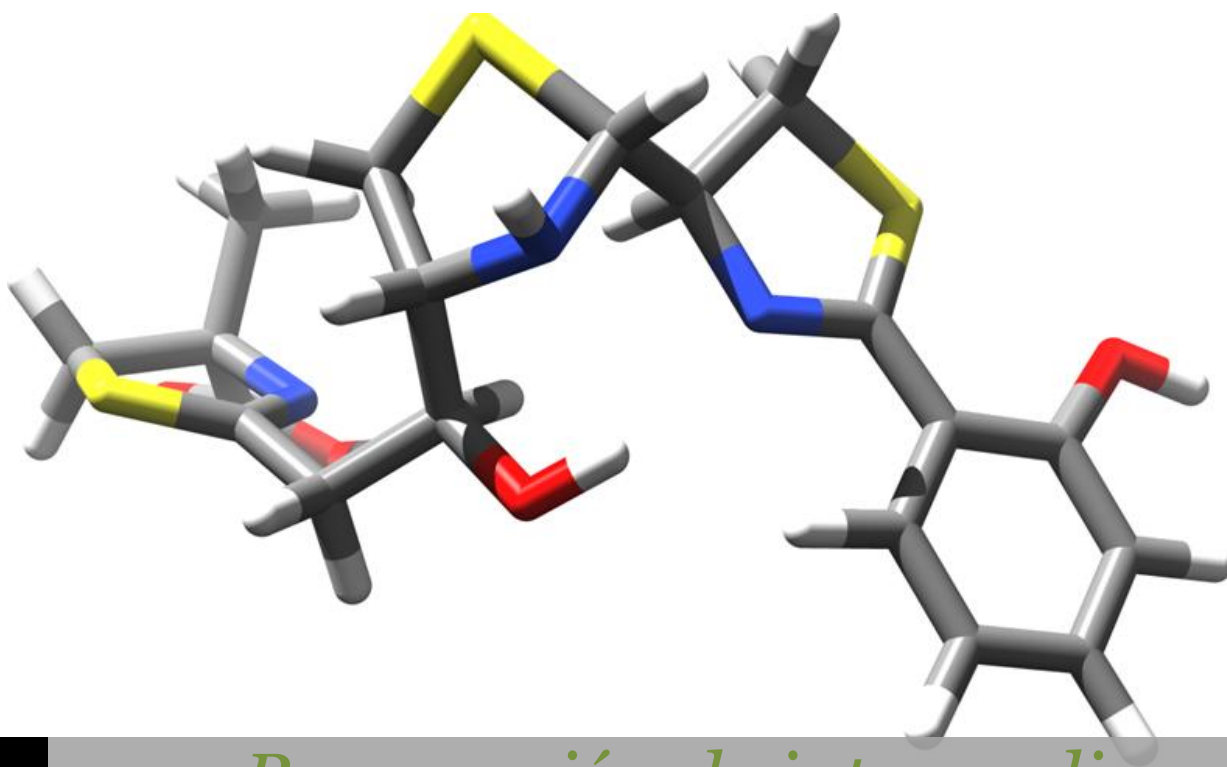




UNIVERSIDADE DA CORUÑA



*Preparación de intermedios
químicos clave en la síntesis total
del sideróforo piscibactina*

Memoria presentada como Trabajo de fin de Grado en Química
Facultade de Ciencias

| **Katherine Cobos Cabrera**
22 de Julio de 2013

AGRADECIMIENTOS:

A Dios porque sé que sin Él no podría haber llegado hasta donde estoy ahora.

Al profesor Carlos Jiménez González por permitirme realizar el Trabajo de Fin de Grado en su grupo de investigación. Por su apoyo y paciencia, y por permitirme conocer con más profundidad el mundo de la investigación en el sector de la Química Orgánica.

Al profesor Jaime Rodríguez González por todo su apoyo y dedicación al transmitirme sus conocimientos en elucidación estructural RMN.

Al profesor Marcos García Romero por su apoyo y ayuda incondicional en todo momento. Por brindarme su dedicación y tiempo durante cada etapa de este proyecto.

A la doctorando Yuri Segade Parrado por enseñarme a trabajar en un laboratorio de investigación, por toda su dedicación y tiempo para resolver mis dudas. Por estar conmigo en cada momento y transmitirme sus conocimientos en Química Orgánica.

Al resto del grupo de investigación, María Blanco Méndez, Juan Carlos Fuentes y Marcos Montaos Varela por toda su ayuda y apoyo en el laboratorio.

A todos mis compañeros de Grado por cada uno de los momentos que pasamos juntos.

A mi familia por apoyarme y creer en mí siempre.

GRACIAS.

Índice

Contenido

1.	INTRODUCCIÓN.....	
1.1	Acuicultura en Galicia.....	1
1.2	Principales enfermedades en peces provocadas por bacterias patógenas en acuicultura.....	1
1.3	La importancia del hierro.....	5
1.3.1	Sideróforos.....	5
1.3.2	Mecanismo de actuación de los sideróforos.....	6
1.3.3	Descubrimiento de los sideróforos.....	7
1.3.4	Propiedades generales de los sideróforos.....	8
1.3.5	Importancia del oxígeno como átomo dador en los sideróforos.....	8
1.3.6	Química redox sideróforo-hierro.....	11
1.4	Aplicaciones terapéuticas de los sideróforos.....	11
1.5	Sideróforo de la bacteria patógena de peces <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	13
2.	OBJETIVOS.....	15
3.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	17
3.1	Planteamiento retrosintético.....	18
3.2	Propuestas sintéticas para la preparación de los intermedios objetivo.....	19
3.2.1	Propuesta sintética para la preparación del fragmento A/intermedio 2.....	19
3.2.2	Propuesta sintética para la preparación del fragmento C/intermedio 3.....	20
3.2.2.1	Síntesis del aldehído tiazolidínico (7).....	20
3.2.2.2	Síntesis del α -cloroacetiloxazolidinona (8).....	20
3.2.2.3	Reacción de Reformatsky mediada por SmI_2 y eliminación del auxiliar quiral. Síntesis del intermedio objetivo 3	21
3.3	Desarrollo de los procesos sintéticos.....	22
3.3.1	Síntesis del intermedio sintético 2	22
3.3.3.1	Formación de la amida de Weinreb 2	22
3.3.2	Síntesis del intermedio sintético 3	24
3.3.2.1	Formación del anillo tiazolidínico (4).....	24
3.3.2.2	Protección del grupo amino del compuesto 4 como carbamato de tert-butoxicarbonilo (5).....	25

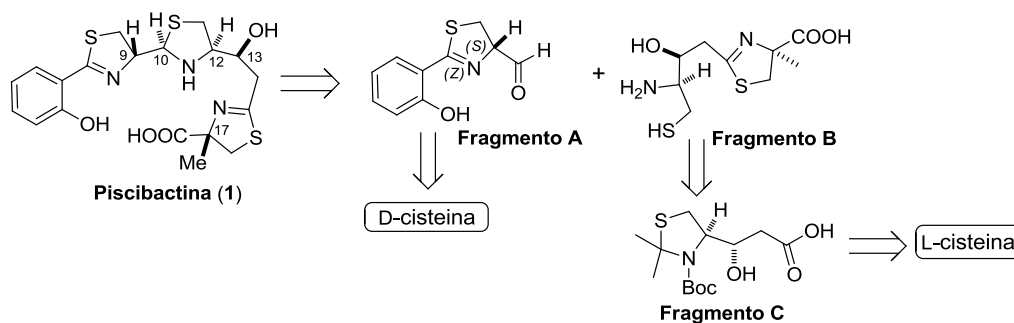
3.3.2.3. Formación de amidas de Weinreb. Síntesis de la amida (6)	26
3.3.2.4. Reducción de la amida de Weinreb. Síntesis del aldehído (7)	27
3.3.2.5. Reacción de acoplamiento Reformastky mediada por SmI_2 3	29
4. PARTE EXPERIMENTAL	35
4.1. Aspectos Generales.....	36
4.2. Procedimientos experimentales.	37
4.2.1. Preparación del intermedio sintético 2. Preparación de (S)-2-(2-hidroxifenil)-N-metoxi-N-metil-4,5-dihidrotiazol-4-carboxamida (2).....	37
4.2.2. Preparación del intermedio sintético (3).....	42
4.2.2.1. Síntesis del ácido (R)-2,2-dimetiltiazolidina-4-carboxílico (4).....	42
4.2.2.2. Síntesis del ácido (R)-3-(tert-butoxicarbonil)-2,2-dimetiltiazolidina-4-carboxílico (5)	46
4.2.2.3. Síntesis de (R)-tert-butil-4-(metoxi(metil)carbamoil)-2,2-dimetiltiazolidina-3-carboxilato (6)	50
4.2.2.4. Síntesis de (R)-tert-butil 4-formil-2,2-dimetiltiazolidina-3-carboxilato (7)	54
4.2.2.5 Síntesis de (R)-tert-butil 4-((S)-1-hidroxi-3-((R)-4-isopropil-2-oxooxazolidin-3-il)-3-oxopropil)-2,2-dimetiltiazolidina-3-carboxilato (3).....	56
5. CONCLUSIONES	62

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Boc	<i>tert</i> -Butoxicarbonilo
COSY	COrrrelation SpectroscopY
DCM	Diclorometano
dd	Doble doblete
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
EDCI	<i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida hidroclicrica
eq	Equivalente
ESI	Ionización mediante electrospray
Hex	Hexano
HMPA	Hexametilfosforamida
HR	Alta resolución
Hz	Hercio
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
LR	Baja resolución
m	Multiplete
Me	metilo
MS	Espectrometría de masa
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
ppm	Parte por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ta	Temperatura ambiente
s	singlete
sa	Singlete ancho
t	Triplete
THF	Tetrahidrofurano
UV	ultravioleta
δ	Desplazamiento químico

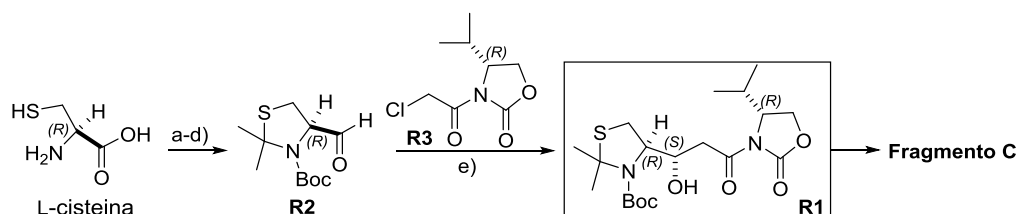
Resumen

El trabajo aquí presentado se centra en la obtención de intermedios sintéticos avanzados clave en la preparación del sideróforo piscibactina (**1**), según lo dispuesto en el esquema retrosintético A. En particular, dichos intermedios serán precursores de los fragmentos moleculares **A** y **C**.



Esquema A. Retrosíntesis propuesta para piscibactina (**1**).

La primera parte del trabajo se centra en la síntesis de un precursor avanzado del **fragmento C** (**R1**, Esquema B), para el cual se ha aplicado una metodología análoga a la desarrollada por T. R. Burke y col., y que implica como etapa clave la utilización de la reacción tipo Reformatsky mediadas por SmI_2 entre el aldehído **R2** y la α -cloroacetiloxazolidinona **R3**, proceso que permite controlar la estereoquímica de uno de los dos centros quirales que no provienen de reactivos sintéticos comerciales. Así, partiendo de L-cisteína, el precursor **R1** ha sido sintetizado en 5 etapas con un rendimiento global del 15%.

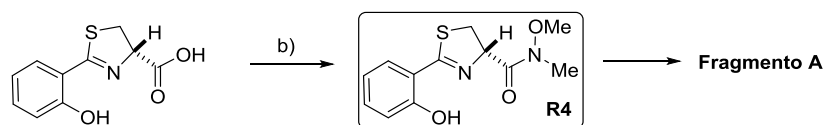


Reactivos y condiciones:

- a) 1. Dimetoxipropano, Acetona, reflujo, 4 días (**73%**); b) $(\text{Boc})_2\text{O}$ (1.1 equiv.), piridina, 0°C a t.a., 3 días (**89%**); c) EDCI, MeHN-OMe.HCl, DCM, DIPEA, 0°C a t.a. 12 hr (**35%**); d) $\text{LiAlH}_4/\text{THF}$ (3 equiv), 0°C , 30 min (**94%** **Cuantitativo**). e) SmI_2 (3 equiv) /THF -78°C (**70%**).

Esquema B. Síntesis del precursor de piscibactina **R1**.

La segunda parte se centra en la preparación a gran escala de la amida de Weinreb **R4** como precursor del **fragmento A** (Esquema C). El mencionado precursor se obtuvo de forma efectiva mediante reacción del correspondiente ácido con clorhidrato de *N,O*-dimetilhidroxilamina con un 46% de rendimiento.



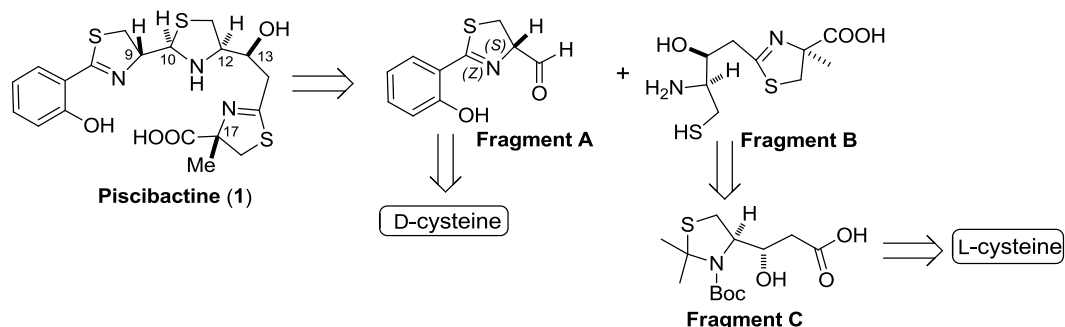
Reactivos y condiciones:

- b) EDCI, MeHN-OMe.HCl, DCM, DIPEA, 0°C a t.a. 12 hr (**46%**).

Esquema C. Síntesis del precursor de piscibactina **R4**.

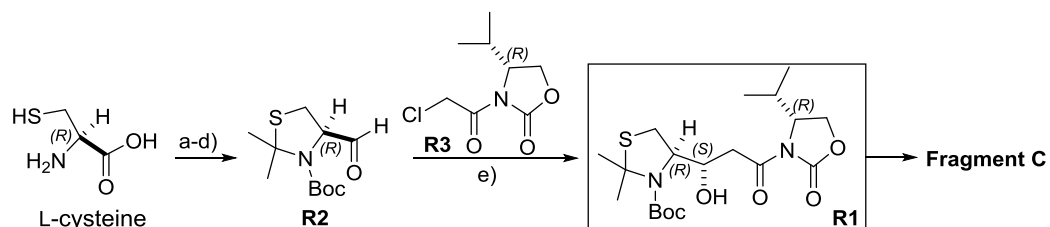
ABSTRACT

The work reported herein deals with the preparation of some key advanced synthetic intermediates on the synthesis of the siderophore piscibactine (**1**), analysis proposed in scheme A. In particular, the above-mentioned intermediates are the synthetic precursors of the molecular fragments **A** and **C**.



Scheme A. Retrosynthetic analysis of piscibactine (**1**).

The first part of this work was focused on the synthesis of an advanced precursor of **fragment C** (**R1**, scheme B), obtained by a similar methodology to that developed by T. R. Burke *et al*, which implies a SmI₂-mediated Reformatsky-type reaction between aldehyde **R2** and the α -chloroacetyloxazolidinone **R3**. This process allowed the stereochemistry control of one of the two chiral centers of fragment C. Therefore, precursor **R1** has been synthesized from L-cysteine in 5 steps with an overall yield of 15 %.

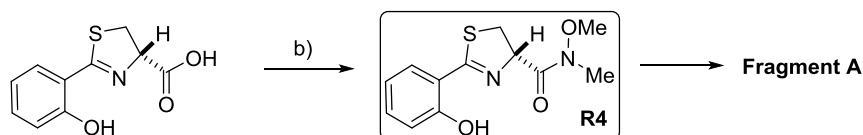


Reagents and conditions:

a) 1. Dimethoxypropane, Acetone, reflux, 4 days (73%); b) (Boc)₂O (1.1 equiv.), pyridine, 0°C to r.t., 3 days (89%); c) EDCI, MeHN-OMe.HCl, DCM, DIPEA, 0°C to r.t. 12 hr (35%); d) LiAlH₄/THF (1.3 equiv), 0°C, 30 min (94% quantitative). e) SmI₂ (3 equiv) /THF -78°C (70%).

Scheme B. Synthesis of precursor **R1**.

The second part of this work was focused on the gram-scale synthesis of the Weinreb's amide **R4** as precursor of **fragment A** (Scheme C). The compound was straightforwardly obtained by reaction of the corresponding acid with *N,O*-dimethylhydroxylammonium hydrochloride in a 46 % yield.



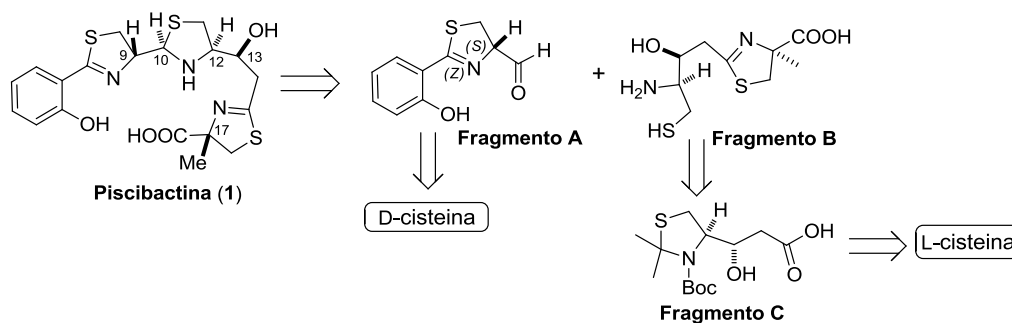
Reagents and conditions:

b) EDCI, MeHN-OMe.HCl, DCM, DIPEA, 0°C to t.a. 12 hr (46%).

Scheme C. Synthesis of precursor **R4**.

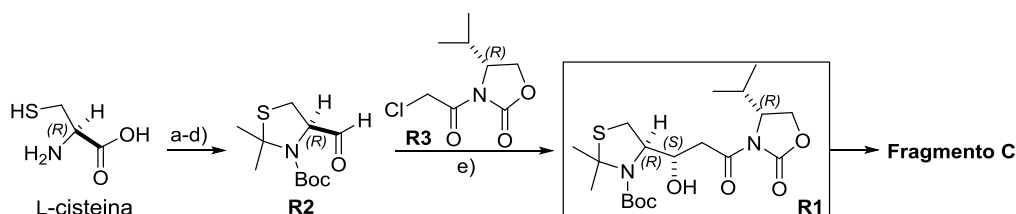
Resumo

O traballo aquí presentado centrase na obtención de intermedios sintéticos avanzados clave na preparación do sideróforo piscibactina (**1**), segundo o disposto no esquema retrosintético A. En particular, estes intermedios serán precursores dos fragmentos moleculares **A** e **C**.



