



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Estudio de Sideróforos  
Procedentes de Bacterias  
Patógenas de peces de  
acuicultura. Preparación  
de intermedios sintéticos  
clave en la síntesis del  
sideróforo acinetobactina  
y análogos estructurales

---

MEMORIA PRESENTADA COMO TRABAJO DE FIN DE GRADO EN  
QUÍMICA

**ELENA NARRILLOS RODRÍGUEZ**

22 DE JULIO DE 2014

A CORUÑA



CONFORMIDADE DO PROXECTO. INFORME DO TITOR.

**1. Datos do alumno:**

---

**Nome e apelidos:** Elena Narrillos Rodríguez

**DNI:**

**Enderezo:**

**Teléfono:**

**Correo electrónico:**

**2. Título do Proxecto:**

---

Estudo de sideróforos procedentes de bacterias patóxenas de peixes de acuicultura

**3. Informe do Proxecto e conformidade do titor para a súa presentación á Comisión Académica:**

---

LA ALUMNA HA REALIZADO UN TRABAJO EXCELENTE, ESPECIALMENTE EN LA ELABORACIÓN DE LA MEMORIA QUE PRESENTA. HA DEMOSTRADO MUY BUENA CAPACIDAD DE TRABAJO Y ALCANZADO LOS OBJETIVOS TANTO EXPERIMENTALES COMO DE COMO DE APRENDIZAJE DE LAS TÉCNICAS MAS IMPORTANTES QUE SE UTILIZAN EN UN LABORATORIO DE SÍNTESIS.

A Coruña, 18 de xullo de 2014

Sinatura do Titor

Jaime Rodríguez González

SR/A COORDINADOR/A DO GRAO EN QUÍMICA

## **Agradecimientos:**

A los profesores Carlos Jiménez González y Jaime Rodríguez González, por permitirme participar en su grupo de investigación, por la orientación continua en la elaboración de este Trabajo de Fin de Grado, así como por su disponibilidad en todo momento para resolver las dudas que fuesen surgiendo durante el desarrollo de este proyecto.

A la doctorando Yuri Segade Parrado, por estar conmigo cada día guiándome, transmitiéndome sus conocimientos y ayudándome a resolver los problemas que fuesen surgiendo. Por la inestimable paciencia que ha tenido conmigo y por haberme enseñado a manejar en el laboratorio. Al doctorando Juan Carlos Fuentes, mi compañero en el laboratorio, por su alegría y sus consejos.

A mis compañeros de Grado, por todos los buenos momentos que hemos compartido a lo largo de estos cuatro años. También a todos los profesores que hemos tenido por procurar que salgamos de aquí convertidos en unos buenos profesionales.

A mis amigos, por estar ahí siempre que me ha hecho falta y por todo lo que hacen por mí día a día.

A mi abuela, mi padre, mi madre y mi hermano por quererme y apoyarme siempre. También a mi tía María José, por desvivirse por sus sobrinos y por todas las veces que ha tenido que levantarse temprano para llevarme a clase. Y por último, pero no menos importante, a mi familia del otro lado del charco: James, Lisa y Brooke Fox, porque gran parte de lo que soy se lo debo a ellos.

**A todos vosotros, muchas gracias.**

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS:

$\delta$	Desplazamiento químico	ppm	Partes por millón
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados	RMN	Resonancia magnética nuclear
AcOEt	Acetato de etilo	RF	Factor de retención
BnOH	Alcohol bencílico	sat.	Saturado
Boc	<i>tert</i> -Butoxicarbonilo	t.a.	Temperatura ambiente
DCM	Diclorometano	TFA	Ácido trifluoroacético
DHBA	Ácido 2,3-dihidroxibenzoico	THF	Tetrahidrofurano
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina	TBTU	Tetrafluoroborato de <i>N,N,N',N'</i> -tetrametil- <i>O</i> -(benzotriazol-1-il)-uronio
DMF	Dimetilformamida		
ESI	Espectro de masas de electrospray		
h	Horas		
Hz	Hercios		
iPr	Isopropilo		
<i>J</i>	Constante de acoplamiento		
Kg	Kilogramos		
Me	Metilo		
MeOH	Metanol		
mg	Miligramos		
min	Minutos		
ml	Mililitros		
<i>m/z</i>	Relación masa/carga		
mmol	Milimoles		
nm	Nanómetro		
OBn	Éter bencílico		
pTsOH	Ácido <i>p</i> -toluensulfónico		

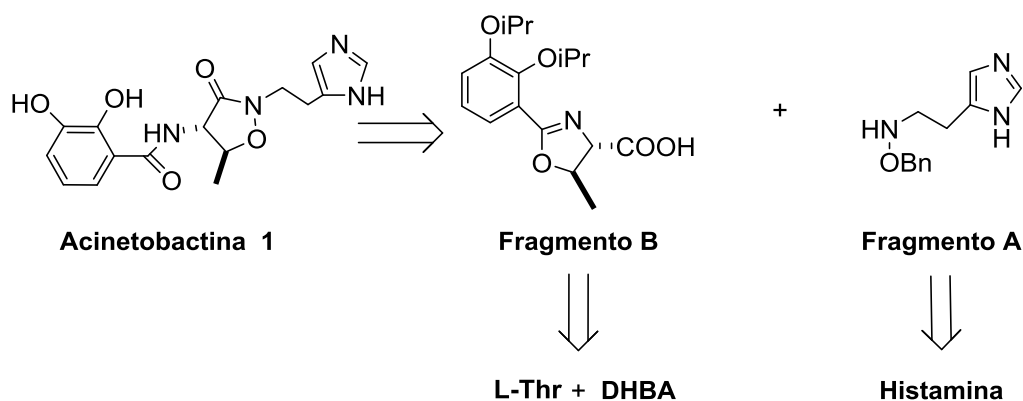
# ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract .....	2
Resumo.....	3
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>4</b>
1.1 Química de los productos naturales .....	5
1.2 Acuicultura .....	5
1.3 Forunculosis y <i>Aeromonas Salmonicida</i> .....	6
1.4 Importancia del hierro en los procesos infecciosos .....	10
1.5 Sideróforos .....	11
1.5.1 Mecanismo de actuación de los sideróforos.....	11
1.5.2 Características generales de los sideróforos.....	12
1.5.3 Características estructurales de los sideróforos .....	13
1.5.4 Aplicaciones de los sideróforos.....	15
1.5.5 Recientes descubrimientos de sideróforos .....	17
1.6 Sideróforo de la bacteria patógena de peces <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> .....	21
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
3.1 Planteamiento retrosintético .....	26
3.2 Propuestas sintéticas para la obtención de los intermedios objetivo .....	28
3.2.1 Propuesta sintética para la obtención del fragmento A .....	29
3.2.2 Propuesta sintética para la obtención del fragmento B/ Intermedio objetivo 3 .....	30
3.2.2.1 Síntesis de L-treoninato de bencilo (7).....	30
3.2.2.2 Síntesis del ácido 2,3-diisopropiloxibenzoico (8) .....	32
3.2.2.3 Reacción de acoplamiento entre 7 y 8. Obtención del intermedio objetivo 3 ...	33
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>36</b>
4.1 Aspectos generales del trabajo en el laboratorio .....	37
4.2 Preparación del Fragmento A.....	38

4.2.1 Síntesis del compuesto 5: hidrocloreuro de 5-(2-bromoetil)-1H-imidazolio e hidrocloreuro de 5-(2-cloroetil)-1H-imidazolio.....	38
4.2.2 Síntesis del compuesto 4: (2-(1H-imidazol-4-il)etil)(benciloxi)carbamato de <i>tert</i> -butilo .....	42
4.2.3 Síntesis del Fragmento A: Ditriflato de N,N'-(2-(1H-imidazol-5-il)etil)- <i>O</i> -bencilhidroxilamonio.....	47
4.3 Preparación del Intermedio sintético 3.....	52
4.3.1 Síntesis del compuesto 7: (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )-2-aminohidroxi-butanoato de bencilo.....	52
4.3.2 Síntesis del compuesto 6: (2,3-diisopropoxibenzoil)- <i>L</i> -treoninato de bencilo .....	57
4.3.3 Síntesis del compuesto 3: (4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> )-2-(2,3-diisopropoxifenil)-5-metil-4,5-dihidrooxazol-4-carboxilato de bencilo.....	62
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>67</b>

## Resumen

Los sideróforos, pequeñas biomoléculas sintetizadas por algunos microorganismos para captar hierro del medio, constituyen una herramienta importante en la lucha contra bacterias patógenas. El presente Trabajo de Fin de Grado está enfocado en la síntesis y caracterización de intermedios sintéticos clave en la obtención del sideróforo acinetobactina, producido por la bacteria patógena de peces *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. En base a esto, se propone para la síntesis de dicho sideróforo la obtención de dos intermedios clave (Fragmentos **A** y **B**) de acuerdo con lo mostrado en el **Esquema 1**.



**Esquema 1: Análisis retrosintético parcial del sideróforo acinetobactina**

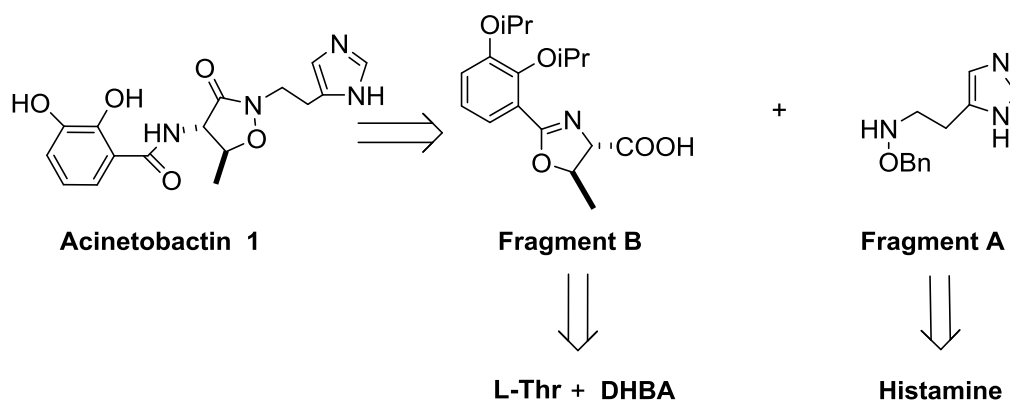
En la primera parte de esta memoria se estudia la preparación del fragmento **A** a partir de histamina comercial mediante halogenación y posterior sustitución nucleófila con una amina protegida.

La segunda parte del trabajo se centra en la obtención del compuesto **3**, precursor del fragmento **B**, mediante el acoplamiento de derivados protegidos del ácido 2,3-dihidroxibenzoico y el aminoácido *L*-treonina.

La caracterización de los productos sintetizados se lleva a cabo mediante resonancia magnética de protón y carbono y espectrometría de masas ESI positiva de alta y baja resolución.

## Abstract

Siderophores, small biomolecules produced for microorganism in lack of iron, are important agents against pathogenic bacteria. The work reported herein deals with the preparation of some key advanced synthetic intermediates on the synthesis of the siderophore acinetobactin, from fish pathogen *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. The siderophore above mentioned could be obtain from two synthetic intermediates (Fragments **A** and **B**) as is reported in [Scheme A](#).



**Scheme A: Partial retrosynthesis of acinetobactin**

The first part of this work deals with preparation of fragment **A** from histamine by halogenation and subsequent nucleophilic substitution with a protected amine.

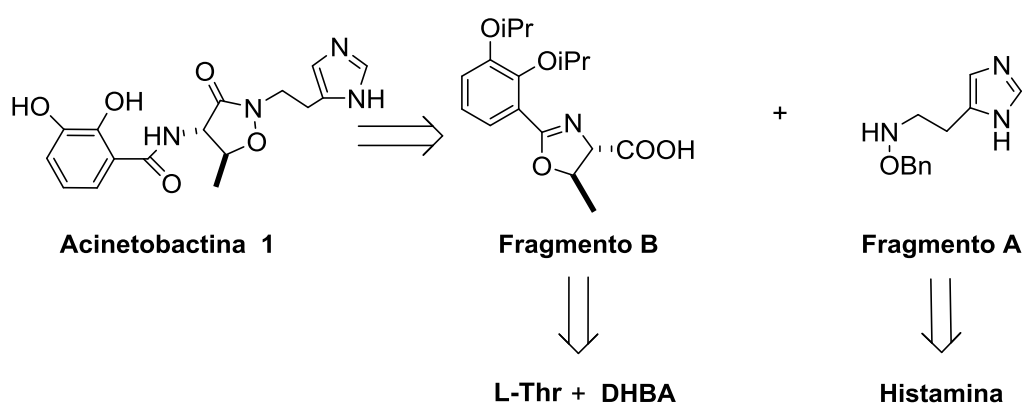
The second part of this work focuses on the preparation of a precursor of fragment **B**, compound **3**, by a coupling reaction between protected derivatives of 2,3-dihydroxybenzoic acid and *L*-threonine.

Characterization of the synthesized compounds is carry out by magnetic resonance techniques. Also products are characterized by mass spectroscopy of high and low resolution.



## Resumo

Os sideróforos, pequenas biomoléculas sintetizadas por algúns microorganismos para captar ferro do medio, constitúen una importante arma na loita contra bacterias patóxenas. O presente Traballo de Fin de Grao céntrase na sínteses e caracterización de intermedios sintéticos clave na obtención do sideróforo acinetobactina, producido pola bacteria patóxena de peces *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. En base a isto, propónse para a sínteses do citado sideróforo a obtención de dous intermedios clave (Fragmentos **A** e **B**) según o disposto no **Esquema 2**.



**Esquema 2: Análisis retrosintético parcial del sideróforo acinetobactina**

Na primeira parte de esta memoria estúdase a preparación do fragmento **A** partindo de histamina comercial mediante haloxenación e posterior sustitución nucleófila cunha amina protexida.

A segunda parte do traballo céntrase na obtención do composto **3**, precursor do fragmento **B**, mediante o acoplamento de derivados protexidos do ácido 2,3-dihidroxibenzoico e o aminoácido *L*-treonina.

A caracterización dos produtos sintetizados lévase a cabo mediante resonancia magnética de protón e carbono e espectrometría de masas ESI positiva de alta e baixa resolución.

# **1. INTRODUCCIÓN**

## 1.1 Química de los productos naturales

Aunque estrictamente hablando un producto natural se podría considerar todo compuesto orgánico producido por cualquier organismo vivo, el término suele identificarse con el de un compuesto químico de bajo peso molecular (generalmente menor de 1500 uma) que es sintetizado por organismos biológicos.<sup>1</sup>

La utilización para uso médico de sustancias naturales, particularmente procedentes de plantas, se remonta a los inicios de la civilización.<sup>2</sup> Los avances científicos posibilitaron la identificación de los principios activos responsables de la actividad biológica de algunos de los productos naturales utilizados y su síntesis a escala industrial, de forma que se convirtiesen en la principal fuente de medicamentos hasta finales del siglo XIX.<sup>3</sup> A finales de los años 90 comenzó el declive en la búsqueda de nuevos fármacos a partir de productos naturales debido, en parte, al desarrollo de la química combinatoria y a la aparición de los denominados ensayos de alta producción (High Throughput Screening, HTS). A pesar de ello, la investigación de los productos naturales sigue estando presente en el desarrollo de nuevos fármacos, de tal forma que en el año 1997 el 43% de los fármacos vendidos procedían de productos naturales o derivaban en algún grado de estos.<sup>4</sup>

La utilidad farmacéutica de los productos naturales se puede explicar considerando que suministran compuestos denominados cabezas de serie, que en muchos casos poseen los requerimientos adecuados de efectividad, selectividad y especificidad con las necesarias propiedades farmacocinéticas para originar un agente terapéutico útil clínicamente.<sup>5</sup>

## 1.2 Acuicultura

Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), España es el segundo país consumidor de pescado de la Unión Europea con 45 kg de pescado por persona al año, por detrás de Portugal con 56,9 kg por persona al año.<sup>6</sup>

La sobreexplotación de los ecosistemas marinos llevada a cabo durante las últimas décadas ha propiciado la búsqueda de nuevas alternativas para satisfacer la demanda de productos pesqueros. La FAO considera que la acuicultura es la única salida para mantener los productos del mar dentro de la dieta cotidiana ante el estancamiento de la pesca extractiva. En este

---

<sup>1</sup> Breinbauer, R.; Vetter, I.R.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 2878-2890

<sup>2</sup> Clark, A.M. Natural Products as a Resource for New Drugs. *Pharm. Res.*, **1996**, 13, 8, 1133-1141

<sup>3</sup> Seidl, P.R. Pharmaceuticals from natural products: current trends. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **2002**, 74, 1, 145-150.

<sup>4</sup> Newman, D.; Cragg, G.; Kingston, D. Natural products as pharmaceuticals and sources for lead structures. *The practice of Medicinal Chemistry*, 2ª edición, Wermuth, C.G., 2003, 2, 91-111

<sup>5</sup> Jiménez, C. El papel de los productos naturales en el mercado farmacéutico actual. *An. Quím.*, **2013**, 109(2), 134-141

<sup>6</sup> [www.fao.org](http://www.fao.org) Fecha de entrada 15 de julio de 2014

sector, Galicia es uno de los líderes mundiales gracias a sus condiciones naturales, especialmente a las rías, y a la apuesta realizada desde las empresas y la Administración gallegas.<sup>7</sup>

Galicia se encuentra al frente de la producción acuícola española, con una producción anual cercana a las 210.000 toneladas, lo que supone el 80% de la producción total de la acuicultura española, cifrada en 268.665 toneladas.<sup>8</sup> En este sentido, la acuicultura es un sector en continua expansión que se constituye en una actividad de mercado que reporta grandes beneficios económicos.

El gran desarrollo de la acuicultura lleva asociado el aumento en la incidencia de numerosas patologías con las consiguientes pérdidas económicas. Las enfermedades infecciosas son las más importantes por su impacto en la producción de las poblaciones cultivadas y, aunque existen vacunas que actualmente se aplican con éxito a numerosos patógenos bacterianos, todavía queda mucho por avanzar en este campo. Por otra parte, los patógenos de peces pueden ser un verdadero problema de salud pública llegando a afectar incluso a seres humanos. Dentro de este contexto, el género *Aeromonas* produce cuantiosas pérdidas en peces al provocar principalmente enfermedades septicémicas y ulcerativas. La de mayor importancia es la forunculosis cuyo agente causal es *Aeromonas salmonicida* y que afecta principalmente a peces del género *Salmo*. Esta condición es una de las enfermedades bacterianas más importantes en la acuicultura de salmónidos, debido a los costes económicos relacionados con mortalidad, prevención y control.<sup>9</sup>

### 1.3 Forunculosis y *Aeromonas Salmonicida*

Desde hace más de 100 años se tiene constancia de la actividad de *Aeromonas salmonicida* como patógeno en peces. Emmerich y Weibel en 1984 elaboraron el primer artículo del aislamiento de *A. salmonicida* durante el brote de una enfermedad en un criadero de truchas que se manifestaba por la aparición de furúnculos, hinchazones y, en etapas avanzadas, lesiones ulcerosas en las truchas infectadas.<sup>10</sup>

*A. salmonicida* es uno de los patógenos de peces más estudiados debido al elevado número de especies en las que se distribuye, a la diversidad de dichas especies hospedadoras y al devastador impacto económico que provoca en el cultivo de peces, particularmente en

---

<sup>7</sup> APROMAR, *La acuicultura en España*. Mayo de 2004. Fecha de entrada 15 de julio de 2014 [www.apromar.es](http://www.apromar.es)

<sup>8</sup> Fundación Observatorio Español de Acuicultura (Foesa), *Indicadores de Acuicultura 2010*

<sup>9</sup> O'Brien, D.; Mooney, J.; Ryan, D.; Powell, E.; Hiney, M.; Smith, P.R.; Powell, R. Detection of *Aeromonas salmonicida*, causal agent of furunculosis in salmonid fish, from the tank effluent of hatchery-reared Atlantic salmon smolts. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1994**, 60, 3874-3877

<sup>10</sup> Emerich, R.; Weibel, E. *Archives fur Hygiene und Bakteriologie*. Ueber eine durch akterien erengte Seuche unter den Forellen, **1984**, 21, 1-21

salmónidos.<sup>11</sup> *A. salmonicida* es un bacilo Gram-negativo del que actualmente se conocen cinco subespecies, de las cuales sólo una de ellas se clasifica como típica (*A. salmonicida* subsp *salmonicida*). Las otras 4 subespecies (*achromogenes*, *masoucida*, *smithia* y *pectinolytica*) son referidas como atípicas. Todas ellas a excepción de *A. salmonicida pectinolytica* causan enfermedades en peces.

*A. salmonicida* subsp *salmonicida* es el agente causante de la forunculosis, llamada así por la forma subaguda o crónica de la enfermedad que se reconoce por la presencia de lesiones similares a forúnculos en la musculatura de los individuos infectados. Las cepas atípicas de *A. salmonicida* son capaces de producir forunculosis en peces, sin embargo, estas cepas poseen menor patogenicidad que *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*.<sup>12</sup> Las manifestaciones clínicas de la enfermedad son las siguientes:

- **Forma sub-aguda o crónica:** Se caracteriza por la aparición de forúnculos y úlceras en distintas partes del cuerpo, letargo, exoftalmia (propulsión del globo ocular), manchas de sangre en las aletas, pérdidas de sangre por las branquias y múltiples hemorragias en los músculos y otros tejidos. Esta forma de la enfermedad es la más común en peces mayores y generalmente causa bajas tasas de mortalidad. Por extraño que parezca, la forma crónica de la enfermedad no es la más frecuente, a pesar de que la presencia de furúnculos es el síntoma más típico de la enfermedad.
- **Forma aguda:** Se presenta mayoritariamente en peces en crecimiento y se manifiesta por septicemia acompañada por melanosis, inapetencia, periodos de letargo y pequeñas hemorragias en la base de las aletas. Internamente se producen hemorragias en las paredes abdominales, vísceras y en el corazón. Esta forma de la enfermedad es de corta duración (los peces suelen morir entre 2 y 3 días por lo que el desarrollo de forúnculos resulta inusual) y es la causante de una elevada tasa de mortalidad.<sup>13</sup>
- **Forunculosis hiperaguda:** Se desarrolla en alevines cuyas defensas en contra de la septicemia bacteriana son pobres, lo que provoca la rápida muerte de los individuos. La principal causa de muerte en los peces con forunculosis hiperaguda deriva del daño cardíaco causado. Las principales evidencias clínicas de la enfermedad consisten en el oscurecimiento de la piel, hinchazón de los ojos y taquicardias, aunque los animales infectados pueden llegar a morir sin presentar síntomas externos acusados

---

<sup>11</sup> Austin, B.; Austin, D.A. Bacterial Fish Pathogens: Diseases in Farmed and Wild Fish, 2ª ed., Ellis Horwood, Londres, **1993**

<sup>12</sup> Pickering, A.D. Husbandry and stress. Furunculosis, *Multidisciplinary Fish Disease Research*, Bernoth, E.; Ellis, A.E.; Midtlyng; P.J.; Olivier G.; Smith, P., Academic Press, Londres, **1997**, 178–202

<sup>13</sup> McCarthy, D.H. Detection of *Aeromonas salmonicida* antigen in diseased fish tissue. *J. Gen. Microbiol.*, **1975**, 88, 185-187

## INTRODUCCIÓN

---

- **Forunculosis intestinal:** Los síntomas consisten en la inflamación del intestino e inversión anal. La tasa de mortalidad causada por esta variante de forunculosis se mantiene baja y constante.<sup>14</sup>

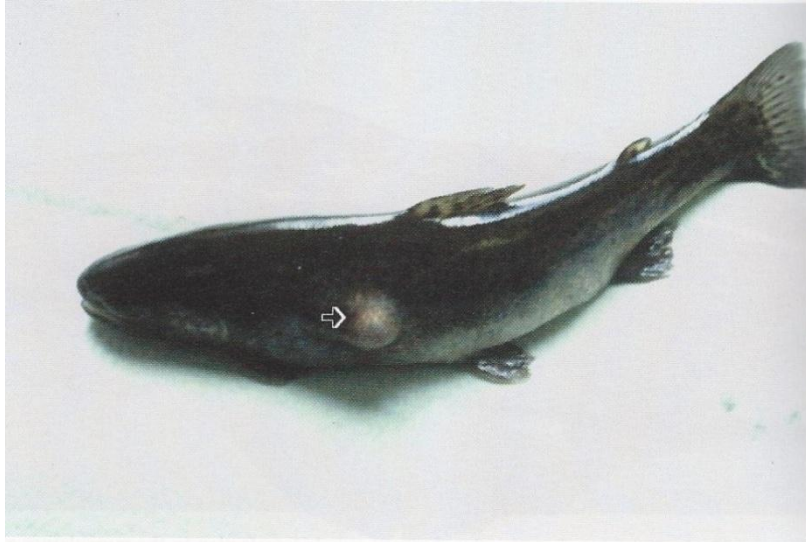


Ilustración 1: Furúnculo atribuible a *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* en la superficie de una trucha arcoíris.<sup>15</sup>



Ilustración 2: Carpa dorada con una úlcera provocada por *A. salmonicida* atípica.<sup>15</sup>

Inicialmente se pensó que *A. salmonicida* era un patógeno presente sólo en salmónidos pero en la actualidad se conoce que la mayoría de las especies pueden resultar susceptibles a infecciones por *A. salmonicida*, siendo el nivel de susceptibilidad variable de unas especies a otras. Cabe decir que la forunculosis es solamente una de las enfermedades clínicas severas

---

<sup>14</sup> Amlacher, E. *Taschenbuch der Fischkrankheiten*. Jena, Gustav Fisher Verlag, **1961**, 286.

