO

La recta de calibrado se realiza en un espectrómetro de UV-VIS. Para ello se prepara una disolución madre de concentración 1124.67 μM , a partir de 6,9 mg de DF-Fe en 10 mL de agua destilada. Partiendo de esta disolución madre se prepararon las 9 disoluciones a diferentes concentraciones (ver tabla 1) para realizar la recta de calibrado.

Tabla 1. Concentraciones y volúmenes empleados en la preparación de las distintas disoluciones para la elaboración de la recta de calibrado

| Concentración deseada (μM) | Volumen total (μL) | Volumen real (μL) | Volumen a coger de la disolución madre (μL) |
|---|---|--|--|
| Blanco | 2000 | 0 | 0 |
| 25 | 2045,47 | 45,47 | 45,47 |
| 50 | 2093,05 | 47,58 | 93,05 |
| 100 | 2195,19 | 102,13 | 195,19 |
| 150 | 2307,8 | 112,61 | 307,80 |
| 200 | 2432,59 | 124,79 | 432,59 |
| 250 | 2571,65 | 139,06 | 571,65 |
| 350 | 2903,61 | 331,97 | 903,61 |
| 500 | 3268,88 | 697,24 | 1600,85 |

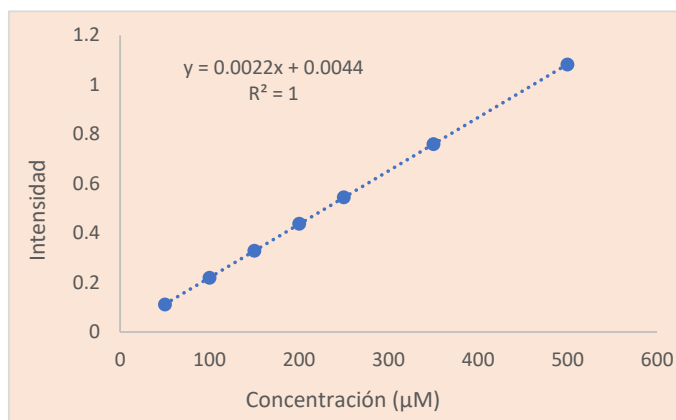
| Volumen pipeta (μL) | Volumen madre (μL) | Volumen total real (μL) | Concentración real (μM) |
|--|---|--|--|
| 0 | 0 | 2000 | 0 |
| 45,4 | 45,4 | 2045,4 | 24,96 |
| 47,6 | 93 | 2093 | 49,97 |
| 102,2 | 195,2 | 2195,2 | 100 |
| 112,6 | 307,8 | 2307,8 | 150 |
| 124,8 | 432,6 | 2432,6 | 200 |
| 139 | 571,6 | 2571,6 | 250 |
| 332 | 903,6 | 2903,6 | 350 |
| 697 | 1600,6 | 3600,6 | 499,96 |

En la tabla 1 se recogen los valores de las concentraciones de las disoluciones que se van a estudiar para la recta de calibrado. Se parte de un blanco que sería concentración 0 μM , por lo que es un volumen de 2 mL de agua miliQ. A partir de ahí se va aumentando la concentración, por lo que se van añadiendo a esos 2 mL de agua el volumen de disolución madre indicado en la tercera columna de la primera tabla. Las pipetas automáticas del laboratorio no permiten añadir volúmenes con dos decimales, por lo que se hace una aproximación a los decimales que permiten las pipetas obteniéndose así

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

los volúmenes indicados en la primera columna de la segunda tabla, por lo que se recalcula la concentración que tendrá la disolución que se está preparando, que sería la indicada en la última columna.

Se realizan tres réplicas midiéndose la absorción de la disolución a $\lambda = 429 \text{ nm}$, obteniéndose así la recta de calibrado $y = 0,0022x + 0,0044$ ($R^2 = 1$).



Gráfica 1. Recta de calibrado final resultado de la media de las tres réplicas

3. RETENCIÓN DE DF-FE CON RESINAS LIPOFÍLICAS XAD

Se acondicionó cada resina dejándola en MeOH durante 24 h. Después, la mezcla se filtró y se lavó 7 veces con agua destilada, empleando en cada lavado un volumen igual al de la resina con la que se está trabajando.

Se pusieron en contacto 5 mL de resina Amberlite XAD-7 con 5 mL de disolución DF-Fe en agua destilada. Se prepararon 3 disoluciones con concentraciones dentro de los límites de la recta de calibrado realizada anteriormente.

Tabla 2. Datos para la preparación de las disoluciones de DF-Fe de concentración 150, 250 y 450 μM .

| Concentración (μM) | V agua miliQ (μL) | V disolución madre (μL) |
|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| 150 | 4333 | 667 |
| 250 | 3889 | 1111 |
| 450 | 2999 | 2001 |

Cada disolución de resina y DF-Fe se dejó en agitación constante durante 24 horas.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

A continuación, se filtró el contenido, arrastrando con agua destilada y recogiendo el filtrado para su posterior estudio. El filtrado se concentró primero en el rotavapor y a continuación en el liofilizador durante 24 h.

La resina filtrada se lavó con 3 volúmenes de MeOH, recogiendo el lavado en un balón que posteriormente se concentró en el rotavapor y después en un liofilizador durante 24 h.

Después del lavado, la resina se deja en contacto con abundante MeOH y a agitación constante durante 24 h. Pasado este tiempo, se filtra arrastrando con MeOH, se recoge el filtrado, y este se concentra en el rotavapor y se liofiliza 24 h.

Los crudos resultantes del liofilizador se disuelven en 3 mL de agua destilada y se analizan en el UV-VIS.