Esquema A. Retrosíntese proposta para piscibactina (**1**).

A primeira parte do traballo centrase na síntese dun precursor avanzado do **fragmento C** (**R1**, Esquema B), para o cal se ten aplicado unha metodoloxía análoga á desenvolta por T. R. Burke e col., e que implica como etapa chave a utilización da reacción tipo Reformatsky mediada por SmI_2 entre o aldehído **R2** e a α -cloroacetiloxazolidinona **R3**, proceso que permite controlar a estereoquímica de un dos dous centros quirais que non proveñen de reactivos sintéticos comerciais. Así, partindo de L-cisteína, o precursor **R1** sintetizouse en 5 etapas con un rendemento global do 15 %.

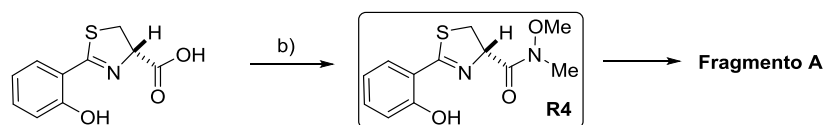


Reactivos e condicións:

a) 1. Dimetoxipropano, Acetona, refluxo, 4 días (73%); b) $(\text{Boc})_2\text{O}$ (1.1 equiv.), piridina, 0°C a t.a., 3 días (89%); c) EDCI, MeHN-OMe.HCl, DCM, DIPEA, 0°C a t.a. 12 hr (35%); d) $\text{LiAlH}_4/\text{THF}$ (1.3 equiv), 0°C, 30 min (94% cantitativo). e) SmI_2 (3 equiv) /THF -78°C (70%).

Esquema B. Síntese do precursor de piscibactina **R1**.

A segunda parte centrase na preparación a grande escala da amina de Weinreb **R4** como precursor do **fragmento A** (Esquema C). Este precursor obtívose de forma axeitada mediante reacción do correspondente ácido con clorhidrato de *N,O*-dimetilhidroxilamonio con un 46 % de rendemento.



Reactivos e condicións:

b) EDCI, MeHN-OMe.HCl, DCM, DIPEA, 0°C a t.a. 12 hr (46%).

Esquema C. Síntese do precursor de piscibactina **R4**.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Acuicultura en Galicia.

Hoy en día, el suministro de recursos naturales marinos mundiales se ve seriamente amenazado debido a su sobreexplotación. Como consecuencia de ello la acuicultura ha incrementado grandemente su importancia y crecimiento en el ámbito mundial, estableciéndose así como la fuente más rica en proteínas en la demanda de alimentos.

Según la Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), casi el 50% de los productos pesqueros mundiales destinados a la alimentación proceden de la acuicultura.¹ Ante el estancamiento de la pesca extractiva, la acuicultura se postula como la única salida futura para mantener los productos del mar dentro de la dieta cotidiana

Galicia es uno de los líderes mundiales en el sector de la acuicultura gracias a sus condiciones naturales, especialmente en las rías, y a la apuesta realizada desde la empresa y la administración gallega. En el año 2002 la acuicultura gallega alcanzó una producción estimada superior a las 267.000 toneladas, dominando el mercado español y siendo uno de los principales suministradores de los mercados europeos.

En los últimos años, el sector de la acuicultura está experimentando un continuo crecimiento, tanto en el volumen de su producción como en el valor generado en la primera venta entre 93.65 millones de euros en 1994 a un total de 193.79 millones en 2002.

Por otra parte, la acuicultura presenta un problema de gran importancia, el cual está relacionado con las enfermedades causadas por agentes biológicos y no biológicos, lo que provoca importantes pérdidas en el sector debido a la alta mortalidad asociada.

1.2 Principales enfermedades en peces provocadas por bacterias patógenas en acuicultura.

El alto valor comercial y las elevadas inversiones en infraestructuras en la acuicultura, hacen que la investigación relacionada con enfermedades que afectan a los cultivos sea de especial interés. Las enfermedades infecciosas son las más importantes por su impacto en la producción de poblaciones. Por otra parte, los patógenos de peces pueden ser un verdadero problema de salud pública, llegando a afectar incluso a seres humanos.

Las enfermedades patógenas en peces que originan mayores pérdidas para el sector de la acuicultura marina son las siguientes:

¹ <http://www.fao.org/fishery/aquaculture/es>.

INTRODUCCIÓN

Vibriosis

El termino Vibriosis define una infección sistémica primaria causada por una especie de *Vibrio* patógena (*V. tubiashii*, *V. ordalii*, *V. salmonicida*, etc.), siendo la especie *Listonella (Vibrio) anguillarum* la principal responsable de las epizootias.²

Es reconocido como el principal agente causal de Vibriosis en el cultivo de alevines de rodaballo, aunque también se ha podido aislar esporádicamente a partir de salmón y trucha arcoíris.³

La Vibriosis es una de las infecciones bacterianas más graves que pueden padecer los peces marinos. Por regla general la mortalidad es alta (hasta de un 80% en casos de infección aguda) y de curso rápido. Frecuentemente, la mortalidad alcanza el 10-20 % de la población aunque se aplique el tratamiento adecuado.

Esta patología afecta a una gran variedad de especies de peces, artrópodos y moluscos tanto en poblaciones naturales como en plantas de cultivo. La evolución de la infección puede variar entre una fase aguda y otra crónica, y la sintomatología depende de la especie hospedadora, de su edad y del estadio de la enfermedad.³

El tratamiento usual se realiza con antibióticos a base de oxitetraciclina, nitrofurantoina, sulfasoxazol, que no son del todo eficientes debido a la existencia de cepas resistentes y a que los peces con esta enfermedad presentan falta de apetito entre sus síntomas, provocando que no consuman el antibiótico que se les suministra.^{4,3}

Yersiniosis

La Yersiniosis conocida también como la *enfermedad de la boca roja*, es causada por la bacteria *Yersinia ruckeri*, la cual afecta a salmónidos. Esta enfermedad representa grandes pérdidas de económicas en la acuicultura mundial, diagnosticándose en los principales países productores como Canadá, Chile o España.

Los síntomas de la enfermedad no son específicos pero se puede detectar al observar un aumento de mortalidad en salmónidos jóvenes, cambios de comportamiento en los peces como nado superficial, movimiento lento, falta de apetito, hemorragia en la boca, en la superficie del cuerpo y en órganos internos.

El tratamiento que se aplica a peces con esta enfermedad consiste en antibióticos como la oxitetraciclina y el ácido oxolínico, aunque resulta más eficaz el empleo de medidas preventivas, evitando el contacto con portadores y manteniendo altas condiciones de higiene.⁵

² Toranzo, A. E.; Barja, J. L. *Dis. Aquat. Org.* **1990**, *9*, 73-82.

³ Toranzo, A. E.; Magariños, B.; Romalde, J. L. *Aquaculture* **2005**, *246*, 37-61.

⁴ Johansen, L. H.; Jensen, I.; Mikkelsen, H.; Bjorn, P. A.; Jansen, P.A.; Bergh, O. *Aquaculture* **2011**, *315*, 167-186

⁵ Tobbach, E.; Decostere, A.; Hermans, K.; Haesebrouck, F.; Chiers K. *J. Fish. Dis.* **2007**, *30*, 257-268.

INTRODUCCIÓN

Estreptococosis.

La Estreptococosis hace referencia a un grupo de enfermedades producidas por varias especies de bacterias. Actualmente se distingue entre la Estreptococosis de agua caliente, aquella que causa mortalidad a temperaturas superiores a 15 °C e implica patógenos como *Lactococcus garvieae* (*Streptococcus seriolicida*), y la Estreptococosis de agua fría, aquella que causa mortalidad a temperaturas inferiores a 15°C y es causada por *Vagococcus salmoninarum* o *Lactococcus piscium*.⁶

El estudio de esta enfermedad es muy importante para la acuicultura mundial ya que puede afectar a gran variedad de especies de peces, como la trucha arcoíris, rodaballo o la lubina rayada. La enfermedad se puede tratar con antibióticos como eritromicina, oxitetraciclina y amoxicilina.

Pasteurelosis.

Photobacterium damsela subsp. *piscida*, previamente conocida como *Pasteurella piscida*, fue aislada por primera vez en 1963 de la perla blanca (*Morone americanus*) y de la lubina rayada (*Morone saxatilis*) en la bahía de Chesapeake en Estados Unidos. La enfermedad causada por esta bacteria fue denominada Pasteurelosis o pseudotuberculosis. En 1991 fue detectada en alevines de dorada (*Sparus aurata*) en la región noreste de España.

En cultivos de dorada se ha demostrado que sólo afecta a alevines con un peso inferior a 50 g, lo que es debido a que los adultos poseen neutrófilos y macrófagos que pueden fagocitar las bacterias. Otro factor de desarrollo de la infección es la temperatura, ya que aparece por encima de los 20 °C.

Los síntomas que presenta la Pasteurelosis son poco visibles, ya que generalmente no hay lesiones superficiales, sin embargo, se puede observar un aumento en la frecuencia respiratoria, letargo, hemorragias en la base de las aletas, agrandamiento del hígado y del riñón, formación de gránulos constituidos por bacterias, células epiteliales y fibroblastos, los cuales al romperse diseminan las bacterias por el organismo produciendo septicemia hemorrágica.⁷ El tratamiento se basa en el uso de antibióticos como el ácido oxolínico, flumequina, nitrofurantoína y oxitetraciclina, los cuales se suministran después de la aparición de los signos clínicos. Por esta razón, más que controlar la enfermedad, lo que hace es evitar su aparición en aquellos peces que no la padecen, ya que los peces infectados pierden el apetito y no consumen el antibiótico.

Por tanto, en la actualidad la *Photobacterium damsela* subsp. *piscida* es considerado como uno de los patógenos bacterianos más importantes debido a su amplia distribución geográfica, diversidad de especies que puede infectar y a la mortalidad tan elevada que produce, lo cual conlleva a grandes pérdidas en las granjas de acuicultura.⁸

⁶ Romalde, J. R.; Ravelo, C.; Valdés, I.; Magariños, B.; De la Fuente, E.; San Martín, C.; Avendaños-Herrera, R.; Toranzo, A. E. *Veterinary Microbiology* **2008**, *130*, 198-207.

⁷ Magariños, B.; Toranzo, A. E.; Romalde, J. L. *Ann. Rev. Fish. Dis.* **1996**, *6*, 41-64.

⁸ Liu, P-C.; Hung, S-W.; Chen, M-H.; Cheng, C-F.; Lin, C-C.; Chang, C-H.; Lin, S-L.; Tu, C-Y.; Lin Y-H.; Shyan, W. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2011**, *5*, 2107-2113.

INTRODUCCIÓN

La importancia de este tipo de enfermedad se debe también a la influencia en la salud humana por posibilidad de 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 este campo.



Figura 1: Organismo infectado por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

INTRODUCCIÓN

1.3 La importancia del hierro.

El hierro es un micronutriente esencial para casi todos los microorganismos, plantas y animales debido a sus propiedades químicas únicas: la capacidad de coordinar y activar el oxígeno, así como su química redox ($\text{Fe}^{2+} \leftrightarrow \text{Fe}^{3+} \leftrightarrow \text{Fe}^{4+}$), ideal para la participación en el transporte de electrones y los procesos metabólicos de la mayor parte de las células.⁹

A pesar de la abundancia de hierro en la corteza terrestre, este elemento no es fácilmente biodisponible en ambientes aeróbicos debido a que está presente en forma de sales de Fe^{3+} de baja solubilidad (por ejemplo el $\text{Fe}(\text{OH})_3$ presenta un $K_{ps} = 10^{-39}$).

En sistemas biológicos, las condiciones fisiológicas del pH y el oxígeno disponible son los que regulan los niveles de hierro disponibles para las funciones requeridas. Así, en presencia de oxígeno y a pH fisiológico (pH = 7.4), el hierro predominante está en forma de Fe^{3+} formando sales insolubles. Por otra parte, a un pH ácido y en condiciones anaerobias, el hierro predominante está en forma de sales solubles de Fe^{2+} de alta solubilidad.¹⁰

Los niveles de Fe^{2+} y Fe^{3+} libres son bajos en los sistemas biológicos, debido a la generación de especies reactivas de oxígeno de alta toxicidad por sus efectos oxidativos sobre las macromoléculas. Por tanto, los sistemas biológicos desarrollaron sistemas de captación de Fe^{3+} a través de proteínas específicas tales como: lactoferrina, transferrina sérica y ferritina. Estas proteínas captan el hierro impidiendo su disponibilidad para bacterias tanto patógenas como no patógenas, ralentizando así su crecimiento y proliferación.¹¹

1.3.1 Sideróforos.

El Fe^{3+} es un componente esencial para el crecimiento y la reproducción de las bacterias, ya que éste participa en procesos biológicos celulares de gran importancia en su ciclo infeccioso. Los microorganismos, los hongos y las plantas han desarrollado estrategias para capturar y absorber el hierro del medio y de los organismos vivos (plantas y animales) que infectan siendo una de las más comunes la producción de sideróforos.

Los sideróforos o transportadores de hierro, son compuestos de bajo peso molecular (500–1500 daltons) que poseen una gran afinidad por el Fe^{3+} . Son sintetizados y secretados al medio extracelular, uniéndose al hierro y transportándolo a la bacteria donde forma parte del metabolismo de reproducción y proliferación. Son recuperados gracias a transportadores específicos.¹²

⁹ Kornereich-Leshem, H.; Ziv, C.; Gumienna-kontecka, E.; Arad-Yellin, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1137-1145.

¹⁰ Harris, W. R.; Raymond, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 6534–6541.

¹¹ Wandersman, C.; Delepelaire, P.; *Annu. Rev. Microbiol.* **2004**, *58*, 611–647.

¹² Hider, R. C.; Kong, X. *Nat. Prod. Rep.*, **2010**, *27*, 637–657.

INTRODUCCIÓN

La biosíntesis de sideróforos se regula normalmente por los niveles de hierro del entorno donde se encuentra el organismo, así como por la cantidad previa adquirida por la bacteria.¹³

1.3.2 Mecanismo de actuación de los sideróforos.

Los sideróforos quelatan los iones Fe^{3+} , transportándolos mediante un sistema de alta afinidad dependiente del ATP a través de receptores de membrana específicos y proteínas transportadoras. El proceso de transporte es impulsado termodinámicamente desde el citoplasma a través del sistema de proteínas denominado *tonB* que transduce la energía necesaria desde el citosol hasta el receptor de membrana externo (Figura 2).¹⁴

Los sideróforos coordinados al Fe^{3+} son transportados hasta los microorganismos en un proceso de transporte activo, usando multitud de receptores de membrana. Posteriormente el hierro es liberado del complejo con el sideróforo mediante un proceso redox, dado que la afinidad del sideróforo hacia el Fe^{2+} es mucho menor que hacia el Fe^{3+} , lográndose introducir de esta forma en el interior del organismo.

Por otra parte, estudios recientes han demostrado que los sideróforos son usados por las bacterias no solo para la adquisición del hierro, sino también para protegerse a sí mismos contra la toxicidad de los metales pesados.¹⁵

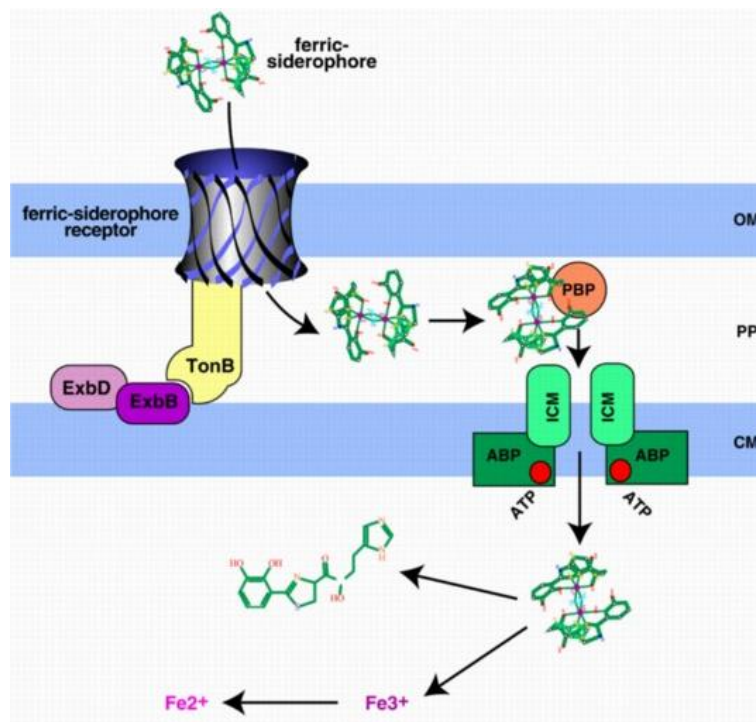


Figura 2: Mecanismo de introducción del Fe^{3+} en las bacterias.¹⁶

¹³ Schalk, J.; Hannauer, M. *Env. Microbiol* **2011**, *13*, 2844-2854.

¹⁴ (a) Ratledge, C.; Dover, G. L. *Annu. Rev. Microbiol* **2000**, *54*, 881-941. (b) Wandersman, C.; Delepelaire, P. *Annu. Rev. Microbiol* **2000**, *58*, 611-647.

¹⁵ Brandel, J.; Humbert, N.; Elhabiri, N.; Schalck, I. J.; Mislin G. L. A.; Albretch-Garry, A. M. *J. Inor. Biochem.* **2011**, *105*, 1293-1298.

¹⁶ Stintzi, A.; Barnes, C.; Xu, J.; Raymond, K. N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, *97*, 10691-10696.