<sup>15</sup> Austin, B.; Austin, D. *Bacterial fish pathogens: diseases of farmed and wild fish*. Chichester, Praxis, 4ªed, **2007**

## INTRODUCCIÓN

asociadas con *A. salmonicida*.<sup>16</sup> Además de furunculosis, *A. salmonicida* está implicada en otras muchas afecciones, especialmente en no salmónidos. Una de las enfermedades más documentadas provocada por *A. salmonicida* es la eritrodermatitis de la carpa (CE), una enfermedad ulcerosa que afecta a peces tanto de agua dulce como de agua salada.<sup>17</sup> Esta enfermedad consiste en una infección de la piel que se manifiesta por la aparición de nódulos esféricos sobre las aletas, hemorragias, úlceras con bordes irregulares, escamas salientes y exoftalmia, entre otros síntomas, que se combate mediante la introducción de antibióticos en la dieta o mediante vacunaciones.<sup>6</sup>



Ilustración 3: Organismos con eritrodermatitis de la carpa causada por *A. salmonicida* atípica<sup>15</sup>

*A. salmonicida* posee un amplio rango de hospedadores, sin embargo, es un patógeno obligado del pez, que puede sobrevivir por algunas semanas fuera del hospedador, dependiendo de la salinidad, pH, temperatura y niveles de detritus del agua. Además puede sobrevivir tanto en agua dulce como en agua salada.<sup>18</sup>

Actualmente los peces infectados se tratan con antibióticos a base de oxitetraciclina o quinolonas fluoradas, sin embargo, la mejor medida para combatir la enfermedad consiste en la aplicación de vacunas protectoras. Durante los últimos 20 años la enfermedad ha sido moderadamente atajada mediante la utilización de vacunas que contienen bacterinas de *A. salmonicida*. Numerosas investigaciones se han llevado a cabo para optimizar las vacunas y

<sup>16</sup> Hiney, M.; Smith, P.; Bernoth, E.M. Furunculosis: Multidisciplinary Fish Disease Research. *Aeromonas salmonicida infections*, Bernoth, E.M., Ellis, A.E., Midtlyng, P.J., Olivier, G., Smith, P., Londres, 1997, 54-97

<sup>17</sup> Bootsma, R.; Fijan, N.; Blommartert, J. Isolation and identification of the causative agent of carp erythrodermatitis. *Veterinarski Archiv*, 1977, 47, 291-302

<sup>18</sup> Bernoth, E.M. Furunculosis. Multidisciplinary Fish Disease Research. *Academic Press*, 1997, 847

descubrir aquellos antígenos implicados en la protección, sin embargo, aún queda mucho por avanzar en este campo puesto que aún no se han encontrado las vacunas definitivas debido a que las cepas de *A. salmonicida* adquieren rápidamente resistencia.<sup>19</sup>

La importancia de esta enfermedad se debe también a la influencia en la salud humana por el posible consumo de peces infectados. Por todo ello, el desarrollo de tratamientos antimicrobianos resulta altamente deseable, ya que podrían además de eliminar este tipo de bacterias de las especies infectadas, ser usados en un futuro para nuevos modos de acción contra bacterias de este tipo (Gram negativas) o ser usados en diferentes dianas farmacológicas.

Por todo lo indicado anteriormente, el desarrollo de estrategias terapéuticas para el tratamiento de esta patología se puede considerar una necesidad de primer orden, centrándose la aplicabilidad del presente Trabajo Fin de Grado en ese campo.

### 1.4 Importancia del hierro en los procesos infecciosos

El hierro es un elemento esencial para la mayoría de los microorganismos, plantas y animales porque está implicado en procesos biológicos como son la síntesis y reparación de ácidos nucleicos, respiración, transporte fotosintético, reducción de nitratos, fijación de nitrógeno o desintoxicación de radicales libres.

A pesar de la relativa abundancia de hierro en la corteza terrestre, su disponibilidad para ser absorbido por microorganismos es baja debido a la poca solubilidad de los compuestos de  $\text{Fe}^{+3}$  (estado de oxidación mayoritario en la biosfera) en medios inorgánicos aeróbicos con pHs neutros o alcalinos. Su importancia metabólica junto a su escasa disponibilidad hace de este elemento un factor limitante para el crecimiento microbiano. Por ello, en el caso de los microorganismos patógenos, la capacidad para asimilar hierro se convierte en un importante factor de virulencia, habiéndose demostrado que el aumento de concentración de hierro en los hospedadores da lugar a un incremento de la susceptibilidad a ser infectados por la mayoría de bacterias patógenas conocidas.<sup>20</sup> Además de la baja disponibilidad de  $\text{Fe}^{+3}$ , otro punto importante a tener en cuenta es que el estado reducido  $\text{Fe}^{+2}$  (mayoritario en ambientes anóxicos), aunque se encuentra soluble y disponible, resulta tóxico para la célula ya que reacciona con el oxígeno provocando la formación de radicales hidroxilos.

Como consecuencia, los seres vivos se han visto obligados a desarrollar diferentes estrategias para satisfacer tanto sus necesidades de hierro en el medio aeróbico como para protegerse de los efectos dañinos del  $\text{Fe}^{+2}$ . Estas estrategias consisten en la utilización de ligandos con

---

<sup>19</sup> Patterson, W.D.; Lall, S.P.; Airdrie, D.; Greer, P.; Greenham, G.; Poy, M. Prevention of disease in salmonids by vaccination and dietary modification. *Fish Pathol*, **1985**, *20*, 147-228

<sup>20</sup> Neilands, J.B. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 26723-26726



elevada afinidad por el hierro que permiten captar, transportar, almacenar y/o secuestrar dicho elemento.

### 1.5 Sideróforos

La limitación de hierro disponible impide que los microorganismos patógenos se multipliquen en los hospederos. Para sobreponerse a las condiciones de restricción de hierro, la mayoría de los patógenos han desarrollado mecanismos de captación de hierro de alta afinidad que les permiten superar esa carencia y establecer una infección.

Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular (500 - 1500 Da), sintetizadas por bacterias, principalmente Gram negativas, hongos y plantas monocotiledóneas, que presentan grupos funcionales que coordinan los iones  $\text{Fe}^{+3}$  con elevada afinidad ( $k_{\text{aff}} > 10^{30}$ ) y especificidad.

Los sideróforos son generados en respuesta a la baja disponibilidad de hierro en el ambiente y su afinidad por este elemento es tal que permite su captación tanto a partir de compuestos presentes en el medio ambiente como a partir de proteínas del organismo hospedero como transferrina o ferritina.<sup>21</sup>

#### 1.5.1 Mecanismo de actuación de los sideróforos

Los sideróforos quelatan los iones  $\text{Fe}^{3+}$  dando lugar a complejos metálicos denominados ferri-sideróforos. A continuación son transportados mediante un sistema de alta afinidad dependiente del ATP a través de proteínas y receptores de membrana específicos. Este proceso es impulsado termodinámicamente desde el citoplasma a través del sistema de proteínas transportadoras denominado *tonB* que transduce la energía necesaria desde el citosol hasta el receptor de membrana externo.

Los sideróforos coordinados al  $\text{Fe}^{3+}$  son trasladados hasta los microorganismos en un proceso de transporte activo, usando multitud de receptores de membrana. Una vez en el interior celular, el hierro es liberado del complejo con el sideróforo mediante un proceso redox, mediado por ferri-reductasas citoplásmicas que intervienen en la formación del complejo  $\text{Fe}^{+2}$ -sideróforo a partir de la reducción del complejo  $\text{Fe}^{+3}$ -sideróforo.<sup>22</sup> Dado que la afinidad del sideróforo hacia el  $\text{Fe}^{2+}$  es mucho menor que hacia el  $\text{Fe}^{3+}$ , la disociación se ve facilitada, lográndose introducir de esta forma el metal en el interior del organismo.

---

<sup>21</sup> Drechsel, H.; Jung, G. Peptide siderophores. *J. Peptide Sci.* **1998**, *4*, 147-181

<sup>22</sup> Ratledge, C.; Dover, L.G. Iron metabolims in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, **2000**, *54*, 881-942

## INTRODUCCIÓN

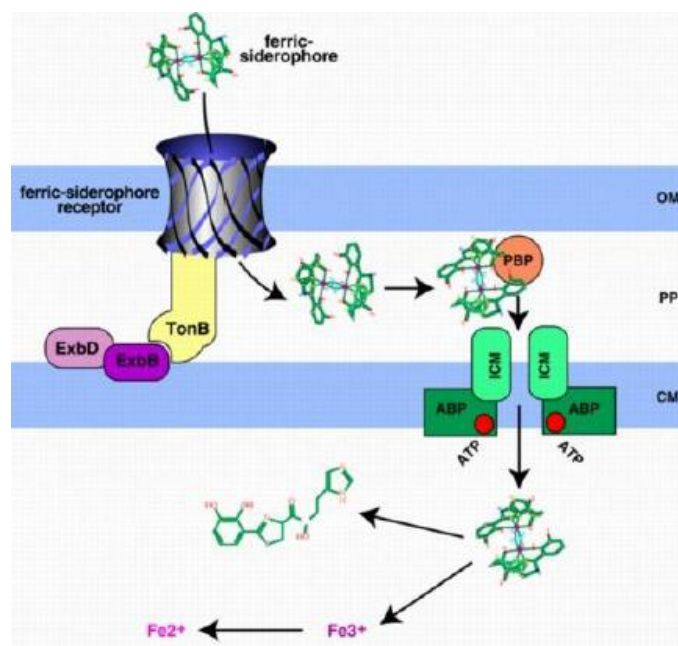


Ilustración 4: Mecanismo de introducción de hierro en bacterias mediado por sideróforos<sup>23</sup>

El hierro liberado es incorporado a proteínas o almacenado intracelularmente. Algunos sideróforos tras este proceso pueden ser secretados otra vez al medio para capturar una nueva molécula de hierro.

### 1.5.2 Características generales de los sideróforos<sup>24</sup>

Los sideróforos tienen una especial afinidad por el Fe<sup>3+</sup>, pero mucho menos por el Fe<sup>2+</sup>. Esto explicaría la baja afinidad por otros cationes divalentes biológicamente abundantes como el Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> o Mn<sup>2+</sup> no llegando a quelatarlos.

Por otra parte, se podría pensar que uno de los problemas de la selectividad de los ligandos que son capaces de quelatar los sideróforos sería la presencia de otros cationes tripositivos en matrices biológicas. Este problema en realidad no existe debido a la ausencia de cationes tripositivos biológicamente importantes que pudiesen competir con el Fe<sup>3+</sup>; el Co<sup>3+</sup> es cinéticamente inerte y el Al<sup>3+</sup> no resulta quelatado por los sideróforos debido a que su radio iónico (0,54 Å) es mucho menor que el del catión Fe<sup>3+</sup> (0,65 Å) y a que la afinidad de los sideróforos hexadentados es mucho mayor hacia el catión Fe<sup>3+</sup> que hacia el Al<sup>3+</sup>. Además de esto último, aún en el caso de que el Al<sup>3+</sup> fuese captado por sideróforos, no podría liberarse mediante un proceso redox, como ocurre con el catión Fe<sup>3+</sup>.

<sup>23</sup> Stintzi, A.; Barnes, C.; Xu, J.; Raymond, K. N. Microbial iron transport via a siderophore shuttle: a membrane ion transport paradigm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, 97, 10691–10696.

<sup>24</sup> Hider, R. C.; Kong, X. Chemistry and biology of siderophores, *Nat. Prod. Rep.*, **2010**, 27, 637–657.

Todas estas razones explican la elevada selectividad del mecanismo de captación del hierro de los microorganismos mediante el empleo de sideróforos.

### 1.5.3 Características estructurales de los sideróforos

Las principales características estructurales que determinan la selectividad de un sideróforo por el ión férrico son: el tipo, número (densidad) y distribución espacial de los grupos de unión a metal.<sup>25</sup>

A pesar de los más de 500 sideróforos identificados hasta la fecha, la diversidad de los grupos funcionales que coordinan el ión férrico es escasa, debido a la necesidad de grupos donadores duros, como por ejemplo los oxoaniones, para coordinar la forma más oxidada del hierro. De esta forma se pueden agrupar a la mayoría de sideróforos en hidroxamatos (a), catecolatos (b), ácidos  $\alpha$ -hidroxicarboxílicos (c) y sideróforos mixtos(d):

- a) **Hidroxamatos:** sideróforos que utilizan un grupo hidroxamato para unirse al hierro. Se pueden clasificar en ferricromos, ferrioxaminas, coprogenos y fusarininas. El sideróforo más representativo es la aerobactina, producida por bacterias del género *Salmonella* y algunas cepas de *E. coli.*, la cual presenta una constante de disociación muy parecida a las transferrinas ( $\sim 10^{25}$ ) por lo que compite con otras fuentes como la ferritina.

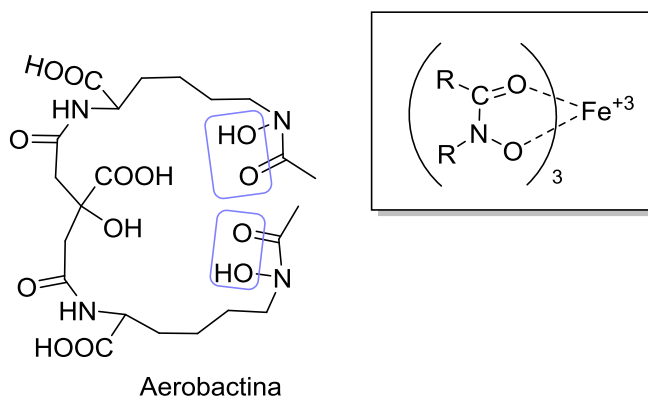


Figura 1: Grupo funcional y ejemplo de un sideróforo tipo hidroxamato<sup>26</sup>

- b) **Catecolatos:** su centro de unión deriva del corismato. A su vez se pueden clasificar en catecoles *sensu stricto* (formados por ácido 2,3-dihidroxibenzoico (DHBA)) o fenolatos (compuestos por ácido salicílico). La enterobactina es el sideróforo más estudiado de este grupo, lo producen cepas de *E. coli* y otras enterobacterias.<sup>27</sup> Este sideróforo

<sup>25</sup> Boukhalfa, H.; Crumbliss, A. Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *BioMetals*, **2002**, 15, 325-339

<sup>26</sup> Balado, M. Caracterización de un nuevo sistema de asimilación de hierro mediante sideróforos en *Vibrio anguillarum*. Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela. **2009**.

<sup>27</sup> Crosa, J. H.; Walsh, C. T. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2002**, 66, 223-249.

## INTRODUCCIÓN

presenta una de las constantes de disociación del hierro más elevadas ( $10^{52}$ ) lo que le permite competir con las transferrinas.

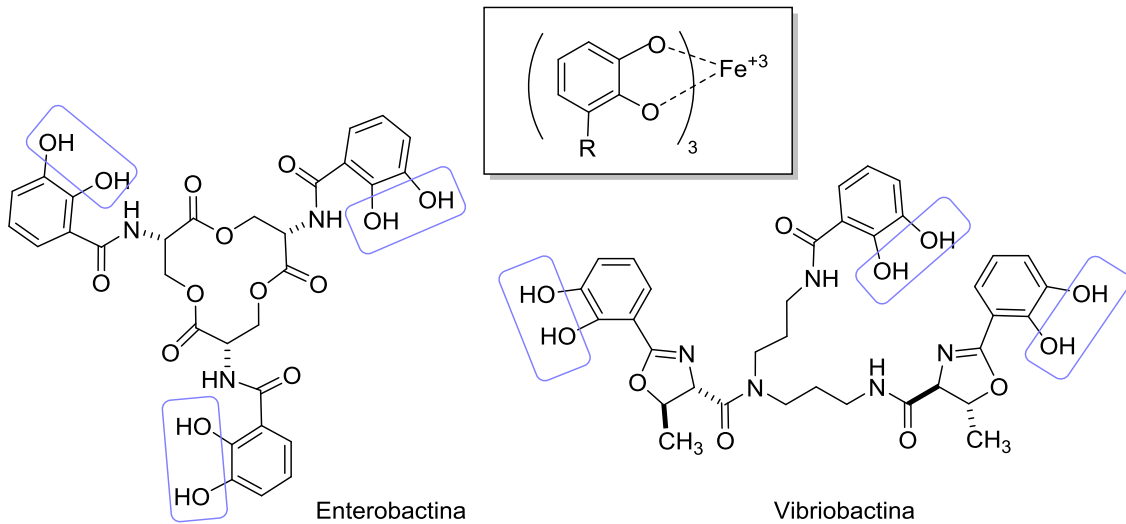


Figura 2: Grupo funcional y ejemplos de sideróforos tipo catecol<sup>26</sup>

- c) **Ácidos  $\alpha$ -hidroxicarboxílicos:** son sideróforos con un grupo similar al de un hidroxamato, en el que se sustituye uno de los radicales por un doble enlace con oxígeno y un nitrógeno del esqueleto por un carbono. Un ejemplo es el sideróforo acromobactina producido por *Erwinia chrysanthemi*.

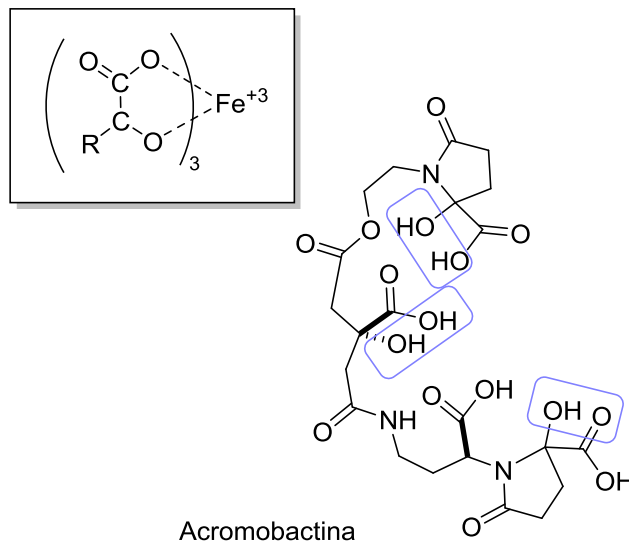


Figura 3: Grupo funcional y ejemplo de sideróforo tipo ácido  $\alpha$ -hidroxicarboxílico<sup>26</sup>

- d) **Mixtos:** son aquellos en los que en una misma molécula se combinan dos grupos de unión diferentes. Un ejemplo es la anguibactina, que contiene un grupo catecol y otro hidroxamato:

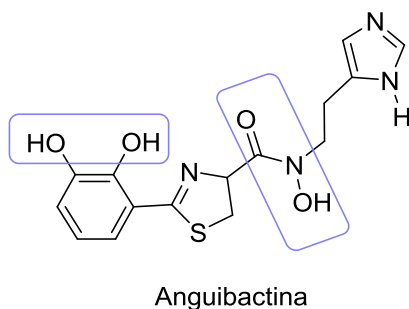


Figura 4: Sideróforo mixto anguibactina. (Se muestran recuadrados los lugares de unión al metal)<sup>26</sup>

Los centros de unión de la mayoría de sideróforos son hexadentados, compuestos por tres grupos ligandos bidentados dispuestos alrededor del ión metálico central en una geometría octaédrica que minimiza las repulsiones y dota a todo el complejo de elevada estabilidad. Además, la estructura octaédrica favorece la formación de especies termodinámicamente estables del  $\text{Fe}^{3+}$  de alto espín. Los sideróforos hexadentados forman complejos 1:1 con el ion  $\text{Fe}^{3+}$ , de modo que la redistribución del hierro es poco probable, disminuyendo así la toxicidad potencial del complejo ferri-sideróforo.<sup>28</sup> En el caso de los sideróforos tetradentados y bidentados es frecuente la formación de estequiometrías  $\text{Fe}_2\text{L}_3$  y  $\text{FeL}_3$  respectivamente, para satisfacer la plena coordinación del átomo de hierro.

Generalmente, para sideróforo del mismo tipo, el aumento de la denticidad de ligando conlleva una mayor afinidad para  $\text{Fe}^{3+}$ , una mayor constante de estabilidad del complejo y una mayor independencia entre la afinidad del sideróforo por  $\text{Fe}^{3+}$  y la concentración de sideróforo.<sup>29</sup>

### 1.5.4 Aplicaciones de los sideróforos

Debido a la gran afinidad que presentan los sideróforos por el hierro, estos se han llegado a utilizar para tratar las enfermedades causadas por el exceso de hierro en el organismo. Un ejemplo de esta utilización la constituye el sideróforo producido por una especie de *Streptomyces* denominado desferrioxamina B. Ha sido comercializado para extraer el exceso de hierro de individuos afectados por hemocromatosis o por sobrecarga de hierro derivada de transfusiones sanguíneas recurrentes por su capacidad para quelatar este metal. La utilización terapéutica de la desferrioxamina B no ha resultado completamente satisfactoria ya que al ser un sideróforo natural, algunos patógenos son capaces de utilizar este agente quelatante como fuente de hierro, dando lugar a infecciones oportunistas. Además, su débil absorción gastrointestinal hace necesaria la administración por vía parenteral.<sup>28</sup>

Recientemente, dado que se ha logrado demostrar la íntima relación entre la producción de los sideróforos y la virulencia en algunas bacterias patógenas, el conocimiento de los

<sup>28</sup> Tilbrook, G.S.; Hider, R.C. Iron chelators for clinical use. *Met. Ions. Biol. Syst.*, **1998**, 35, 691-730

<sup>29</sup> Albrecht-Gary, A. M.; Crumbliss, A.L. Coordination chemistry of siderophores: thermodynamics and kinetics of iron chelation and release. *Met. Ions. Biol. Syst.*, **1998**, 35, 239-316

mecanismos de asimilación de hierro está siendo empleados en el diseño de nuevos antimicrobianos mediante varias estrategias:

- Utilización de inhibidores de las primeras etapas de la biosíntesis de sideróforos. Se utilizan compuestos con estructuras de nucleósidos que actúan como potentes inhibidores de las enzimas que están implicadas en la biosíntesis de sideróforos. Esta metodología se ha descrito para patologías asociadas a *Yersinia pestis* y *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>30</sup>
- Síntesis de análogos que actúen como antagonistas interfiriendo en los procesos de asimilación del hierro. La micobactina S actúa como un potente inhibidor del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* debido a su gran similitud al sideróforo natural. Este compuesto es un epímero sintético del sideróforo natural micobactina T.<sup>31</sup>

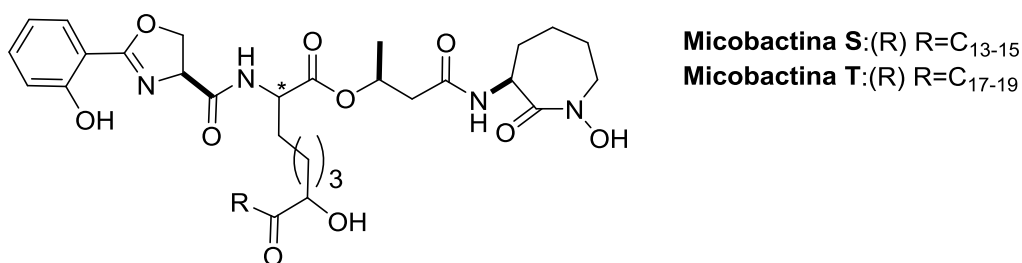


Figura 5: Ejemplo de análogo de sideróforo usado como antibacteriano que actúa como antagonista

- Aplicación de la ingeniería de proteínas a la biosíntesis de sideróforos. Abren la posibilidad de sobrepasar las fronteras de la diversidad natural de estos péptidos no ribosomales, mediante el diseño dirigido de nuevas líneas de ensamblaje. Las estrategias se basan en la adición, delección, reorganización de dominios y módulos, alteraciones en los dominios de adenilación que repercutan en la especificidad de selección de monómeros y combinación de subunidades compatibles de diferentes líneas de ensamblaje.<sup>32</sup>
- Estrategia de Caballo de Troya. Desarrollada inicialmente por M. J. Miller,<sup>33</sup> consiste en la preparación de aductos o conjugados entre un compuesto que tenga una actividad siderófora y un antibiótico conocido. La unión se realiza a través de un espaciador cuya misión es, por una parte poder enlazar ambos componentes y, por otra, separarlos convenientemente para que la estructura del antibiótico no interfiera tanto en el proceso de quelatación del hierro como en el reconocimiento molecular por el

<sup>30</sup> Ferrera, J.A.; Ryu, J.S.; Di Lello, F.; Tan, D.S.; Quadri, L. E. Small-molecule inhibition of siderophore biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* and *Yersinia pestis*. *Nature. Chem. Biol* **2005**, *1*,29-32

<sup>31</sup> Hu, J.; Miller, M. J. Total Synthesis of a Mycobactin S, a Siderophore and Growth Promoter of *Mycobacterium Smegmatis*, and Determination of its Growth Inhibitory Activity against *Mycobacterium tuberculosis* *J Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3462-3468

<sup>32</sup> Quadri, L. Assembly of aryl-capped siderophores by modular peptide synthetases and polyketide synthases. *Mol Microbiol.*, **2000**, *37*, 1-12

<sup>33</sup> Miller, M. J.; Malouin, F. Microbial iron chelators as drug delivery agents: the rational design and synthesis of siderophore-drug conjugates. *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 241-249.

receptor. De esta manera, aprovechando los mecanismos naturales de transporte de ligandos, se consigue superar de forma más efectiva la baja permeabilidad de la membrana exterior de la célula bacteriana y aumentar en gran medida la efectividad de los antibióticos conocidos. Como la interacción entre antibiótico y bacteria sería mucho más directa, permitiría por un lado disminuir su concentración necesaria para tener efecto, y, por otro, permitir saltarse los mecanismos de resistencia que están surgiendo por el abuso en el consumo de antibióticos.<sup>34</sup> Para poder diseñar una estrategia de este tipo es necesario un completo conocimiento tanto estructural como funcional tanto del sideróforo, para saber dónde anclar el antibiótico, como de su receptor, para saber cuál es la parte involucrada en la interacción con el sideróforo.

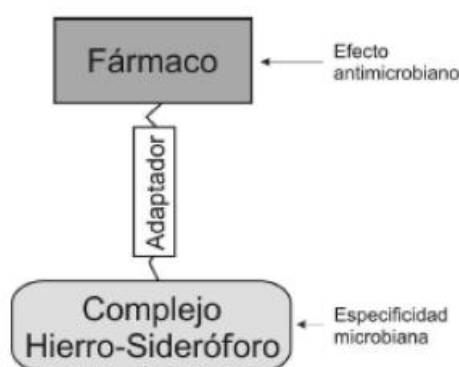


Figura 6: Esquema de los "Caballos de Troya"

### 1.5.5 Recientes descubrimientos de sideróforos

A día de hoy cientos de sideróforos microbianos han sido caracterizados y explotados directa o indirectamente en agricultura, medicina, industria y en estudios medioambientales. Sin embargo, los sideróforos caracterizados sólo representan una pequeña fracción del total, permaneciendo el campo de los sideróforos ampliamente inexplorado.

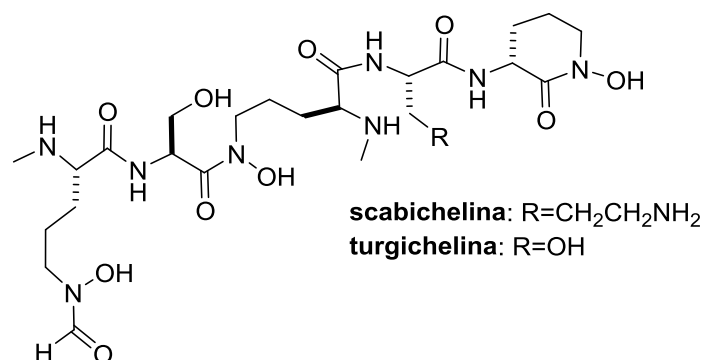
Aun así, dada la amplia variedad de aplicaciones que pueden tener estas biomoléculas, numerosos estudios se llevan a cabo actualmente para elucidar algunas estructuras de sideróforos desconocidos.