Tabla 3. Valores de recuperación obtenidos a partir de tres concentraciones de disolución de DF-Fe y resina XAD-7 (proporción 1:1)

| Concentración disolución (μM) | Absorbancia desorbido | Concentración desorbido (μM) | μmoles | masa (mg) | Recuperación (%) |
|--|------------------------------|---|-------------------------------------|------------------|-------------------------|
| 150 | 0,14 | 61,55 | 0,18 | 0,11 | 24,6 |
| 250 | 0,22 | 95,55 | 0,30 | 0,18 | 23,7 |
| 450 | 0,24 | 108,64 | 0,33 | 0,20 | 14,5 |

En la tabla 3 se recoge el valor de la absorbancia que aporta cada disolución resultante del filtrado recogido al hacer pasar por la resina 3 volúmenes de MeOH, y a partir de ese valor se obtiene la concentración al aplicar la recta de calibrado. Tras esto, conociendo que el crudo se disuelve en 3 mL de agua, se calculan los micromoles, y de esta forma se obtiene la masa que se ha conseguido recuperar en la resina. Finalmente, al tener el valor de la masa extraída y de la masa que se ha puesto en contacto con la resina inicialmente, se obtiene el porcentaje de recuperación.

Se concluye que la mejor concentración es la de 150 μM , por lo que a partir de este momento cada disolución de DF-Fe preparada para el estudio con las resinas XAD será de dicha concentración.

Tabla 4. μM y masas que suponen el uso de la disolución de 150 μM de DF-Fe

| Concentración disolución (μM) | μmoles | masa (mg) |
|--|-------------------------------------|------------------|
| 150 | 7,50E-13 | 0,4601355 |

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

En la tabla 4 se muestra la cantidad de DF-Fe que es puesta en contacto con las resinas en todo el proyecto, teniendo en cuenta que es un volumen de 5 mL. Este valor es necesario para los cálculos del porcentaje de recuperación.

Una vez establecido el protocolo a seguir en el uso de resinas, se repite este procedimiento modificando la cantidad de resina y empleando otros tipos de resinas XAD, para obtener el mayor porcentaje de recuperación posible y estudiar cuál de las resinas es mejor para el aislamiento de la DF-Fe.

4. RETENCIÓN DE DF-FE CON CARTUCHOS CROMATOGRÁFICOS C18

Para trabajar con estos cartuchos cromatográficos se sigue el siguiente protocolo:

❖ Acondicionamiento del cartucho

Se hace pasar un volumen de cartucho (6 mL) de las siguientes disoluciones:

- 1) 100% H₂O: 6 mL de agua miliQ
- 2) 50% H₂O, 50% MeOH: 3 mL de agua miliQ y 3 mL de metanol
- 3) 100% MeOH: 6 mL de metanol
- 4) 50% MeOH, 50% H₂O: 3 mL de metanol y 3 mL de agua miliQ
- 5) 100% H₂O: 6 mL de agua miliQ

❖ Carga del compuesto

Se prepara una disolución de 1 mL de DF-Fe en agua miliQ de concentración 250 μ M, a partir de una disolución madre recién preparada, de concentración 1142 μ M.

Tabla 5. Concentración y volumen utilizado para la preparación de la disolución de 250 μ M.

| Concentración (μ M) | V agua miliQ (μ L) | V disolución madre (μ L) |
|--------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| 250 | 782 | 218 |

Esta disolución se introduce en el cartucho, aplicando vacío hasta dejar este volumen encima de la frita de la parte superior del cartucho.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

❖ Elución de DF-Fe

Se hace pasar un volumen de cartucho (6 mL) de cada una de las siguientes disoluciones, en orden creciente a la composición orgánica, para eluir la DF-Fe:

- 1) 100% H₂O: 6 mL de agua miliQ
- 2) 75% H₂O, 25% MeOH: 4.5 mL de agua miliQ y 1.5 mL de metanol
- 3) 50% H₂O, 50% MeOH: 3 mL de agua miliQ y 3 mL de metanol
- 4) 25% H₂O, 75% MeOH: 1.5 mL de agua miliQ y 4.5 mL de metanol
- 5) 100% MeOH: 6 mL de metanol

Las fracciones recogidas se concentran en primer lugar con una corriente de N₂ (g) y se terminan de secar en un liofilizador durante 24 h. El crudo obtenido se disuelve en 3 mL de agua destilada y se analiza en el UV-VIS para estudiar la recuperación.

5. RETENCIÓN DE DF-FE CON CARTUCHOS HLB

El procedimiento para el uso de estos cartuchos es muy similar al de los cartuchos C18. Las principales diferencias son que el volumen de este cartucho es de 60 mL, por tanto, los volúmenes que se hacen pasar en el acondicionamiento y elución de la DF-Fe son de 60 mL en vez de 6 mL; por otro lado, se utilizará acetonitrilo como disolvente orgánico en vez de metanol.

❖ Acondicionamiento del cartucho

- 1) 100% H₂O: 60 mL de agua miliQ
- 2) 50% H₂O, 50% ACN: 30 mL de agua miliQ y 30 mL de acetonitrilo
- 3) 100% ACN: 60 mL de acetonitrilo
- 4) 50% ACN, 50% H₂O: 30 mL de acetonitrilo y 30 mL de agua miliQ
- 5) 100% H₂O: 60 mL de agua miliQ

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

❖ Carga del compuesto

Se prepara una disolución de 1 mL de DF-Fe en agua destilada con concentración 1 mM, a partir de la disolución madre con concentración 1038 μM .

Tabla 6. Volúmenes para la preparación de la disolución de concentración 1 mM.

| Concentración (mM) | V agua miliQ (μL) | V disolución madre (μL) |
|---------------------------|--|--|
| 1 | 40 | 960 |

Esta disolución se carga en el cartucho, aplicando vacío hasta que quede justo por encima de la resina.

❖ Elución de DF-Fe

En este paso del estudio se procede a la elución de la DF-Fe, para ello se preparan disoluciones de agua destilada y acetonitrilo para eluir el compuesto que hay en el cartucho. Se irán introduciendo estos disolventes en orden creciente a la composición orgánica, es decir, se empieza con 100% agua hasta llegar a 100% acetonitrilo (ACN).

- 1) 100% H₂O: 60 mL de agua miliQ
- 2) 75% H₂O, 25% ACN: 45 mL de agua miliQ y 15 mL de acetonitrilo
- 3) 50% H₂O, 50% ACN: 30 mL de agua miliQ y 30 mL de acetonitrilo
- 4) 25% H₂O, 75% ACN: 15 mL de agua miliQ y 45 mL de acetonitrilo
- 5) 100% ACN: 60 mL de acetonitrilo

Las fracciones recogidas se concentran en primer lugar con una corriente de N₂ (g) y se terminan de secar en un liofilizador durante 24 h.