INTRODUCCIÓN

1.3.3 Descubrimiento de los sideróforos.

Durante el periodo 1949-1952, tres sideróforos diferentes fueron aislados e identificados como factores de crecimiento; micobactina, ferricromo y coprogeno (Figura 3). Así, en este estudio clásico en el campo, G. A. Snow caracterizó el sideróforo micobactina, identificando de forma correcta sus grupos de coordinación y también la alta afinidad del compuesto por el Fe^{3+} .¹⁷ Casi al mismo tiempo, las estructuras de ferricromo y ferricromo A fueron elucidadas por Emery y Neilands en el año 1961.¹⁸

Los primeros sideróforos con estructuras de tipo catecol fueron caracterizados en 1958, cuando se logró aislar el primer conjugado de glicina con el ácido 2,3-dihidroxibenzoico, un compuesto secretado por *Bacillus subtilis* en condiciones de cultivo de bajo contenido en hierro.¹⁹ Posteriormente, en el año 1970 O'Brien, Cox y Gibson reportaron la evidencia de la existencia de un sideróforo tipo triccatecol.²⁰

Desde 1970 se han caracterizado un gran número de sideróforos, la mayoría teniendo como grupos funcionales hidroximato, catecolato o α -hidroxicarboxilato en sus estructuras. En la actualidad se han descrito más de 500 sideróforos, y alrededor de 270 han sido caracterizados estructuralmente.¹⁶

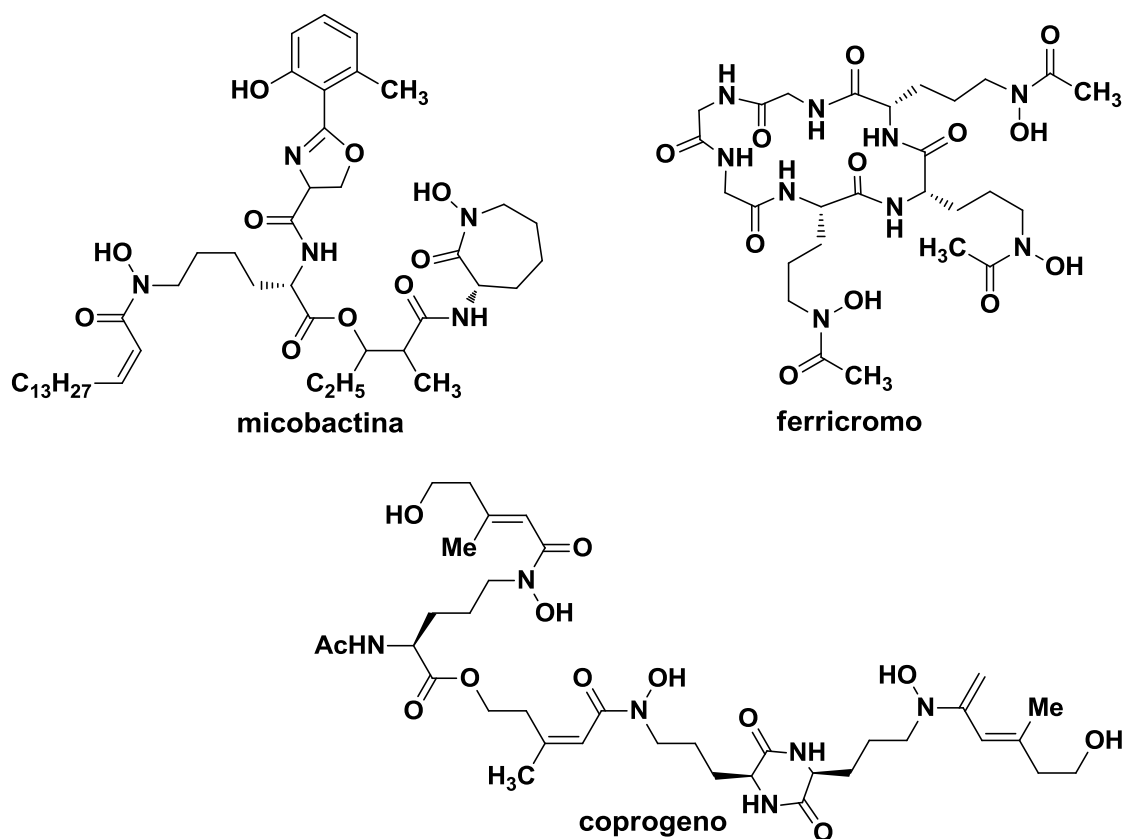


Figura 3. Primeros sideróforos aislados e identificados.

¹⁷ Snow, G. A. *J. Chem. Soc.* **1954**, 2588-2596.

¹⁸ Emery, T.; Neilands, J. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, 83, 1626-*i*?

¹⁹ Ito, T.; Neilands, J. B. *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, 80, 4645-4646.

²⁰ O'Brien, I. G.; Cox, G. B.; Gibson, F. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **1970**, 215, 393-402.

INTRODUCCIÓN

1.3.4 Propiedades generales de los sideróforos.¹²

Los sideróforos tienen una especial afinidad por el Fe^{3+} , pero mucho menos por el Fe^{2+} . Esto explicaría la baja afinidad por otros cationes biológicamente abundantes como el Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} o Mn^{2+} 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. Pero este problema en realidad no existe debido a la ausencia de cationes tripositivos biológicamente importantes, el Co^{3+} es cinéticamente inerte y el Al^{3+} aunque esté presente en las matrices biológicas como aguas naturales o aceites, no compite por el hierro porque:

- El radio del catión Al^{3+} es de 0.54 Å, mucho más pequeño que el del catión Fe^{3+} , el cual es de 0.65 Å.
- Los sideróforos Hexadentados poseen una afinidad mucho más alta por el catión Fe^{3+} que por el Al^{3+} .
- Cuando el Fe^{3+} es transportado por un sideróforo, este se libera en un proceso redox, mientras que el Al^{3+} no puede liberarse mediante este proceso.

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

1.3.5 Importancia del oxígeno como átomo dador en los sideróforos.¹²

Los átomos dadores que presentan la mayor afinidad hacia el catión Fe^{3+} son los oxígenos cargados negativamente, de forma que en cuanto mayor sea la carga en el oxígeno, más estrecha será la interacción.

Los sideróforos tienden a usar oxígenos cargados como átomos dadores, y la geometría más común es la octaédrica, lo que permite la organización de seis ligandos alrededor del núcleo de hierro con una energía mínima de repulsión entre ligandos. Además la estructura octaédrica favorece la formación de especies termodinámicamente estables del Fe^{3+} de alto espín.

Algunos sideróforos presentan otros átomos donadores diferentes al oxígeno, como nitrógeno o azufre, los cuales presentan menos afinidad con el Fe^{3+} y por tanto disminuyen la afinidad total del sideróforo por el hierro.

INTRODUCCIÓN

En la **tabla 1** se indican los ligandos más comunes en los sideróforos:

Ligandos sideróforos característicos valores de pK_a			
Nombre	pK_{a1}	pK_{a2}	estructura
catecolato	9.2	13	
α -hidroxicarboxilato	3	14.5	
hidroxibenzoiloxazolina	9	-	
hidroxamato	9	-	
α -aminocarboxilato	2.5	9.5	
4-hidroxiimidazol	6.0	14.5	

Tabla 1. Ligandos bidentados más abundantes y sus valores de pK_a .

Dependiendo de la naturaleza del tipo de ligando, los sideróforos se pueden dividir en tres tipos básicos: catecoles, hidroxamatos y α -hidroxicarboxilatos o mixtos.²¹

Catecoles: su centro de unión deriva del corismato. A su vez se pueden clasificar en catecoles *sensu stricto* (formados por ácido 2,3-dihidroxi benzoico (DHBA)) o fenolatos (compuestos por ácido salicílico). La enterobactina (Figura 4) es el sideróforo más estudiado de este grupo, lo producen cepas de *E. coli* y otras, y presenta una de las constantes de disociación del hierro más elevadas (10^{52}), lo que le permite incluso competir con las transferrinas en la fijación de hierro.

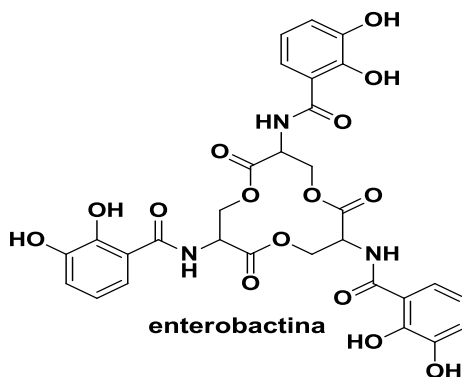


Figura 4. Sideróforo enterobactina.

INTRODUCCIÓN

Hidroxamatos: del tipo de la aerobactina producida por *Salmonella spp.*, *Shigella flexneri* y algunas cepas de *E. coli*. Se pueden clasificar en ferricromos, ferrioxaminas, coprogenos y fusarininas. El sideróforo más representativo es la aerobactina (Figura 5) la cual presenta una constante de disociación muy parecida a las transferrinas ($\sim 10^{25}$) por lo que compete con otras fuentes como la ferritina.

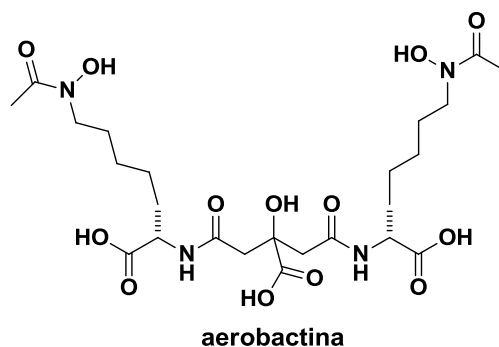


Figura 5. Sideróforo aerobactina.

Ácidos α -hidroxicarboxílicos: un ejemplo de este grupo es el sideróforo acromobactina (Figura 6) derivado del citrato. Este sideróforo lo produce *Erwinia chrysanthemi*, especie que produce simultáneamente dos sistemas de sideróforos diferentes: acromobactina y crisobactina (de tipo catecol).

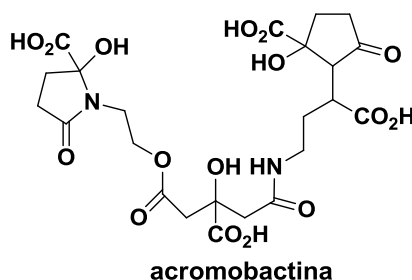


Figura 6. Sideróforo acromobactina.

Mixtos: se caracterizan por tener más de un tipo de ligando en su estructura, como la anguibactina (Figura 7), que contiene en su estructura dos grupos de unión a hierro: un grupo catecol y uno de tipo hidroxamato, por lo que se consideraría este sideróforo como de tipo catecol-hidroxamato.²¹

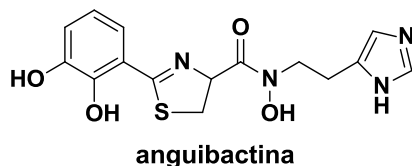


Figura 7. Sideróforo anguibactina.

²¹ 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.

1.3.6 Química redox sideróforo-hierro.¹²

En función de su estructura, los sideróforos poseen una afinidad mucho más alta por el Fe^{3+} frente a Fe^{2+} , siendo éste un factor muy importante para hacerlos selectivos frente al hierro en relación con otros metales presentes en la biosfera. La selectividad es más alta cuanto más negativo sea el potencial redox del hierro enlazado con el sideróforo. Así, un alto potencial redox negativo asegura que el complejo Fe^{3+} no revertirá el ciclo redox y, por tanto, no generará radical hidroxilo dañino en un medio aeróbico.

Los sideróforos basados en grupos catecol son los que poseen los potenciales redox más negativos, volviéndose éstos más negativos bajo condiciones ácidas, ya que los ligandos catecol pueden producir una reacción redox interna con el Fe^{3+} .

1.4 Aplicaciones terapéuticas de los sideróforos.

A causa de la gran afinidad de los sideróforos por el hierro, éstos se han llegado a utilizar en los tratamientos de enfermedades causadas por el exceso de hierro en el organismo. Sin embargo, el uso de estos compuestos en el tratamiento de enfermedades presenta efectos secundarios, ya que algunos patógenos pueden utilizarlos como quelatantes de hierro produciendo infecciones.

Además, dado que se ha logrado demostrar la íntima relación entre la producción de los sideróforos y la virulencia en algunas bacterias patógenas, los mecanismos de asimilación de hierro están siendo empleados en el diseño de nuevos antimicrobianos mediante tres estrategias:

1. 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*.²²
2. Síntesis de análogos que actúen como antagonistas interfiriendo en los procesos de asimilación del hierro. La mycobactina 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 (Figura 8).²³

²² Ferrera, J.A.; Ryu, J.S.; Di Lello, F.; Tan, D.S.; Quadri, L. E. *Nature. Chem. Biol* **2005**, 1:29-32

²³ Hu, J.; Miller, M. J. *J Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 3462-3468

INTRODUCCIÓN

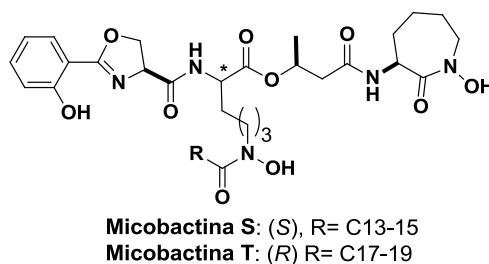


Figura 8. Ejemplo de análogo de sideróforo usado como antibacteriano que actúa como antagonista.

3. *Estrategia de Caballo de Troya*. Desarrollada inicialmente por M. J. Miller,²⁴ consiste en la preparación de aductos o conjugados entre un compuesto que tenga una actividad siderófora y un antibiótico conocido, unidos a través de un espaciador cuya misión es, por una parte poder enlazar ambos componentes y, por otra parte, separarlos convenientemente para que la estructura del antibiótico no interfiera en el proceso de quelatación del hierro y de reconocimiento molecular por el receptor (Figura 9). De esa manera 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.

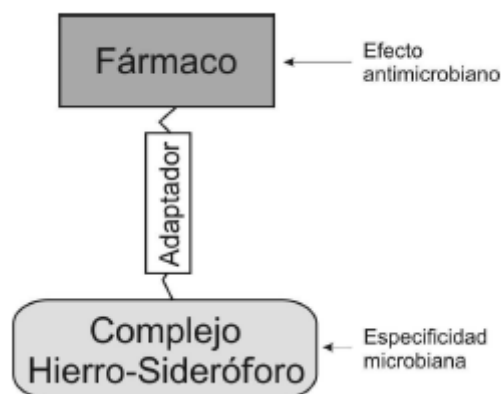


Figura 9. Esquema de los “caballos de Troya”.

Hasta el momento se pueden encontrar numerosos antecedentes del uso de la estrategia de caballo de Troya para la formación de nuevos antimicrobianos. Destaca los estudios llevados a cabo por M. J. Miller en la Universidad de Notre Dame de EEUU que ha logrado sintetizar numerosos sideróforos acoplados a distintos antibióticos conocidos.²⁵

Una de sus últimas publicaciones presenta especial interés, ya que explica la síntesis de un sideróforo de estructura tipo tris-catecolato, y sus conjugados con antibióticos como ampicilina y amoxicilina utilizando la estrategia descrita. Ambos mostraron una

²⁴ Miller, M. J.; Malouin, F. *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 241-249.

²⁵ Ji, C.; Miller, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9898-9901.

INTRODUCCIÓN

mejora en la actividad antimicrobiana *in vitro* contra especies Gram-negativas con respecto a otros antibióticos contra la *Pseudomonas aeruginosa*.

Antecedentes de la estrategia de caballo de Troya en el grupo de investigación.

En el grupo de investigación en el que se ha desarrollado el presente trabajo, se han desarrollado análogos del sideróforo vancrobactina (Figura 11), que presentan actividad como sideróforo y que presentan una funcionalización apropiada para actuar como vector de antibiótico en la estrategia de caballo de Troya.²⁶ A partir de estos análogos, se prepararon una serie de conjugados con el antibiótico norfloxacin, empleando una unidad de acetilo como espaciador. Aunque todos ellos mostraron actividad antibiótica frente a *Vibrio anguillarum*, el MIC que mostraron fue menor que la de norfloxacin libre.²⁷

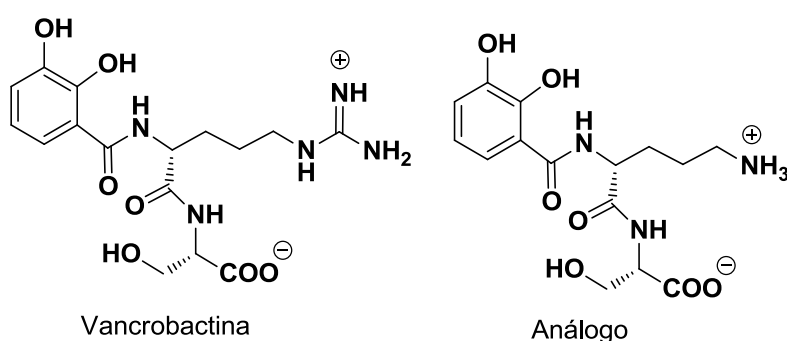


Figura 11. Sideróforo vancrobactina y análogo del mismo apropiado para su uso como vector de antibióticos en la estrategia de “Caballo de Troya”.

1.5 Sideróforo de la bacteria patógena de peces *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

En estudios realizados en la bacteria *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* responsable de la Pasteurelisis 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.²⁸

Estudios realizados por el grupo de Microbiología de la Universidad de Santiago de Compostela junto al grupo de investigación PRONAMAR de la Universidad de La Coruña, han identificado, clonado y caracterizado un clúster de 35 kb que incluye los genes que codifican la biosíntesis de un sideróforo tipo fenolato. En estos estudios se encontró una gran similitud entre el clúster caracterizado y la secuencia de genes que

²⁶ González-Soengas, R.; Larrosa, M.; Balado, M.; Rodríguez, J.; Lemos, M. L.; Jiménez, C. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1278-1287.

²⁷ Souto, A.; Montaós, M. A.; Balado, M.; Osorio, G.; Rodríguez, J.; Lemos, M. L.; Jiménez, C. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2013**, *21*, 294-301

²⁸ Magariños, S.; Romalde, J. L.; Lemos, M. L.; Barja, J. L.; Toranzo, A. E. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 2990-2998.

INTRODUCCIÓN

codifica la síntesis de las proteínas implicadas en la producción de la yersiniabactina,²⁹ aislada previamente de especies patógenas de *Yersinia*. Por tanto, la comparación de secuencia de proteínas sugiere que el sideróforo producido por *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* es biosintetizado la acción de dos familias de enzimas llamadas sintasas policétidas (PKS) y sintetasas no-ribosómicas peptídicas que forman el denominado megasintetasa NRPS/PKS mediada por un mecanismo similar a la descrita para yersiniabactina

Los estudios realizados por el grupo de investigación PRONAMAR han logrado el aislamiento y caracterización del sideróforo producido por esta bacteria, el cual fue denominado como piscibactina (Figura 10).³⁰

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 *Pasteurelosis*. En particular, se plantea en un futuro la utilización de sideróforo en estrategias terapéuticas de tipo caballo de Troya.