Recientemente se ha comprobado que *Streptomyces scabies*, una bacteria patógena de plantas que causa serios daños a patatas y otros tubérculos, produce un sideróforo de tipo hidroxamato denominado scabichelina. Simultáneamente también se ha descubierto otro sideróforo estructuralmente similar a scabichelina, turgichelina, producido por *Streptomyces*

<sup>34</sup> Miller, M.J.; Malouin, F. Siderophore-mediated drug delivery: the designed, synthesis, and study of the siderophore-antibiotic and antifungal conjugates. *Development of iron chelators for clinical use*; Bergeron, R.J., Brittenham, G.M., CRC: BocaRaton, FL, 1994; 275-306

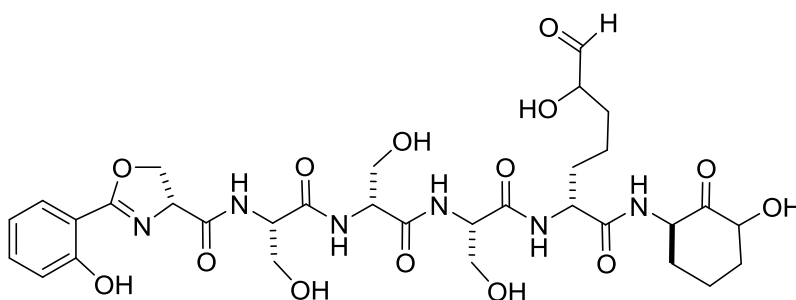
## INTRODUCCIÓN

*turgidiscabies*, un pariente próximo de *S. scabies*.<sup>35</sup> Las estructuras de scabichelina y turgichelina se muestran en la **Figura 7**.



**Figura 7:** Estructuras de los sideróforos scabichelina y turgichelina

Las actinobacterias generan un amplio número de pequeñas moléculas con diversidad estructural con valor terapéutico potencial. Estudios realizados en los últimos años revelaron que *Amycolatopsis sp. AA4*, también llamado actinomiceto raro, produce un sideróforo tipo hidroxamato desconocido hasta el momento, amyachelin, que altera los procesos de desarrollo de varios streptomicetos vecinos.<sup>36</sup>



**Figura 8:** Estructura del sideróforo amyachelin

Un ejemplo de sideróforo tipo catecol descubierto en los últimos años es vulnibactina, un sideróforo producido por *Vibrio vulnificus*. *Vibrio vulnificus* es un patógeno bacteriano oportunista que causa septicemias fatales e infecciones graves en individuos susceptibles con altos niveles de hierro en suero.<sup>37</sup> Vulnibactina capacita al patógeno para adquirir hierro a partir de proteínas saturadas de hierro del hospedador como transferrina.<sup>38</sup>

<sup>35</sup> Kodani, S.; Bicz, J.; Song, L. Structure and biosynthesis of scabichelin, a novel tris-hydroxamate siderophore produced by the plantpathogen *Streptomyces scabies* 87.22. *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, 11, 4686-4694

<sup>36</sup> Seyedsayamdost, M.R.; Traxler, M.F.; Zheng, S.; Kolter, R.; Clardy, Jon. Structure and Biosynthesis of Amyachelin, an Unusual Mixed-Ligand Siderophore from *Amycolatopsis sp. AA4*. *J. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 30, 11434-11437

<sup>37</sup> Strom, M.S.; Paranjpye, R.N. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Microbes Infect.*, **2000**, 2, 177-188

<sup>38</sup> Stelma, G.N. Jr.; Reyes, A.L.; Peeler, J.T.; Johnson, C.H.; Spaulding, P. L. Virulence characteristics of clinical and environmental isolates of *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1992**, 58, 2776-2782.



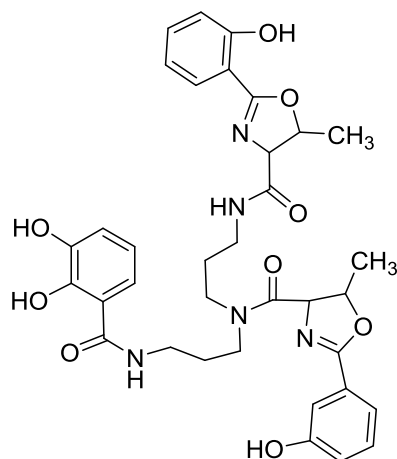


Figura 9: Estructura química de vulnibactina, sideróforo producido por *Vibrio vulnificus*

En los últimos años también han sido publicadas las estructuras de numerosos sideróforos de tipo mixto de bacterias patógenas humanas. Este es el caso de las llamadas fimsbactinas, una familia de sideróforos mixtos con grupos catecol e hidroxamatos aisladas de *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 y *Acinetobacter baylyi* ADP1.<sup>39</sup>

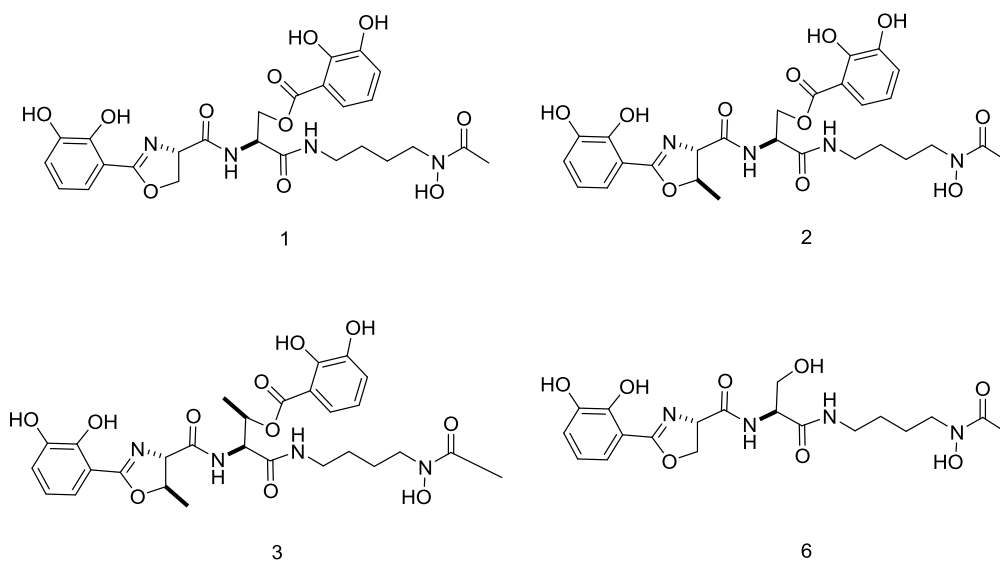


Figura 10: Fimsbactinas 1,2, 3 y 6

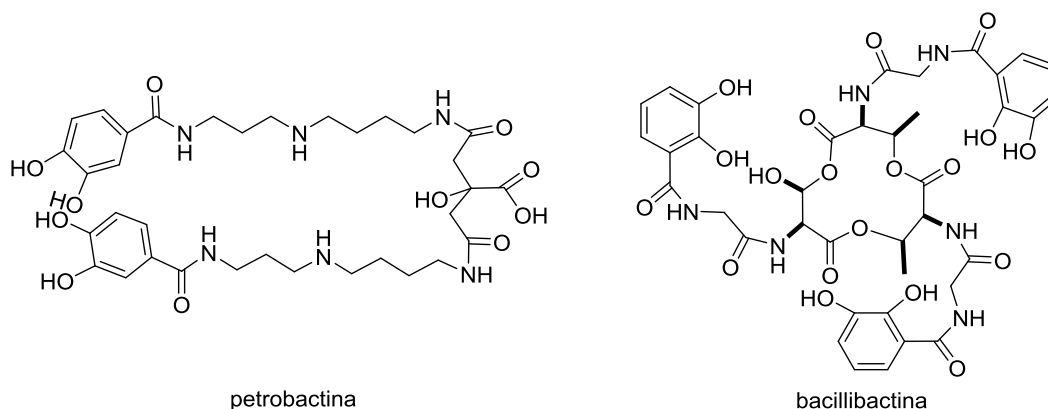
En la última década también se ha descubierto que *Bacillus anthracis*, el agente causante del ántrax, es capaz de sintetizar dos sideróforos: bacillibactina<sup>40</sup> y petrobactina<sup>41</sup> cuyas

<sup>39</sup> Proschak, A.; Lubuta, P.; Gruen, P.; Loehr, F.; Wilharm, G.; De Berardinis, V.; Bode, H.B. Structure and Biosynthesis of Fimsbactins A-F, Siderophores from *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter baylyi*. *ChemBioChem*, **2013**, 14(5), 633-638

<sup>40</sup> Wilson, M.K.; Abergel, R.J.; Raymond, K.N.; Arceneaux, J.E.; Byers, B.R. Siderophores of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2006**, 348, 320–325

<sup>41</sup> Hotta, K.; Kim, C.Y.; Fox, D.T.; Koppisch A.T. Siderophore-mediated iron acquisition in *Bacillus anthracis* and related strains. *Microbiology*, **2010**, 156, 1918–1925

estructuras han sido propuestas recientemente. Bacillibactina es un sideróforo de tipo catecol y petrobactina es un sideróforo mixto con grupos catecol y ácido  $\alpha$ -hidroxicarboxílico.



**Figura 11: Estructura de los sideróforos petrobactina y bacillibactina producidos por *Bacillus anthracis***

Cabe destacar que la mayor parte de los sideróforos descubiertos hasta la fecha son sideróforos de bacterias terrestres. La particularidad y complejidad de los ambientes marinos provoca que los microorganismos marinos produzcan metabolitos diferentes a los producidos por sus parientes terrestres.<sup>42</sup>

Mientras que se conoce relativamente poco a cerca de las estructuras de los sideróforos de bacterias marinas en comparación con aquellas relativas a bacterias terrestres, dos características estructurales caracterizan la mayoría de los sideróforos marinos descubiertos últimamente. Una característica estructural es la predominancia de sideróforos anfóteros compuestos por una cabeza de unión a  $\text{Fe}^{+3}$  polar unida a una o dos series de ácidos grasos.<sup>43 44</sup> La otra característica estructural es la prevalencia de sideróforos que contienen unidades de ácidos  $\alpha$ -hidroxicarboxílicos que resultan fotorreactivas al coordinarse al ión férrico.<sup>45</sup>

Así, por ejemplo, la petrobactina (**Figura 11**) que además de ser producida por *Bacillus anthracis* también es producida por *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, una bacteria marina degradadora de aceite, resulta fotorreactiva al coordinarse con el ión  $\text{Fe}^{+3}$ ; En el complejo de  $\text{Fe}^{+3}$ -petrobactina al ser radiado por la luz del sol, se produce la descarboxilación del ligando petrobactina y la reducción de  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$ .<sup>46</sup>

<sup>42</sup> Zhang, L.X.; An, R.; Wang, J.P.; Sun, N.; Zhang, S.; Hu, J.C.; Kuai, J. Exploring novel bioactive compounds from marine microbes. *Curr. Opin. Microbiol.* **2005**, 8, 276–281.

<sup>43</sup> Butler A. Marine siderophores and microbial iron mobilization. *Biometals.* **2005**, 18, 369–374

<sup>44</sup> Martin, J.D.; Ito, Y.; Homann, V.V.; Haygood, M.G.; Butler, A. Structure and membrane affinity of new amphiphilic siderophores produced by *Ochrobactrum* sp. SP18. *J. Bio. Inorg. Chem.* **2006**, 11, 633–641.

<sup>45</sup> Küpper, F.C.; Carrano, C.J., Kuhn, J.U.; Butler, A. Photoreactivity of iron(III)-aerobactin: photoproduct structure and iron(III) coordination. *Inorg. Chem.* **2006**, 45, 6026–6033.

<sup>46</sup> Barbeau, K.; Zhang, G.; Live, D.H.; Butler, A. Petrobactin, a photoreactive siderophore produced by the oil-degrading marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 378–379

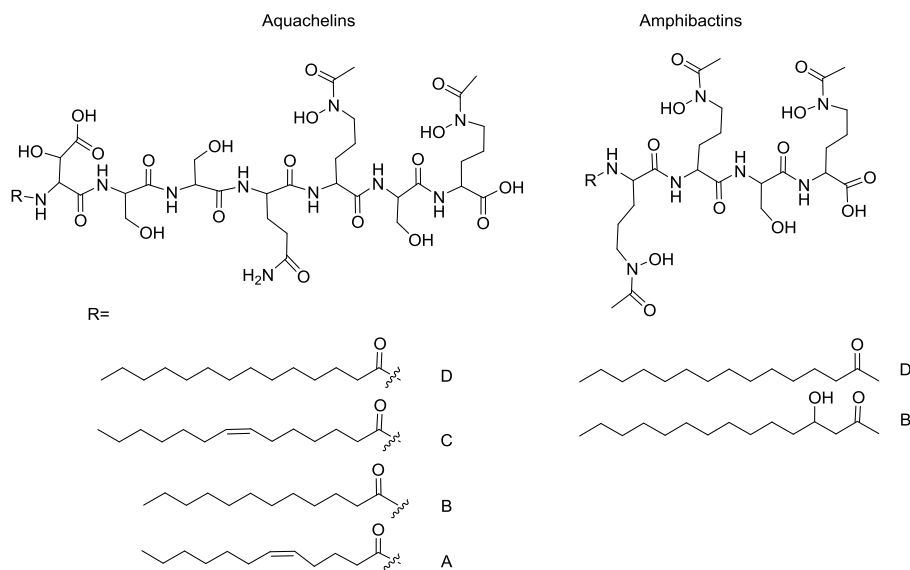


Figura 12: Estructuras de diferentes sideróforos anfóteros producidos por bacterias marinas.<sup>47</sup>

## 1.6 Sideróforo de la bacteria patógena de peces *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*

En estudios realizados en la bacteria patógena *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* responsable de la forunculosis se ha podido determinar que el patógeno posee un sistema de obtención de hierro de alta afinidad que funciona mediante síntesis de sideróforos y proteínas de membrana reguladas por hierro que actúan como receptores del complejo sideróforo hierro.

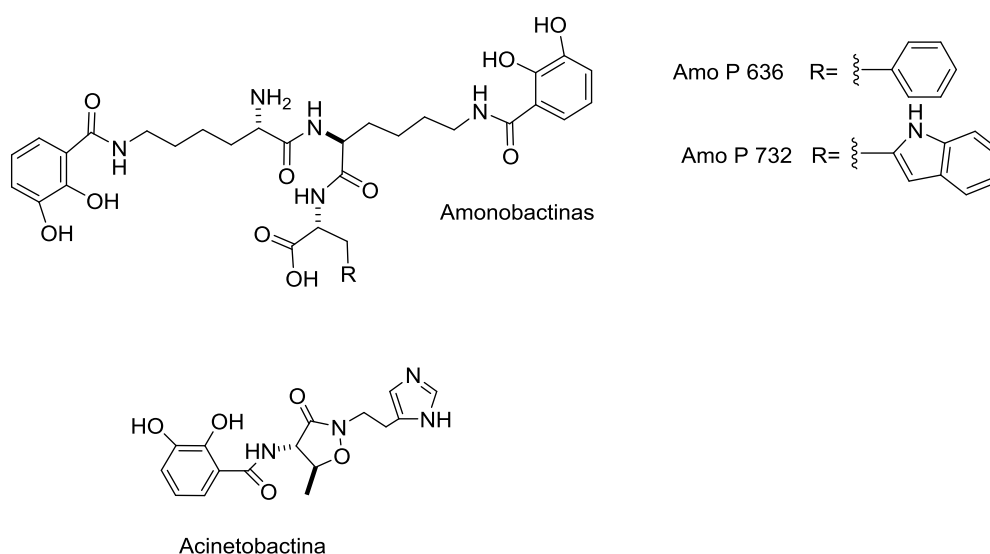
Estudios realizados por el grupo de Microbiología de la Universidad de Santiago de Compostela junto con una parte del grupo de investigación QUIMOLMAT de la Universidad de La Coruña, han identificado y caracterizado los genes responsables de la biosíntesis y transporte en *A. salmonicida*. Dichos estudios confirmaron la presencia de dos clusters genómicos que incluyen los genes que codifican la biosíntesis de sideróforos de tipo catecol. En estos estudios se encontró una gran similitud entre uno de los clúster caracterizado y la secuencia de genes que codifican la síntesis de proteínas implicadas en la producción de *acinetobactina*, un sideróforo mixto con grupos catecolato e hidroxamato aislada previamente de bacterias patógenas de *Acinetobacter*. Este descubrimiento resulta de marcada importancia puesto que *Acinetobacter baumannii* es un patógeno humano oportunista que durante las últimas dos décadas ha estado relacionado con un significativo y creciente número de infecciones hospitalarias, principalmente brotes de infecciones respiratorias.<sup>48</sup> Se ha asociado también esta bacteria con

<sup>47</sup> Ilustración tomada de: Homann, V.V.; Edwards, K.J.; Webb, E.A.; Butler, A. Siderophores of *Marinobacter aquaeolei*: petrobactin and its sulfonated derivatives. *Biometals*, **2009**, 22, 4, 565–571

<sup>48</sup> Bergogne-Berenzin, E.; Towner, K. J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Rev.*, **1996**, 9, 148–165

una serie de casos fatales de neumonía.<sup>49</sup> *A. baumannii* es, de manera significativa, la especie de *Acinetobacter* más resistente a los antibióticos. Cada vez es más frecuente encontrar una resistencia combinada a todos los  $\beta$ -lactámicos, a todos los aminoglucósidos y a las quinolonas, por ello, los estudios acerca del sideróforo producido por *A. salmonicida* similar a acinetobactina, podrían resultar de utilidad en el tratamiento de los procesos infecciosos causados por este patógeno humano.

Los estudios realizados por nuestro grupo de investigación han logrado el aislamiento y caracterización de los sideróforos producido por *A. salmonicida* subsp *salmonicida*. Uno de los cuales fue denominado como acinetobactina, por su similitud con el sideróforo producido por *Acinetobacter*. Los otros dos sideróforos producidos por *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* son dos ejemplares de amonobactinas (**Figura 13**).



**Figura 13: Sideróforos producidos por la bacteria patógena *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida***

Uno de los objetivos asociados al descubrimiento de este nuevo sideróforo consiste en su síntesis total como primer paso hacia el desarrollo de aplicaciones terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad forunculosis. En particular, se plantea en un futuro la utilización de este sideróforo en estrategias terapéuticas del tipo “Caballo de Troya”.

En el desarrollo de la presente memoria de Trabajo de Fin de Grado, se presentarán los aspectos experimentales relacionados con la preparación de intermedios clave en la síntesis química del sideróforo acinetobactina.

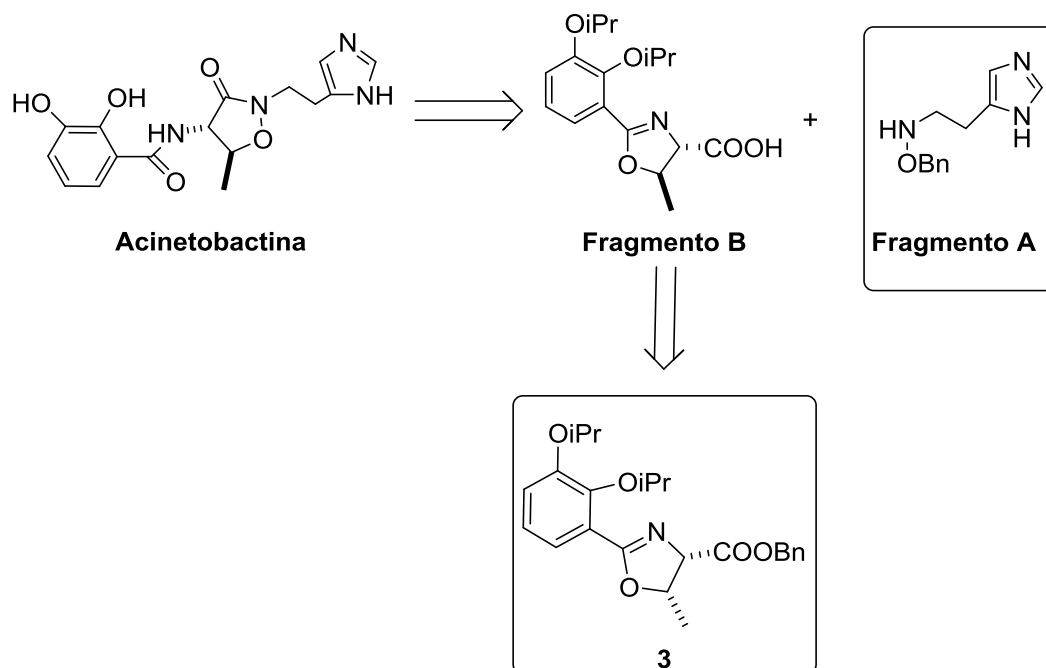
<sup>49</sup> Anstey, N. M.; Currie, B. J.; Withnall, K. M. Community-acquired *Acinetobacter* pneumonia in the Northern Territory of Australia. *Clin. Infect. Dis.*, **1991**, 14, 83–91

## **2. OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

Este Trabajo de Fin de Grado está incluido dentro del proyecto de síntesis total del sideróforo acinetobactina y análogos, para su posterior aplicación en el diseño de nuevos fármacos antibacterianos y vacunas contra la forunculosis.

El objetivo principal de este trabajo consiste en la preparación de dos equivalentes sintéticos avanzados en la síntesis convergente del sideróforo, que podrán ser utilizados posteriormente en la síntesis del compuesto y análogos. En particular, se plantea la síntesis de los intermedios sintéticos **3** y Fragmento A. (**Esquema 3**)



**Esquema 3:** Retrosíntesis parcial de acinetobactina mostrando los intermedios clave objetivo A y 3

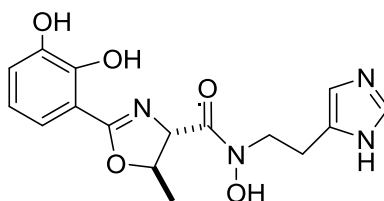
Como objetivos específicos de este trabajo se plantean:

1. Síntesis del Fragmento A (**Esquema 3**) mediante la formación de una amina terciaria protegida derivada de histamina y su posterior desprotección.
2. Síntesis del Intermedio sintético **3**, precursor a su vez del Fragmento B (**Esquema 3**). Con este propósito se lleva a cabo una reacción de acoplamiento entre un derivado protegido del ácido dihidroxibenzoico y *L*-treoninato de bencilo, sintetizado a partir del aminoácido *L*-treonina.
3. Correcta caracterización estructural de los productos formados.

# **3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

### 3.1 Planteamiento retrosintético

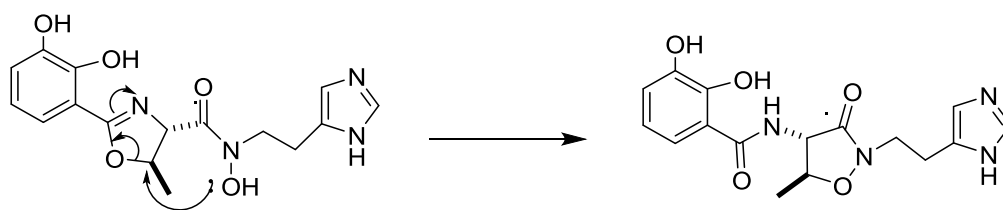
El sideróforo acinetobactina fue aislado e identificado en 1994 a partir de cultivos con baja concentración en hierro de *Acinetobacter baumannii* ATCC1960.<sup>50</sup> Entonces se propuso una estructura de sideróforo mixto donde los tres grupos funcionales (catecol, hidroxamato y oxazolina) estaban presentes. La estructura propuesta se muestra en la **Figura 14**.



Preacinetobactina **1a**

**Figura 14:** Estructura química de preacinetobactina (**1a**)

Sin embargo, en 2009 se determinó que la estructura propuesta era un intermedio inestable y que la estructura **1a** evolucionaba espontáneamente mediante una reacción  $S_N2$  intramolecular para dar lugar a la estructura real de acinetobactina **1b**. Desde entonces a la estructura **1a** se la conoce como preacinetobactina.<sup>51</sup> En la **Figura 15** se muestra la estructura real de la acinetobactina:



Preacinetobactina **1a**

Acinetobactina **1b**

**Figura 15:** Obtención de acinetobactina (**1b**) a partir del reordenamiento de preacinetobactina (**1a**)

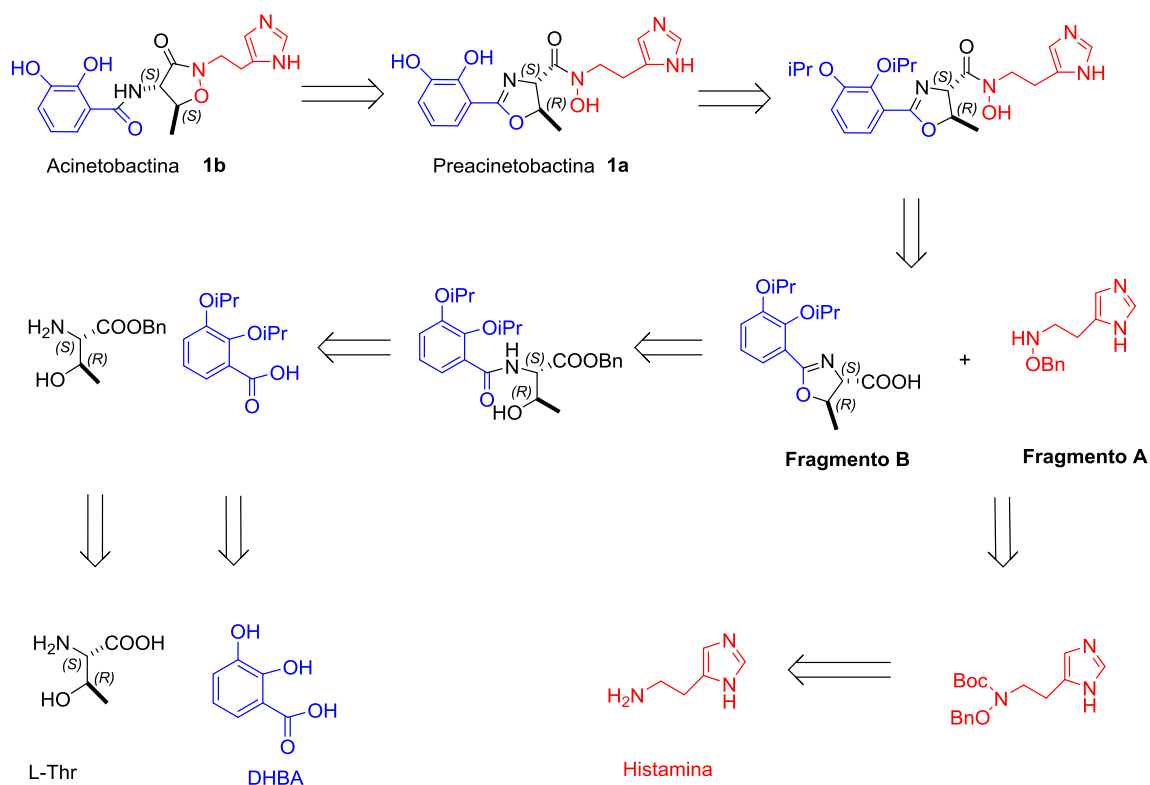
Con la finalidad de diseñar un procedimiento para la preparación del sideróforo acinetobactina se planteó el siguiente análisis retrosintético:

<sup>50</sup> Yamamoto, S.; Okujo, N.; Sakakibara, Y. Isolation and structure elucidation of acinetobactin, a novel siderophore from *Acinetobacter baumannii*. *Arch. Microbiol.*, **1994**, 162, 249—254

<sup>51</sup> Walsh, C. T.; Wuest, W. M.; Sattely, E. S. Three siderophores from one bacterial enzymatic assembly line. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 5056—5057



## DISCUSIÓN DE RESULTADOS



Esquema 4: Análisis retrosintético de acinetobactina (1b)

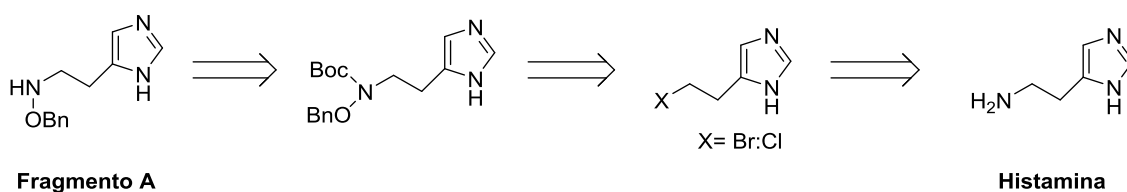
La síntesis presentada para el sideróforo acinetobactina sigue la metodología propuesta por Takeuchi y Ozaki.<sup>52</sup> Como se muestra en el **Esquema 4**, se plantea para la síntesis del sideróforo acinetobactina la obtención de dos fragmentos clave **A** y **B**. Como principales productos de partida se considera la utilización de histamina, *L*-treonina y ácido 2,3 dihidroxibenzoico (DHBA).