El crudo obtenido es DF-Fe pura, la cual se disuelve en 3 mL de agua destilada para su analizado mediante UV-VIS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. PREPARACIÓN DE LA FERROXAMINA

En primer lugar, se sintetizó la DF-Fe, mediante tratamiento de la DFO con $\text{Fe}(\text{acac})_3$. Tras la elaboración de la reacción, se obtuvo un crudo de reacción de aspecto granular y rojo intenso, el cual se purificó empleando una columna Sephadex LH20, de la que se obtuvieron 4 fracciones, separadas por las diferentes tonalidades resultado de la elución de la columna. Estas fracciones fueron analizadas por LC-MS, obteniéndose 4 cromatogramas iguales, que indicaron la presencia de DF-Fe pura en cada una de las fracciones obtenidas.

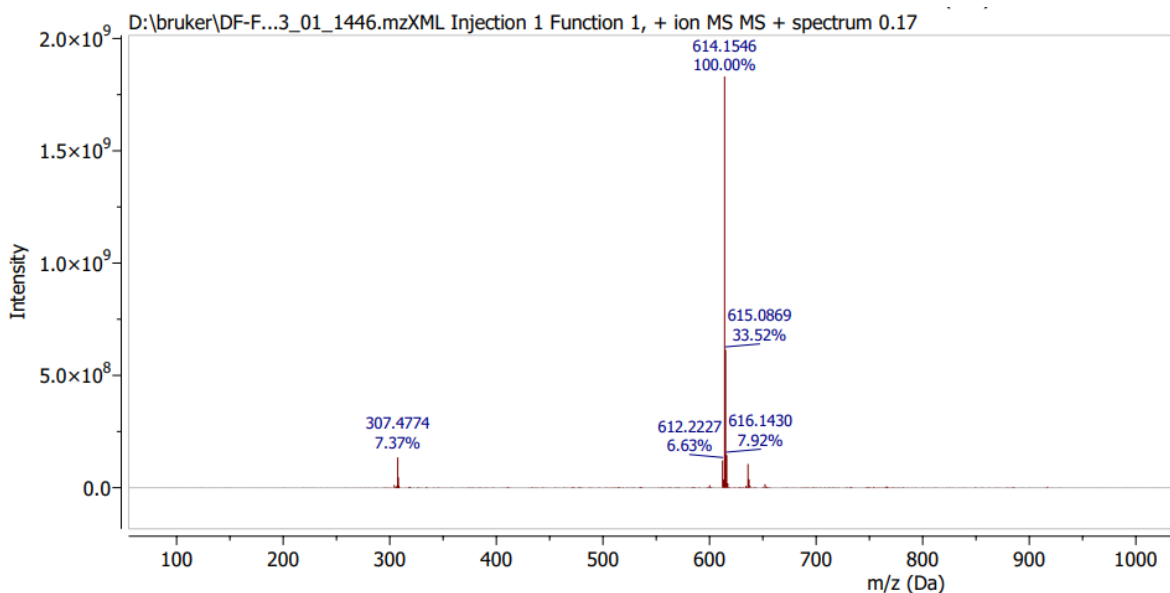


Figura 18. (+)-HRESIMS que indica la presencia de ferrioxamina

En la figura 18 se observa el espectro de masas sacado del cromatograma LC-MS de una de estas fracciones, viéndose claramente el ión $[\text{M}+\text{H}]^+$ a m/z 614, lo que muestra la presencia de la DF-Fe pura en dicha fracción.

Como conclusión de esto se juntan las 4 fracciones, obteniéndose así 44.6 mg de producto de reacción, lo que supone un 82 % de rendimiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2. CONSTRUCCIÓN DE LA RECTA DE CALIBRADO

Todos los estudios realizados en este trabajo, tanto con resinas como con cartuchos, necesitan unos cálculos posteriores para obtener así los valores de recuperación para analizar si dicha técnica es adecuada para el objetivo marcado. Para ello, es necesario construir inicialmente una recta de calibrado con la cual se realizarán todos estos cálculos y con la cual se conocerán los límites de concentración con los que se puede trabajar.

La elaboración de la recta de calibrado se realizó empleando el mismo equipo UV-VIS con el que se han llevado a cabo todos los estudios de este proyecto, manteniendo siempre las mismas condiciones.

Para seleccionar la longitud de onda a la que realizar las medidas de los análisis con la DF-Fe se realizó previamente un estudio de la absorción que tiene dicho compuesto, además de la DFO y de la sal $\text{Fe}(\text{acac})_3$. Para ello, se preparó una disolución de cada compuesto de $150 \mu\text{M}$, observándose los espectros mostrados en la siguiente figura.