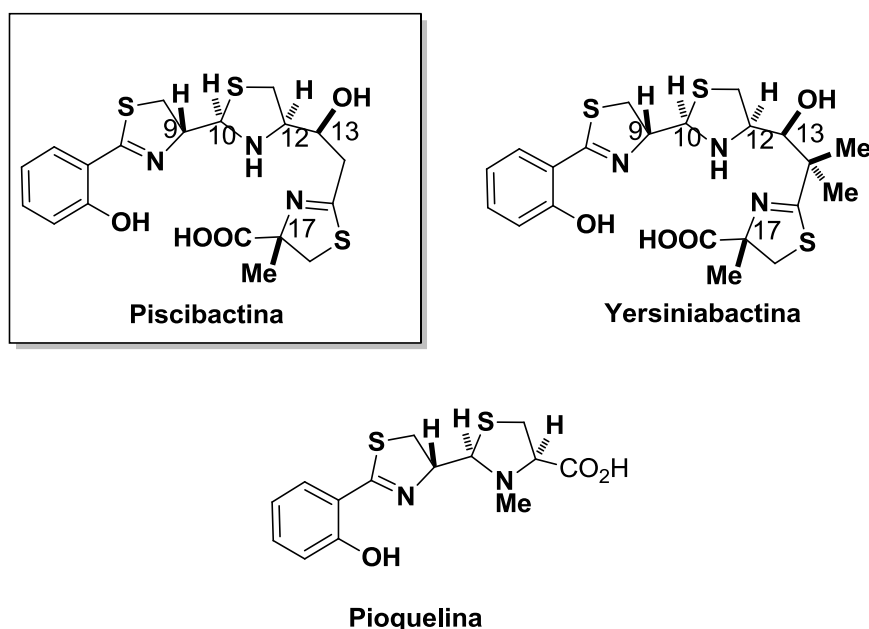


Figura 10. Estructuras de los sideróforos piscibactina, yersiniabactina y pioquelina

Debido a la similitud estructural de piscibactina con los sideróforos yersiniabactina y pioquelina³¹ (Figura 10), en el presente trabajo (y como se verá más adelante) se utilizará una metodología sintética similar para la preparación de precursores de piscibactina.³²

²⁹ Souto, A.; Montaos, M. A.; Rivas, A. J.; Balado, M.; Osorio, C. G.; Rodríguez, J.; Lemos, M. L.; Jiménez, C. *Eur. J. Org. Chem* **2012**, 29, 5693-5700

³⁰ Osorio, C. R.; Ríos, S. J.; Lemos, M. L. *Microbiology* **2006**, 152, 3327-3341.

³¹ Rivault, F.; Schons, V.; Liébert, C.; Burger, A.; Sakr, E.; Abdallah, M. A.; Schalk, I. J.; Mislin, G. L. A. *Tetrahedron* **2006**, 62, 2247-2254.

³² Ino, A.; Murabayashi, A. *Tetrahedron* **2001**, 57, 1897

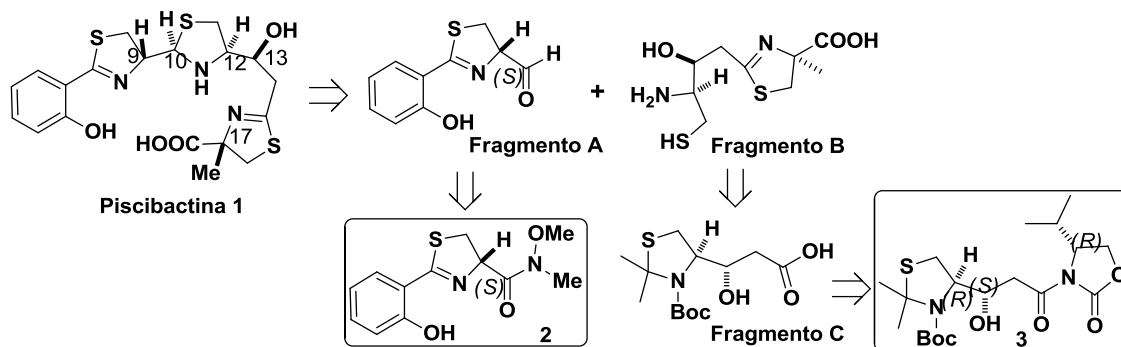
2. OBJETIVOS

OBJETIVOS

OBJETIVOS

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

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 **2** y **3**, precursores a su vez de los fragmentos moleculares **A** y **C**, claves en la síntesis total del sideróforo (Esquema A).



Esquema A. Retrosíntesis parcial de piscibactina **1**, mostrando los intermedios sintéticos clave objetivo **2** y **3**.

Como objetivos específicos del presente trabajo se proponen:

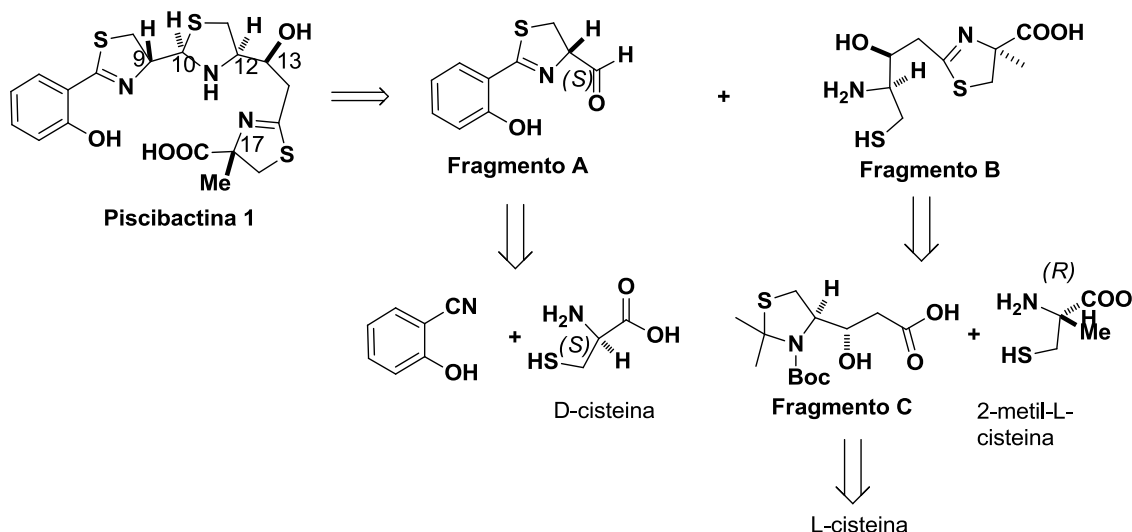
- Síntesis del intermedio sintético 2 (Esquema C)**, mediante una metodología similar a la empleada en la síntesis del sideróforo pioquelina.
- Síntesis del intermedio sintético 3 (Esquema B)**, siguiendo una secuencia sintética que implica como etapa clave la aplicación de la metodología desarrollada por T. R. Burke y col. para acoplamiento tipo Reformatsky mediadas por SmI_2 , en atmósfera inerte y a baja temperatura. La utilización de una oxazolidinona como auxiliar quiral permitirá que el proceso ocurra con una alta diastereoselectividad, generándose en el proceso, el nuevo estereocentro de configuración deseada.
- Correcta caracterización de los intermedios** de cada ruta para la síntesis de los intermedios objetivo **2** y **3**, mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón, carbono y técnicas de espectrometría de masas

3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 Planteamiento retrosintético.

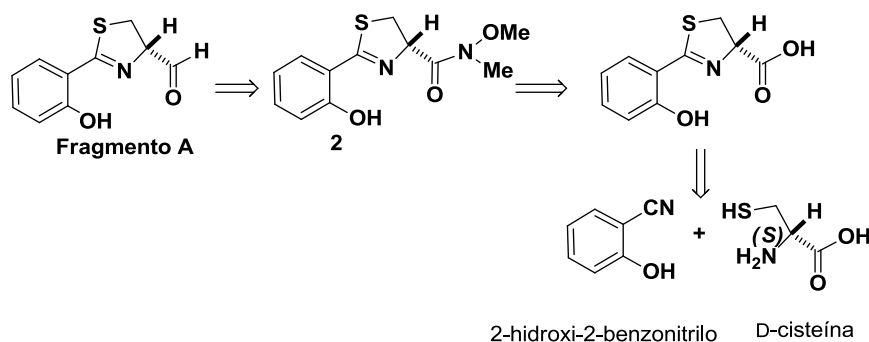
Con la finalidad de diseñar un procedimiento de preparación del sideróforo piscibactina (**1**, Esquema 2) se planteó el siguiente análisis retrosintético:



Esquema 1. Análisis retrosintético de piscibactina (**1**).

La síntesis química de piscibactina se plantea a través de una metodología sintética análoga a la desarrollada para la preparación de yersiniabactina³² y pioquelina,³¹ dada las similitudes estructurales que tiene con estos dos sideróforos. Así, como se muestra en el Esquema 1, se plantea para la síntesis del sideróforo la obtención de tres fragmentos clave **A-C**. Como principales productos de partida se considera la utilización de L/D-cisteína y 2-metil-L-cisteína, que servirían para generar tres de los cinco centros quirales de la molécula (C9, C12 y C17). Para la creación del centro quiral en C13 se recurre, como veremos más adelante, a una reacción tipo Reformatsky diastereoselectiva.³³ Teniendo en cuenta la tendencia a epimerizar del centro quiral C10, se plantea construir el anillo de tiazolidina que lo contiene al final de la síntesis.

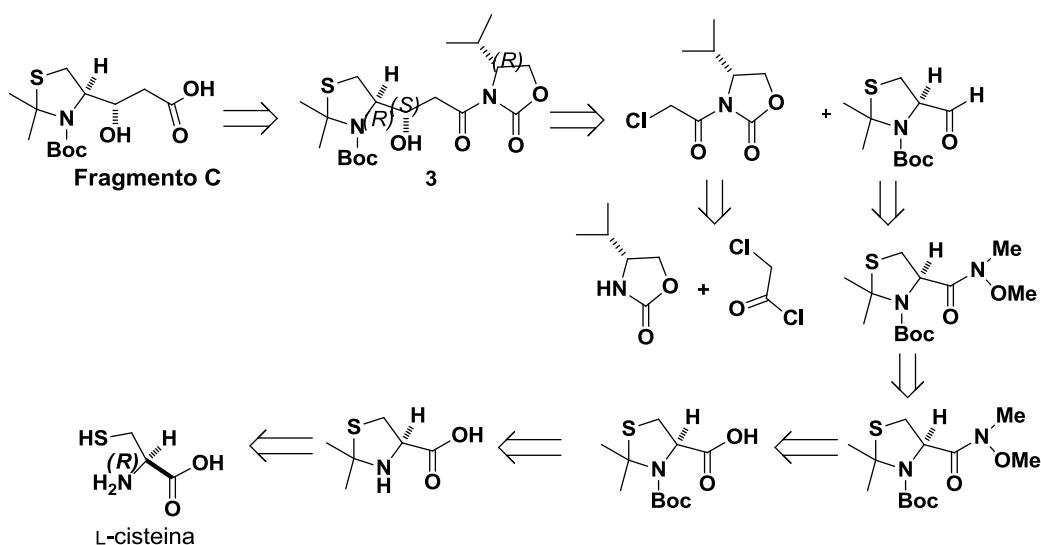
Luego de plantear el análisis retrosintético general, se presentan los de los fragmentos **A** y **C**, los cuales presentan los intermedios clave objetivo del presente trabajo **2** y **3** (Esquemas 2 y 3, respectivamente):



Esquema 2. Análisis retrosintético del fragmento **A** de piscibactina **1**.

³³ Nelson, C. G.; Burke, T. R. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 733–738

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

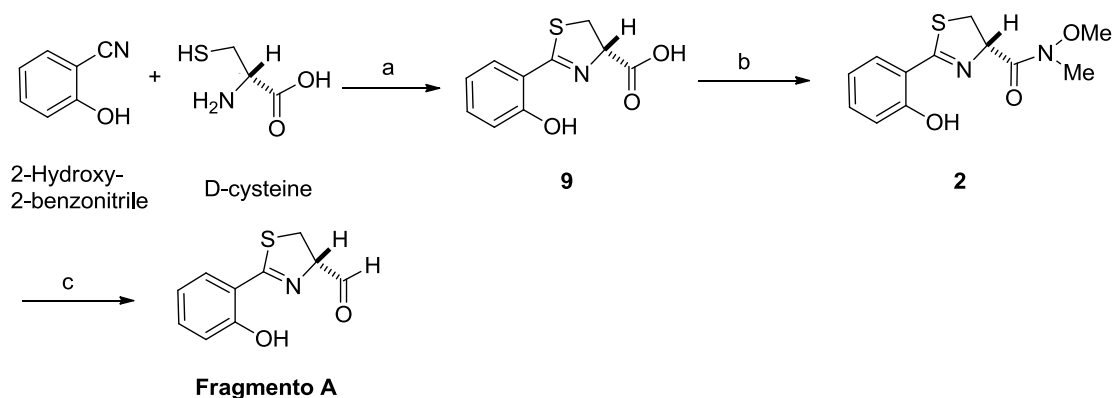


Esquema 3. Análisis retrosintético del fragmento C de piscibactina 1.

3.2 Propuestas sintéticas para la preparación de los intermedios objetivo.

3.2.1. Propuesta sintética para la preparación del fragmento A/intermedio 2.

El análisis retrosintético visto en la sección 3.1. permite plantear la síntesis del fragmento A, y por lo tanto la preparación del intermedio objetivo 2, a partir una secuencia lineal en 3 etapas partiendo de D-cisteína (Esquema 4).



Reactivos y condiciones:

a) Tampón fosfato 0.1 M pH 6.4/MeOH (1:1). b) EDCI, MeHN-OMe.HCl, DMF, DIPEA. c) LiAlH₄/THF)

Esquema 4. Propuesta sintética para la preparación de 2.

La reacción de condensación entre D-cisteína y 2-hidroxi-2-benzonitrilo permitiría acceder al ácido tiazolidínico 9, la posterior activación del grupo carbonilo del compuesto con EDCI y reacción con clorhidrato de N,O-dimetilhidroxilamina permitiría la obtención de la molécula objetivo 2. Por último, la reducción con hidruro de litio y aluminio del grupo amida posibilitaría el acceso al fragmento A.

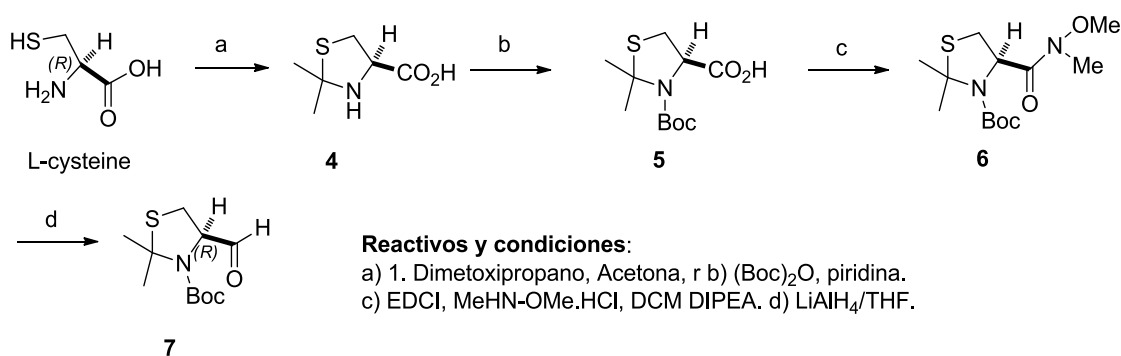
DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La gran disponibilidad del compuesto **9** en el grupo de investigación, así como la inestabilidad del fragmento **A** debido a la presencia del grupo aldehído, hace que el presente trabajo se centre en la síntesis de la molécula objetivo **2** a partir del ácido **9**.

3.2.2 Propuesta sintética para la preparación del fragmento C/intermedio 3.

El análisis retrosintético de la sección 3.1. Permite trazar, partiendo de productos disponibles comercialmente, la síntesis del fragmento **C** (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.

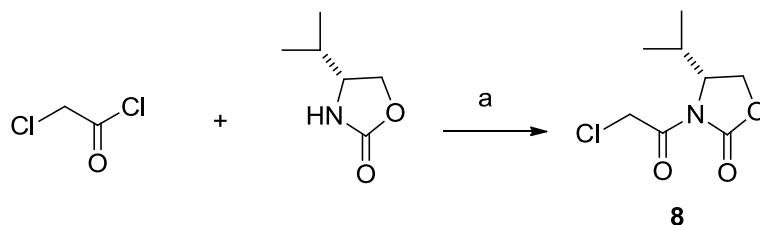
3.2.2.1. Síntesis del aldehído tiazolidínico (**7**).



Esquema 5. Propuesta sintética para la preparación de **7**.

En el Esquema 5 se muestra la síntesis propuesta para el aldehído **7**. Así, la reacción entre el clorhidrato de L-cisteína con 2,2-dimetoxipropano en acetona a reflujo, conduciría a la formación del ácido tiazolidínico (**4**). La posterior protección del grupo amino del heterociclo con el anhídrido de *tert*-butoxicarbonilo (**5**), seguido de la activación del grupo carboxílico con EDCI y posterior ataque de la *N,O*-dimetilhidroxilamina al grupo carbonilo permitiría la formación de la amida de Weinreb (**6**). Por último, la reducción de la amida **6** a aldehído en presencia de LiAlH₄ como agente reductor, conduciría a la formación del aldehído tiazolidínico (**7**), el cual será utilizado posteriormente en la siguiente etapa de acoplamiento conducente a la molécula objetivo **3** (sección 3.2.2.3).

3.2.2.2. Síntesis del α -cloroacetiloxazolidinona (**8**).



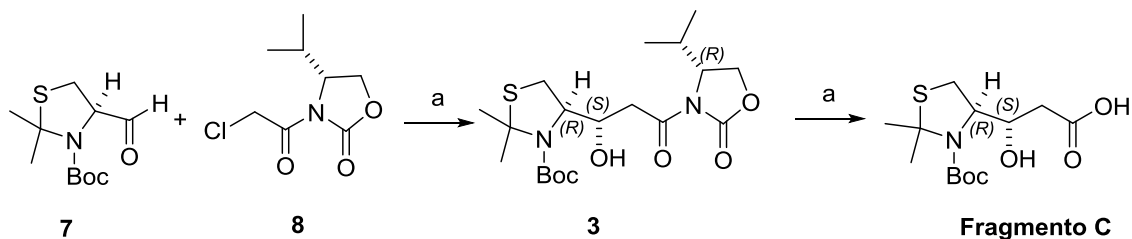
Reactivos y condiciones:
a) nBuLi, Et₂O, -78°C, ClCH₂COCl.

Esquema 6. Propuesta sintética para la preparación de **8**.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el Esquema 6, la síntesis de α -cloroacetiloxazolidinona se plantea en la reacción entre el cloruro de cloroacetilo recién destilado con el auxiliar quiral de Evans en presencia de $n\text{BuLi}$, lo que conduciría a la formación de la α -cloroacetiloxazolidinona (**8**).³⁴

3.2.2.3. Reacción de Reformastky mediada por SmI_2 y eliminación del auxiliar quiral. Síntesis del intermedio objetivo 3.