El análisis retrosintético propuesto se fundamenta en la utilización de grupos funcionales protectores para minimizar la formación de productos indeseados, debido a la alta capacidad de los intermedios sintetizados a participar en reacciones secundarias.

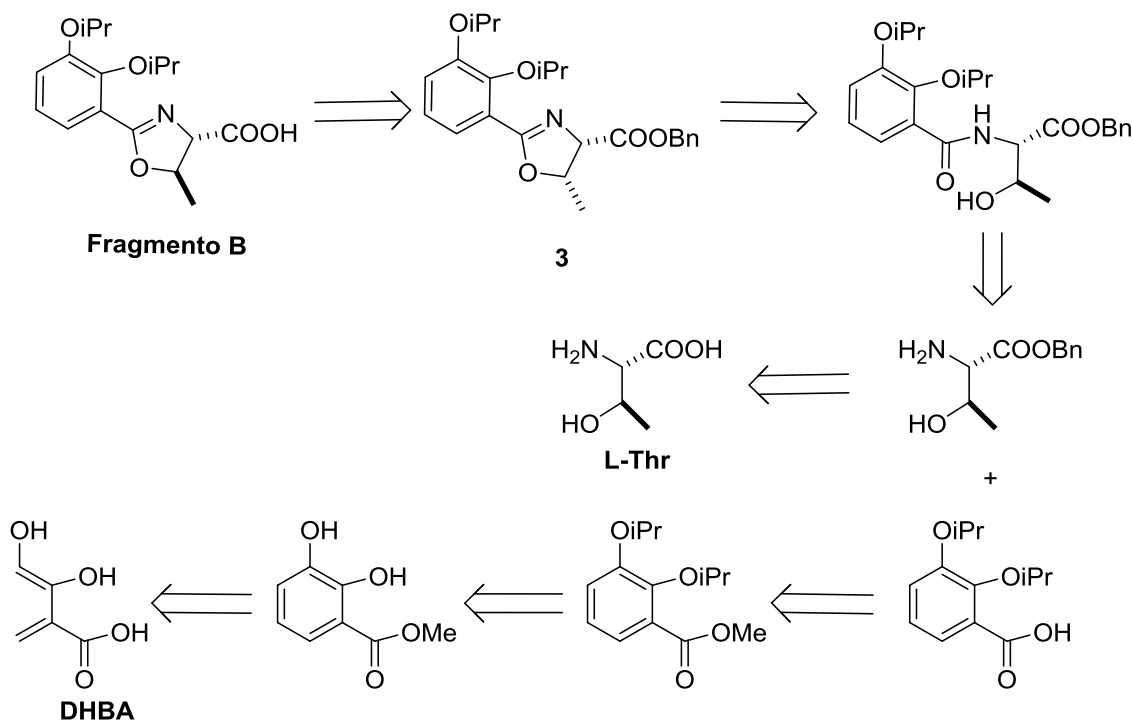
Tras el planteamiento retrosintético general de acinetobactina, se presentan los de los fragmentos **A** y **B**, los cuales presentan los intermedios clave objetivo del presente trabajo (Fragmento **A** e intermedio **3**, respectivamente).

<sup>52</sup> Takeuchi Y.; Ozaki S.; Satch M.; Mimura K.; Hara S.; Abe H.; Nishioka H.; Harayama T. Synthesis of Acinetobactin. *Chem. Pharm. Bull.*, **2010**, 58, 11, 1552-1553

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS



Esquema 5: Análisis retrosintético del fragmento A de acinetobactina (1b)



Esquema 6: Análisis retrosintético fragmento B de acinetobactina (1b)

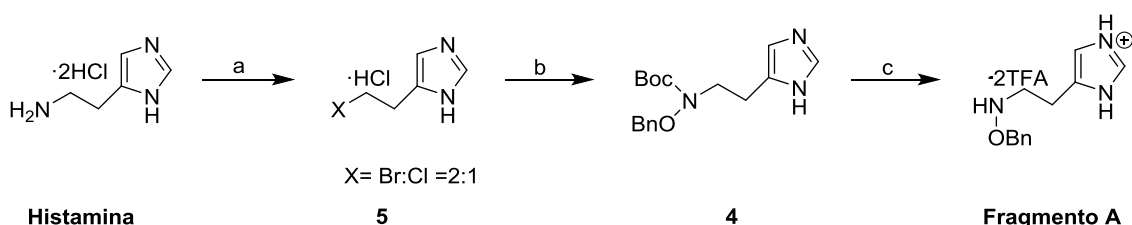
### 3.2 Propuestas sintéticas para la obtención de los intermedios objetivo

En esta sección se estudia la preparación y caracterización de los fragmentos A y B. La ruta sintética propuesta para la obtención del fragmento A consiste en una síntesis lineal en tres pasos a partir de histamina disponible comercialmente. La obtención del intermedio objetivo 3, precursor del fragmento B, se lleva a cabo mediante una ruta sintética convergente que concluye con el acoplamiento entre el *L*-treoninato de bencilo (7, Esquema 8), formado a partir de *L*-Treonina, y el ácido 2,3-diisopropiloxibenzoico (8,

Esquema 9), preparado a partir de DHBA.

### 3.2.1 Propuesta sintética para la obtención del fragmento A

El análisis retrosintético visto en la sección 3.1. nos permite plantear la síntesis del fragmento **A** a partir de una secuencia lineal en 3 etapas partiendo del dihidrocloruro de histamina (**Esquema 7**):



**Reactivos y condiciones:**

- a) NaNO<sub>2</sub>, KBr/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. 3h, -15°C, t.a.    b) NaH, BnONHBoc/DMF, 12h, 50°C  
 c) TFA/DCM, 90 min. t.a.

**Esquema 7: Propuesta sintética para la obtención del fragmento A**

El tratamiento de histamina comercial con nitrito sódico y bromuro potásico en medio ácido conduce a la formación del hidrocloreto de 5-(2-bromoetil)-1*H*-imidazol (compuesto **5**).<sup>53</sup> El compuesto **5** se forma a través de un proceso de diazotación/halogenación, que implica la conversión del grupo amina en un grupo diazo, seguida por la sustitución nucleófila con el haluro.<sup>54</sup> En dicho proceso se libera nitrógeno gas, lo cual se pudo apreciar por la aparición de un leve burbujeo tras la adición de nitrito sódico. El producto **5** fue caracterizado por resonancia magnética nuclear y se comprobó que los datos espectroscópicos coincidían con los descritos en la bibliografía.<sup>53</sup> Debido a la presencia de iones cloruro en el medio de reacción, se obtiene tanto el producto **5** clorado como bromado en una proporción Br:Cl 2:1. Este hecho se pone de manifiesto al observar en el espectro de resonancia magnética nuclear dos pares de tripletes equivalentes desplazados ligeramente (3.26 ppm y 3.36 ppm; 3.74 ppm y 3.89 ppm) originados por la presencia de dos tipos de entornos químicos relacionados con la diferente electronegatividad de los dos haluros. A pesar de obtenerse dos tipos de haluros de alquilo diferentes para el compuesto **5**, se considera que tanto el producto bromado como el clorado participan activamente en la siguiente reacción de sustitución nucleófila con la amina secundaria protegida para formar el compuesto **4** (2-(1*H*-imidazol-4-il)etil)(benciloxi)carbamato terc-butilo).

La reacción de formación del producto **4** se siguió por cromatografía en capa fina, pudiéndose observar después de doce horas de reacción que se había formado producto deseado

<sup>53</sup> Ting, R. et al. Triggering DNAzymes with Light: A Photoactive C8 Thioether-Linked Adenosine. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126(40), 12720-12721.

<sup>54</sup> Allerton, C.M.N. et al. Preparation of substituted imidazoles as TAFIa inhibitors. *PCT Int. appl.* **2002**, 2002014285

quedando una mínima cantidad de material de partida. La elaboración de la reacción se realizó mediante la eliminación del disolvente y reactivos volátiles a presión reducida.

El producto fue purificado por columna cromatográfica en gel de sílice, usando como eluyente DCM:MeOH 95:5 y polarizando hasta 80:20. Aquellas fracciones que presentaron la misma composición por capa fina fueron juntadas y el disolvente eliminado a vacío. La fracción cuyos datos espectroscópicos concordaban con la formación del producto **4** fue utilizada en el siguiente paso. En este sentido, se puede confirmar la formación del producto **4** esperado por la aparición en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de un singlete que integra por nueve hidrógenos a 1.43 ppm, que se correspondería con la señal de los hidrógenos del grupo terc-butílico.

La reacción de desprotección de la amina terciaria generada (**4**) con ácido trifluoroacético (TFA) fue seguida por cromatografía en capa fina y el producto obtenido fue caracterizado por técnicas de elucidación estructural, RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  y de espectrometría de masas ESI positivo de baja y alta resolución. El espectro de resonancia magnética de protón resultó similar al obtenido para **4**, salvo por la ausencia de la señal correspondiente a los hidrógenos terc-butílicos. A su vez, las demás técnicas de elucidación estructural proporcionaron resultados coherentes con la formación del fragmento **A**.<sup>52</sup> En base a estos resultados se puede concluir que la reacción de desprotección de la amina terciaria ha funcionado satisfactoriamente y se ha obtenido el fragmento **A** con un rendimiento global del 26%.

### 3.2.2 Propuesta sintética para la obtención del fragmento B/ Intermedio objetivo 3

El análisis retrosintético de la sección 3.1. permite trazar, partiendo de productos disponibles comercialmente, la síntesis del fragmento **B** (así como la del intermedio objetivo **3**) a partir de varias etapas. Así, se plantea una ruta sintética convergente que puede dividirse en tres etapas.

#### 3.2.2.1 Síntesis de L-treoninato de bencilo (**7**)

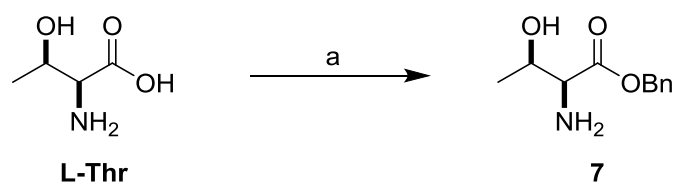
En la síntesis total de acinetobactina resulta necesaria la protección del grupo ácido de L-treonina para prevenir el ataque nucleófilo en esa posición, así como para evitar la interferencia del protón ácido en las siguientes reacciones. Con el objetivo de proteger este grupo ácido se propone su conversión en el correspondiente éster bencílico, lo que origina el amino-alcohol **7**.

El intermedio **7** es obtenido a partir del tratamiento del reactivo comercial L-treonina con alcohol bencílico según las condiciones reflejadas en la bibliografía (síntesis de Pactamicina).<sup>55</sup>

---

<sup>55</sup> Hanessian, S.; Vakiti, R.R.; Dorich, S.; Banerjee, S. Total Synthesis of Pactamycin, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **2011**, 50, 15, 3497-3500

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS



**Reactivos y condiciones:**

a) pTsOH, Tolueno/BnOH 4:1, 24h, 150°C, reflujo

Esquema 8: Propuesta sintética para la obtención del intermedio 7

La conversión del grupo ácido de L-treonina se lleva a cabo bajo condiciones inertes con exceso de alcohol bencílico frente al aminoácido. La mezcla de reacción se agita durante 24 horas con eliminación azeotrópica de agua.

El producto formado es soluble en agua hasta que se basicifica el medio hasta pH 10. En este punto ha de especificarse que las condiciones descritas en la bibliografía fueron modificadas. Inicialmente se siguió el procedimiento teórico que implicaba lavar la fase acuosa con acetato de etilo (AcOEt) cinco veces para posteriormente extraer estas cinco porciones orgánicas con agua. Sin embargo, al examinar el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del producto obtenido se observó, junto con las señales relativas al producto esperado, la presencia de un singulete a 4.5 ppm que integraba por más hidrógenos de los esperados, lo que puso de manifiesto que procediendo de esta forma se arrastraba gran cantidad de alcohol bencílico sin reaccionar. Asimismo, la señal de un singulete a 4.60 ppm reveló la presencia del principal producto secundario de la reacción en el compuesto obtenido. El principal producto secundario de la reacción resulta de la condensación del alcohol bencílico con el grupo hidroxilo de la molécula de L-treonina, dando lugar al éter bencílico en vez de al éster esperado. Por ello, en el espectro de protón del producto obtenido se observa junto con la señal en torno a 5.19 ppm correspondiente a los hidrógenos bencílicos del producto principal (éster), otro singulete a campo más alto relativa a la señal de los hidrógenos bencílicos del producto secundario (éter). En base a esto se repitió la experiencia lavando únicamente dos veces la fase acuosa y extrayendo las dos fases orgánicas recogidas con agua para limitar la cantidad arrastrada de las dos sustancias mencionadas. Los datos espectroscópicos tomados de los productos obtenidos pusieron de manifiesto que se obtenían mejores resultados en cuanto a la pureza del producto obtenido al disminuir el número de lavados realizados a la fase acuosa primaria.

El producto obtenido según el procedimiento modificado fue caracterizado por técnicas de elucidación estructural, RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  y de espectrometría de masas ESI positivo de baja y alta resolución. Los datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$ -RMN coincidieron con los descritos en la bibliografía para el mismo compuesto.<sup>52</sup>

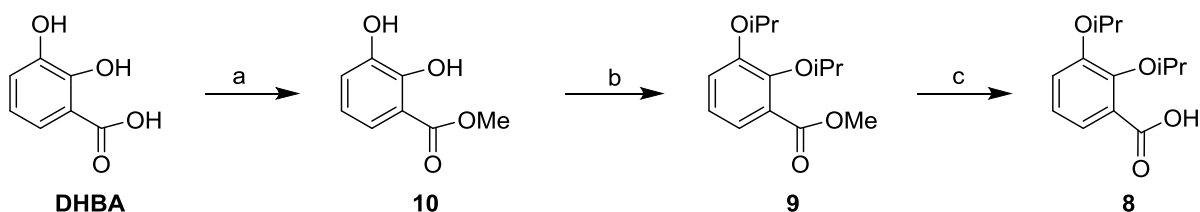
La reacción se obtuvo con un rendimiento del 29%. Este bajo rendimiento resulta, en parte, de limitar el número de lavados ya que existe un equilibrio del producto entre la fase acuosa y la fase orgánica, por lo que al aumentar el número de lavados de la fase acuosa se conseguiría arrastrar más producto a la orgánica, que posteriormente serían llevados a una nueva fase

acuosa. Sin embargo, el compromiso existente entre la cantidad de producto obtenido y la pureza del mismo condicionó optar por reducir el número de lavados.

### 3.2.2.2 Síntesis del ácido 2,3-diisopropiloxibenzoico (8)

La unidad de catecol requerida para la obtención de acinetobactina se oxida fácilmente a quinonas, por lo que resulta necesaria la protección de los grupos hidroxilo. Previamente se utilizó la protección con grupos metílicos, pero este tipo de protección es complicada por la difícil eliminación en las últimas etapas de la síntesis de acinetobactina. La protección con grupos bencilo, a pesar de ser fáciles de eliminar mediante hidrogenólisis convencional ( $H_2$ , Pd/C), provoca rendimientos menores debido a que al tratarse de grupos voluminosos reducen la reactividad del compuesto.<sup>56</sup> Por estos motivos en la síntesis propuesta se utilizan grupos isopropílicos como grupos protectores ya que resultan fáciles de eliminar en las últimas etapas de la síntesis y originan derivados lo suficientemente reactivos.

En el **Esquema 9** se muestra la ruta sintética elegida para obtención del derivado de catecol protegido (compuesto **8**).<sup>56</sup>



**Reactivos y condiciones:**

a)  $H_2SO_4$  / MeOH    b)  $iPrBr$ ,  $K_2CO_3$  / DMF, KI    c)  $Ba(OH)_2$  / THF- $H_2O$

**Esquema 9: Ruta sintética para la obtención del intermedio 8**

Según la ruta sintética propuesta el ácido **8** se obtiene fácilmente a partir de DHBA en un proceso de 3 etapas.

Para evitar que el protón del grupo ácido de la molécula de DHBA interfiera en la reacción de formación de los éteres isopropílicos, se propone su previa conversión en éster metílico. Este proceso se lleva a cabo mediante tratamiento con ácido sulfúrico y metanol durante cinco horas. De esta forma se obtiene el éster **10**.

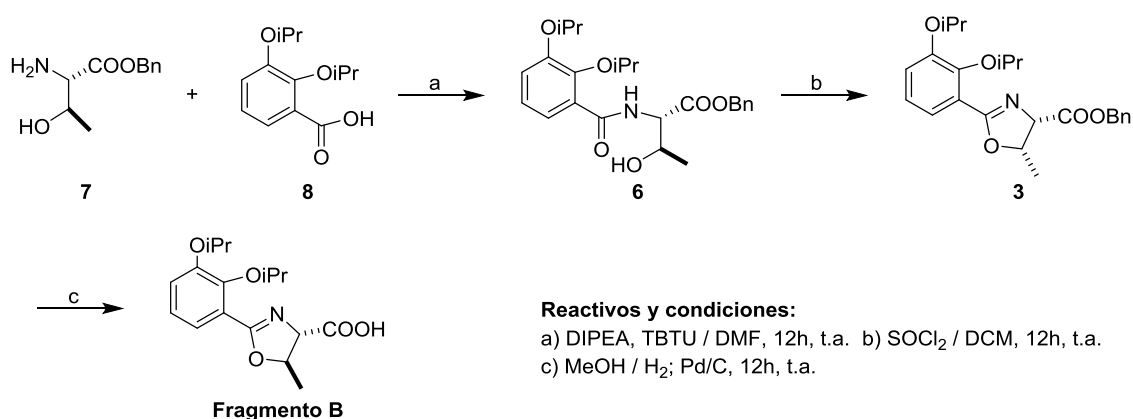
La introducción de los grupos isopropílicos se realiza mediante el tratamiento del intermedio **10** con carbonato de potasio y bromuro de isopropilo, lo que conduce al producto **9**. La

<sup>56</sup> Sakakura A.; Umemura S.; Ishihara K. Convergent total syntheses of fluvibactin and vibriobactin using molybdenum(VI) oxide-catalyzed dehydrative cyclization as a key step. *Chem. Commun.*, **2008**, 30, 3561-3563

desprotección del grupo ácido se produce haciendo reaccionar el producto **9** con hidróxido de bario en THF durante seis horas.

En el presente trabajo no tuvo que sintetizarse el compuesto **8**, al disponerse en el laboratorio de suficiente cantidad del compuesto que había sido preparado por otros miembros del grupo de investigación. Así, el compuesto pudo utilizarse directamente en la siguiente reacción de la ruta planteada, sin necesidad de realizar su preparación por parte de la autora de la presente memoria.

### 3.2.2.3 Reacción de acoplamiento entre **7** y **8**. Obtención del intermedio objetivo **3**



Esquema 10: Propuesta sintética para la obtención del fragmento B

La reacción de acoplamiento entre el aminoalcohol **7** y el ácido **8** se llevó a cabo empleando éste último en ligero exceso (1,1 equivalentes frente a 1 equivalente del intermedio **7**). Como base se empleó DIPEA y se hizo uso TBTU como agente acoplante. La utilización de agentes acoplantes es una práctica común en síntesis orgánica, particularmente en la preparación de amidas, puesto que permite aumentar el rendimiento de las reacciones y evitar en cierta medida la posible racemización de los productos formados.<sup>57</sup>

Se realizó una capa fina del crudo obtenido utilizando como testigo el compuesto **6** sintetizado previamente por otro miembro del laboratorio. En esta se observó la presencia en el crudo de tres compuestos diferentes: restos del producto de partida, un producto secundario, y un compuesto cuyo RF coincidía con el del producto **6** utilizado como testigo. El crudo de la reacción fue purificado mediante cromatografía en columna en gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla de AcOEt:hexano 1:2.

<sup>57</sup> Montalbetti, C.A.G.N.; Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*. **2005**, 61, 46, 10827-10852

Las fracciones que presentaron la misma composición por capa fina fueron reunidas y el disolvente eliminado a vacío. La fracción cuyos datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$  RMN concordaban con la formación del producto **6** fue caracterizada además por RMN de  $^{13}\text{C}$  y por espectrometría de masas (ESI positivo de baja y alta resolución). En el espectro de protón se observan varias señales de hidrógenos aromáticos, así como también se observan señales correspondientes a hidrógenos bencílicos (singulete a 5.23 ppm que integra por dos hidrógenos) y a hidrógenos isopropílicos (multiplete a 1.35 ppm). Sin embargo, a la vista del espectro de RMN de protón del producto, los factores determinantes para afirmar que se ha formado el compuesto **6** consisten en el desplazamiento en el espectro de  $^1\text{H}$  de la señal del hidrógeno del carbono en  $\alpha$  al nitrógeno del grupo amida que resonó a 4.40 ppm en relación con el mismo hidrógeno en el espectro de **7**, que aparece a 3.34 ppm, así como la aparición de la señal del hidrógeno del grupo amida a 9.09 ppm.

La espectrometría de masas también permite confirmar la síntesis de la estructura propuesta al mostrar el pico del ión molecular  $[\text{M}+\text{H}]^+$  a  $m/z=452.2041$ .

Cabe decir que el rendimiento de la reacción (47%) resulta menor que el esperado en parte debido a que no se está empleando para su síntesis el compuesto **7** puro, puesto que resultó imposible obtener dicho compuesto sin trazas de productos secundarios.

La ciclación de la amida **6** se consigue mediante tratamiento con cloruro de tionilo, un agente deshidratante, a temperatura ambiente.<sup>55</sup> Se asume que el cloruro de tionilo reacciona con grupo hidroxilo libre convirtiéndolo en un buen grupo saliente. El oxígeno carbonílico adyacente puede reaccionar en una sustitución nucleófila bimolecular ( $\text{S}_{\text{N}}2$ ) y reemplazar el grupo alcohólico ahora convertido en un buen grupo saliente. Debido a la naturaleza de la reacción  $\text{S}_{\text{N}}2$ , se produce inversión de configuración, lo que conduce a la estructura molecular indicada en el **Esquema 10** para el compuesto **3**.<sup>58</sup>

La caracterización del producto obtenido se lleva a cabo mediante espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear. El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  muestra las señales correspondientes a los hidrógenos aromáticos, así como dos multipletes centrados en 4.52 y 5.00 ppm correspondientes a los CH unidos al nitrógeno y al oxígeno del anillo de oxazolina respectivamente. En vista de los resultados de los desplazamientos en los espectros de resonancia magnética nuclear y al pico del ión molecular se puede afirmar que se ha obtenido el producto **3** en un rendimiento del 87% a partir del compuesto **6**.

La hidrogenación catalítica del compuesto **6** conduce a la formación del fragmento **B**. En este paso de reacción tiene lugar la epimerización del compuesto **6** que conduce a la formación del intermedio más estable, que es aquél con los grupos sustituyentes del anillo de oxazolina en disposición relativa trans. Por ello, la estructura observada para el Fragmento **B** es la que se observa en el **Esquema 10**.

---

<sup>58</sup> Kikkeri, R.; Traboulsi, H.; Humbert, N.; Gumienna-Kontecka, E.; Arad-Yellin, R.; Melman, G.; Elhabiri, M.; Albrecht-Gary, A.M.; Shanzer, A. Toward Iron Sensors: Bioinspired Tripods Based on Fluorescent Phenol-oxazoline Coordination Sites. *Inorg. Chem.*, **2007**, 46, 7, 2485-2497



## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

---

Sin embargo, debido a la inestabilidad del fragmento **B** y la imposibilidad por razones técnicas de utilizarlo en los siguientes pasos de la síntesis de forma inmediata, esta última reacción de hidrogenación no se llevó a cabo por la autora de esta memoria

# **4. PARTE EXPERIMENTAL**

### 4.1 Aspectos generales del trabajo en el laboratorio

Salvo que se indique lo contrario, todas las reacciones se realizaron en condiciones anhidridas bajo atmósfera inerte de argón. Del mismo modo, el material de vidrio empleado se secó en estufa a 120°C durante al menos 4 horas. Al retirarlo de la estufa se dejó enfriar a temperatura ambiente en desecador a vacío. Las reacciones se realizaron en balones de una boca adaptándosele un septum al que se le hizo pasar una corriente de argón con entrada y salida mediante una aguja. Para reacciones en las que se precisaron las máximas condiciones anhidridas posibles, una vez retirado el material de vidrio de la estufa a 120°C se colocó en un desecador con P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> a vacío. En el momento de su uso, el material fue purgado con corriente de argón.

Las reacciones a baja temperatura se llevaron a cabo en baño de agua-hielo para las reacciones a 0°C y en baño de metanol con enfriamiento mediante el equipo cryocool para reacciones a temperaturas menores a 0°C.

Los disolventes empleados en las reacciones fueron secados previamente mediante reflujo en atmósfera inerte con un agente desecante adecuado: Na para tolueno; CaH<sub>2</sub> para DCM. La DMF seca fue adquirida anhidrida en su envase comercial sellado con septum.