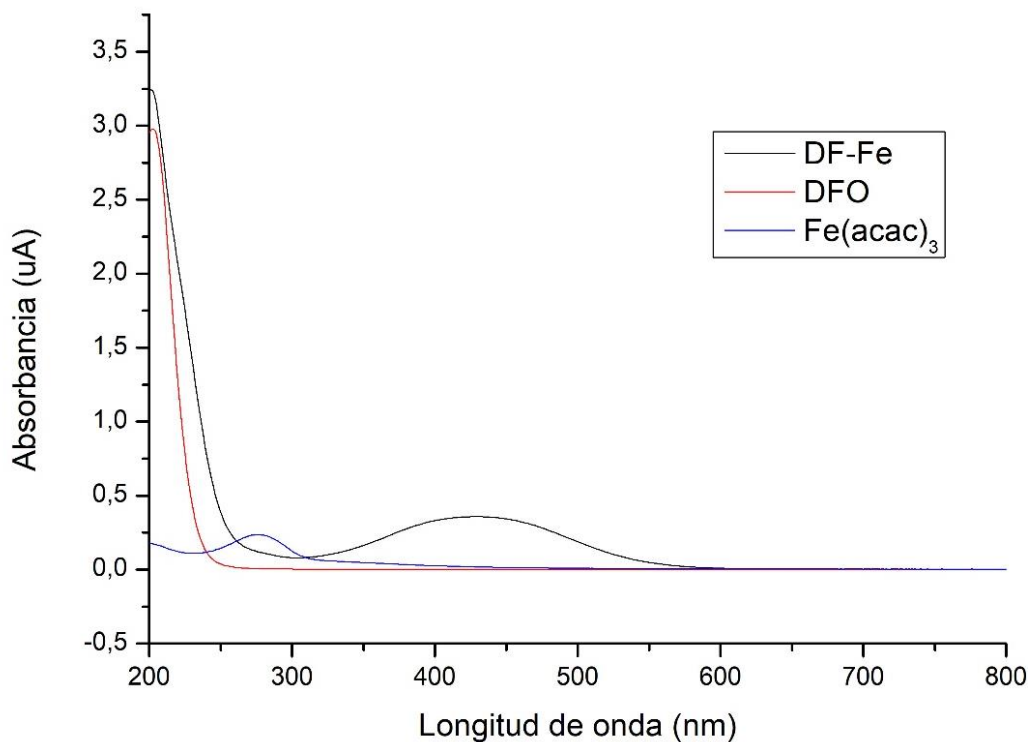


Figura 19. Espectros de absorción de la DFO, $\text{Fe}(\text{acac})_3$ y la DF-Fe.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el espectro de UV-VIS de DF-Fe se puede observar la presencia de un pico en torno a $\lambda = 429$ nm, correspondiente a la longitud de onda a la que más absorbe dicho compuesto. Por ello, esta ha sido la longitud de onda empleada para todos los estudios realizados en este trabajo.

Para construir la recta de calibrado se ha seguido un protocolo similar al descrito por la empresa científica LGC¹⁹, el cual indica que para tener una recta representativa se debe tener un mínimo de 7 puntos, incluyendo el blanco, y se deben realizar al menos dos réplicas de cada una de las medidas.

Por ello, la recta de calibrado de este trabajo se ha hecho con 9 puntos de diferentes valores de concentración, como se indica en el procedimiento experimental, y se han hecho 3 réplicas de cada uno de estos puntos, para tener así un resultado fiable.

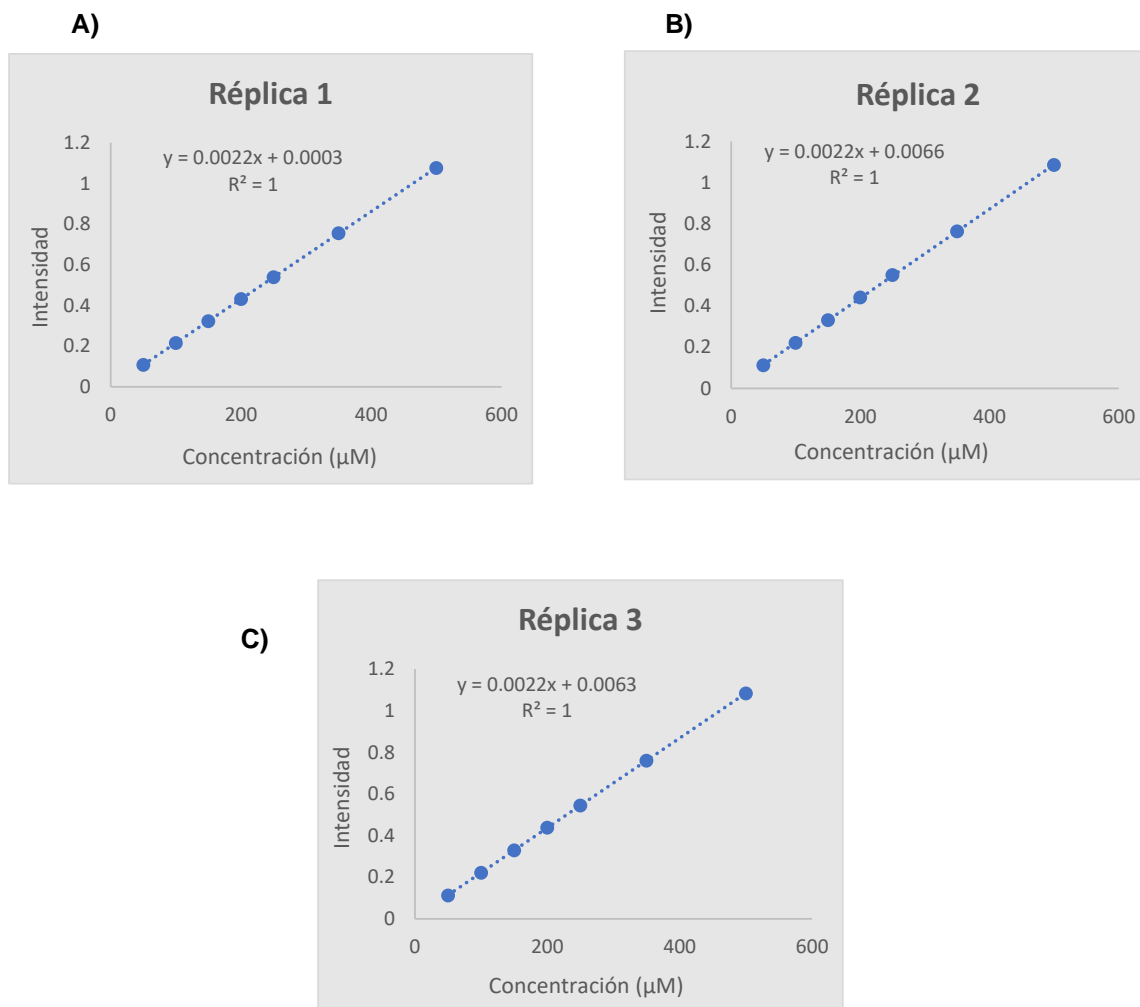
Tabla 7. Valores de concentración real de las disoluciones preparadas y la intensidad registrada en el UV-VIS a $\lambda = 429$ nm.

| Concentración real (μM) | Intensidad réplica 1 | Intensidad réplica 2 | Intensidad réplica 3 |
|--|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 24,96 | 0,054 | 0,055 | 0,057 |
| 49,97 | 0,108 | 0,112 | 0,113 |
| 100,01 | 0,215 | 0,221 | 0,222 |
| 150,00 | 0,323 | 0,332 | 0,330 |
| 200,00 | 0,432 | 0,442 | 0,438 |
| 249,98 | 0,540 | 0,550 | 0,545 |
| 350,00 | 0,756 | 0,763 | 0,760 |
| 499,96 | 1,076 | 1,086 | 1,083 |

En la tabla 7 se muestran los valores reales de concentración de las disoluciones preparadas para realizar la recta de calibrado, y los valores de intensidad de cada una de ellas a $\lambda = 429$ nm. Cada una de estas medidas se ha realizado por triplicado.