Reactivos y condiciones:

a) SmI_2/THF -78°C . b) LiOH , $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$

Esquema 7. Propuesta sintética para la preparación de **3**.

En esta secuencia (Esquema 7), se propone la síntesis del intermedio clave objetivo **3** a partir de la reacción de Reformastky mediada por SmI_2 entre el aldehído tiazolidínico (**7**) y la α -cloroacetiloxazolidinona **8**. La utilización del auxiliar quiral de Evans permite anticipar un alto grado de diastereoselectividad en la reacción. La última etapa en la síntesis del fragmento C se correspondería con la hidrólisis del auxiliar quiral de Evans en presencia de LiOH .³⁵

³⁴ 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.

³⁵ En el presente trabajo, esta reacción no se ha realizado debido a la inestabilidad del compuesto aun en condiciones de atmosfera inerte, vacío, y bajas temperaturas (-30°C)

3.3. Desarrollo de los procesos sintéticos.

3.3.1. Síntesis del intermedio sintético 2.

Como se mencionó anteriormente, al disponerse en los laboratorios del grupo de investigación de gran cantidad de producto **9**, se parte desde este reactivo en la formación del intermedio objetivo **2**.

3.3.1.1. Formación de la amida de Weinreb 2.

Antecedentes:

El uso de *N*-metoxi-*N*-metilamidas como equivalentes sintéticos del grupo carbonilo, fue publicado por primera vez por Nahm y Weinreb, y desde entonces este grupo funcional se ha hecho muy popular en síntesis orgánica.³⁶ Normalmente, estos derivados se sintetizan por tratamiento de *N,O*-dimetilhidroxilamina o *N,N*-dimetilhidroxilaminas con un grupo ácido carboxílico activado.³⁷

La facilidad de preparación, la limitación en la aparición de productos asociados a reacciones secundarias durante la adición nucleófila, y la fácil reducción selectiva a aldehídos de estas amidas, ha impulsado su popularidad en su uso en síntesis orgánica.

El principal uso sintético de amidas de Weinreb se deriva de su reactividad hacia los nucleófilos. Pueden ser útiles para la adición de reactivos de Grignard o de alquil litio para producir cetonas. Otras ventajas se ven en la reducción selectiva de las amidas de Weinreb a los correspondientes aldehídos. La capacidad de quelatación de las amidas proporciona un intermedio estable que no forma el aldehído hasta el tratamiento acuoso. Esto evita además la sobrerreducción del grupo funcional, que ocurre comúnmente en las reducciones de otros grupos carbonílicos en presencia de agentes reductores fuertes como el LiAlH_4 .³⁸ Así, puede concluirse que muchas de las ventajas asociadas al uso de las amidas de Weinreb, se pueden atribuir al intermedio tetraédrico de metal-quelato que se forma por la adición de nucleófilos a *N*-metoxi-*N*-metilamidas.

Las amidas de Weinreb han sido empleadas como intermedios útiles en la preparación de cetonas, aldehídos, acetilenos, heterociclos, productos naturales y también como un resto prolífico en la reducción de Birch y reacciones de Wittig.³⁹

Resultados propios:

Para la formación de la amida de Weinreb **2** se utilizará la metodología descrita en la síntesis del sideróforo pioquelina.³¹ Así, la amida se forma mediante la activación del grupo carboxílico de **9** con EDCI seguido de la reacción con clorhidrato de *N,O*-dimetilhidroxilamina en CH_2Cl_2 seco (Esquema 8).

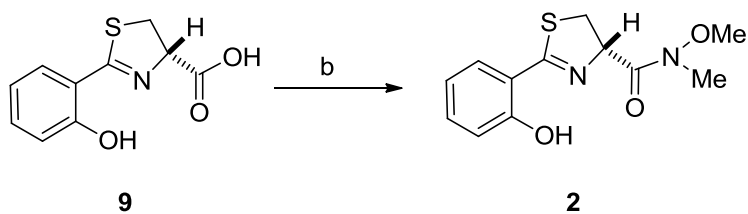
³⁶ Balasubramaniam, S.; Aidhen, I. S. *Synthesis* **2008**, 3707–3738

³⁷ Nahm, S.; Weinreb, S. M. *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 3815–3818

³⁸ White, J. M.; Tunoori, A. R.; Georg, G. I. *Chem Innovation* **2000**, 30, 17-21

³⁹ Sharnaba, K. M.; Nagendra, G.; Vishwanatha, T. M.; Sureshababu, V. *Tetrahedron Lett.* **2013**, 54, 478-482.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS



Reactivos y condiciones:

b) EDCI, MeHN-OMe.HCl, DCM, DIPEA (12 hrs), 0°C (54%)

Esquema 8. Síntesis de la amida de Weinreb **2**.

La reacción se siguió por cromatografía de capa fina, pudiendo observar después de 12 horas de reacción que se había formado producto quedando una pequeña cantidad de material de partida. La elaboración de la reacción se realiza mediante la eliminación del disolvente y reactivos volátiles a presión reducida.

Por último, el producto se purifica por columna cromatográfica en gel de sílice, usando eluyente AcOEt/Hex: 1/1. Aquellas fracciones que presentaron la misma composición por capa fina fueron juntadas y el disolvente eliminado a vacío, cuyos datos espectroscópicos de ^1H RMN coincidieron con los descritos en la bibliografía para el mismo compuesto.³¹ rindiendo así en un 54% el producto **2**

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.3.2. Síntesis del intermedio sintético 3.

3.3.2.1. Formación del anillo tiazolidínico 4.

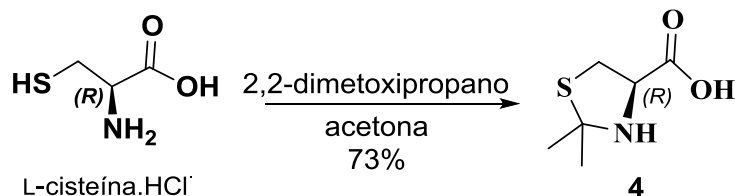
Resultados propios:

El producto **4** es obtenido partiendo del reactivo comercial clorhidrato de L-cisteína, y siguiendo las condiciones descritas en la bibliografía (síntesis del antibiótico micacocidina).⁴⁰

La formación del anillo tiazolidínico se lleva a cabo bajo condiciones inertes, con un exceso de 2,2-dimetoxipropano frente al clorhidrato de L-cisteína. Se hace reaccionar (1 eq) de la clorhidrato de L-cisteína hidratada con 2,2-dimetoxipropano (5 eq) en acetona seca a reflujo durante 4 días. La formación del anillo tiazolidínico es un proceso de condensación reversible, por lo que la reacción se ve favorecida en el sentido de los productos con el exceso de uno de los reactivos.

Ha de especificarse que en las condiciones descritas en la bibliografía se describe que la reacción se mantiene en reflujo a 1.5 horas.⁴¹ Este tiempo de reacción fue modificado en el presente trabajo, debido a la baja cantidad de producto obtenida en relación con la de producto de partida sin reaccionar.

Según lo propuesto (Esquema 9), se generó el producto deseado **4** con un rendimiento alto (73%), si bien la reacción debe llevarse a cabo a baja escala, ya que el rendimiento de la reacción baja considerablemente con cantidades de material de partida superiores a 5g.



Esquema 9. Síntesis de la tiazolidina **4**.

El producto obtenido fue caracterizado por técnicas de elucidación estructural (RMN de ¹H y de ¹³C y de espectrometría de masas (ESI positivo de baja y alta resolución)). Los datos espectroscópicos de ¹H-RMN coincidieron con los descritos en la bibliografía para el mismo compuesto.⁴⁰

Además, el producto **4** se identifica fácilmente por comparación del espectro ¹H RMN del material obtenido con respecto al de la L-cisteína, debido a la aparición de dos singletes que integra por tres hidrógenos cada uno a 1.76 y 1.74 ppm, correspondiente a los seis hidrógenos de los dos metilos del anillo.

⁴⁰ Ino, A.; Hasegawa, Y.; Murabayashi, A. *Tetrahedron lett.* **1998**, *39*, 3509-3512.

⁴¹ Kemp, D. S.; Carey, R. I. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 3640-3646.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.3.2.2. Protección del grupo amino del compuesto **4** como carbamato de *tert*-butoxicarbonilo (**5**).

Antecedentes:

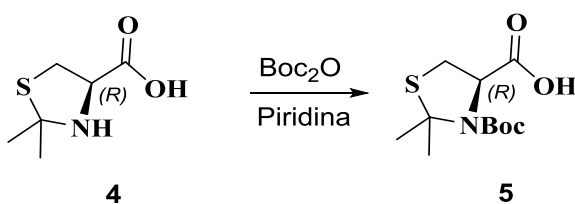
La protección de grupos α -amino libres de los aminoácidos se realiza debido a que los aminoácidos presentan grupos químicamente reactivos: carboxilo (-COOH), amino (-NH₂), tiol (-SH) e hidroxilo (-OH) que producen reacciones laterales indeseables. Para impedir estos tipos de reacciones no deseadas, se usan grupos protectores para los grupos reactivos, dejando libres los grupos necesarios a emplear.⁴²

El grupo *tert*-butoxicarbonilo (Boc), es uno de los grupos protectores de grupos α -amino libres más importantes. Presenta una gran estabilidad a la hidrogenación catalítica, a álcalis e hidracinas, proporcionando Boc-aminoácidos libres de contaminantes y con altos rendimientos por procedimientos convencionales; además, es rápidamente eliminado del extremo amino por tratamiento con ácido moderado, lo cual facilita la síntesis.⁴³

Resultados propios:

La protección del grupo α -amino del aminoácido L-cisteína con el grupo *tert*-butoxicarbonilo (Boc), se llevó a cabo mediante reacción del compuesto **4** con anhídrido *tert*-butoxicarbonílico en piridina como base y disolvente, a temperatura ambiente y con agitación durante 3 días según lo especificado en la bibliografía para la síntesis del mismo compuesto (Esquema 10).⁴⁴

La reacción se elaboró con la adición de HCl al 5% a la mezcla de reacción, seguido de la extracción del compuesto **5** con AcOEt. Por último, se eliminó el disolvente a presión reducida. En esta reacción los reactivos de partida son eliminados durante la elaboración no precisando mayor purificación y obteniéndose el producto deseado con un rendimiento del 89%.



Esquema 10. Protección del grupo amino de **4**.

El producto obtenido fue caracterizado mediante resonancia magnética nuclear de ¹H y ¹³C y masas (ESI positivo de baja y alta resolución).

En el espectro ¹H-RMN del compuesto se observa la aparición de dos singletes que integra por nueve hidrógenos cada uno (correspondiente a dos rotámeros) a 1.49 y 1.44

⁴² Erickson, B. W. Merrifield, B. (1976). *Solid-phase peptide synthesis*. In: *The Proteins*. Vol II. Academic Press, USA.

⁴³ Merrifield, R. B. *Science* **1965**, 150: 178-185.

⁴⁴ Duthaler, R. O.; Wyss, B. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 4667–4680

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

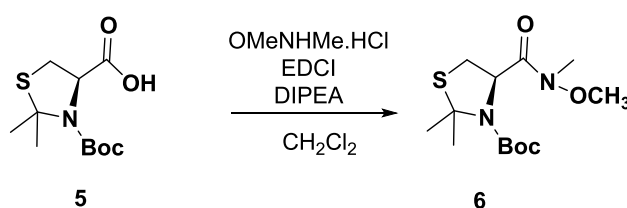
ppm correspondiente al grupo *tert*-butilo, confirmando así la protección del grupo amino.

3.3.2.3. Formación de amidas de Weinreb. Síntesis de la amida 6.

Resultados propios:

De acuerdo con lo descrito en la sección 3.3.1.1., y de forma análoga a lo descrito para la síntesis del compuesto **2**, para la formación de la amida de Weinreb **6** se siguió el método descrito en la bibliografía.^{44,32}

Así, una vez que se han protegido los grupos libres químicamente reactivos de la tiazolidina, se forma la amida de Weinreb **6** mediante la activación del grupo carboxílico de **5** con EDCI seguido de la reacción con *N,O*-dimetilhidroxilamina en CH₂Cl₂ seco (Esquema 11).



Esquema 11. Síntesis de la amida de Weinreb **6**.

La reacción se siguió por cromatografía en capa fina, pudiendo observar después de 12 horas de reacción que había desaparecido el material de partida. La elaboración de la reacción se realiza mediante la eliminación del disolvente y reactivos volátiles a presión reducida.

Por último, el producto se purifica por columna cromatográfica en gel de sílice, obteniéndose el producto deseado **6** en rendimientos moderados (35%).

El producto obtenido fue caracterizado por técnicas de elucidación estructural (RMN de ¹H y de ¹³C y de espectrometría de masas ESI positivo de baja y alta resolución). Su espectro de ¹H-RMN coincide con el previamente reportado en la bibliografía.⁴⁴

El compuesto puede ser identificado fácilmente por la aparición de un singlete que integra por tres hidrógenos a 3.22 ppm, correspondientes al grupo –NMe, y a la aparición de dos singletes muy juntos que integra por tres hidrógenos a 3.77 y 3.73 ppm correspondientes al grupo –OMe.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

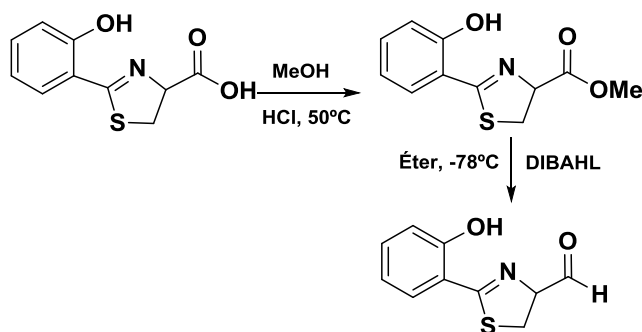
3.3.2.4. Reducción de la amida de Weinreb. Síntesis del aldehído 7.

Antecedentes:

En una de las síntesis reportadas del sideróforo pioquelina,⁴⁵ de estructura muy similar a piscibactina, se puede encontrar la explicación de porqué el aldehído 7 se prepara por reducción de una amida de Weinreb y no mediante otros métodos.

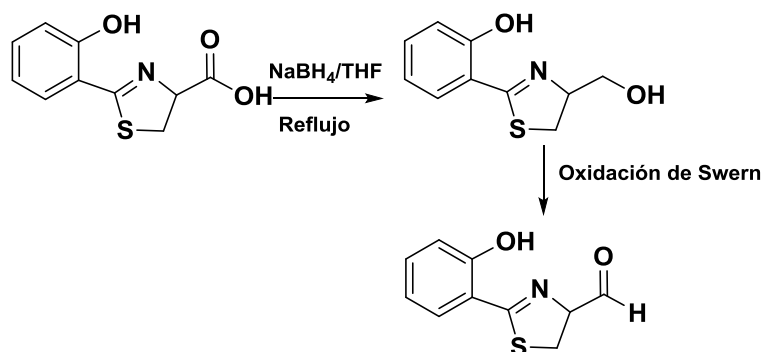
Así, para llegar al grupo aldehído se utilizaron distintas rutas previamente a la reducción de la amida de Weinreb:

- a) Transformación del ácido a éster seguido de reducción del mismo con DIBALH en condiciones anhídridas y a baja temperatura (-78°C). Esta reacción dio como resultado mezcla de producto de reacción y producto de partida en una relación 8:2. Para mejorar el rendimiento se modificaron las condiciones: disolvente utilizado, cantidad de DIBALH (más de 2 equivalentes) y temperatura de reacción (sobre 50°C) aumentado considerablemente la cantidad de alcohol (Esquema 12).



Esquema 12. Obtención de un aldehído por reducción de un éster metílico con DIBALH.⁴⁵

- b) Otra ruta propuesta de formación de aldehído a partir del ácido carboxílico fue la reducción del éster a alcohol con borohidruro sódico, con una posterior oxidación a través de diferentes métodos: Swern, Moffat o Collins, mostrando finalmente que la aromatización del alcohol es más rápida que la oxidación del alcohol.^{46,47}



Esquema 13. Obtención de un aldehído por reducción de un ácido a alcohol seguida de oxidación.⁴⁵

⁴⁵ Zamri, A.; Abdallah, M. A. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 249.

⁴⁶ Cuppels, D. A.; Stipanovic, R. D.; Stoessl, A.; Stothers, J. B. *Can. J. Chem.* **1987**, *65*, 2126–2130.

⁴⁷ Rinehart, K. L.; Staley, A. L.; Wilson, S. R.; Ankenbauer, R. G.; Cox, C. D. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2786–2791.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Por estos motivos se utilizó el método en la síntesis de la amida reportado en 1983 por Fehrentz y Castro⁴⁸ para la preparación de aldehídos derivados de aminoácidos protegidos basados en la reducción correspondiente a *N*-metoxi-*N*-metil hidroxamatos (amidas de Weinreb) usando exceso de LiAlH_4 (3 equivalentes) a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ obteniendo excelentes rendimientos sin epimerización.

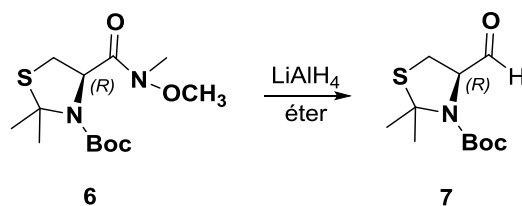
Resultados propios:

En la reducción de la amida de Weinreb se utiliza el mismo método que el empleado en la síntesis de pioquelina³¹ y discutido anteriormente, con una modificación en la temperatura y el tiempo de reacción. Así, se hace reaccionar **6** (1 eq.) con LiAlH_4 (3 eq.) en éter seco con agitación a 0°C durante 2 hrs (Esquema 14).

Se ha de indicar que se debe establecer un cuidadoso control de las condiciones de reacción, ya que exceder las 2 horas establecidas en la optimización de la reacción, o un aumento de la temperatura, podría provocar la descomposición del aldehído o la formación de productos secundarios como el alcohol.

El seguimiento de la reacción se hace mediante cromatografía de capa fina. Una vez que se observa la desaparición del material de partida, se lleva a cabo la elaboración. Así, en primer lugar se finaliza la reacción mediante la adición gota a gota de AcOEt , seguido de la adición de NaH_2PO_4 y una disolución saturada de NaHCO_3 . Se forma un precipitado gris en la disolución correspondiente a las sales de litio y aluminio. Por último se añadió CH_2Cl_2 para extraer el producto, se eliminó la fase acuosa del medio de reacción mediante la adición de MgSO_4 , se filtró sobre Celita y se eliminó el disolvente a presión reducida (con el baño de agua a temperatura ambiente para evitar que el aldehído formado se descomponga).