Las cromatografías en columna se realizaron empleando gel de sílice Merck 60 (230-400 Mesh) como fase estacionaria. Para la cromatografía en capa fina, se utilizó placas de gel de sílice Merck 60 F254, empleando como luz reveladora la UV de 254 nm o como disolución reveladora una disolución de ácido fosfomolibdico, ácido sulfúrico o sulfato de cerio (IV) con posterior calentamiento. En los casos en los que fue necesario, se empleó como disolución reveladora ninhidrina (hidrato de tricetohidrendeno).

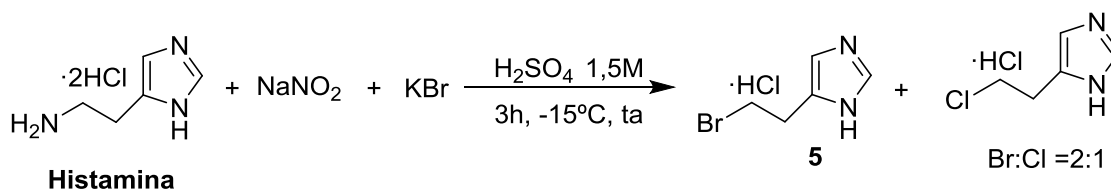
Los espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN se realizaron en los Servicios de Apoyo a Investigación de la Universidade da Coruña (SAI), y se registraron en espectrómetro Bruker Advance 300 MHz o Bruker Advance 500 MHz equipado con una criosonda. Como disolventes deuterados para RMN se emplearon CDCl<sub>3</sub>, D<sub>2</sub>O ó CD<sub>3</sub>OD dependiendo de la polaridad de los productos.

Los desplazamientos químicos fueron determinados en escala δ partes por millón (ppm), con constantes de acoplamiento (*J*) en Hercios (Hz). Las multiplicidades de las señales de <sup>13</sup>C fueron determinados mediante experimentos DEPT-135.

Los espectros de masas de electroespray (ESI) se realizaron en un espectrómetro Qq-TOF Q-Star Elite de Applied Biosystems.

## 4.2 Preparación del Fragmento A

### 4.2.1 Síntesis del compuesto 5: hidrocloreto de 5-(2-bromoetil)-1H-imidazolio e hidrocloreto de 5-(2-cloroetil)-1H-imidazolio.



En un balón de 25 ml, 500 mg de dihidrocloruro de histamina (2,72 mmol; 1 eq.) y 1066 mg (8,98 mmol; 3,3 eq.) de KBr se disuelven en 4 ml de una disolución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,5M. La disolución se enfría a -15°C y se añaden 0,3 ml (3,26 mmol; 1,2 eq.) de una disolución saturada de NaNO<sub>2</sub>. La mezcla de reacción, inicialmente transparente, adquiere un color amarillo oscuro tras la adición de NaNO<sub>2</sub> y comienza a burbujear. Después de un periodo de 30 minutos a 0°C, se deja que la mezcla de reacción evolucione a temperatura ambiente durante tres horas más. Después de tres horas a temperatura ambiente la mezcla de reacción presenta un color amarillo tenue y no se observa burbujeo por lo que se enfría de nuevo a -15°C y se lleva a pH=10 mediante el goteo de 2,7 ml de una disolución de NaOH 5M, lo que causa que la mezcla de reacción adquiera de nuevo turbidez. Se trasvasa el contenido del balón a un embudo de decantación y se extrae rápidamente con CHCl<sub>3</sub> (5 x 15 ml). Las fracciones orgánicas reunidas se vierten en un balón que contiene 6 ml de una disolución de HCl 0,5M en AcOEt con la finalidad de prevenir la reacción intramolecular. Se evapora el disolvente a presión reducida para dar 280 mg de producto (49%) como sal de hidrocloreto. El producto se presenta como aceite amarillo por lo que se hace cristalizar con tolueno para obtener cristales amarillo-blancos.

**RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ<sub>H</sub> ppm:** 8.67 (d, J = 1.4 Hz, 3H), 7.46 – 7.39 (m, 3H), 3.90 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 3.75 (t, J = 6.4 Hz, 4H), 3.37 (td, J = 6.4, 0.8 Hz, 5H), 3.30 – 3.21 (m, 3H).

**RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O) δ<sub>C</sub> ppm:** 133.04 (C), 130.64 (CH), 116.61 (NH-CH), 42.77 (Cl-CH<sub>2</sub>), 30.73 (CH<sub>2</sub>), 27.27 (CH<sub>2</sub>), 22.17 (Br-CH<sub>2</sub>).

**(+)-LR-ESIMS m/z, (%):**

C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>ClN<sub>2</sub><sup>+</sup>: Encontrada: 131.04; Calculada: 131.0371

C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>BrN<sub>2</sub><sup>+</sup>: Encontrado 176.98; Calculada: 174.9865

## PARTE EXPERIMENTAL

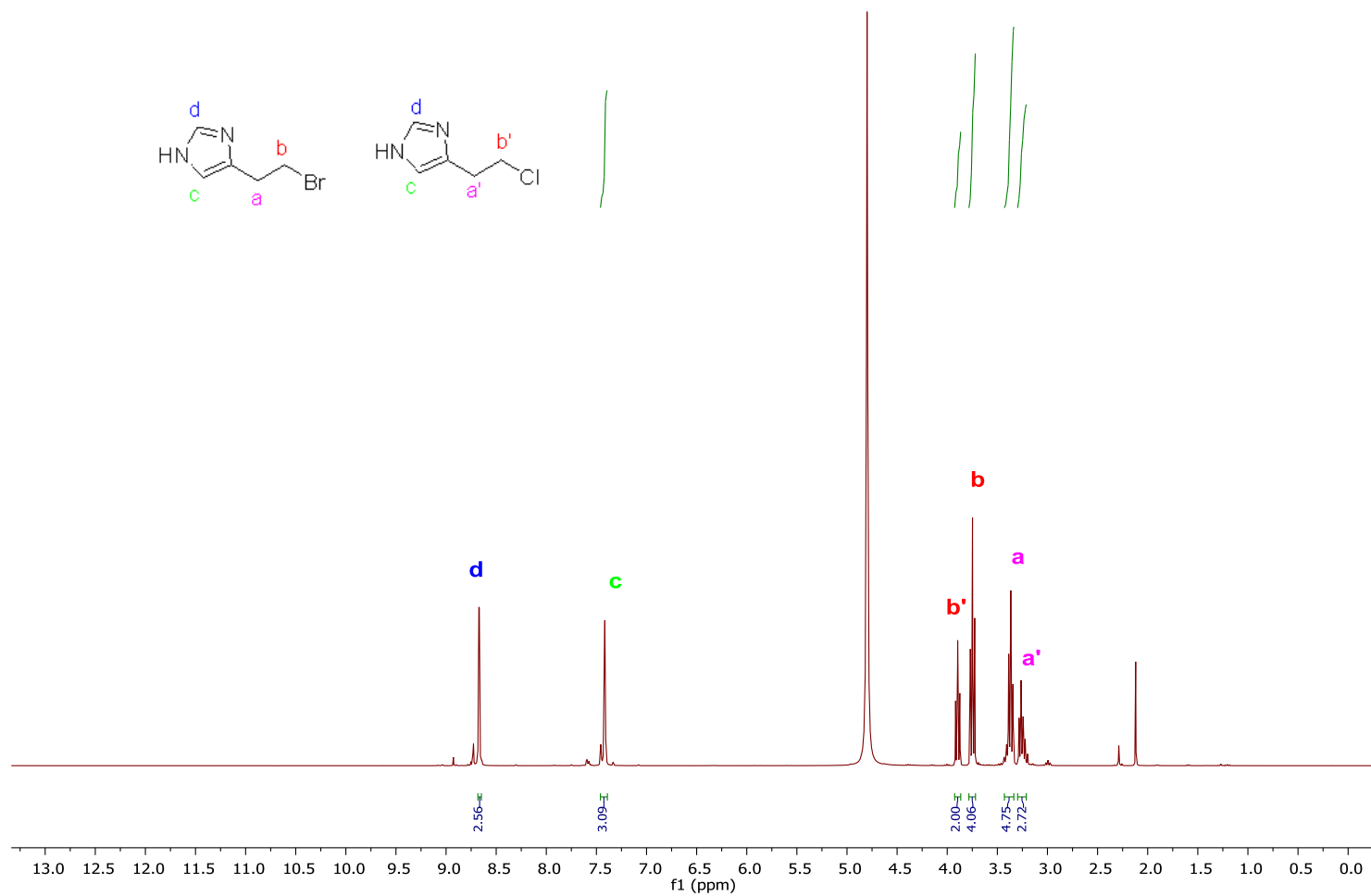


Figura 16: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de 5

## PARTE EXPERIMENTAL

---

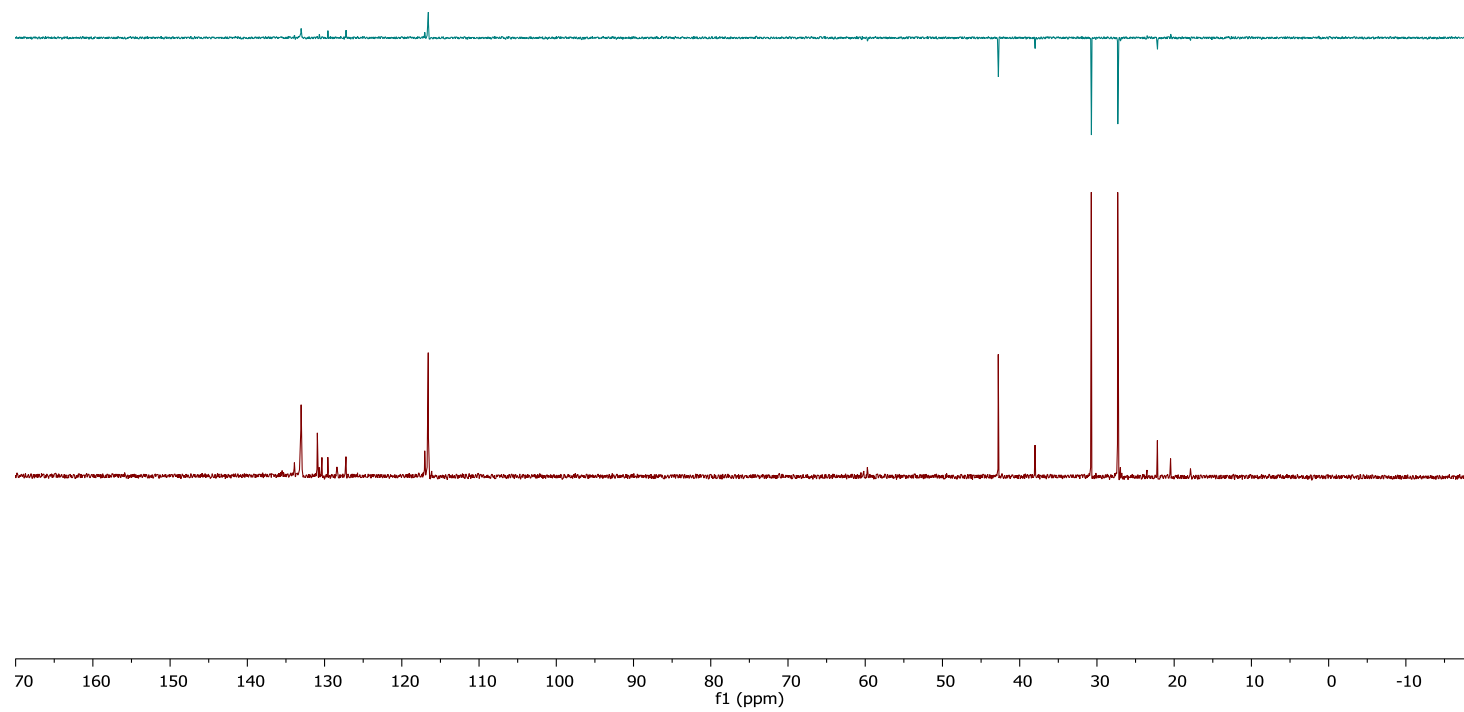


Figura 17: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de 5

## PARTE EXPERIMENTAL

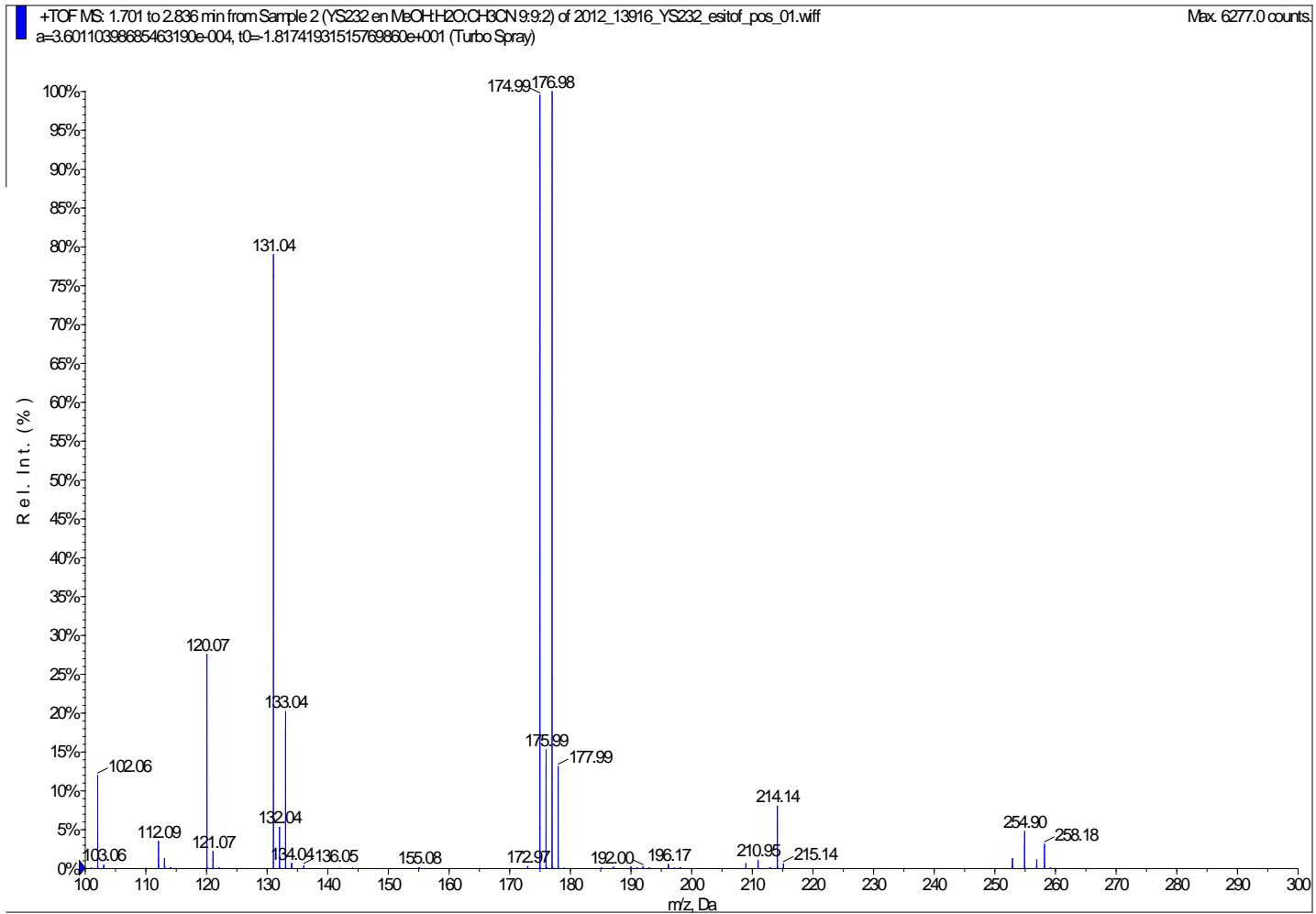
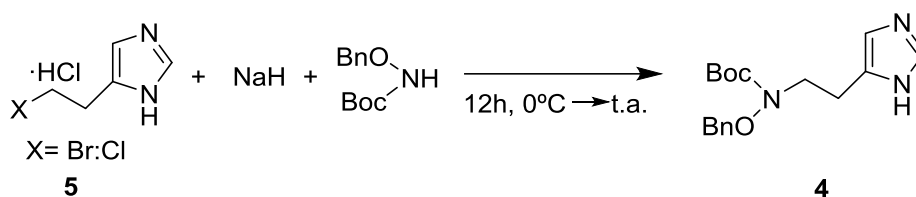


Figura 18: Espectro de masas ESI positivo de baja resolución de 5

## PARTE EXPERIMENTAL

### 4.2.2 Síntesis del compuesto 4: (2-(1H-imidazol-4-il)etil)(benciloxi)carbamato de *terc*-butilo



Sobre una disolución de benciloxicarbamato de *terc*-butilo (255 mg; 1,135 mmoles; 1,2 eq.) en 8 ml de DMF anhidra a 0°C se añaden 72 mg de NaH (2,85 mmoles; 3 eq.) La mezcla resultante se agita durante 30 minutos dejando que alcance temperatura ambiente. Pasados los 30 minutos se añaden 200 mg de **5** (0,95 mmoles; 1 eq.) y se deja agitando la mezcla de reacción durante toda la noche a 50°C. Transcurrido ese tiempo se realiza una capa fina para comprobar que la reacción ha finalizado y la mezcla se diluye con 10 ml de agua y 10 ml de AcOEt. La fase orgánica se lava con agua cinco veces, se seca sobre MgSO<sub>4</sub> y se elimina el disolvente a presión reducida.

El producto se purifica por cromatografía en columna a presión reducida utilizando como eluyente DCM:MeOH 95:5 y polarizando hasta DCM:MeOH 80:20. El revelado de las capas finas se realiza con cerio. Las fracciones que presentaron la misma composición por cromatografía en capa fina se reunieron y el disolvente de cada una de ellas se eliminó a presión reducida. Se obtuvieron 101,41 mg de producto en forma de cristales blancos.

**Rf (DCM:MeOH 80:20)= 0,53**

**RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> ppm:** 7.50 (s, 1H), 7.40 – 7.31 (m, 5H), 4.82 (s, 2H), 3.69 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.89 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 1.43 (s, 9H).

**RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub> ppm:** 156.44 (C=O), 135.44 (2 x C), 134.53 (CH), 129.42 (2 x CH), 128.58 (CH), 128.45 (2 x CH), 81.52 (C), 76.94 (O-CH<sub>2</sub>), 49.22 (N-CH<sub>2</sub>), 28.22(3 x CH<sub>3</sub>), 24.47 (CH<sub>2</sub>).

**(+)-LR-ESIMS *m/z*, (%) C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>: 318.18**

**(+)-HR-ESIMS *m/z*, (%)C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>: encontrado: 318.1831; calculado: 318.1812**