En vista de los valores de intensidad obtenidos, se rechazan los dos primeros puntos por tener un valor de intensidad inferior a 0,1, ya que no aporta representatividad a los resultados, y finalmente se obtienen las rectas que se muestran en la Gráfica 2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Gráfica 2. Rectas obtenidas para la elaboración de la recta de calibrado

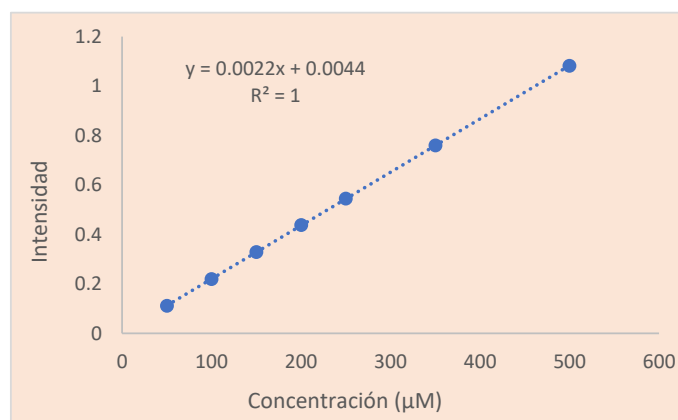
A) Réplica 1; **B)** Réplica 2; **C)** Réplica 3.

Tras realizar una media de los valores obtenidos en estas tres réplicas, se construyó una recta de calibrado final, representada en la Gráfica 1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 8. Concentración real de las disoluciones preparadas y la intensidad registrada en el UV-VIS a $\lambda = 429 \text{ nm}$ (resultado de la media de las 3 réplicas)

| Concentración (μM) | Intensidad |
|---------------------------------|------------|
| 0,00 | 0,000 |
| 24,96 | 0,055 |
| 49,97 | 0,111 |
| 100,01 | 0,219 |
| 150,00 | 0,328 |
| 200,00 | 0,437 |
| 249,98 | 0,545 |
| 350,00 | 0,760 |
| 499,96 | 1,082 |



Gráfica 3. Recta de calibrado final resultado de la media de las tres réplicas

Esta recta tiene un valor de $R^2 = 1$, lo cual aporta gran fiabilidad al resultado obtenido.

Con dicha recta se realizan todos los cálculos posteriores de los estudios de recuperación.

Una vez que se ha construido la recta de calibrado que se empleará para evaluar la buena recuperación de cada una de las técnicas con las que se va a trabajar, se procede a realizar el primero de los estudios para el aislamiento de la DF-Fe, que es el uso de cartuchos C18.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. ANÁLISIS CARTUCHOS C18

Siguiendo el protocolo detallado en el apartado del procedimiento experimental, se carga en un cartucho C18 una muestra de DF-Fe de volumen 5 mL y de concentración 150 μM , y tras su elución se obtienen 5 fracciones, las cuales una vez liofilizadas serán analizadas mediante UV-VIS.

De cada fracción, el sólido obtenido se disuelve en 3 mL de agua miliQ para su posterior análisis por UV-VIS, obteniéndose así los siguientes valores de intensidad.

Tabla 9. Intensidad de la señal de UV-VIS ($\lambda = 429 \text{ nm}$) de cada una de las fracciones. Valores obtenidos a partir de la recta de calibrado y porcentajes de recuperación utilizando cartuchos C18

| Vial | Intensidad | Concentración (μM) | μmoles | masa (mg) | Recuperación (%) |
|------|------------|---------------------------------|-------------------|-----------|------------------|
| 1 | 0,005 | 0,32 | 0,001 | 0,0006 | 0,1 |
| 2 | 0,016 | 5,36 | 0,016 | 0,0100 | 2,1 |
| 3 | 0,040 | 16,05 | 0,048 | 0,0300 | 6,4 |
| 4 | 0,031 | 12,00 | 0,036 | 0,0220 | 4,8 |
| 5 | 0,010 | 2,45 | 0,007 | 0,0050 | 1,0 |

En la tabla 9 se muestra la intensidad de cada una de las fracciones, medidas a $\lambda = 429 \text{ nm}$. Empleando la recta de calibrado mostrada en la Gráfica 2, se calcula la concentración de cada una de ellas, y teniendo en cuenta el volumen de 3 mL en el que se ha disuelto cada fracción, se obtiene el valor de los micromoles, y con el peso molecular de la ferrioxamina (613,514 g/mol) se calcula la masa. Finalmente, teniendo los valores de la masa recuperada y la masa que se ha cargado en el cartucho inicialmente (tabla 4), se obtiene el porcentaje de recuperación que se analiza para determinar si esta técnica es adecuada.

Dado que los porcentajes de recuperación obtenidos fueron muy bajos, este estudio se repitió una segunda vez, siguiendo el mismo protocolo y en las mismas condiciones, para comprobar si estos valores han sido resultado de un error cometido.

Tabla 10. Intensidad de la señal de UV-VIS ($\lambda = 429 \text{ nm}$) de cada una de las fracciones. Valores obtenidos a partir de la recta de calibrado y porcentajes de recuperación utilizando cartuchos C18

| Vial | Intensidad | Concentración | μmoles | m (mg) | Recuperación (%) |
|------|------------|---------------|-------------------|--------|------------------|
| 1 | 0,238 | 106,36 | 0,319 | 0,1958 | 6,4 |
| 2 | 0,097 | 41,86 | 0,126 | 0,0771 | 2,5 |
| 3 | 0,100 | 43,41 | 0,130 | 0,0799 | 2,6 |
| 4 | 0,083 | 35,77 | 0,107 | 0,0658 | 2,1 |
| 5 | 0,123 | 53,95 | 0,162 | 0,0993 | 3,2 |

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de los porcentajes de recuperación siguen siendo muy bajos, por lo que se concluye de este estudio que con el uso de cartuchos cromatográficos C18 no se logra una buena recuperación de los sideróforos del tipo hidroxámico.