La purificación del producto se realizó usando una columna cromatográfica corta y rápida para evitar la descomposición del aldehído.



Esquema 14. Reducción de la amida de Weinreb **6**.

El aldehído se identificó fácilmente mediante $^1\text{H-RMN}$ por la desaparición de las señales correspondientes a los grupos $-\text{OMe}$ y $-\text{NMe}$, y la subsiguiente aparición de una señal singlete a 9.57 ppm característica de los aldehídos.

La alta sensibilidad del aldehído **6** hace que deba ser sintetizado inmediatamente antes de su utilización en el acoplamiento con la α -cloroacetiloxazolidinona en la reacción de Reformastky, manteniéndolo durante el periodo de tiempo intermedio entre

⁴⁸ Fehrentz, J. A.; Castro, B. *Synthesis* **1983**, 676–678.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

una reacción y otra en condiciones de vacío dentro de un agente desecante potente (pentóxido de fosforo).

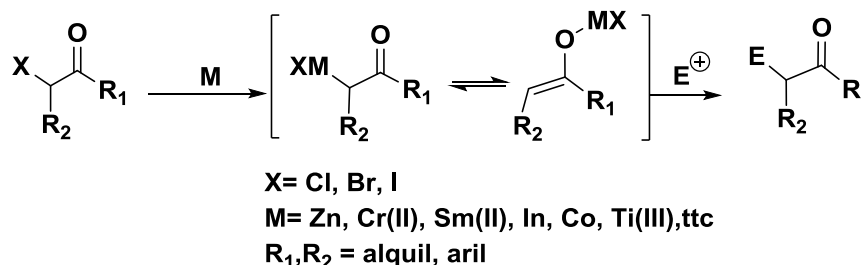
3.3.2.5. Reacción de acoplamiento Reformastky mediada por SmI_2

Antecedentes:

La reacción de Reformastky fue definida como una reacción inducida entre un α -haloéster y una aldehído o cetona. El alcance de la reacción se ha extendido más allá de la definición original, incluyendo en la actualidad una extensa variedad de grupos electrófilos.

El mecanismo de reacción puede dividirse en 2 etapas (Esquema 15):

1. El metal activado se inserta entre el enlace carbono-halógeno seguido de la formación del enolato de Zn.
2. La reacción aldólica entre el enolato de Zn y el compuesto carbonílico.



Esquema 15. Esquema general para la reacción de Reformastky.

El alcance de la reacción de Reformastky fue considerablemente ampliado con el desarrollo de procedimientos de activación del Zn:

1. Por la eliminación de la capa de óxido formada en la superficie del metal a través de agentes oxidantes como el Yodo, haluros de Mercurio, o usando compuestos de Zn-Cu o Zn-Ag.
2. Por reducción de haluros de Zn en disolución mediante varios agentes reductores como potasio, sodio, etc.

En la reacción pueden ser empleados otros metales además del Zn como: Litio, magnesio, cadmio, Bario, Indio, Germanio Níquel o Cerio.

Las desventajas comunes en el uso tradicional del Zinc metal son:

1. La falta de reactividad del Zinc debido a la formación en la superficie del metal de su óxido, haciendo necesaria la activación del Zinc mediante sales de metales.^{49,50}
2. La necesidad de un grupo halógeno α al carbonilo para la formación del enolato
3. El problema a la hora de escalar la reacción para la formación del enolato.⁵¹

⁴⁹ Maruoka, K.; Hashimoto, S.; Kitagawa, Y.; Yamamoto, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 7705

⁵⁰ Fukuzawa, S.; Matsuzawa, H.; Yoshimitsu, S. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1702-1706

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Un gran avance en la reacción de Reformastky fue la aplicación de sales metálicas con potenciales de reducción favorables. Las más importantes son: SmI_2 , CrCl_2 , y TiCl_2 . Estas reacciones pueden ser llevadas a cabo bajo condiciones suaves y con una alta estereoselectividad.

SmI_2 como mediador de la reacción de Reformastky.

El SmI_2 fue utilizado por primera vez en química orgánica por Kagan y colaboradores en 1977.^{52,53} Desde entonces ha sido empleado en una amplia variedad de reacciones y ha aparecido en cientos de síntesis.⁵⁴ El alto potencial de reducción ($E^\circ = 2.05 \text{ V}$ en presencia de HMPA)⁵⁵ permite el acceso a una amplia variedad de productos intermedios reactivos.

Debido a su alta reactividad y selectividad sintonizable, el SmI_2 es ampliamente empleado y reconocido como uno de los más importantes agentes de reducción de un solo electrón en la química sintética.

Se ve implicado como mediador en una gran variedad de reacciones, como por ejemplo: Barbier, radical-alqueno/alquino, condensaciones tipo Reformastky y aldólica, tipo pinacol, fragmentaciones y reacciones de eliminación, entre otras.

Esta síntesis se centra en la reacción de Reformastky mediada por SmI_2 la cual procede a través de una reducción inicial de un sustituyente que contiene heteroátomos vecinal a un grupo carbonilo para formar un enolato de Sm^{3+} el cual luego ataca a un grupo carbonilo (aldehído) de forma aldólica.

Dependiendo del grupo funcional inicial, existen dos posibles mecanismos para la formación del enolato intermedio:

1. Si el producto de partida posee un sustituyente vecinal con respecto al grupo funcional carbonilo o un grupo funcional carboxilo que es susceptible a una escisión reductora directa, tal como un haluro o una sulfona, el yoduro de samario puede inducir a una reducción de un solo electrón para formar un radical estabilizado, seguido de una segunda reducción que proporciona el enolato de Sm^{3+} el cual contiene un enlace oxígeno-samarario (Esquema 16).

⁵¹ Choppin, S.; Ferreiro-Medeiros, L.; Barbarottoa, A.M.; Colobert, F. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 937-949

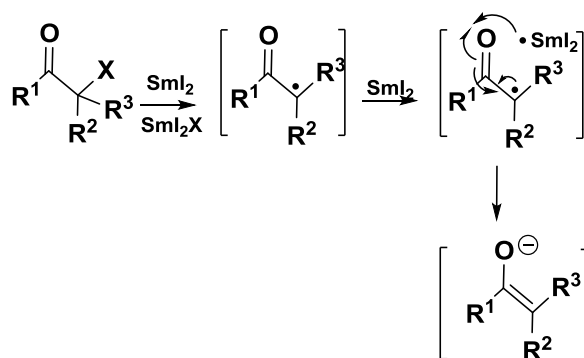
⁵² Namy, J. L.; Girard, P.; Kagan, H. B.; *New J. Chem.* **1977**, *1*, 5-7

⁵³ Girard, P.; Namy, J. L.; Kagan, H. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 2693 – 2698.

⁵⁴ Nicolaou, K. C.; Shelby, P.; ChenAngew, S. *Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7140 – 7165

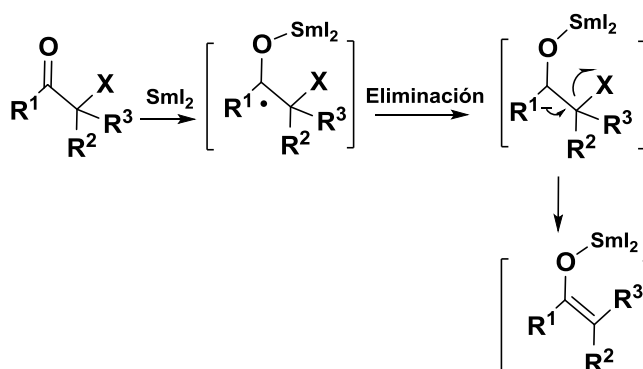
⁵⁵ a) M. Shabangi, R. A. Flowers II, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1137 – 1140; b) R. A. Flowers II, *Syn lett* **2008**, 1427 – 1439

DISCUSIÓN DE RESULTADOS



Esquema 16. Generación del enolato a partir de SmI_2 .

2. El otro mecanismo posible ocurriría si el grupo vecinal no es reductivamente lábil, procediendo la reacción a través de la formación de un radical acetilo que luego se somete a una segunda reducción para formar el carboanión, seguido de la eliminación espontánea del grupo vecinal al carbonilo inicial generando así el enolato de Sm^{3+} (Esquema 17).



Esquema 17. Generación del enolato a partir de SmI_2 .

Las reacciones de Reformatsky mediadas por SmI_2 han destacado en varias síntesis totales, sustituyendo a la reacción mediada con Zinc en casos en los que el metal no logró proporcionar el producto deseado.⁵⁴

Como se ha indicado anteriormente el SmI_2 , tiene un potencial favorable para actuar como agente reductor debido a la estabilidad del estado de oxidación (+3). Por otra parte, la solubilidad del SmI_2 en THF (~ 0.1M), y el cambio de color verde oscuro (Sm^{2+}) a amarillo (Sm^{3+}), facilita diversas transformaciones orgánicas.⁵⁶

⁵⁶ K. Gopalaiah; H. B. Kagan. *New J. Chem* **2008**, 32, 607–637

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Reacción Reformastky asimétrica estereoquímicamente controlada con SmI₂ y un agente quirral

En la síntesis del sideróforo piscibactina **1**, los reactivos de partida (aminoácidos comerciales) poseen 3 de los 5 centros quirales que presenta la molécula. Por otra parte, uno de los dos centros quirales restantes que se han de generar se plantea en la síntesis del **fragmento C**, mediante la utilización de la reacción de Reformastky mediada por SmI₂ de α -cloroacetiloxazolidinonas con aminoaldehídos el cual depende de la configuración absoluta del auxiliar quirral de Evans introducido en la α -cloroacetiloxazolidinona.

Como se mencionó anteriormente, en la reacción de Reformastky el uso de Zn como mediador en reacciones asimétricas se ve limitado debido a la baja reactividad del Zn, a su bajo rendimiento en reacciones a gran escala, su baja diastereoselectividad y a la necesidad de sustituyentes en posición alfa al grupo carbonilo. Así, con el fin de evitar estos inconvenientes, se han desarrollado varios métodos para la optimización de estas reacciones controlando la diastereoselectividad del producto final.

Uno de los métodos más populares consiste en el uso de auxiliares quirales conectados al nucleófilo o al electrófilo en reacciones mediadas por Zn, método que se demostró producía limitados rendimientos y diastereoselectividad con compuestos α -halosustituídos.

Por este motivo se optó por el uso del SmI₂, porque es un agente altamente versátil para ser aplicado en la reacción de Reformastky. Así, sin necesidad de tener sustituyentes en posición alfa al carbonilo,⁵⁷ y mediante el uso auxiliares quirales, el SmI₂ ha mostrado ser un excelente mediador en la formación del enolato, mostrando una alta diastereoselectividad que se puede explicar en base al estado de transición tipo silla que se produce en el transcurso de la reacción (Figura 11).

La reacción de Reformastky mediada por SmI₂ empleando un auxiliar quirral de Evans para la preparación de β -hidroxi- γ -aminoácidos fue estudiada por T. R Burke para la síntesis de isostatina y dolaisoleucina utilizando α -cloroacetiloxazolidinonas y aminoaldehídos.³³

Dada la similitud de la reacción desarrollada por Burke con la ruta sintética propuesta para la preparación del compuesto **3**, se aplicará este método en la preparación del compuesto intermedio objetivo.

⁵⁷ (a) Orsini, F.; Sello, G.; Manzo, A. M.; Lucci, E. M. *Tetrahedron: Asymmetry* 2005, 16, 1913. (b) Kim, S.-J.; Kang, H.-Y.; Sherman, D. H. *Synthesis* 2001, 2001, 1790. (c) John, J. P.; Jost, J.; Novikov, A. V.J. *Org. Chem.* 2009, 74, 6083.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

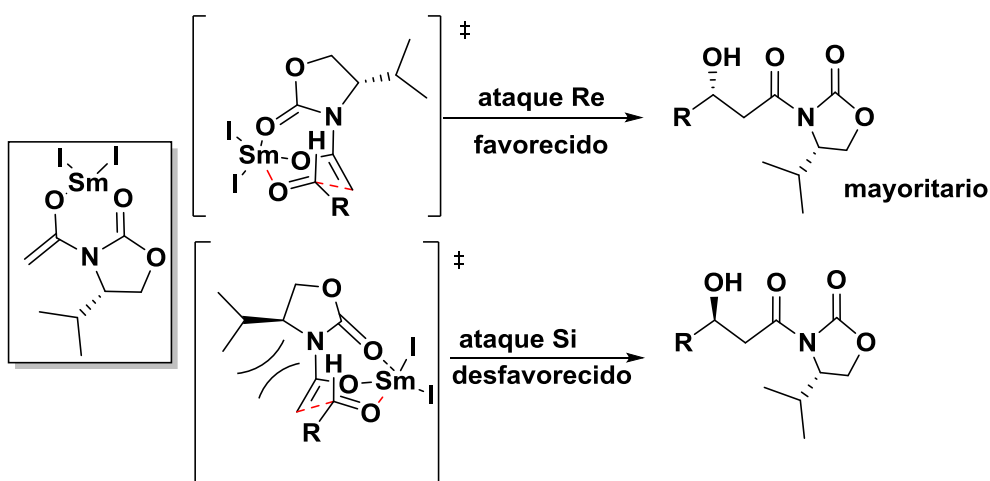


Figura 11. Modelo de estado de transición con estructura silla en la reacción Reformatsky mediada por SmI_2

Resultados propios:

Para la ejecución de la reacción de acoplamiento de Reformatsky se preparó primero la disolución de SmI_2 (0.1 M en THF). Debido a que la reacción debe llevarse a cabo en condiciones inertes, ya que la sal de samario (II) generada se oxida con mucha facilidad en presencia de humedad u oxígeno, se realizó su preparación en condiciones inertes empleando para ello un balón de se purga con una llama (con ayuda de un mechero) y una corriente de argón.

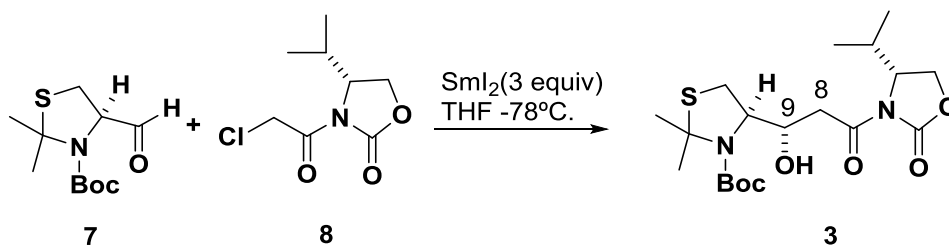
La reacción se matuvo en agitación cerrado con doble septum y parafilm, en ausencia de luz para evitar la descomposición del yodo. Se dedujo que la reacción se ha completado una vez que se observa el cambio de color inicial marrón-naranja a verde oscuro, lo que indica el paso de Sm a Sm^{2+} .

Una vez obtenida la disolución se llevó a cabo la reacción Reformatsky enfriando la disolución de SmI_2 (3 eq) a -78°C con ayuda del equipo cryocool. A continuación se preparó una disolución del α -cloroacetiloxazolidinona (1 eq) y aldehído (1.1 eq) en THF seco (0.3M), añadiéndose a continuación a la disolución de SmI_2 gota a gota. Esta reacción se dejó en agitación a -78°C bajo atmósfera de Ar durante 5 minutos (Esquerma 18).

La elaboración de la reacción se realizó mediante el paso de oxígeno a través de la disolución trayendo consigo la oxidación del Sm^{2+} (sin reaccionar) a Sm^{3+} , seguido de la adición de NH_4Cl (sat) y finalmente la extracción con éter lavando las fracciones orgánicas con NaSO_3 .

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El producto obtenido se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando Eter/Hex : 1/1 como eluyente.



Esquema 18. Reacción de Reformastky entre **7** y **8**.

El compuesto **3** se identificó mediante técnicas espectroscópicas (RMN de ^1H y ^{13}C , COSY y espectrometría de masas ESI positivo de baja y alta resolución).

El espectro de masas ESI positivo de baja resolución permite observar el ion pseudomolecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ a $m/z = 417.21$. La repetición del espectro ESI positivo a alta resolución permitió corroborar que su peso molecular se corresponde con la esperada ((+)-**HR-ESIMS** m/z : encontrada: 207.0796, calculada: 267.0797).

Mediante ^1H -RMN se puede observar la aparición de dos señales doblete a 3.17 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H) y 2.82 (d, $J = 12.5$, 1H), los cuales podrían corresponderse a los protones diastereotópicos H8 y H8' del enlace C-C formado, vecinales al nuevo centro quiral generado en C9. De la misma forma el protón del estereocentro aparece a 4.52 ppm (t, $J = 6.4$ Hz, 1H, H9). El espectro COSY confirma el acoplamiento entre los protones H8 y H8' con H9.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Aspectos Generales.

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 varias horas. Al retirarlo de la estufa se dejó llegar a temperatura ambiente en desecador a vacío, luego se cerró rápidamente con un septum y se estableció 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 que el material de vidrio se retira de la estufa a 120°C se coloca en un desecador con pentóxido de fósforo (desecante potente) a vacío. En el momento de su uso, el material es purgado con corriente de argón y calentado con un mechero de alcohol para eliminar toda la humedad posible.

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/benzofenona para THF, Et₂O; CaH₂ para CH₂Cl₂ y sulfato magnésico para la acetona. Los disolventes como la Piridina se adquieren anhidridos en su envase comercial, sellado con septum, bajo argón y tamices moleculares de 4 Å.

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 y sulfato de cerio (IV) con posterior calentamiento.

Los espectros de ¹H y ¹³C 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 y Bruker Advance 500 MHz equipado con una criosonda. Como disolventes deuterados para RMN se emplearon CDCl₃, D₂O o CD₃OD dependiendo de la polaridad de los productos.

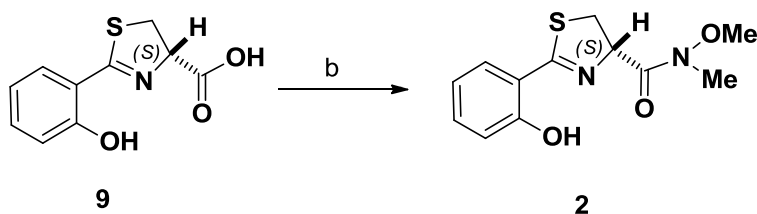
Los desplazamientos químicos fueron determinados en escala δ partes por millón (ppm), con constantes de acoplamiento (*J*) en Hercios (Hz). Las multiplicidades de las señales de ¹³C fueron determinados mediante experimentos DEPT-135.

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

Para la medida de rotación óptica se utilizó un polarímetro JASCO DIP-1000. Utilizando CH₂Cl₂ puro.