## PARTE EXPERIMENTAL

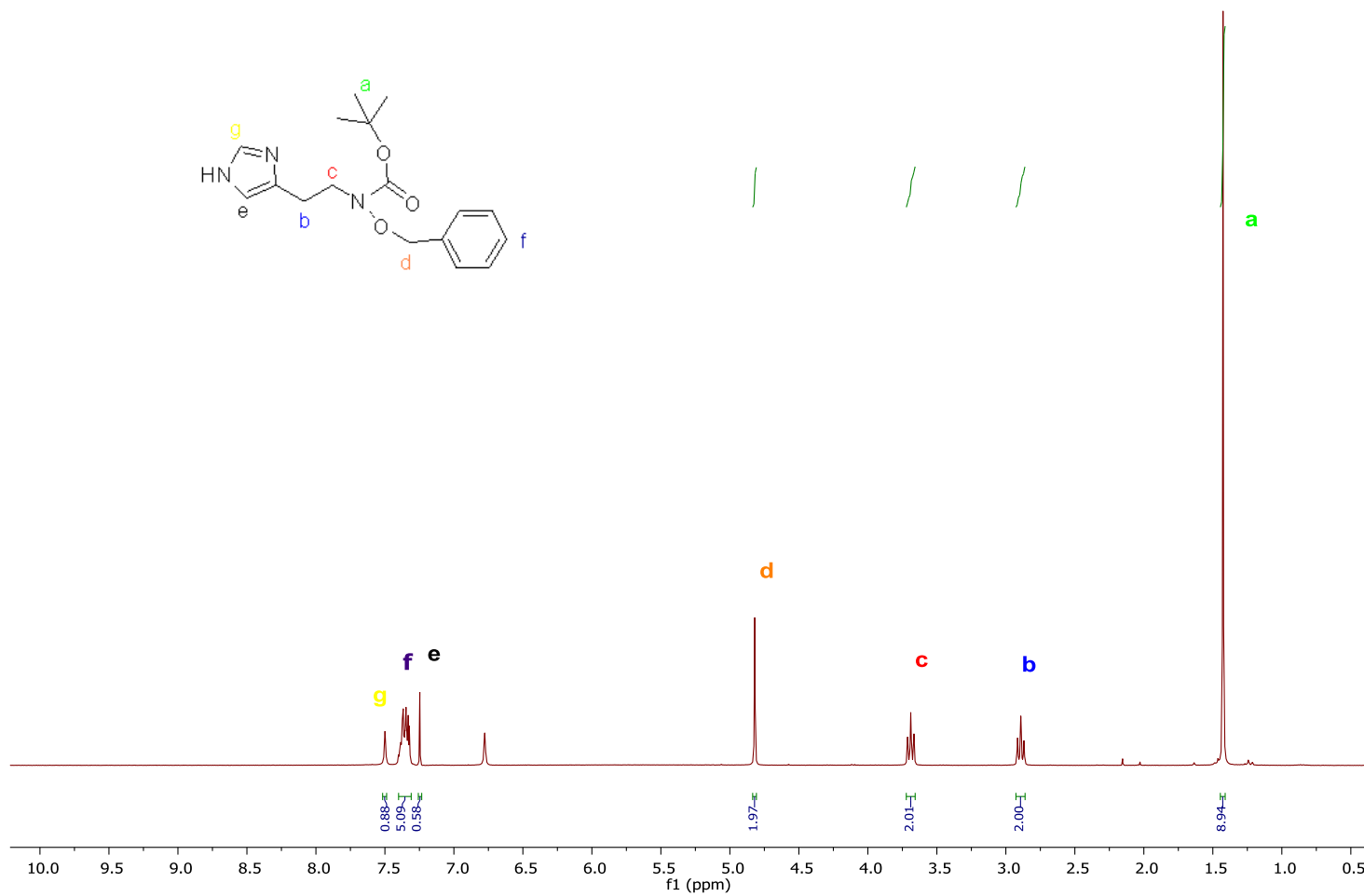


Figura 19: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de 4

## PARTE EXPERIMENTAL

---

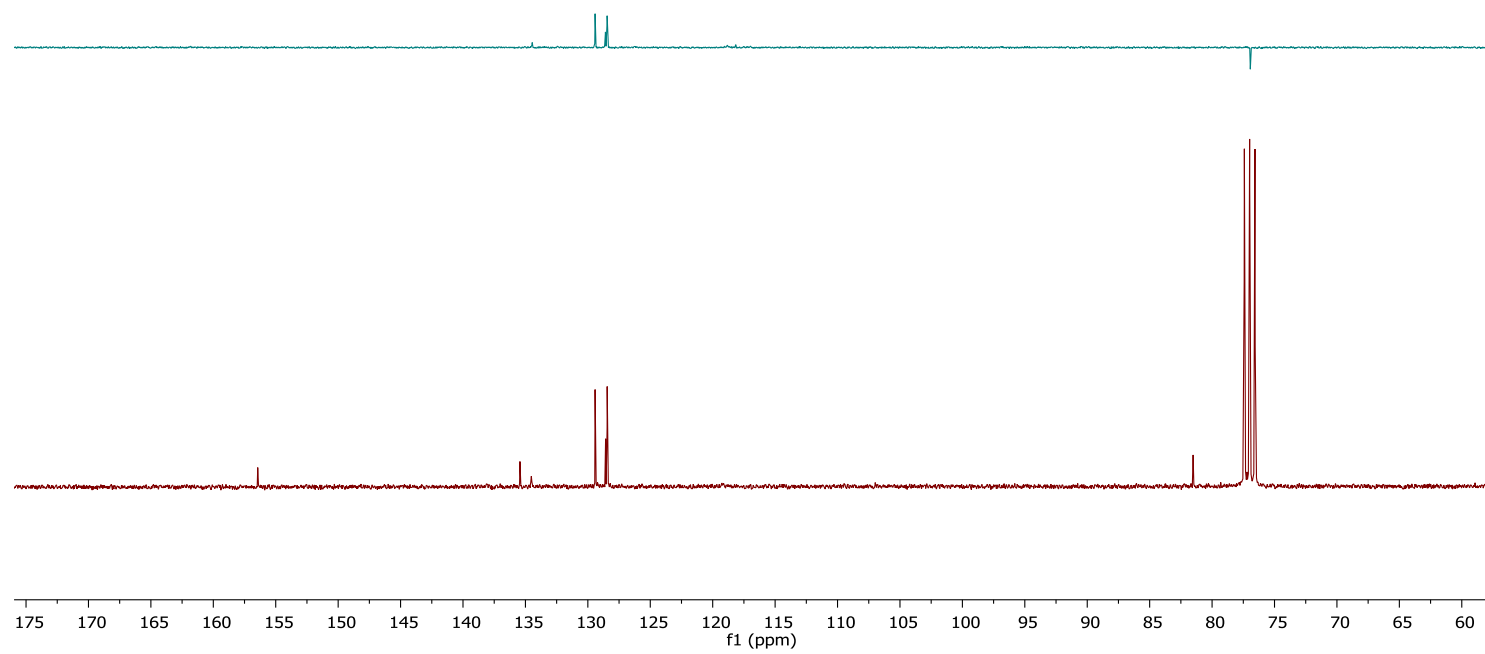


Figura 20: Espectro de RMN de <sup>13</sup>C de 4

## PARTE EXPERIMENTAL

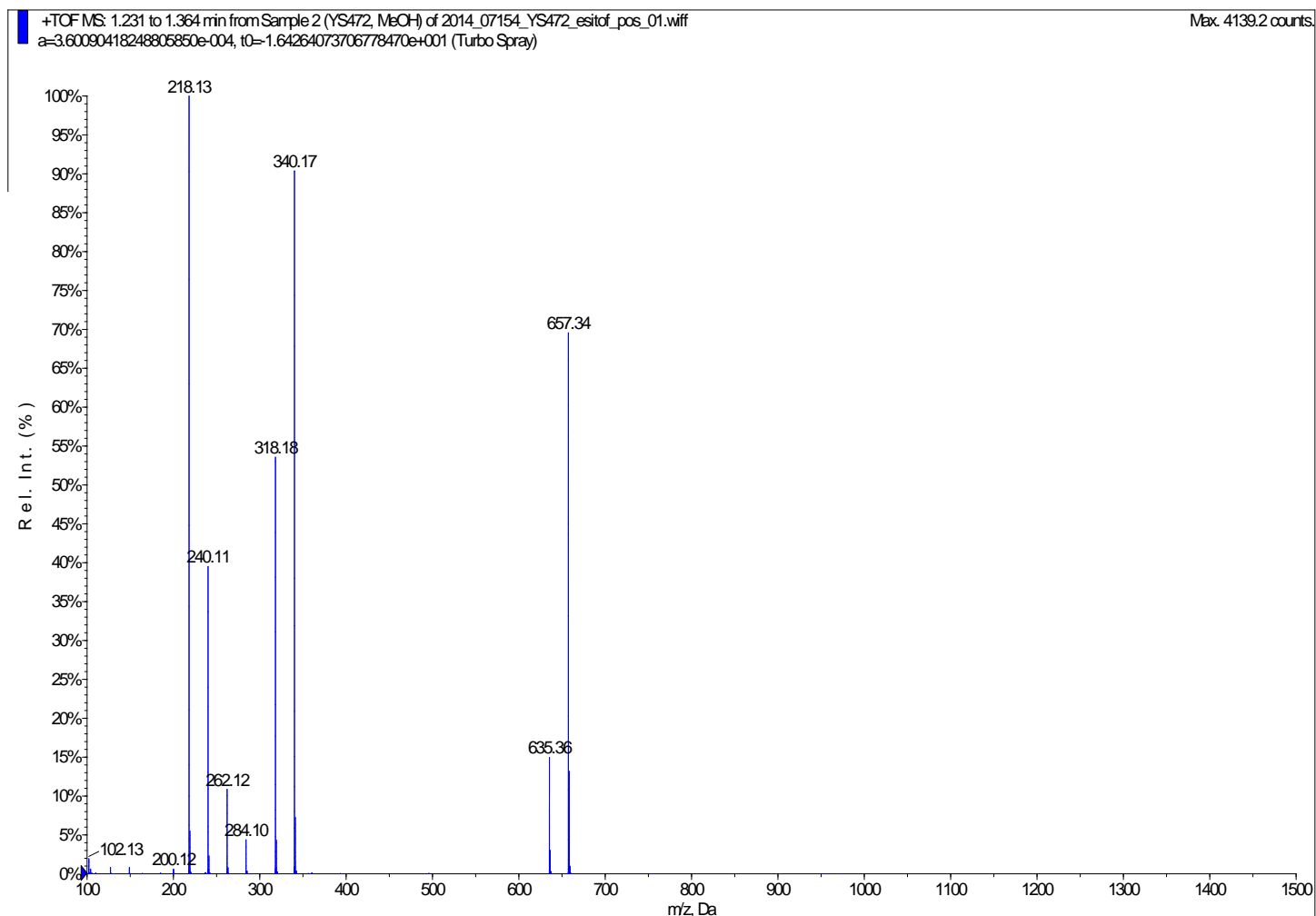


Figura 21: Espectro de masas ESI positivo de baja resolución de 4

## PARTE EXPERIMENTAL

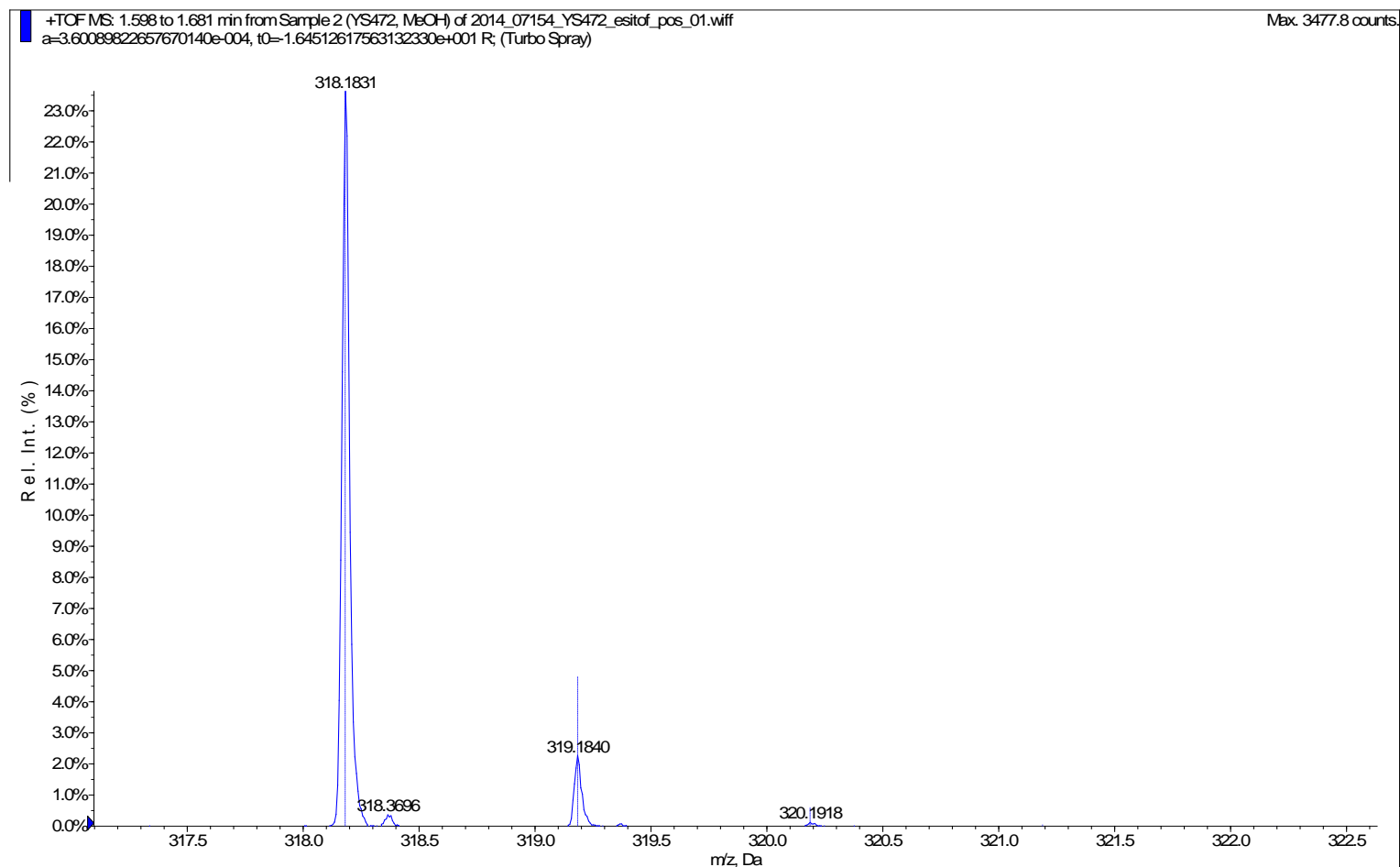


Figura 22: Espectro de masas ESI positivo de alta resolución de 4

## PARTE EXPERIMENTAL

### 4.2.3 Síntesis del Fragmento A: Ditriflato de N,N'-(2-(1H-imidazol-5-il)etil)-O-bencilhidroxilamonio



200 mg del compuesto **4** (0,63 mmol; 1eq.) se disuelven en 5 ml de DCM seco. Sobre la disolución anterior enfriada a 0°C se gotea 1 ml de TFA. La mezcla resultante se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 90 minutos, tras los que se comprueba mediante cromatografía en capa fina que la reacción ha finalizado. Se evapora el disolvente a presión reducida y se obtiene un aceite marrón que se corresponde con el producto esperado (364 mg; 100%) en forma de la sal de amonio.

Rendimiento global: 26%

Rf (DCM:MeOH 9:1)= 0,69

RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$  ppm: 8.64 (d,  $J = 1.4$  Hz, 1H), 7.26 (q,  $J = 2.2$  Hz, 6H), 4.87 (s, 2H), 3.45 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 3.09 – 3.01 (m, 2H).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{C}}$  ppm: 134.24 (C- Ph), 133.62 (2 x CH- Ph), 130.05 (C), 128.86 (2 x CH-Ph), 128.77 (CH), 128.34 (CH-Ph), 116.68 (CH), 75.85 (O- $\text{CH}_2$ ), 48.48 (N- $\text{CH}_2$ ), 20.10 ( $\text{CH}_2$ )

(+)-LR-ESIMS  $m/z$ , (%)  $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}^+$ : 218.13

(+)-HR-ESIMS  $m/z$ , (%)  $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}^+$ : encontrado: 218.1302; calculado: 218.1287

## PARTE EXPERIMENTAL

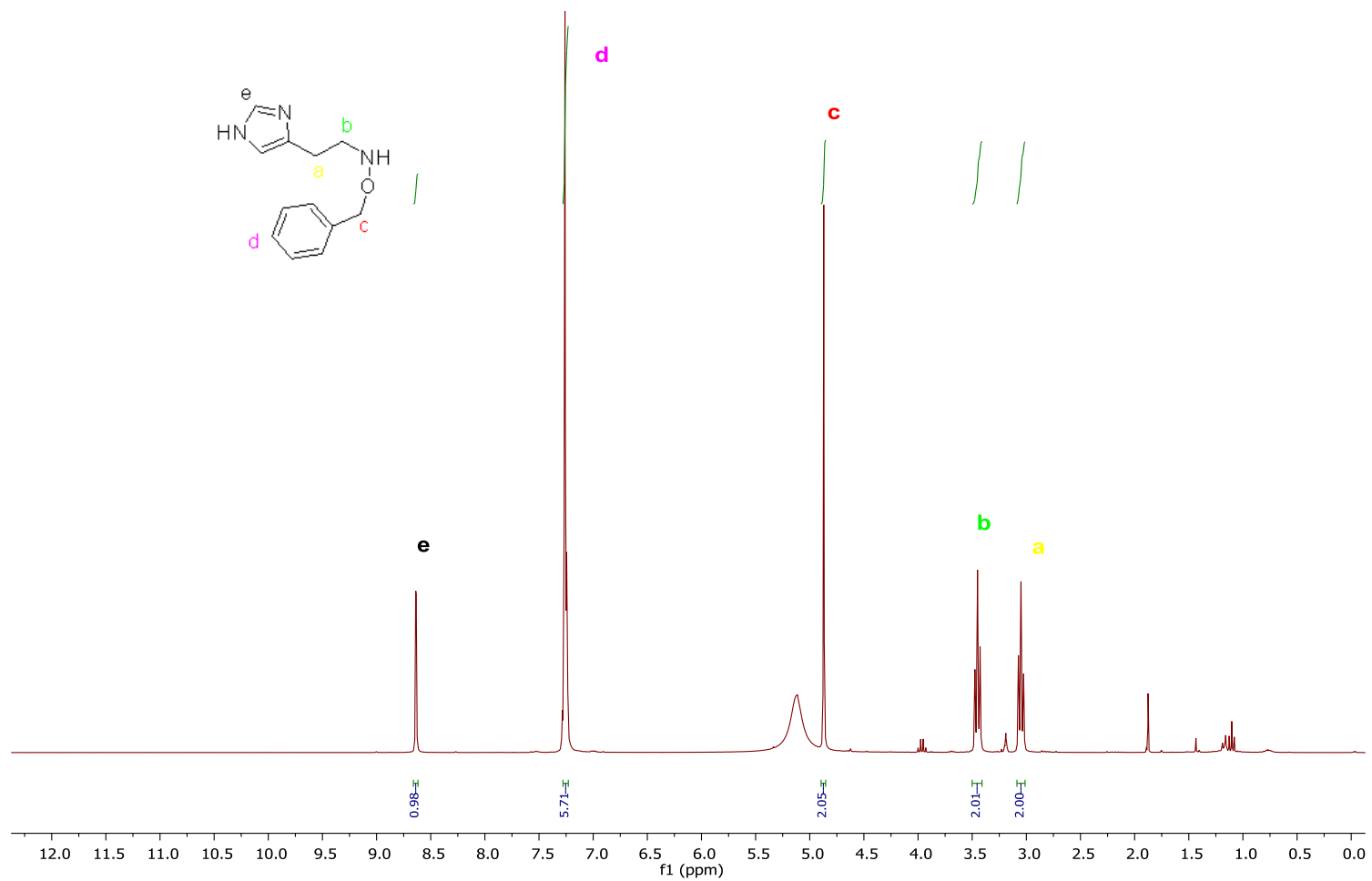


Figura 23: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del fragmento A

## PARTE EXPERIMENTAL

---

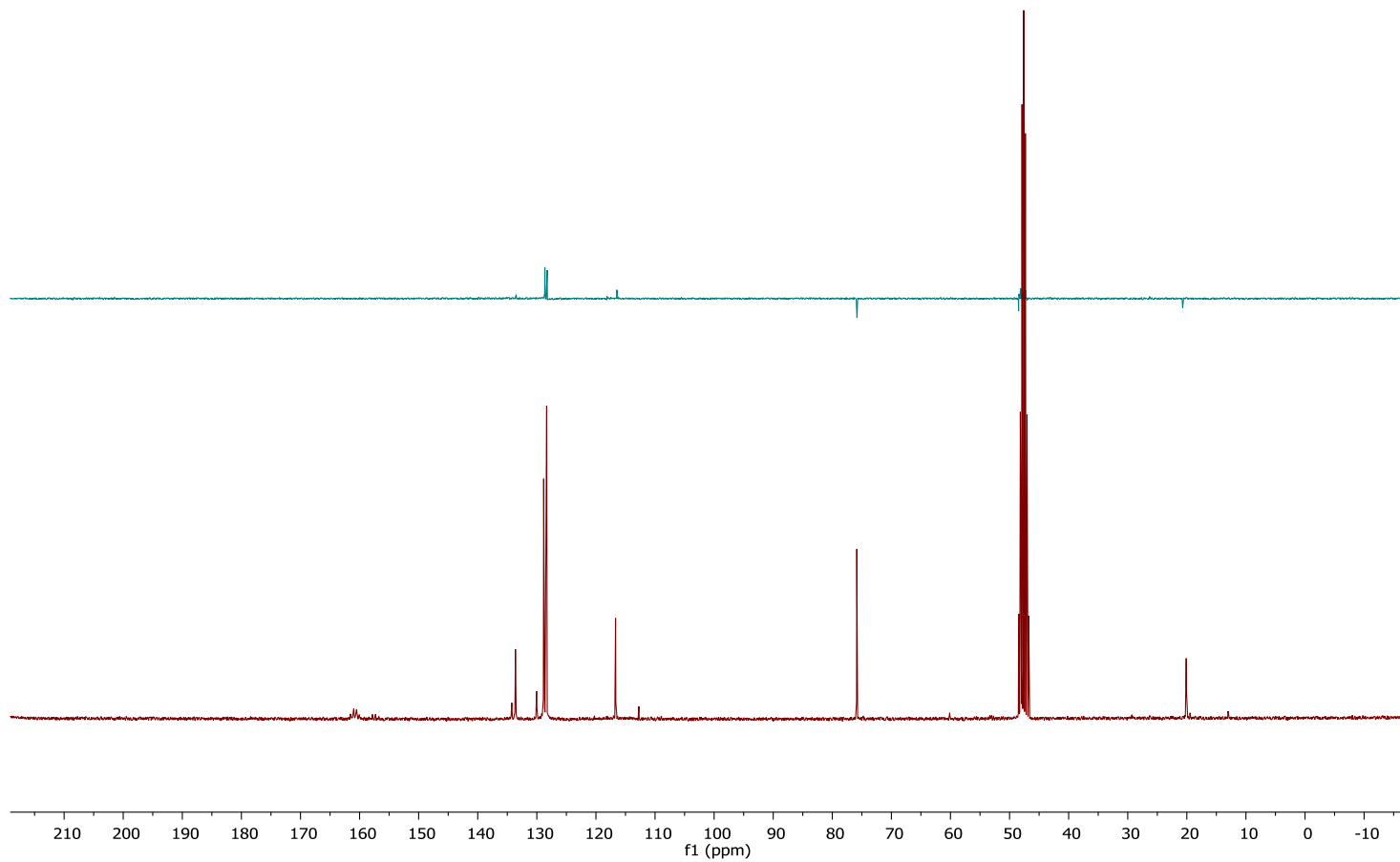


Figura 24: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del fragmento A

## PARTE EXPERIMENTAL

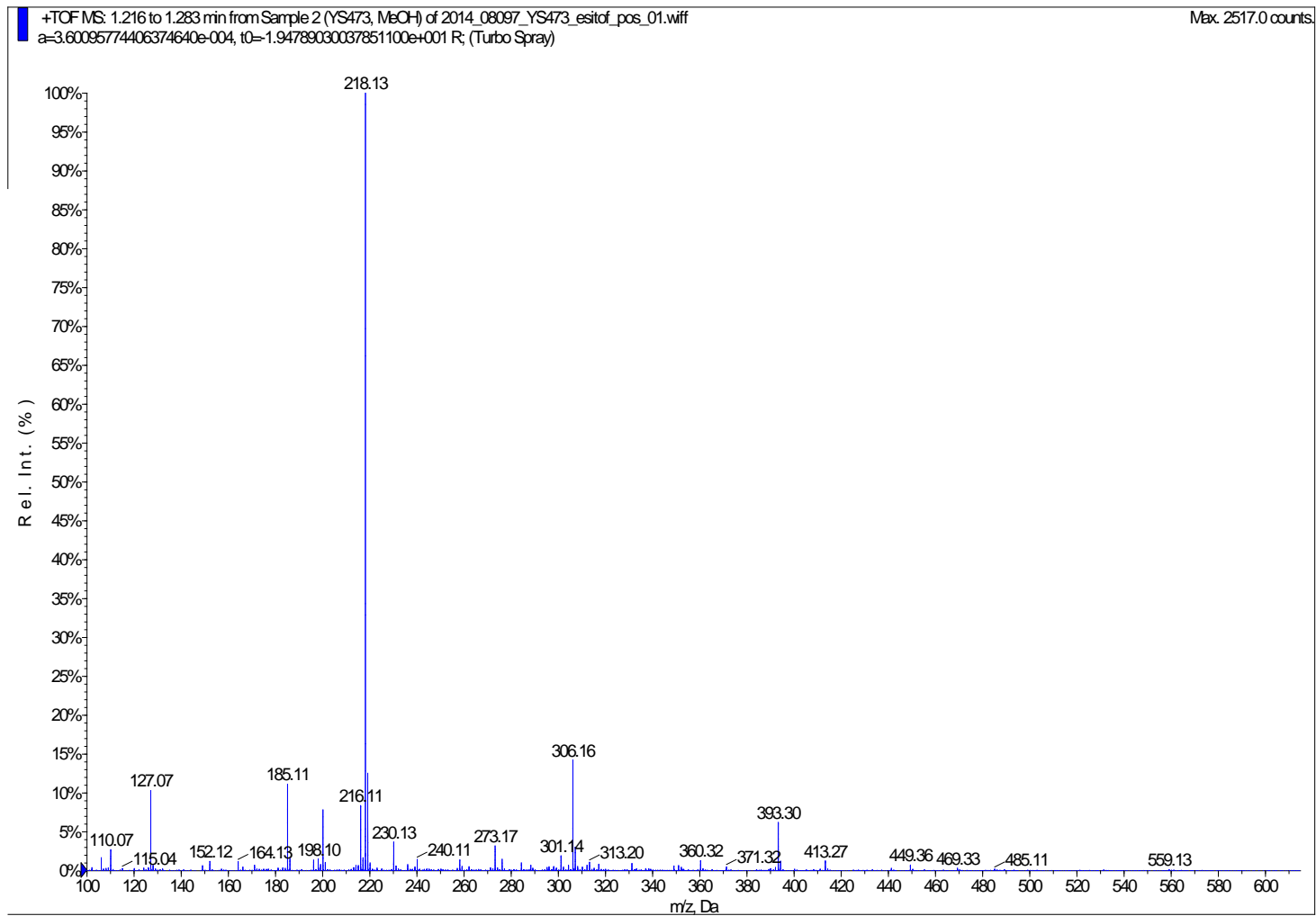


Figura 25: Espectro de masas ESI positivo de baja resolución del fragmento A



## PARTE EXPERIMENTAL

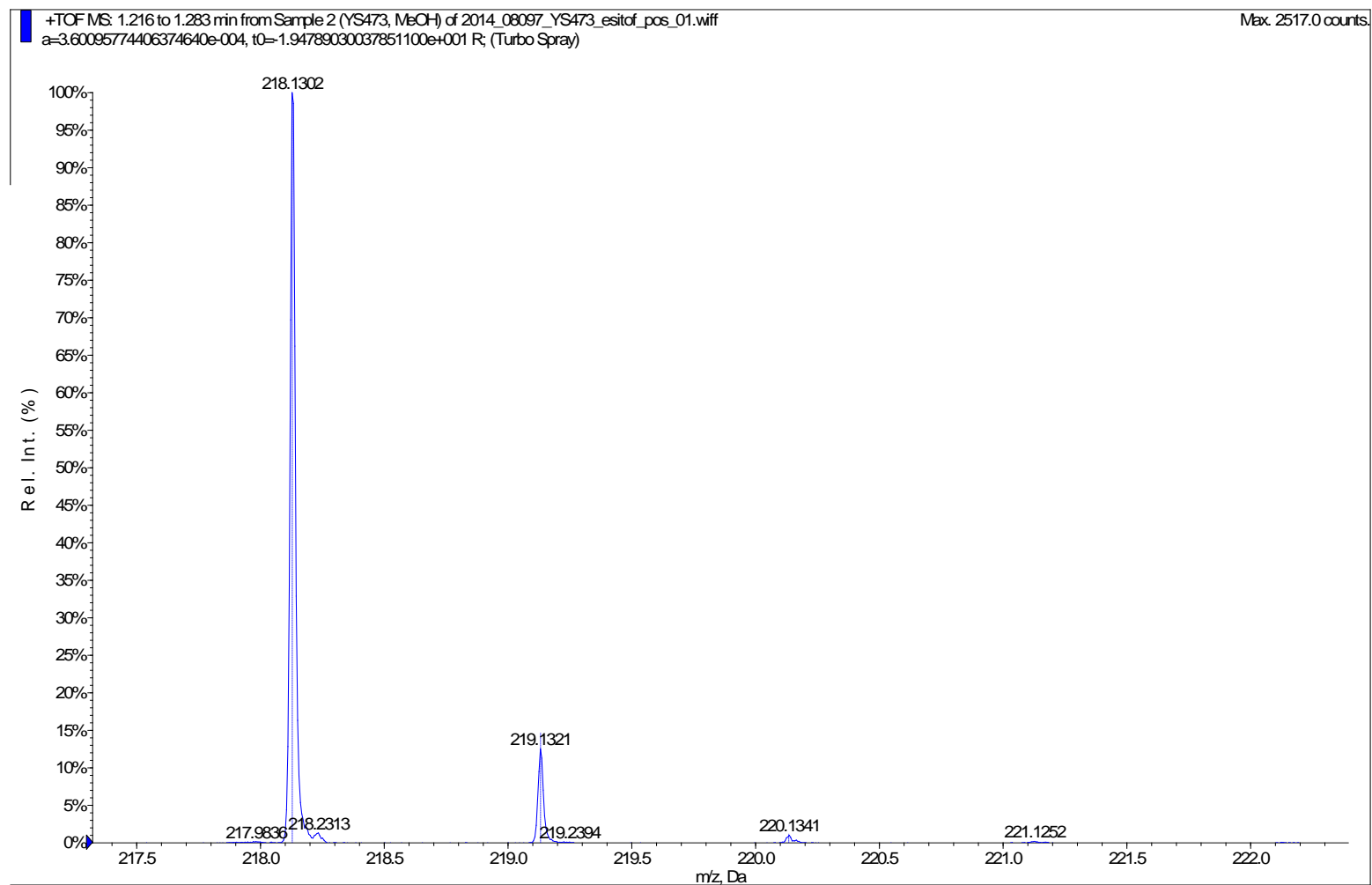
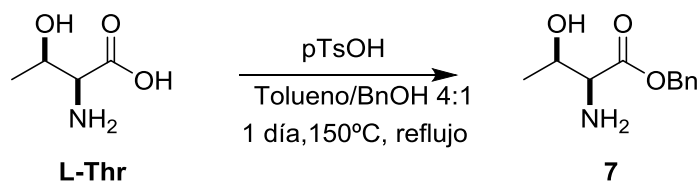


Figura 26: Espectro de masas ESI positivo de alta resolución del fragmento A

### 4.3 Preparación del Intermedio sintético 3

#### 4.3.1 Síntesis del compuesto 7: (2*S*,3*R*)-2-aminohidroxi butanoato de bencilo



A una suspensión de 500 mg de *L*-treonina (4,19 mmol; 1eq.) en 10 ml de una mezcla de alcohol bencílico y tolueno 1:4 se le añaden 950 mg de pTsOH (5,03 mmol; 1,2 eq.) y la disolución resultante se deja reaccionar durante 24 horas con eliminación azeotrópica de agua. Se comprueba que transcurrido ese tiempo no hay restos de producto de partida mediante cromatografía en capa fina empleando una disolución de ninhidrina como revelante. Posteriormente se evapora el tolueno y el residuo se distribuye entre agua y AcOEt. La fase acuosa se lava dos veces con AcOEt y se reserva. Las dos fracciones orgánicas resultantes de los lavados de la fase acuosa se extraen cuatro veces con agua. Las fases acuosas reunidas se basifican hasta pH=10 con KOH y se extraen con AcOEt tres veces. Se evapora a presión reducida el disolvente y se obtienen 225 mg del compuesto **7** (29%) como aceite amarillo.

**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  ppm:** 7.38 – 7.34 (m, 5H), 5.19 (s, 2H), 3.92 (qd,  $J = 6.3, 5.3$  Hz, 1H), 3.34 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H), 1.22 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$  ppm:** 173.67 (C=O), 135.31 (C), 128.65 (2 x CH-Ph), 128.51 (2 x CH-Ph), 128.35 (CH-Ph), 68.18 (HO-CH), 67.08 ( $\text{CH}_2$ ), 59.92 (HN-CH), 19.77 ( $\text{CH}_3$ ).