Por tanto, se procede a continuar el trabajo probando otra técnica con un procedimiento experimental similar, le uso de cartuchos HLB.

4. ANÁLISIS CARTUCHOS HLB

El segundo estudio implicó el uso de cartuchos del tipo HLB, siguiendo el protocolo establecido en el procedimiento experimental. Se obtuvieron nuevamente 5 fracciones después de realizar la elución de los analitos.

La eliminación del disolvente de las fracciones se realiza nuevamente con una corriente de nitrógeno y se liofilizan. Los productos obtenidos son disueltos a continuación en 3 mL de agua miliQ y estudiados siguiendo el método del UV-VIS.

Tabla 11. Intensidad de la señal de UV-VIS ($\lambda = 429 \text{ nm}$) de cada una de las fracciones. Valores obtenidos a partir de la recta de calibrado y porcentajes de recuperación utilizando cartuchos HLB

| Vial | Intensidad | Concentración (μM) | μmoles | <i>m</i> (mg) | Recuperación (%) |
|-------------|-------------------|---|-------------------------------------|----------------------|-------------------------|
| 1 | 0,012 | 3,23 | 0,01 | 0,006 | 0,2 |
| 2 | 0,372 | 167,00 | 0,50 | 0,307 | 10,0 |
| 3 | 0,267 | 119,36 | 0,36 | 0,220 | 7,2 |
| 4 | 0,046 | 18,82 | 0,06 | 0,035 | 1,1 |
| 5 | 0,052 | 21,68 | 0,07 | 0,040 | 1,3 |

En vista de los porcentajes de recuperación bajos de la DF-Fe en las 5 fracciones, se concluye que el uso de cartuchos HLB tampoco es un buen método para aislar este tipo de compuestos.

Para conseguir obtener un método que proporcione una buena recuperación en cuanto al aislamiento de este compuesto se procede a realizar el siguiente estudio, el uso de resinas lipofílicas XAD, de las que se dispone de 4 tipos diferentes (XAD-2, XAD-4, XAD-7 y XAD-16).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. ANÁLISIS RESINAS XAD

A continuación, se realizó un estudio empleando resinas del tipo Amberlite® XAD siguiendo el protocolo detallado en el procedimiento experimental. En este caso, no solo se emplea la concentración de 150 μM , sino que se seleccionan otras dos concentraciones que contienen la recta de calibrado, que se van a poner en contacto con la resina, para evaluar cual proporciona mayor porcentaje de recuperación.

Para ello, se preparan 3 disoluciones de 5 mL de DF-Fe de estas tres concentraciones, para asegurar así que pueden ser detectadas por UV-VIS, y se ponen en contacto con 5 mL de resina XAD-7.

En este caso se emplea una proporción 1:1 para comenzar este estudio, es decir, se ponen en contacto 5 mL de disolución de DF-Fe con 5 mL de resina. La proporción con la que se trabaja es un dato importante, ya que afecta al porcentaje de recuperación, debido a la mayor o menor saturación de la resina.

Tabla 12. Relaciones entre las concentraciones DF-Fe y la señal del UV-VIS ($\lambda = 429 \text{ nm}$) en el desorbido de la resina en 3 disoluciones de diferentes concentraciones. Valores obtenidos a partir de la recta de calibrado y porcentajes de recuperación utilizando una resina XAD-7

| Concentración disolución (μM) | Absorbancia desorbido | Concentración desorbido (μM) | μmoles | masa (mg) | Recuperación (%) |
|--|------------------------------|---|-------------------------------------|------------------|-------------------------|
| 150 | 0,140 | 61,55 | 0,184 | 0,113 | 24,6 |
| 250 | 0,221 | 95,55 | 0,296 | 0,181 | 23,7 |
| 450 | 0,243 | 108,64 | 0,326 | 0,200 | 14,5 |

En la tabla 12 se recoge el valor de absorbancia para cada disolución, y aplicando la recta de calibrado (Gráfica 2) se obtiene la concentración del desorbido. Tras esto, conociendo que cada fracción desorbida ha sido disuelta en 3 mL de agua miliQ para su análisis por UV-VIS, se calculan los micromoles, y con el peso molecular del compuesto se obtiene la masa. Para finalizar, se obtiene el porcentaje de recuperación al conocer el valor de la masa extraída y el valor de la masa que se ha puesto en contacto con la resina inicialmente (Tabla 4).

En vista de estos resultados, se concluye que la que presenta un mayor porcentaje de recuperación será la de concentración 150 μM , por lo que en todos los estudios posteriores se emplearán disoluciones de 5 mL de DF-Fe de dicha concentración.

Siguiendo el protocolo indicado, se comenzaron los estudios con una proporción 1:2, es decir, 5 mL de disolución 150 μM en contacto con 10 mL de resina XAD previamente lavada y acondicionada, empleando los 4 tipos de resina de los que se disponen.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizaron varias repeticiones de este estudio, obteniéndose los siguientes resultados de recuperación:

Tabla 13. Porcentaje de recuperación de cada una de las resinas

• RESINA XAD-2:

| Absorbancia desorbido | Concentración desorbido (μM) | μmoles | masa (mg) | Recuperación (%) |
|------------------------------|---|------------------------------|------------------|-------------------------|
| 0,365 | 164,00 | 0,49 | 0,30 | 65,6 |
| 0,366 | 164,36 | 0,49 | 0,30 | 65,7 |
| 0,369 | 165,73 | 0,50 | 0,31 | 66,3 |

• RESINA XAD-4:

| Absorbancia desorbido | Concentración desorbido (μM) | μmoles | masa (mg) | Recuperación (%) |
|------------------------------|---|------------------------------|------------------|-------------------------|
| 0,364 | 163,55 | 0,49 | 0,30 | 65,4 |
| 0,378 | 169,64 | 0,51 | 0,31 | 67,9 |
| 0,385 | 173,00 | 0,52 | 0,32 | 69,2 |