4.2. Procedimientos experimentales.

4.2.1. Preparación del intermedio sintético 2. Preparación de (S)-2-(2-hidroxifenil)-N-metoxi-N-metil-4,5-dihidrotiazol-4-carboxamida 2.



Reactivos y condiciones:

b) EDCI, MeHN-OMe.HCl, DMF, DIPEA (12 hrs), 0°C (54%)

Se hicieron reaccionar 0.501 gramos (1.24 mmoles) del ácido **9** disueltos en 20 mL de CH₂Cl₂ seco a 0°C en baño de agua-hielo, con una disolución preparada con 0.260 gramos (2.69 mmoles) de MeONHMe.HCl, 0.5 mL (2.69 mmoles) de DIPEA y 0.470 gramos (2.46 mmoles) de EDCI en 15 mL de CH₂Cl₂ seco. La mezcla se dejó en agitación 12 horas a temperatura ambiente.

Se comprobó que la reacción se completó por cromatografía en capa fina, y una vez que se observa la desaparición del material de partida, se eliminó el disolvente a presión reducida y se purificó el producto por cromatografía en columna a presión (eluyente: éter/Hex (1:1) polarizando a éter/Hex (2:1), disolución reveladora de Ce). Se obtuvieron 0.276 gramos de un sólido amarillento que fue identificado como el compuesto **9** por sus datos espectroscópicos (54%).

(S)-2-(2-hidroxifenil)-N-metoxi-N-metil-4,5-dihidrotiazol-4-carboxamida 2:

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃), δ_H ppm: 7.43 (dd, *J* = 7.8, 1.6 Hz, 1H, H₆), 7.36 (ddd, *J* = 8.3, 7.3, 1.6 Hz, 1H, H₄), 7.01 (dd *J* = 8.4, 0.9 Hz, 1H, H₃), 6.88 (ddd, *J* = 7.8, 7.3, 1.2 Hz, 1H,H), 5.70 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H, H_{4'}), 3.84 (s, 3H,-OMe), 3.78 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, H_{5'L}), 3.49 (dd, *J* = 10.9, 9.2 Hz, 1H, H_{5'H}), 3.30 (s, 3H,- N-CH₃).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃), δ_H ppm: 174.08 (C), 158.97(C), 133.34(CH), 130.80 (CH), 118.95 (CH), 117.06(CH), 116.14 (C), 74.65(CH), 61.81(O-CH₃), 32.84 (N-CH₃), 32.59 (CH₂).

(+)-LR-ESIMS *m/z*, (%): 267.08 ([M + H]⁺, 100)

(+)-HR-ESIMS *m/z*: Encontrada: 207.0796, calculada: 267.0797.

PARTE EXPERIMENTAL

20130313--A-0002-KC08.1.fid
Espectrómetro de RMN AV500 (N/I 59369), Unidade de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC

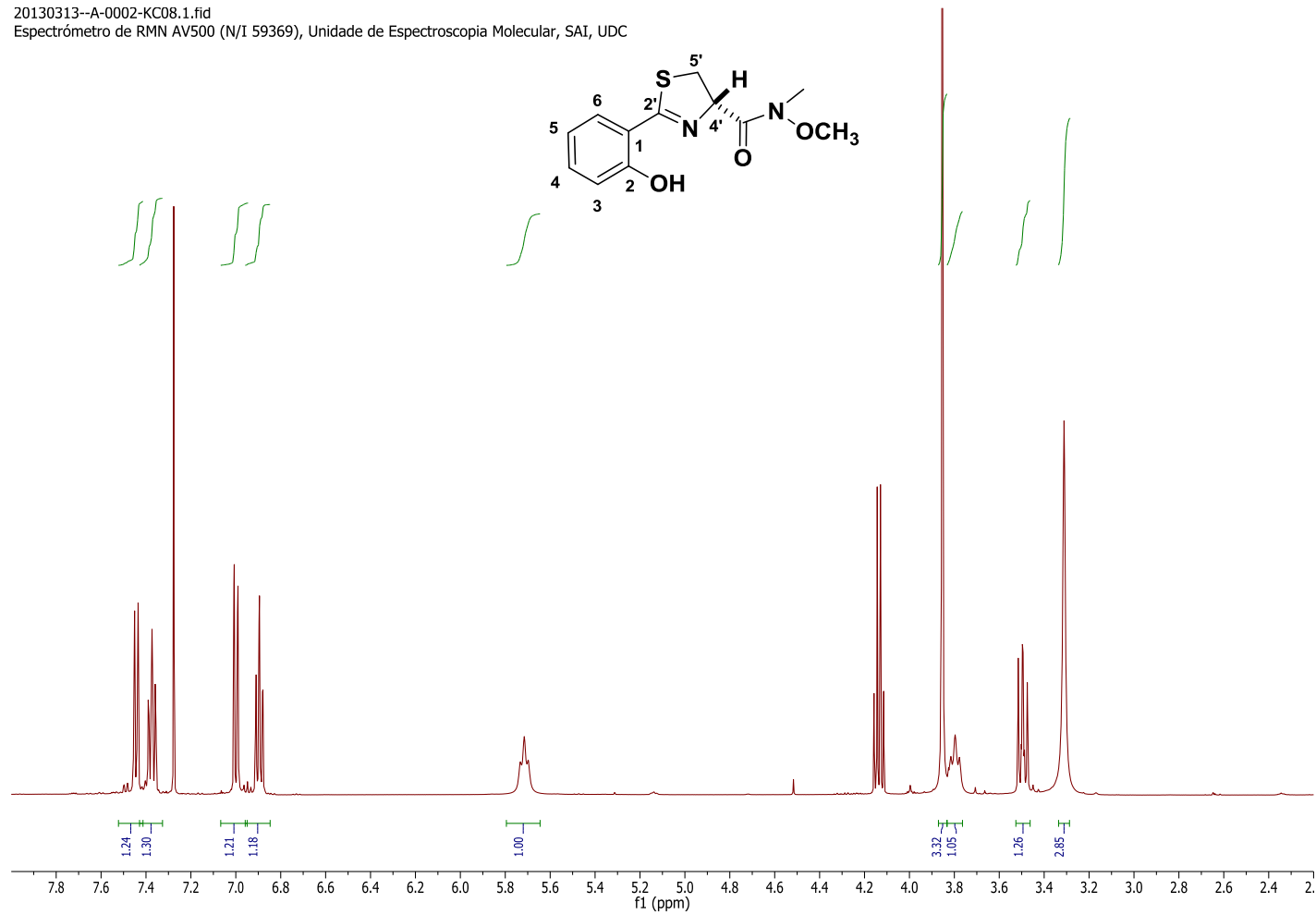
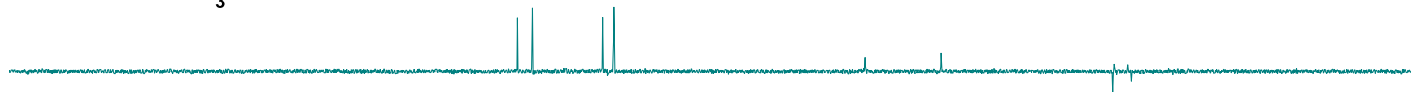
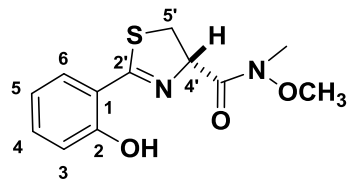


Figura 12. Espectro ¹H RMN del compuesto 9

PARTE EXPERIMENTAL

weinreb A.3.fid
Espectrómetro de RMN AV300 (N/I 36425), Unidade de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC 2



weinreb A.2.fid
Espectrómetro de RMN AV300 (N/I 36425), Unidade de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC 1

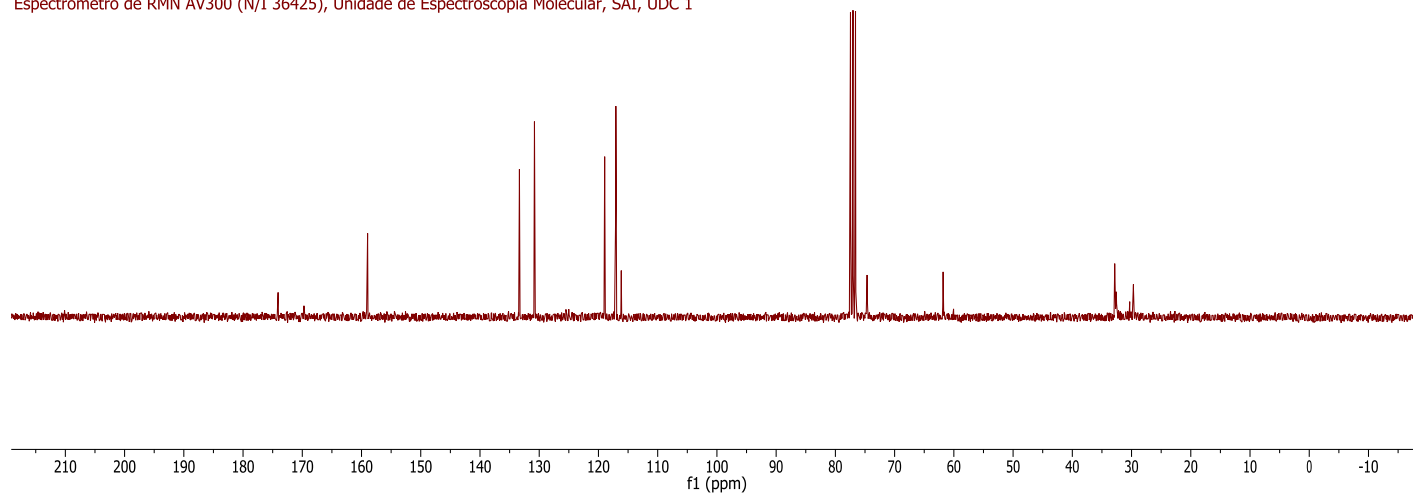


Figura 13. Espectro de ¹³C RMN del compuesto **9**.

PARTE EXPERIMENTAL

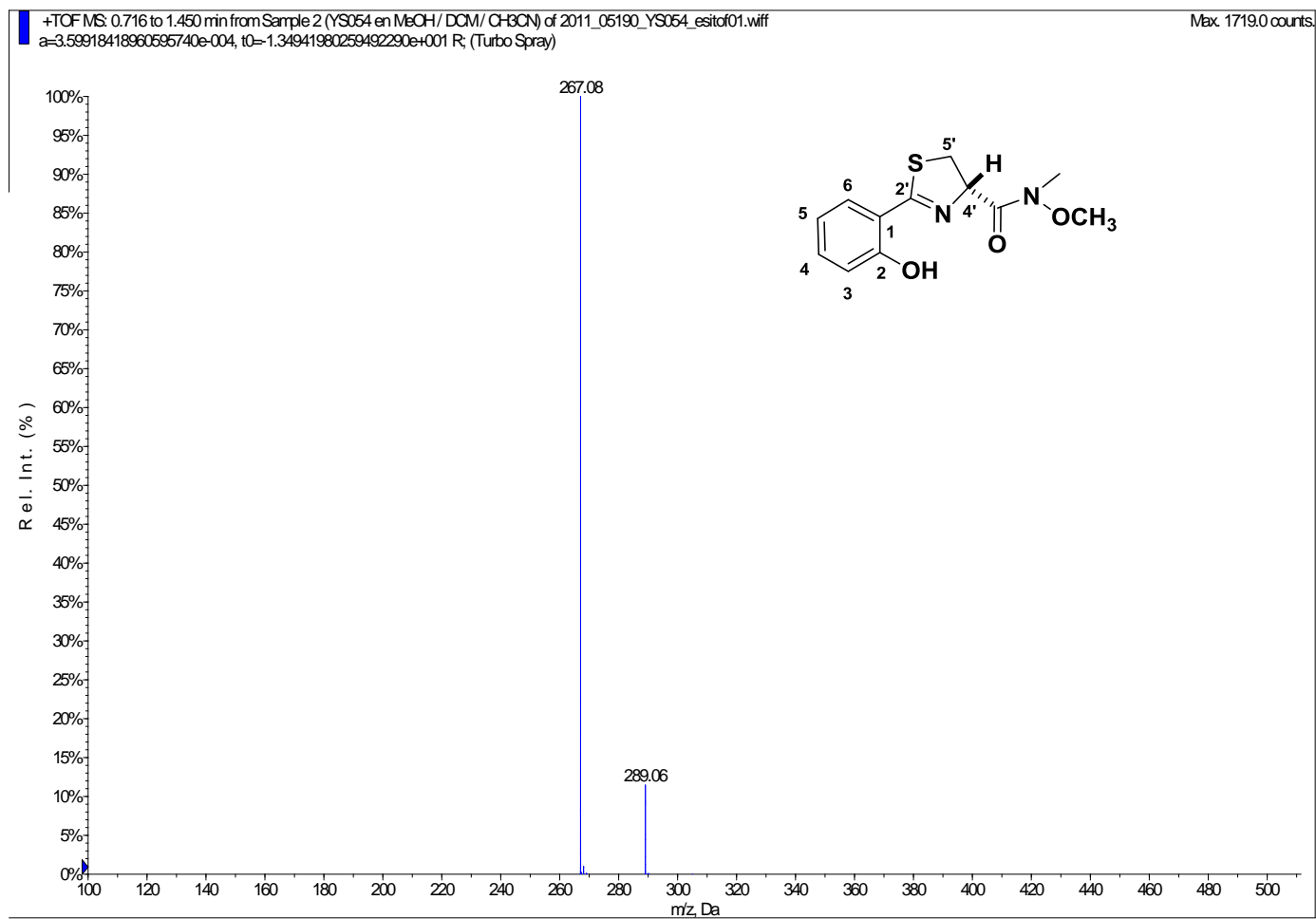


Figura 14. Espectro de masas ESI de baja resolución del compuesto **9**

PARTE EXPERIMENTAL

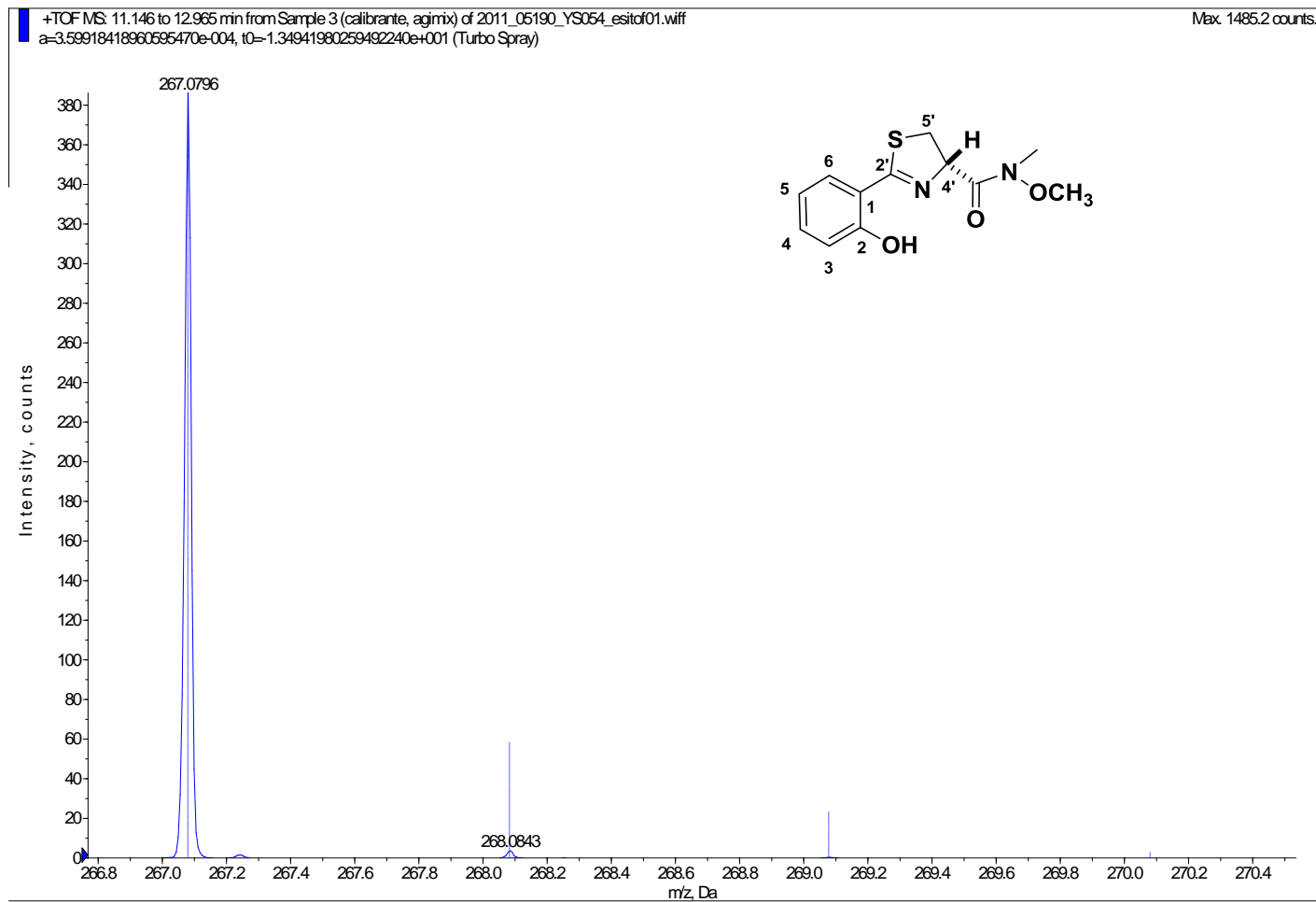
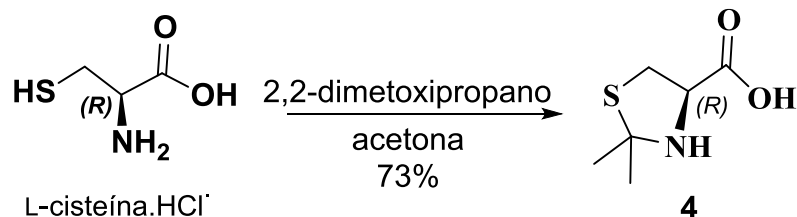


Figura 15. Espectro de masas ESI de alta resolución del compuesto **9**.

4.2.2. Preparación del intermedio sintético 3.

4.2.2.1. Síntesis del ácido (R)-2,2-dimetiltiazolidina-4-carboxílico (4).



2.50 gramos (15.86 mmoles) de la L-cisteína·HCl·H₂O se disuelven en 50 mL de acetona seca y se hacen reaccionar con 10 mL (81.32 mmoles) de 2,2-dimetoxipropano colocando la mezcla de reacción a reflujo 70°C durante 4 días.

Se filtra a vacío con placa filtrante obteniéndose un sólido blanco. Éste se lava con fracciones de 10 mL de acetona y se seca a vacío para dar finalmente 1.88 gramos (73%) del compuesto **4**.