**(+)-LR-ESIMS  $m/z$ , (%)  $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{NO}_3^+$ :** 210.11

**(+)-HR-ESIMS  $m/z$ , (%)  $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{NO}_3^+$ :** encontrado: 210.1129; calculado: 210.1124

## PARTE EXPERIMENTAL

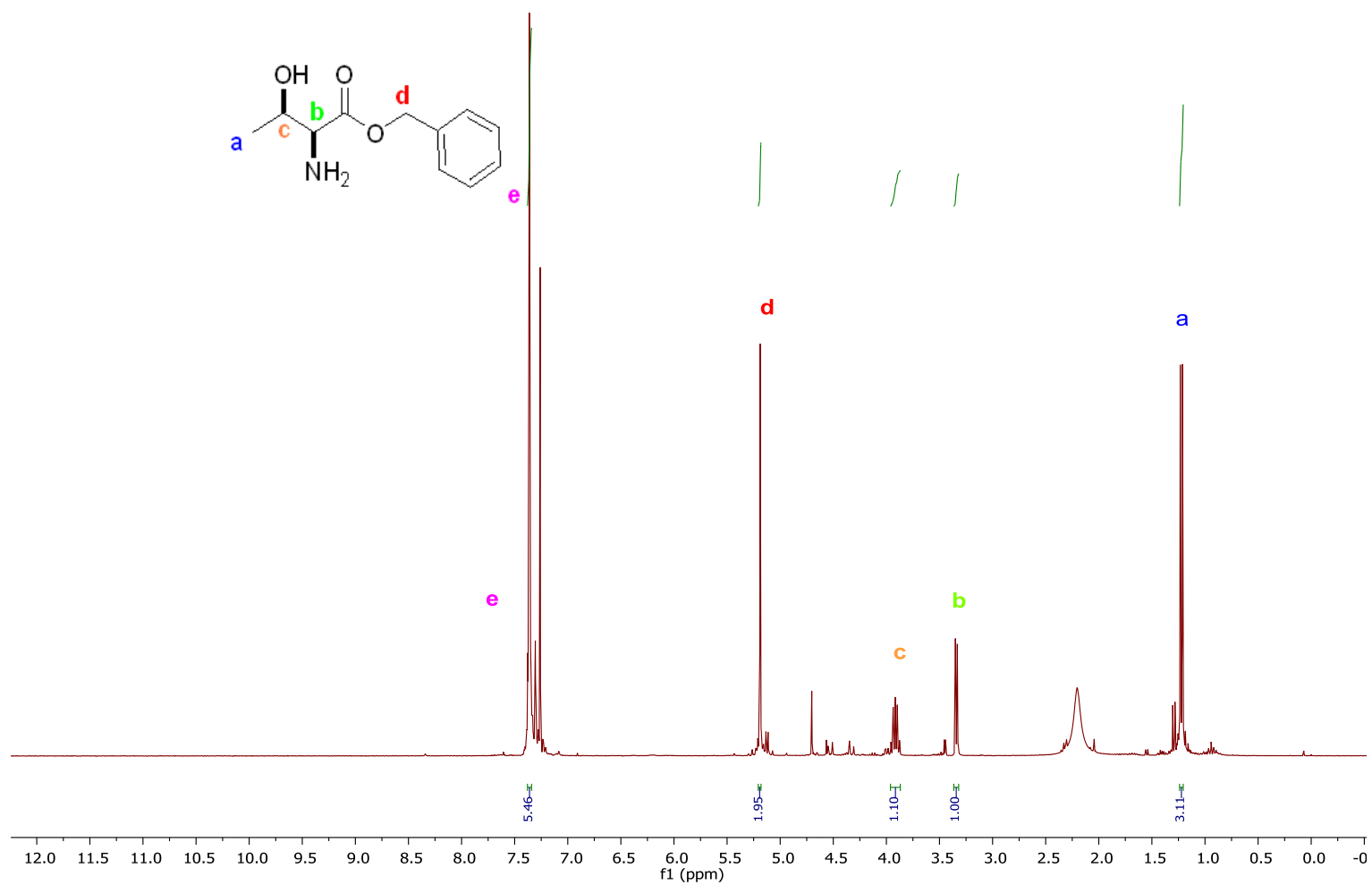


Figura 27: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de 7

## PARTE EXPERIMENTAL

---

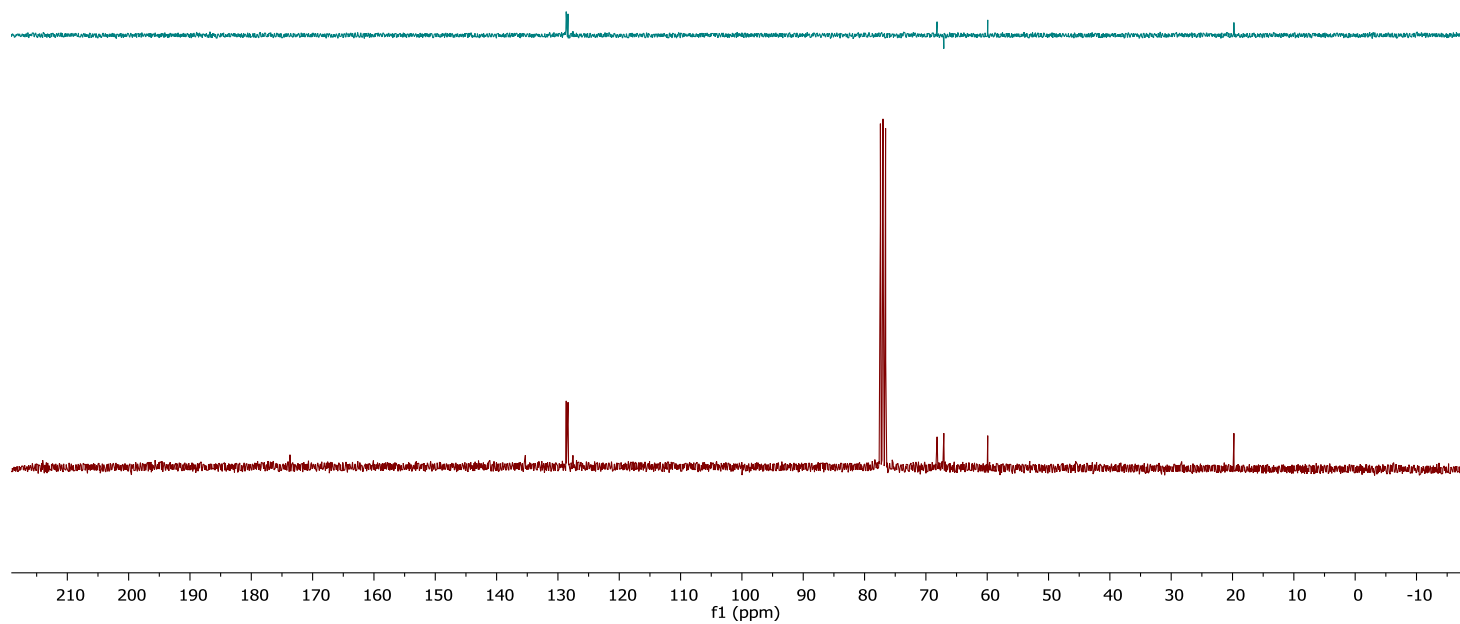


Figura 28: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de 7

## PARTE EXPERIMENTAL

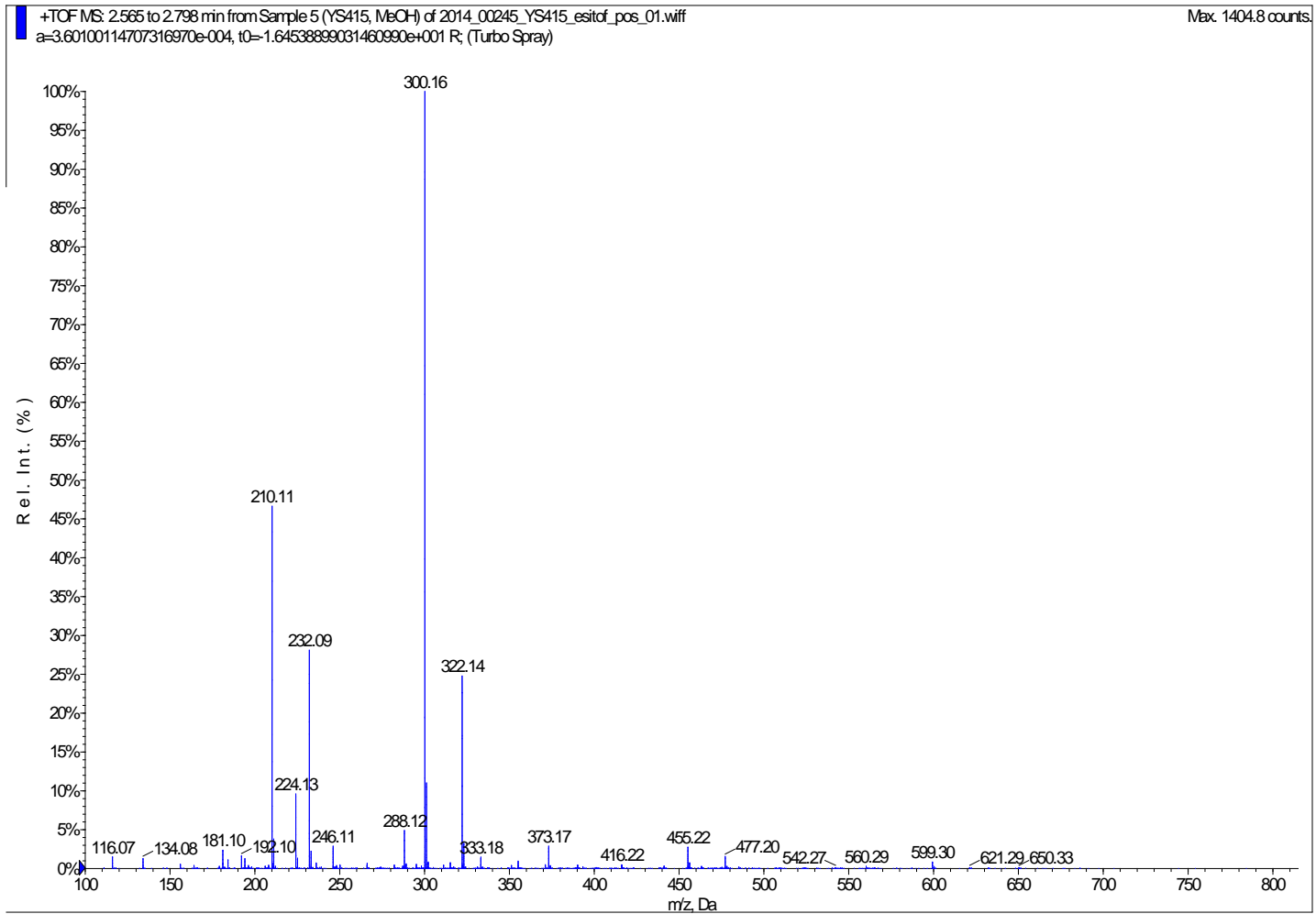


Figura 29: Espectro de masas ESI de baja resolución del compuesto 7

## PARTE EXPERIMENTAL

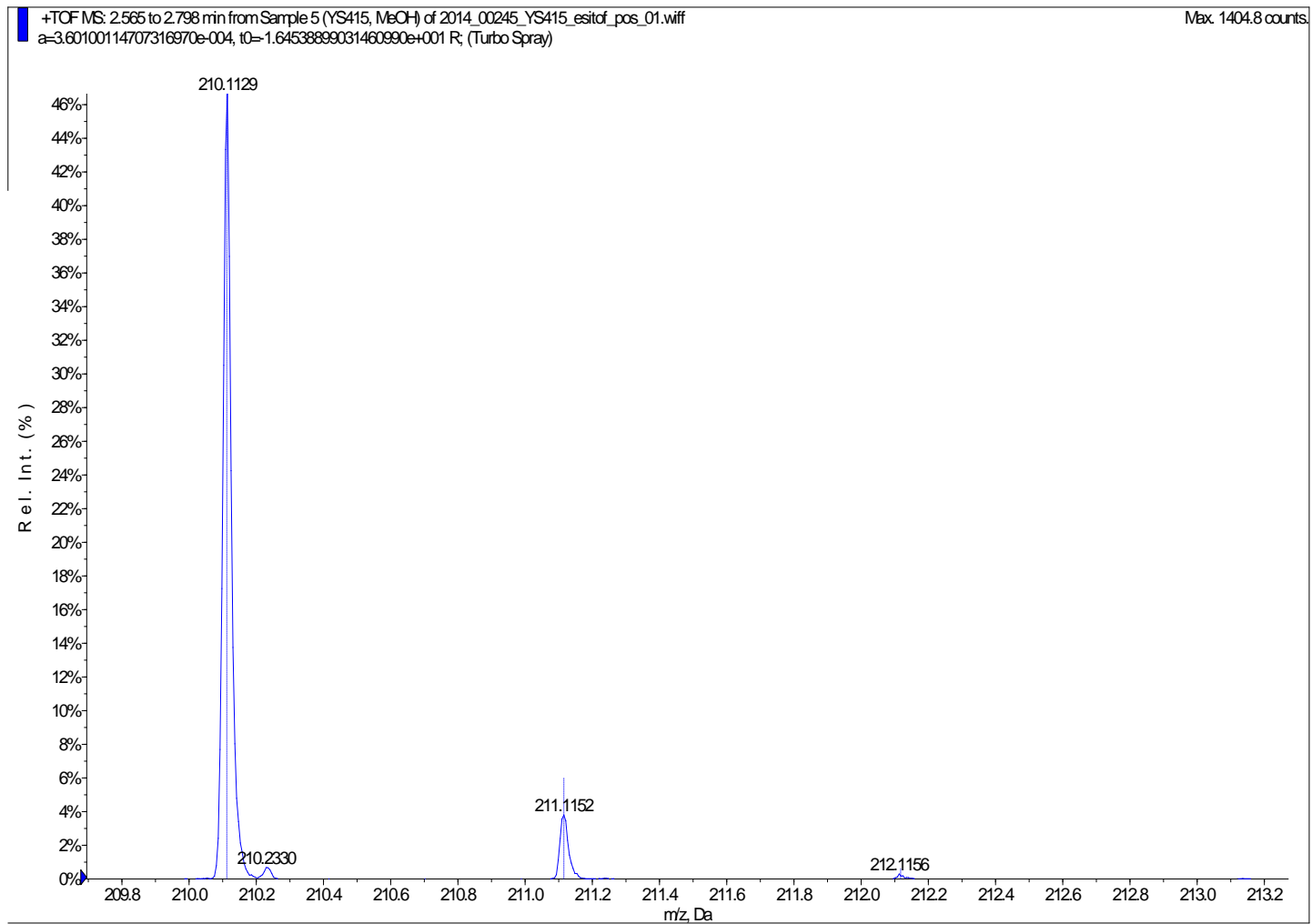
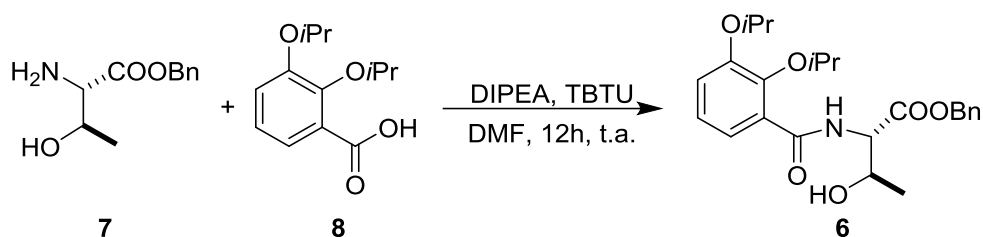


Figura 30: Espectro de masas ESI de alta resolución de 7

4.3.2 Síntesis del compuesto 6: (2,3-diisopropoxibenzoil)-L-treoninato de bencilo



Sobre una disolución del ácido **8** (407 mg; 1,71 mmol; 1,1 eq.) y el aminoalcohol **7** (325 mg; 1,55 mmol; 1 eq.) en 7,75 ml de DMF se añaden 548 mg del agente acoplante TBTU (1,71 mmol; 1,1 eq.) y se gotean 0,4 ml de DIPEA. La mezcla resultante se deja agitando toda la noche a temperatura ambiente. Después de comprobar que la reacción ha terminado, se diluye la mezcla de reacción con AcOEt y se lava sucesivamente con disolución saturada acuosa de NaHCO<sub>3</sub>, agua, ácido cítrico 0,1 M, agua y disolución saturada acuosa de NaCl. La fase orgánica se seca con MgSO<sub>4</sub> y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo se purifica mediante cromatografía en columna empleando una mezcla de hexano:AcOEt 2:1 como eluyente. Para el revelado de las capas finas se utiliza hexano:AcOEt 3:1. Los compuestos que presentaron la misma composición por capa fina fueron reunidos y el disolvente se eliminó a presión reducida. Se obtuvieron 225,70 mg (47%) de producto como aceite amarillo.

Rf (AcOEt:Hexano 1:3)= 0,46

RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> ppm: 8.94 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.73 (dd, J = 7.5, 2.1 Hz, 1H), 7.38 – 7.31 (m, 5H), 7.09 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.06 – 7.04 (m, 1H), 5.23 (s, 2H), 4.90 – 4.83 (m, 2H), 4.55 (p, J = 6.1 Hz, 1H), 4.40 (qd, J = 6.4, 2.8 Hz, 1H), 1.39 – 1.34 (m, 11H), 1.27 – 1.22 (m, 7H).

RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub> ppm: 170.95 (-O-C=O), 166.31(N-C=O), 150.77 (C-Ph), 128.57 (C-Ph), 128.37 (2x CH-Ph), 128.28 (2 x CH-Ph), 127.32 (C-Ph), 123.40 (CH-Ph), 123.30 (2 x CH-Ph), 119.28 (CH-Ph), 76.03 (CH-O), 71.34(CH-O), 68.53 (CH-O), 67.16 (CH<sub>2</sub>-O), 58.09 (NH-CH), 22.15 (CH<sub>3</sub>), 22.06 (CH<sub>3</sub>), 21.50 (CH<sub>3</sub>), 20.14 (2 x CH<sub>3</sub>).

(+)-LR-ESIMS m/z, (%) C<sub>24</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>6</sub>Na<sup>+</sup>: 452.21

(+)-HR-ESIMS m/z, (%) C<sub>24</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>6</sub>Na<sup>+</sup>: encontrado: 452.2041; calculado: 452.2043