• RESINA XAD-7:

| Absorbancia desorbido | Concentración desorbido (μM) | μmoles | masa (mg) | Recuperación (%) |
|------------------------------|---|------------------------------|------------------|-------------------------|
| 0,431 | 194,05 | 0,58 | 0,36 | 77,6 |
| 0,403 | 181,14 | 0,54 | 0,33 | 72,5 |
| 0,401 | 180,27 | 0,54 | 0,33 | 72,1 |

• RESINA XAD-16:

| Absorbancia desorbido | Concentración desorbido (μM) | μmoles | masa (mg) | Recuperación (%) |
|------------------------------|---|------------------------------|------------------|-------------------------|
| 0,356 | 159,91 | 0,48 | 0,29 | 64,0 |
| 0,350 | 156,86 | 0,47 | 0,29 | 62,7 |
| 0,378 | 169,82 | 0,51 | 0,31 | 67,9 |

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las tablas se recoge la absorbancia de la cantidad de DF-Fe retenida por la resina en cuestión, y a partir de ese valor se calcula la concentración del desorbido aplicando la recta de calibrado (Gráfica 2), que por cálculos permiten obtener los micromoles y la masa del compuesto recuperado. Para finalizar, se obtiene el porcentaje de recuperación.

Analizando los porcentajes de recuperación obtenidos para cada una de las resinas XAD, se observa que todas ellas presentan porcentajes bastante elevados de recuperación de la muestra de DF-Fe, concluyéndose que el uso de estas resinas supone un buen método de aislamiento de sideróforos del tipo hidroxámico.

La media de los porcentajes de recuperación obtenidos por cada resina se recoge en la siguiente tabla.

Tabla 14. Valores de los porcentajes de recuperación de cada tipo de resina XAD, resultado de la media de los estudios realizados con cada una de las resinas

| Resina | Recuperación (%) |
|---------------|-------------------------|
| XAD-2 | 65,9 |
| XAD-4 | 67,5 |
| XAD-7 | 74,1 |
| XAD-16 | 64,9 |

Se concluye que la resina XAD-7 es la que proporciona un mayor porcentaje de recuperación, por lo que es la resina más adecuada para el aislamiento de los sideróforos del tipo hidroxámico.

Como la resina XAD-7 es la que mejor recuperación proporciona, se repitió el estudio con esta resina aumentando la proporción disolución:resina a 1:4, es decir, 5 mL de disolución 150 μ M de DF-Fe en contacto con 20 mL de resina, con el fin de comprobar si se puede aumentar el porcentaje de recuperación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 15. Porcentaje de recuperación de la resina XAD-7 en proporción 1:4

| Absorbancia desorbido | Concentración desorbido (μM) | μmoles | masa (mg) | Recuperación (%) |
|------------------------------|---|-------------------------------------|------------------|-------------------------|
| 0,153 | 67,55 | 0,20 | 0,12 | 27,0 |
| 0,092 | 39,95 | 0,12 | 0,07 | 16,0 |

En la tabla 15 se observa como al aumentar la cantidad de resina que se pone en contacto con la DF-Fe, manteniendo la misma cantidad de dicho compuesto, el porcentaje de recuperación disminuye en vez de aumentar, por lo que no es una buena proporción para este estudio. Se concluye por tanto que la proporción 1:2 es la más adecuada.

CONCLUSIONES

En este proyecto de fin de grado se ha marcado como objetivo la búsqueda de un método de aislamiento adecuado para los sideróforos de tipo hidroxámico, trabajando con la ferrioxamina como modelo de este tipo de compuestos.

Se han realizado tres métodos alternativos para ello, que son el uso de resinas lipofílicas XAD, de cartuchos cromatográficos C18 y de cartuchos cromatográficos HLB.

En vista de los resultados obtenidos en los estudios realizados, se concluye que el uso de los cartuchos cromatográficos, tanto los C18 como los HLB, no es adecuados para el aislamiento de la ferrioxamina.

En cambio, se logra obtener buenos valores de recuperación con el uso de las resinas lipofílicas XAD, concluyéndose que estas resinas son adecuadas para aislar este tipo de compuestos, en concreto la resina XAD-7, que ha sido la que ha aportado mayor porcentaje de recuperación.

En cuanto a la proporción disolución:resina, se concluye que la mejor proporción es aquella que contiene el doble de cantidad de resina que de disolución del sideróforo.

CONCLUSIONS

The aim of this final degree project was to find a suitable isolation method for hydroxamic-type siderophores, working with ferrioxamine as a model for this type of compound.

Three alternative methods have been used for this purpose, namely the use of XAD lipophilic resins, C18 chromatographic cartridges and HLB chromatographic cartridges.

In view of the results obtained in the studies carried out, it is concluded that the use of chromatographic cartridges, both C18 and HLB, are not suitable for the isolation of ferrioxamine.

On the other hand, good recovery values are obtained with the use of XAD lipophilic resins, concluding that these resins are suitable for isolating this type of compounds, specifically the XAD-7 resin, which has provided the highest recovery percentage.

As for the solution:resin ratio, it was concluded that the best ratio is that one which contains twice the amount of resin as the amount of siderophore solution.

CONCLUSIONES

Neste traballo de fin de grao púxose como obxectivo a procura dun método de illamento axeitado para sideróforos de tipo hidroxámico, traballando coa ferrioxamina como modelo para este tipo de compostos.

Para iso leváronse a cabo tres métodos alternativos, que son o uso de resinas lipofílicas XAD, cartuchos cromatográficos C18 e cartuchos cromatográficos HLB.

Á vista dos resultados obtidos nos estudos realizados, conclúese que o uso de cartuchos cromatográficos, tanto C18 como HLB, non son axeitados para o illamento da ferrioxamina.

Por outra banda, é posible obter bos valores de recuperación co uso de resinas lipofílicas XAD, concluíndo que estas resinas son aptas para illar este tipo de compostos, concretamente a resina XAD-7, que foi a que ten proporcionou a maior porcentaxe de recuperación.

Respecto da relación disolución:resina, conclúese que a mellor relación é a que contén o dobre de resina que a disolución do sideróforo.

ANEXOS

CRONOGRAMA DE LA ORGANIZACIÓN DEL PROYECTO

Este cronograma muestra la organización que se ha seguido para la realización de este trabajo.

Se ha comenzado con una búsqueda bibliográfica para tener suficiente información para la realización de dicho proyecto. Una vez recopilada la información necesaria, se ha comenzado la parte experimental del estudio, analizando los resultados a la vez que se obtenían. Finalmente, la presente memoria se ha redactado desde noviembre de 2021 hasta febrero de 2022, mes en el que se ha entregado.

| | <i>mar-21</i> | <i>abr-21</i> | <i>may-21</i> | <i>jun-21</i> | <i>jul-21</i> | <i>sep-21</i> | <i>oct-21</i> | <i>nov-21</i> | <i>dic-21</i> | <i>ene-22</i> | <i>feb-22</i> |
|-----------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Búsqueda y análisis bibliográfico | | | | | | | | | | | |
| Trabajo experimental | | | | | | | | | | | |
| Análisis de resultados | | | | | | | | | | | |
| Redacción de la memoria | | | | | | | | | | | |

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Schalk, I. J.; Hannauer, M.; Braud, A. New Roles for Bacterial Siderophores in Metal Transport and Tolerance. *Environmental Microbiology*. November 2011, pp 2844–2854. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02556.x>.
- (2) Hider, R. C.; Kong, X. Chemistry and Biology of Siderophores. *Natural Product Reports*. 2010, pp 637–657. <https://doi.org/10.1039/b906679a>.
- (3) Balado, M.; Segade, Y.; Rey, D.; Osorio, C. R.; Rodríguez, J.; Lemos, M. L.; Jiménez, C. Identification of the Ferric-Acinetobactin Outer Membrane Receptor in *Aeromonas Salmonicida* Subsp. *Salmonicida* and Structure-Activity Relationships of Synthetic Acinetobactin Analogues. *ACS Chemical Biology* 2017, 12 (2), 479–493. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00805>.
- (4) Cisneros Sureda, J. *Preparación de Conjugados de Sideróforos Con Nanopartículas Magnéticas y Su Posible Aplicación En La Detección de Patógenos. Trabajo de Fin de Máster, UDC;* 2016.
- (5) Saha, M.; Sarkar, S.; Sarkar, B.; Sharma, B. K.; Bhattacharjee, S.; Tribedi, P. Microbial Siderophores and Their Potential Applications: A Review. *Environmental Science and Pollution Research* 2016, 23 (5), 3984–3999. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4294-0>.
- (6) Saavedra Bouza, A. *Diseño de Sondas Moleculares : Síntesis de Análogos de Sideróforos Para La Preparación de Conjugados. Trabajo de Fin de Grado, UDC;* 2017.
- (7) Górska, A.; Sloderbach, A.; Marszałł, M. P. Siderophore-Drug Complexes: Potential Medicinal Applications of the “Trojan Horse” Strategy. *Trends in Pharmacological Sciences*. Elsevier Ltd 2014, pp 442–449. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.06.007>.
- (8) OMS. La escasez mundial de antibióticos innovadores favorece la aparición y propagación de la farmacorresistencia <https://www.who.int/es/news/item/15-04-2021-global-shortage-of-innovative-antibiotics-fuels-emergence-and-spread-of-drug-resistance> (accessed 2022 -02 -09).

BIBLIOGRAFÍA

- (9) Merck. Amberlite® XAD®-2
<https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/substance/amberlitexad2123459003707>
(accessed 2022 -02 -11).
- (10) dos Reis, L. G. T.; Robaina, N. F.; Pacheco, W. F.; Cassella, R. J. Separation of Malachite Green and Methyl Green Cationic Dyes from Aqueous Medium by Adsorption on Amberlite XAD-2 and XAD-4 Resins Using Sodium Dodecylsulfate as Carrier. *Chemical Engineering Journal* 2011, 171 (2), 532–540.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.04.024>.
- (11) Merck. Amberlite® XAD4
https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/product/supelco/10358?gclid=CjwKCAiA3L6PBhBvEiwAINIJ9EkHFkSBvYurQNXXKUSGw4Yf6PqaizaogAclb4slmrU7wovfB8DQeoxoCHLkQAvD_BwE (accessed 2022 -02 -11).
- (12) Kyriakopoulos, G.; Doulia, D.; Anagnostopoulos, E. Adsorption of Pesticides on Porous Polymeric Adsorbents. *Chemical Engineering Science* 2005, 60 (4), 1177–1186. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2004.09.080>.
- (13) Merck. Amberlite® XAD7HP
<https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/product/sigma/xad7> (accessed 2022 -02 -11).
- (14) Merck. Amberlite® XAD16N
https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/product/sigma/xad16?gclid=Cj0KCQqiArt6PBhCoARIsAMF5waiSeV2YD_QbUg3LjwhSrlJ28bw-j1std31F56OLKatxt9zpvIHGTMIaAjxIEALw_wcB (accessed 2022 -02 -11).
- (15) Fisherscientific. Thermo Scientific™ Cartuchos HyperSep™ C18 Thermo Scientific™ Cartuchos HyperSep™ C18 (accessed 2022 -02 -11).
- (16) Science Unfiltered. ¿POR QUÉ C18 ES LA FASE ESTACIONARIA MÁS POPULAR PARA FASE REVERSA? <https://phenomenex.blog/2019/10/09/fase-estacionaria/> (accessed 2022 -02 -11).
- (17) Hawach Scientific. C18 Cartuchos SPE de fase invertida
<https://es.hawach.com/spe-cartridges/reversed-phase-c18-spe-cartridges.html>
(accessed 2022 -02 -11).

BIBLIOGRAFÍA

- (18) WatersTM. Oasis HLB 6 cc Vac Cartridge, 200 mg Sorbent per Cartridge, 30 μm , 30/pk <https://www.waters.com/nextgen/es/es/shop/sample-preparation--filtration/wat106202-oasis-hlb-6-cc-vac-cartridge-200-mg-sorbent-per-cartridge-30--m-.html> (accessed 2022 -02 -11).
- (19) Prichard, L.; Barwick, V. *Preparation of Calibration Curves A Guide to Best Practice*; 2003.