## PARTE EXPERIMENTAL

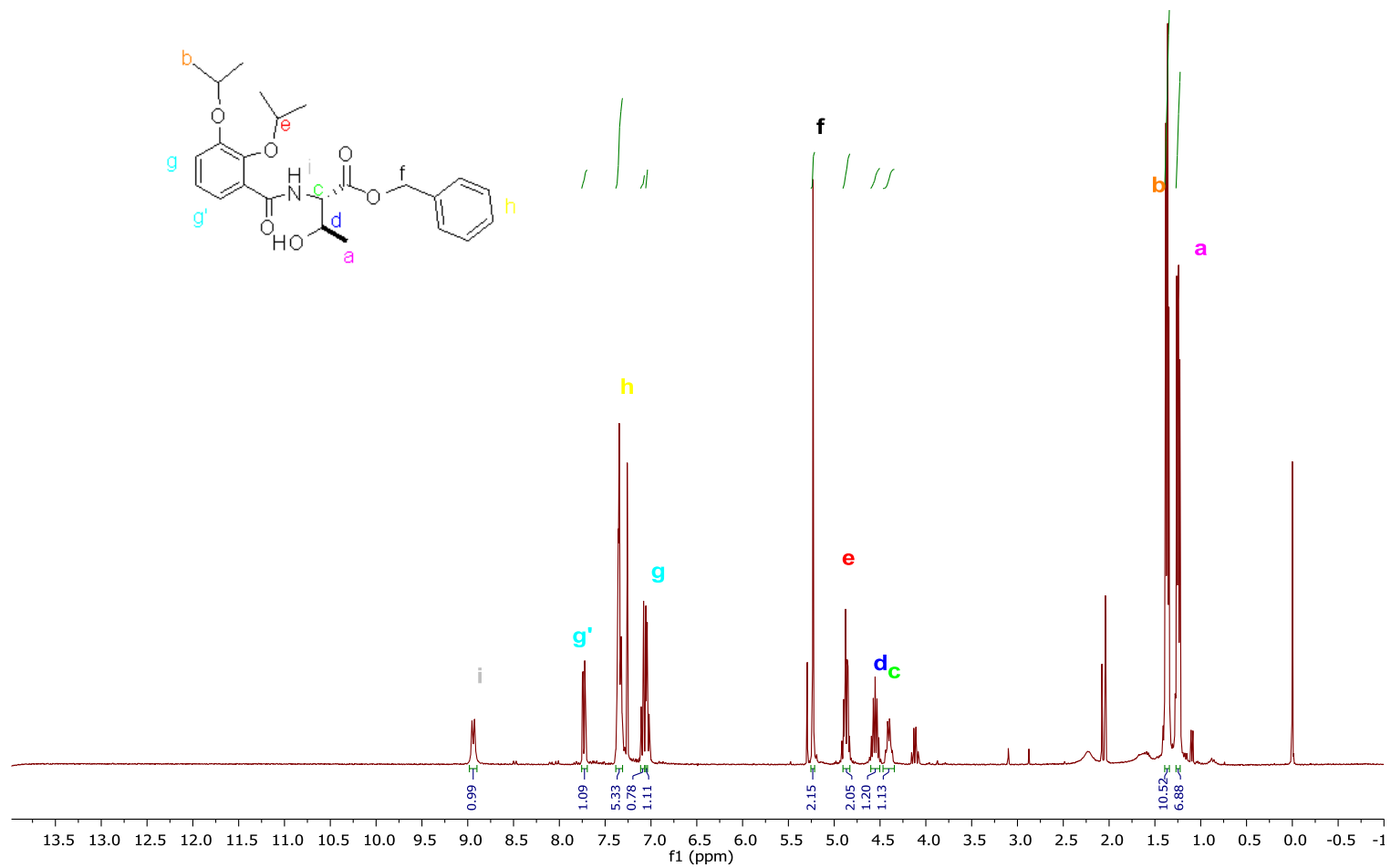


Figura 31: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de 6



## PARTE EXPERIMENTAL

---

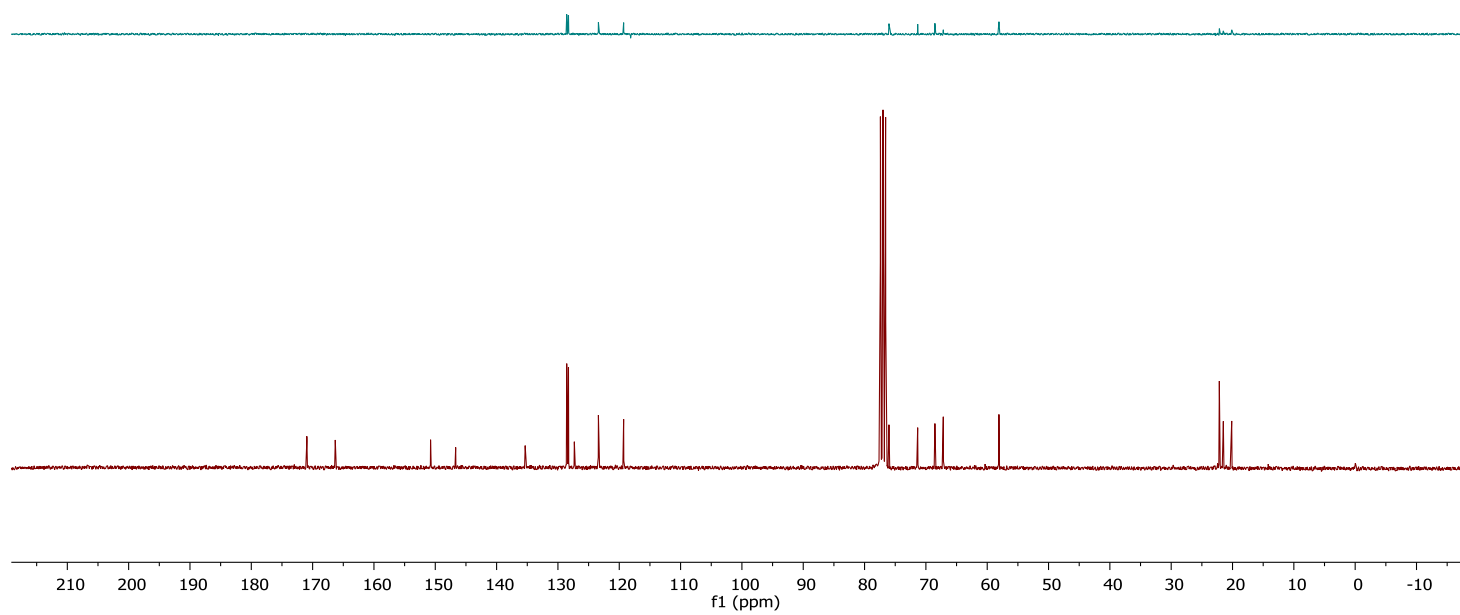


Figura 32: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de 6

## PARTE EXPERIMENTAL

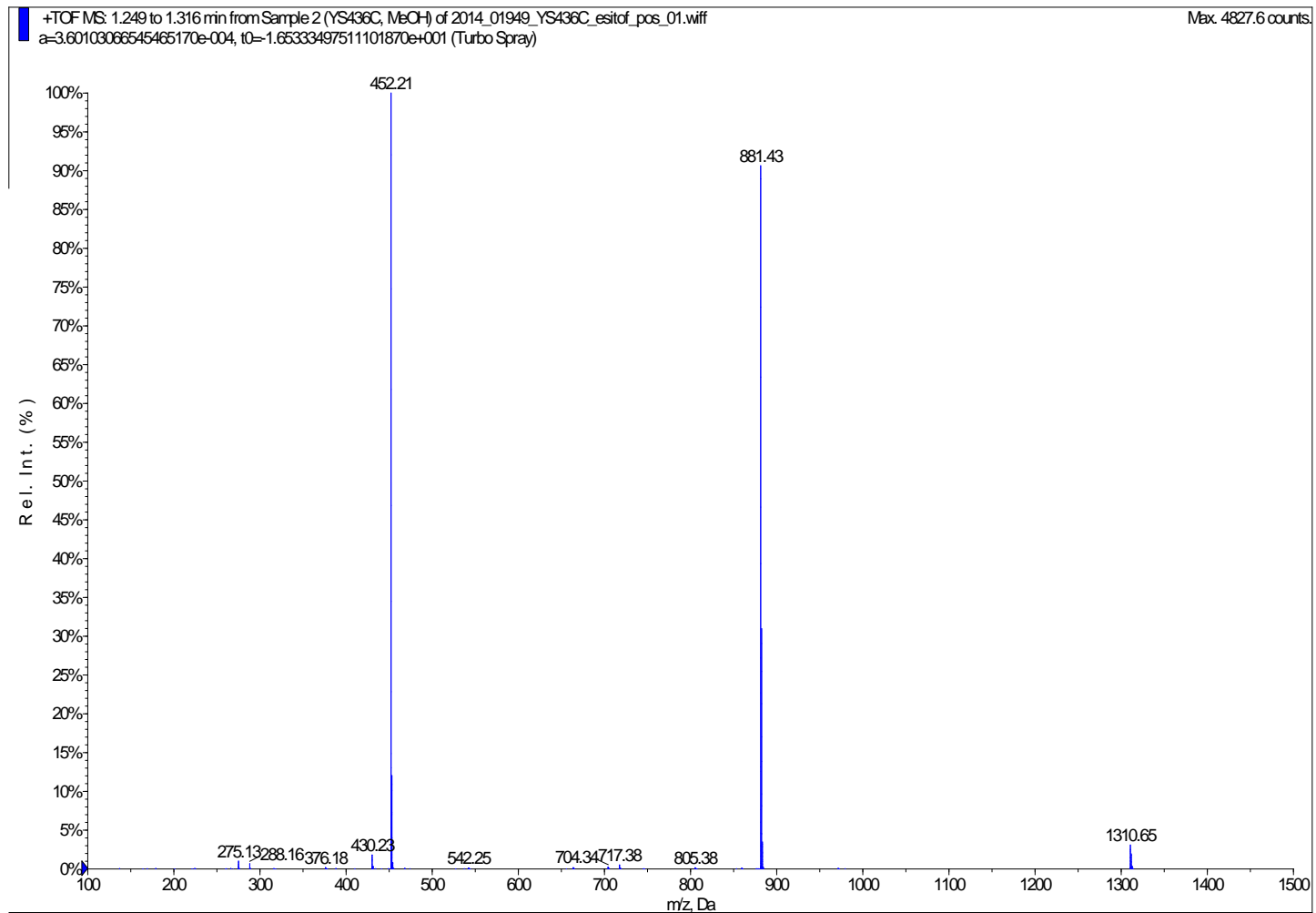


Figura 33: Espectro de masas ESI positivo de baja resolución de 6

## PARTE EXPERIMENTAL

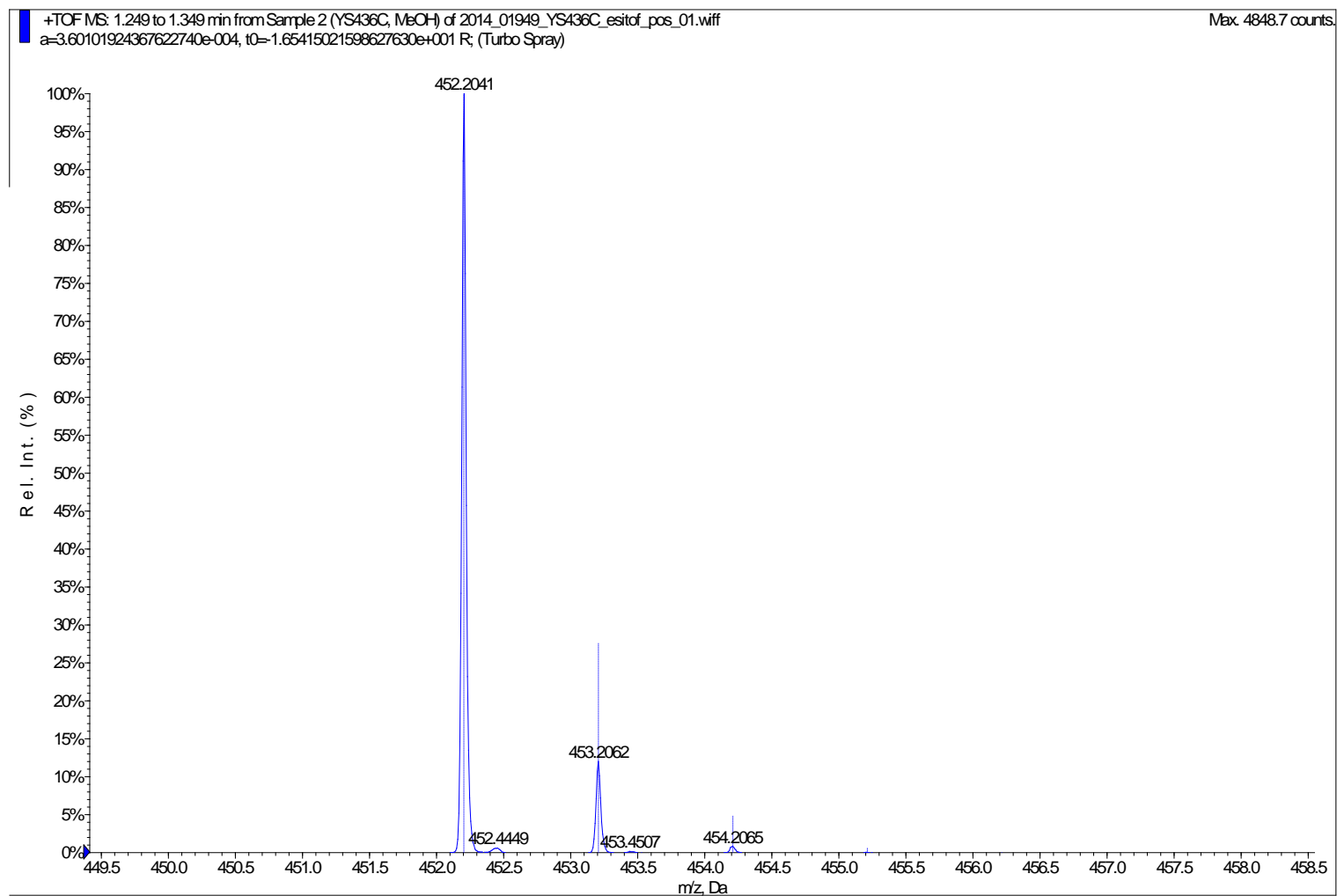
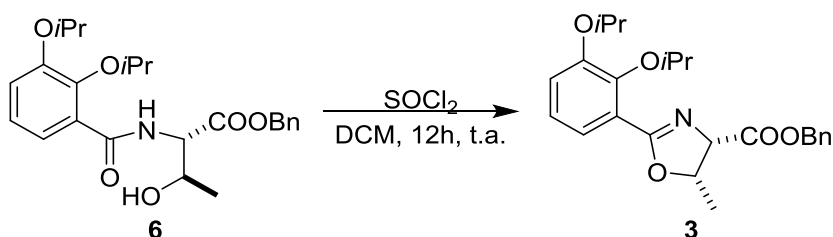


Figura 34: Espectro de masas ESI positivo de alta resolución de 6

## PARTE EXPERIMENTAL

### 4.3.3 Síntesis del compuesto 3: (4S,5S)-2-(2,3-diisopropoxifenil)-5-metil-4,5-dihidrooxazol-4-carboxilato de bencilo



A una disolución del compuesto **6** (380 mg; 0,892 mmol; 1 eq.) en 9 ml de DCM enfriada a 0°C se le añade gota a gota 0,4 ml de  $\text{SOCl}_2$  (5,35 mmol; 6 eq.). La disolución adquiere un color naranja y se deja agitando toda la noche a temperatura ambiente.

Tras comprobar mediante capa fina que la reacción ha terminado se diluye con AcOEt y enfriada a 0°C se comienza a añadir una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  gota a gota hasta que no se observa burbujeo.

Se separan las fases y la fase acuosa se extrae con AcOEt tres veces. Las fases orgánicas obtenidas se secan con  $\text{MgSO}_4$  y se concentran a presión reducida.

Para la purificación del producto se utiliza cromatografía en columna en gel de sílice empleando una mezcla de hexano:AcOEt 3:1 como eluyente. El revelado de las capas finas se realiza con hexano:AcOEt 3:1. Se obtuvieron 320 mg (87%) del producto **3** en forma de cristales amarillos.

El rendimiento global de la síntesis del compuesto **3** a partir de *L*-treonina es de 7,6%.

**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  ppm:** 7.43 – 7.23 (m, 6H), 7.05 – 6.92 (m, 2H), 5.31 – 5.12 (m, 2H), 5.10 – 4.91 (m, 1H), 4.52 (dp,  $J = 8.7, 6.1$  Hz, 2H), 1.41 – 1.17 (m, 16H).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$  ppm:** 169.77 (C=O), 166.23 (C=N), 151.73 (C-Ph), 148.22 (2 x C-Ph), 135.36 (C-Ph), 128.70 (3 x CH-Ph), 128.54 (CH-Ph), 128.43 (CH-Ph), 123.49 (CH-Ph), 123.17 (CH-Ph), 120.19 (CH), 77.67 (O-CH), 75.88 (O-CH), 71.73 (O-CH), 71.52 (N-CH), 66.85 (O- $\text{CH}_2$ ), 22.13 (4 x  $\text{CH}_3$ ), 16.16 ( $\text{CH}_3$ ).

**(+)-LR-ESIMS  $m/z$ , (%)  $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{NO}_5^+$ :** 412.21

**(+)-HR-ESIMS  $m/z$ , (%)  $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{NO}_5^+$ :** encontrado: 412.2132; calculado: 412.2118

## PARTE EXPERIMENTAL

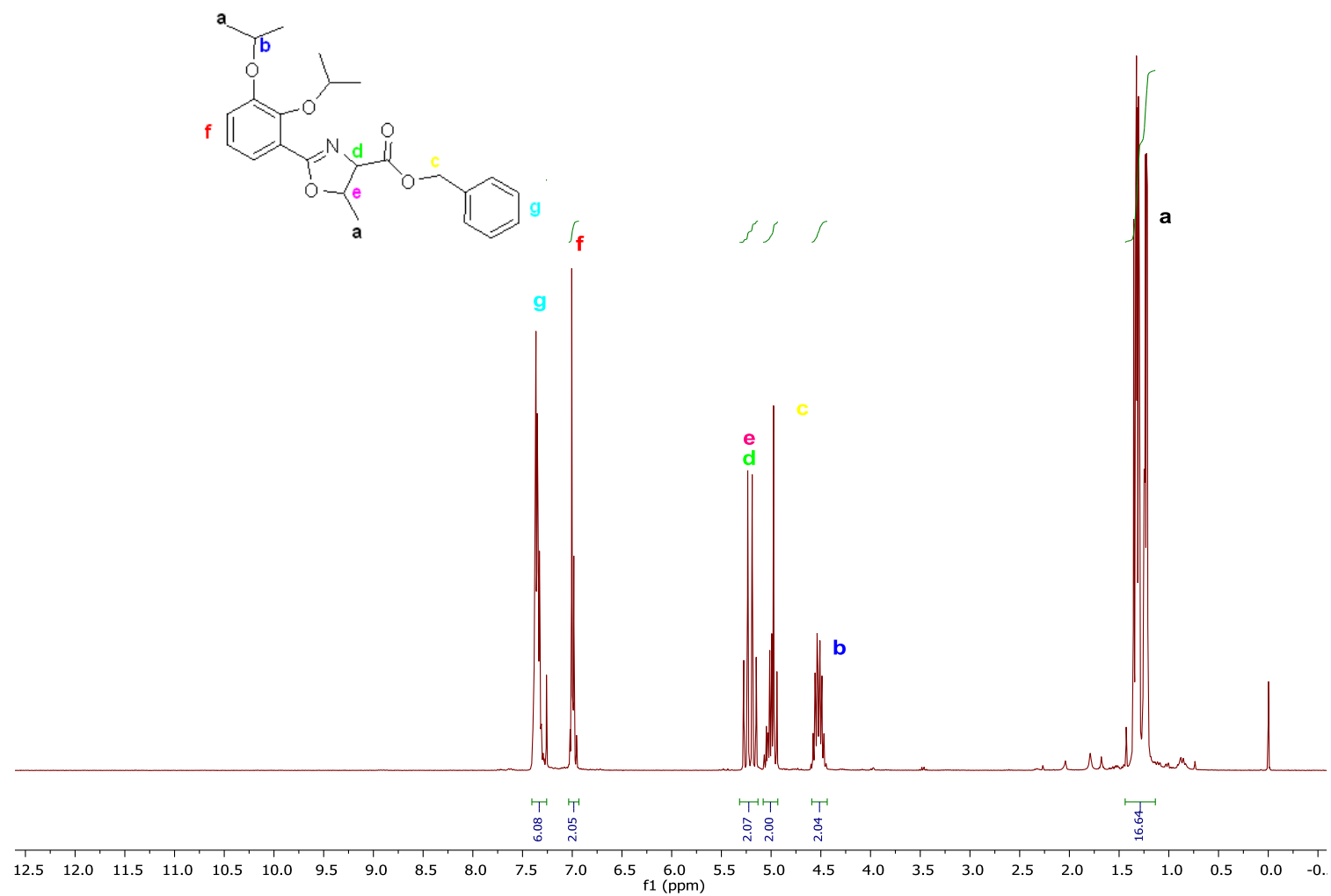


Figura 35: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto 3

## PARTE EXPERIMENTAL

---

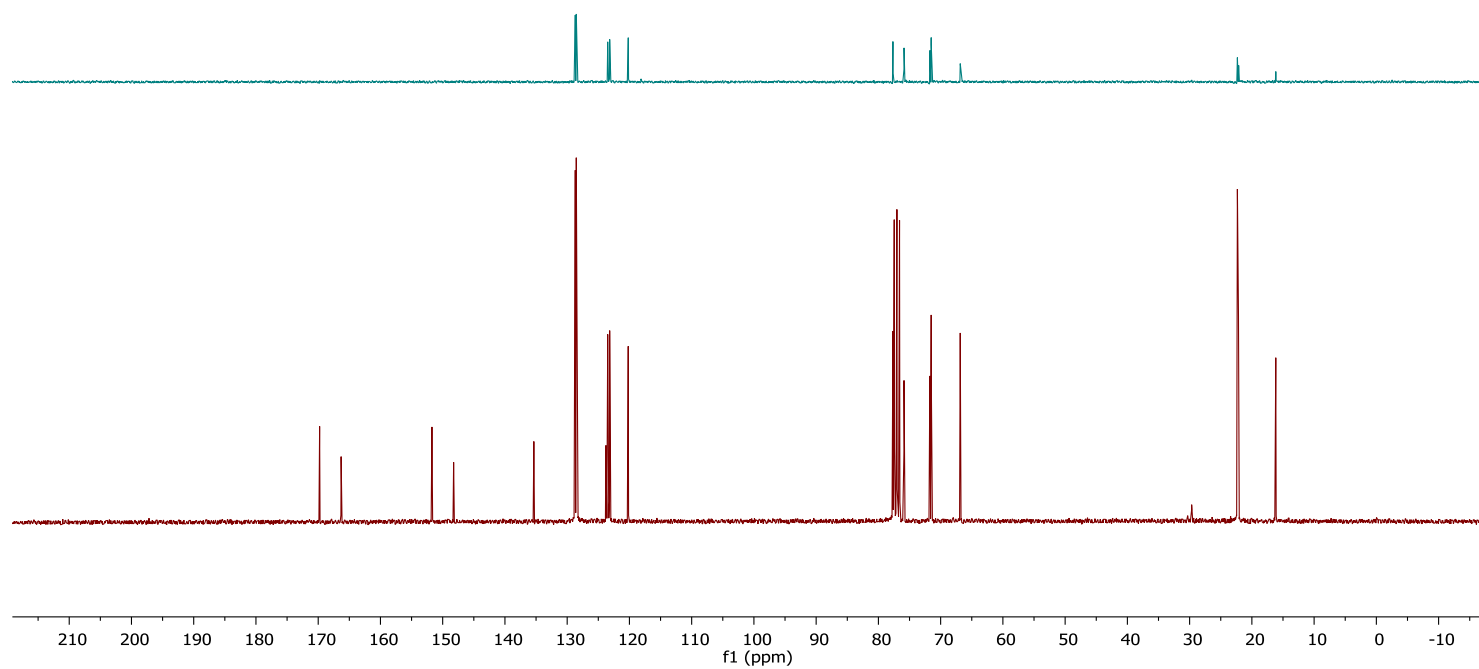


Figura 36: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de 3

## PARTE EXPERIMENTAL

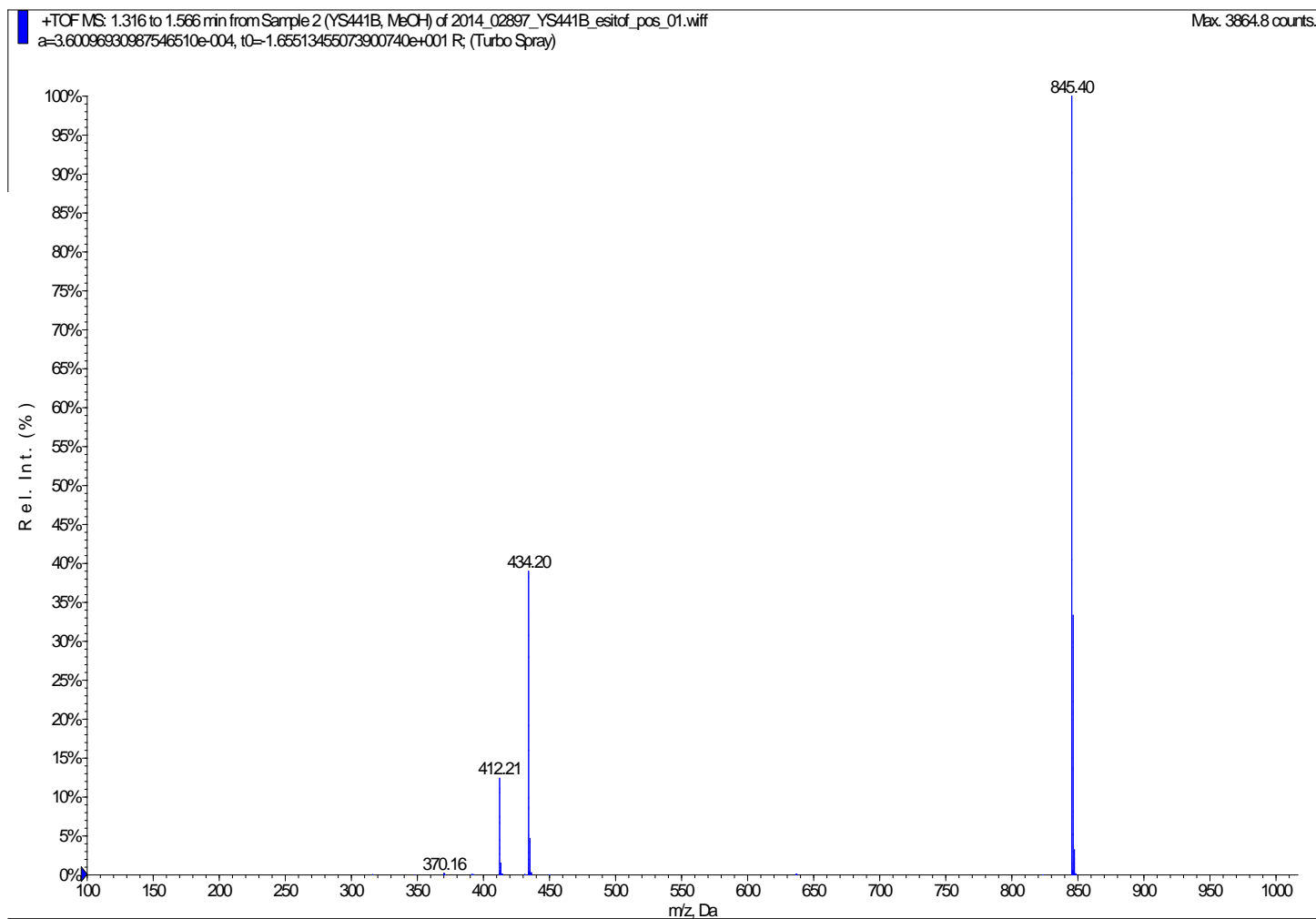


Figura 37: Espectro de masas ESI positivo de baja resolución de 3

## PARTE EXPERIMENTAL

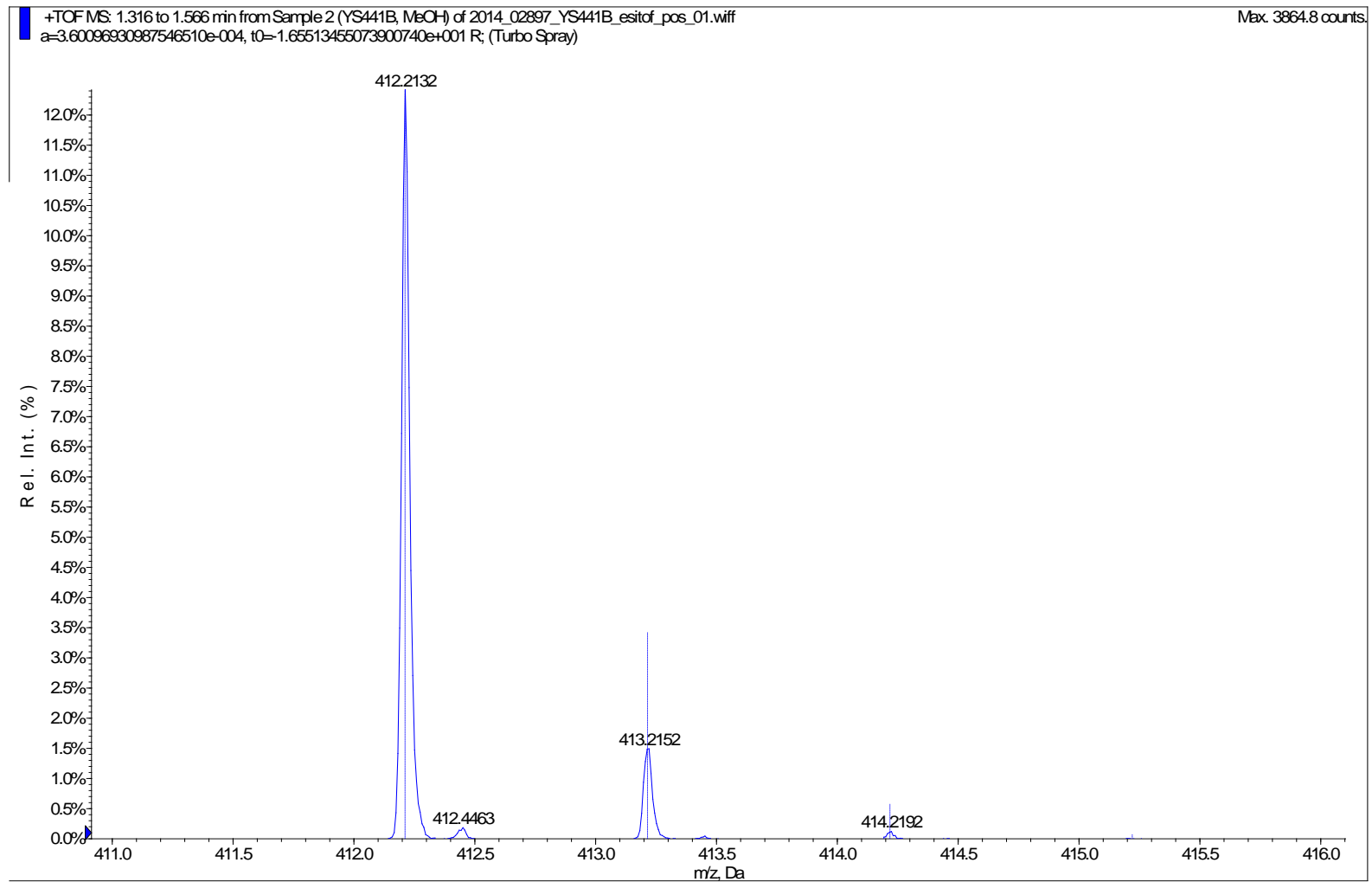


Figura 38: espectro de masas ESI positivo de alta resolución de 3



# **5. CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

---

Durante la realización de este Trabajo de Fin de Grado se han desarrollado distintas secuencias sintéticas con el fin de obtener dos intermedios sintéticos clave en la preparación del sideróforo acinetobactina.

En base a los objetivos propuestos en este Trabajo de Fin de Grado se han cumplido los siguientes:

- Obtención del Fragmento **A** de forma satisfactoria a partir de histamina comercial.
- Obtención del intermedio **3** mediante una ruta sintética convergente.
- Correcta caracterización de todos los productos obtenidos en la síntesis de cada uno de los compuestos buscados, intermedio **3** y fragmento **A**.

La satisfactoria obtención de los intermedios buscados ha permitido su utilización en la síntesis total del sideróforo acinetobactina en la búsqueda de posibles vacunas contra la forunculosis, causada por la bacteria patógena de peces *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. Asimismo, la metodología llevada a cabo podría resultar de utilidad para la futura obtención del sideróforo acinetobactina, así como para la preparación de parientes estructurales o análogos del sideróforo con posible actividad terapéutica.

Además, por la autora de esta memoria se han adquirido diversas competencias durante el desarrollo del presente Trabajo de Fin de Grado:

- Aprendizaje de técnicas avanzadas de síntesis orgánica.
- Manejo de los programas de elucidación estructural y capacidad de interpretación de los espectros de resonancia magnética nuclear y espectros de masas.
- Capacidad de realizar búsquedas bibliográficas y publicaciones científicas.
- Ampliación de los conocimientos acerca de la química de los productos naturales.
- Contacto directo con los proyectos en curso de un grupo de investigación

## CONCLUSIONES

---

In this “Trabajo Fin de Grado” various synthetic sequences were developed in order to obtain two key synthetic intermediates on the synthesis of siderophore acinetobactin.

About the goals proposed on this work, the following ones have been accomplished:

- Fragment **A** was successfully obtained from histamine.
- Intermediate **3** was prepared by a converging synthetic route.
- Spectroscopic characterization of all the intermediate products obtained on the synthesis of fragment **A** and intermediate **3**.

The successful synthesis of the goal intermediates has allowed its utilization in the total synthesis of siderophore acinetobactin in the research of new vaccines against furunculosis, caused by pathogenic bacterium fish *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. Additionally, the reported methodology would serve to synthesize other siderophores with similar structure to that of acinetobactin or analogs with possible therapeutic activity.

Moreover, the author of this work has been working on the development of some of the skills pointed out in order to obtain the corresponding Degree, for instance:

- Learning of advanced techniques of organic synthesis.
- Management of structural elucidation programs, and the interpretation skills of spectrums of magnetic nuclear resonance and mass spectrums.
- Capability to do bibliographic researches and scientific publications.
- Increased knowledge about natural products chemistry.
- Having direct contact with ongoing projects in a research group.

## CONCLUSIONES

---

Durante a realización do presente Traballo de Fin de Grao leváronse a cabo distintas secuencias sintéticas ca finalidade de obter dous intermedios sintéticos clave na preparación do sideróforo acinetobactina.

En base a os obxetivos propostos en este Traballo de Fin de Grao cumpríronse os seguintes:

- Obtención do fragmento **A** de forma satisfactoria a partir de histamina comercial.
- Obtención do intermedio **3** mediante unha ruta sintética converxente.
- Correcta caracterización de todos os produtos obtidos na sínteses de cada un dos compostos buscados, intermedio 3 e fragmento A.

A satisfactoria obtención dos intermedios buscados permitiu a súa utilización na síntesis total do sideróforo acinetobactina na búsqueda de posibles vacinas contra a forunculosis, causada pola bacteria patóxena de peixes *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. Ademais, a metodoloxía levada a cabo podería resultar de utilidade para a futura obtención do sideróforo, así como para a preparación de parentes estruturais ou análogos do sideróforo con posible actividade terapéutica.

Ademais, pola autora da presente memoria adquiríronse diversas competencias durante o desenvolvemento do presente Traballo de Fin de Grao:

- Aprendizaxe de técnicas avanzadas de sínteses orgánica.
- Manexo de programas de elucidación estrutural e capacidade de interpretación dos espectros de resonancia magnética nuclear e espectros de masas.
- Capacidade de realizar búsquedas bibliográficas e publicacións científicas.
- Ampliación dos coñecementos acerca da química dos produtos naturais.
- Contacto directo cos proxectos en curso dun grupo de investigación.