Ácido (R)-2,2-dimetiltiazolidina-4-carboxílico **4**:

¹H-RMN (300 MHz, D₂O), δ_H ppm: 4.85 (m, 1H, H₂, debajo de pico disolvente); 3.69 (dd, *J* = 12.2, 7.9 Hz, H_{3L}), 3.55 (dd, *J* = 12.2, 7.9 Hz, 1H, H_{3H}), 1.85 y 1.83 (2_s, 3H, (CH₃)₂C).

(+)-LR-ESIMS *m/z*, (%): [M+H]⁺: 162.06 ([M + H]⁺, 100)

(+)-HR-ESIMS *m/z*: Encontrada: 162.0581, calculada: 162.0583

PARTE EXPERIMENTAL

20130225-A-0002-KC01.1.fid

Espectrómetro de RMN AV300 (N/I 36425), Unidade de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC

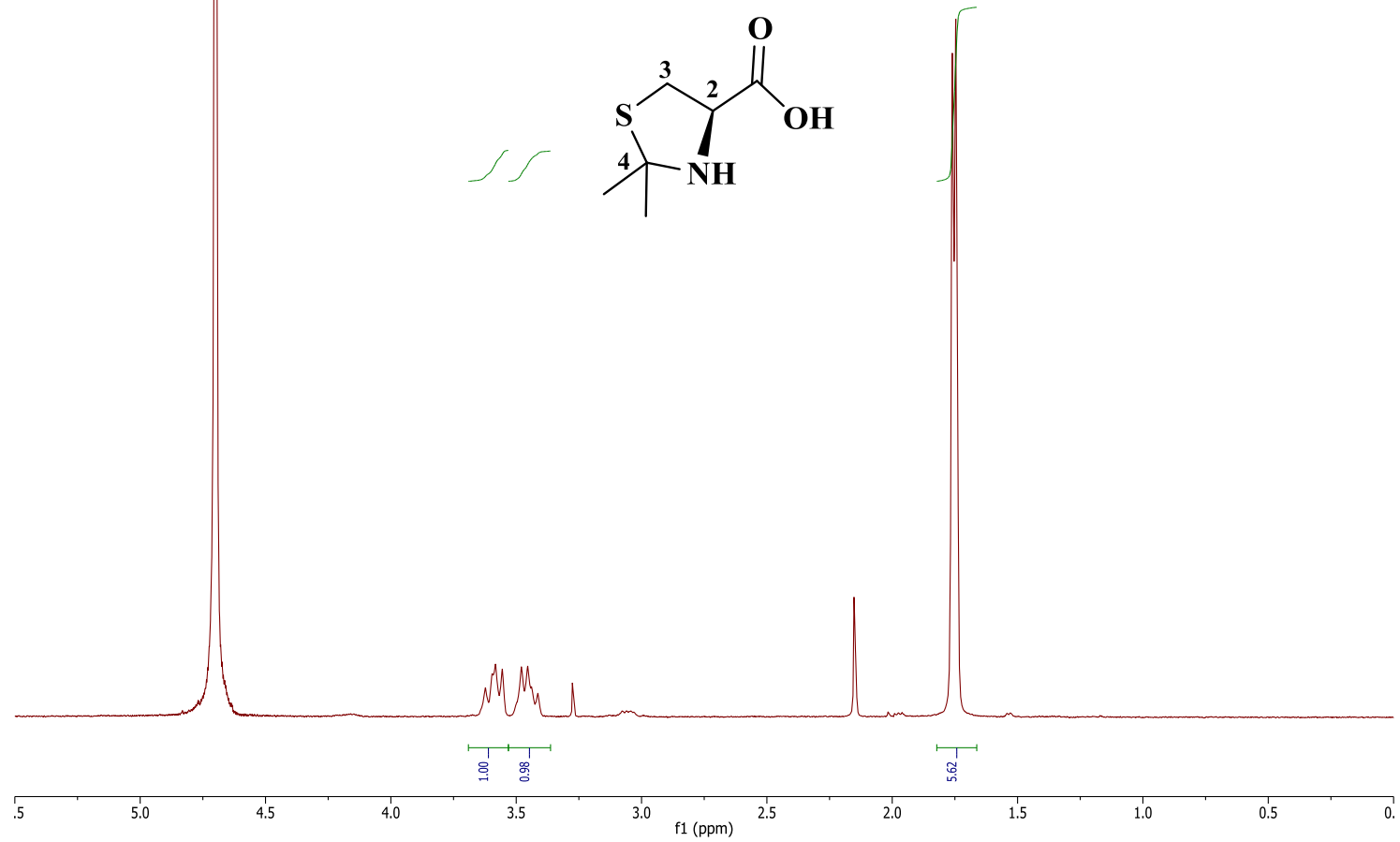


Figura 16. ¹H RMN del compuesto 4.

PARTE EXPERIMENTAL

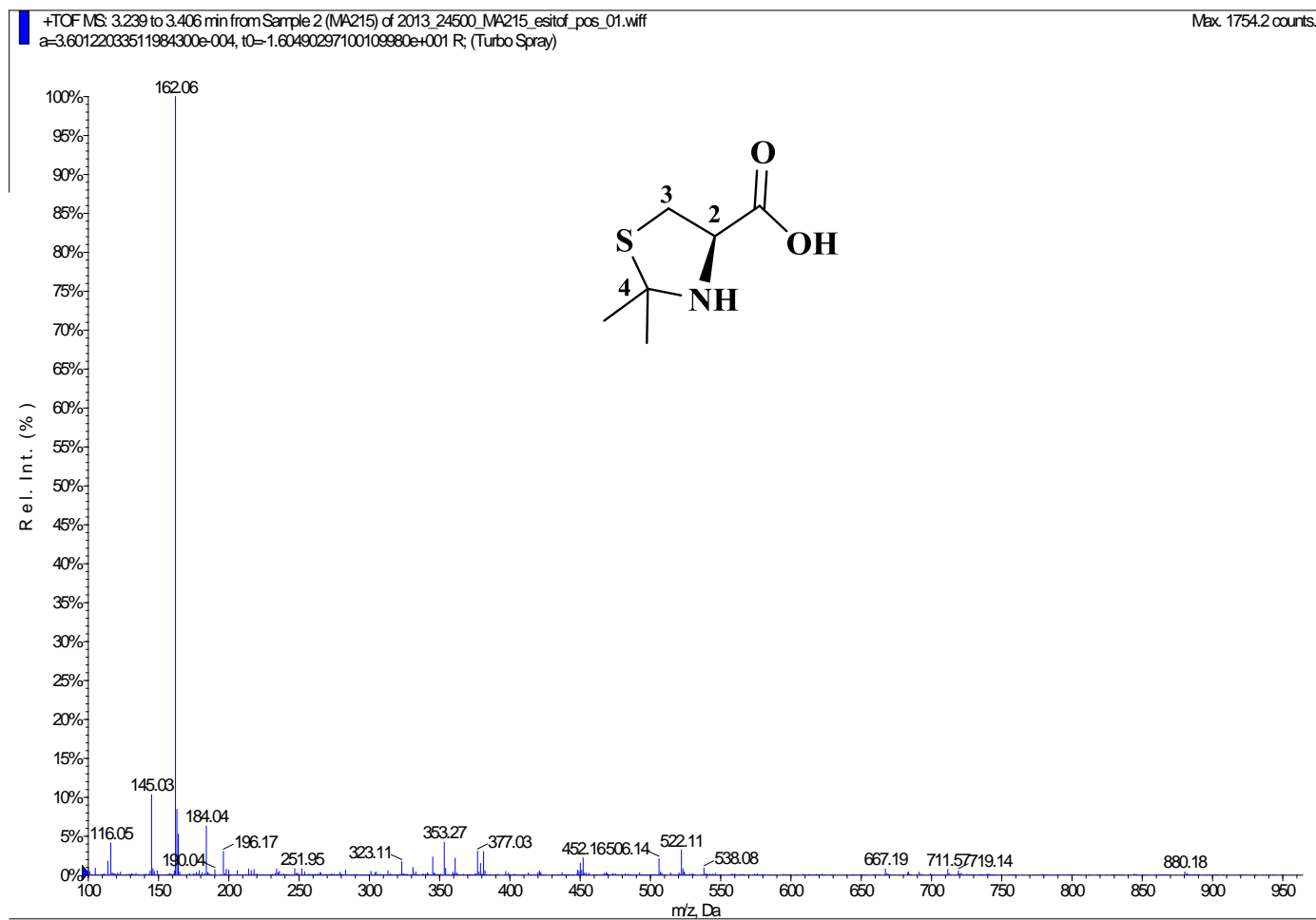


Figura 17. Espectro de masas ESI positivo de baja resolución del compuesto **4**.

PARTE EXPERIMENTAL

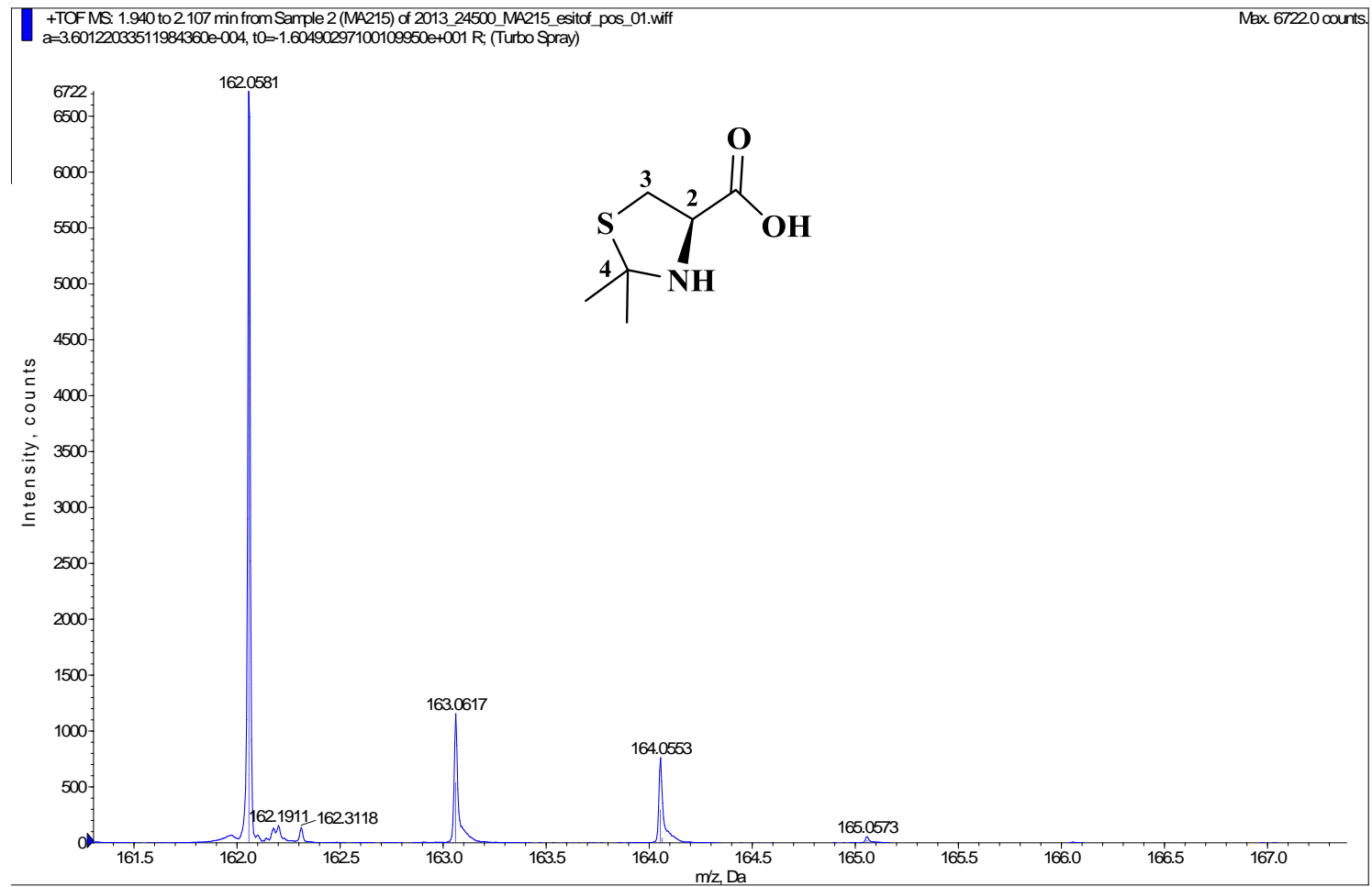
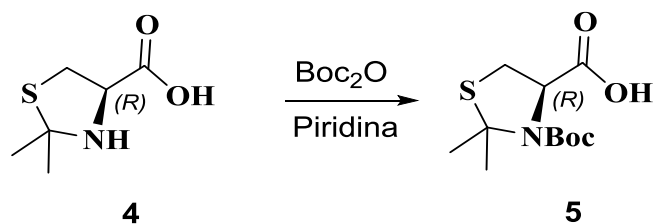


Figura 18. Espectro de masas ESI positivo de alta resolución del compuesto **4**.

PARTE EXPERIMENTAL

4.2.2.2. Síntesis del ácido (R)-3-(*tert*-butoxicarbonil)-2,2-dimetiltiazolidina-4-carboxílico (5).



1.00 gramos (6.20 mmoles) del compuesto **4** se hace reaccionar con 1.50 gr (6.82 mmoles) de Boc_2O en 10 mL de piridina seca, se deja en agitación 3 días a temperatura ambiente.

La reacción se detiene con la adición de 10 mL de HCl 5%, pasando la disolución de turbia a transparente, se extrae con 15 mL de AcOEt y se lava la fracción orgánica con 10 mL de agua y un segundo lavado con 10 mL de una disolución de NaCl. Se seca la fase orgánica con MgSO_4 y el disolvente se elimina a presión reducida para dar 1.44 gramos (89%) del compuesto **5** como un polvo blanco.

Ácido (R)-3-(*tert*-butoxicarbonil)-2,2-dimetiltiazolidina-4-carboxílico **5**:

RMN- ^1H (300 MHz, CD_3OD , 2 Rotámetros *E/Z* 1:1), δ_{H} ppm: 4.83 (dd, $J=7.0$, 3.0 Hz, H_2), 3.36 (dd, $J = 12.2$, 7.0 Hz, 1H, $\text{H}_{3\text{L}}$), 3.13 (dd, $J = 12.2$, 3.0 Hz, 1H, $\text{H}_{3\text{H}}$), 1.84 y 1.78 (2_s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 1.52 y 1.44 (2_s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$).

(+)-LR-ESIMS m/z , (%): 262.11 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 15)

(+)-HR-ESIMS m/z : encontrada: 262.1111, calculada: 262.1107.

PARTE EXPERIMENTAL

20130717-A-0002-kc-b2.1.tif
Espectrómetro de RMN AV300 (N/I 36425), Unidade de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC

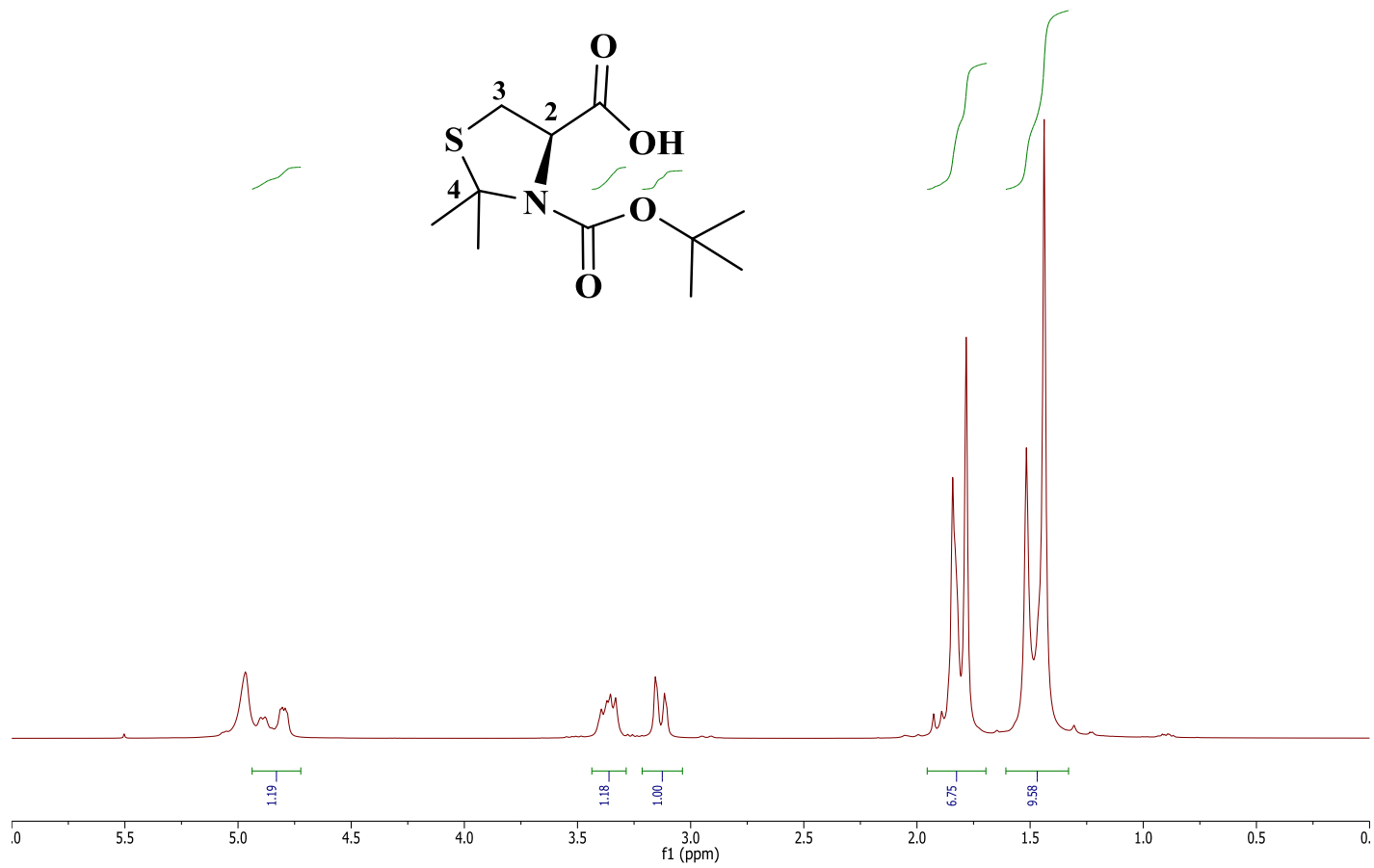


Figura 19. ¹H RMN del compuesto 5.

PARTE EXPERIMENTAL

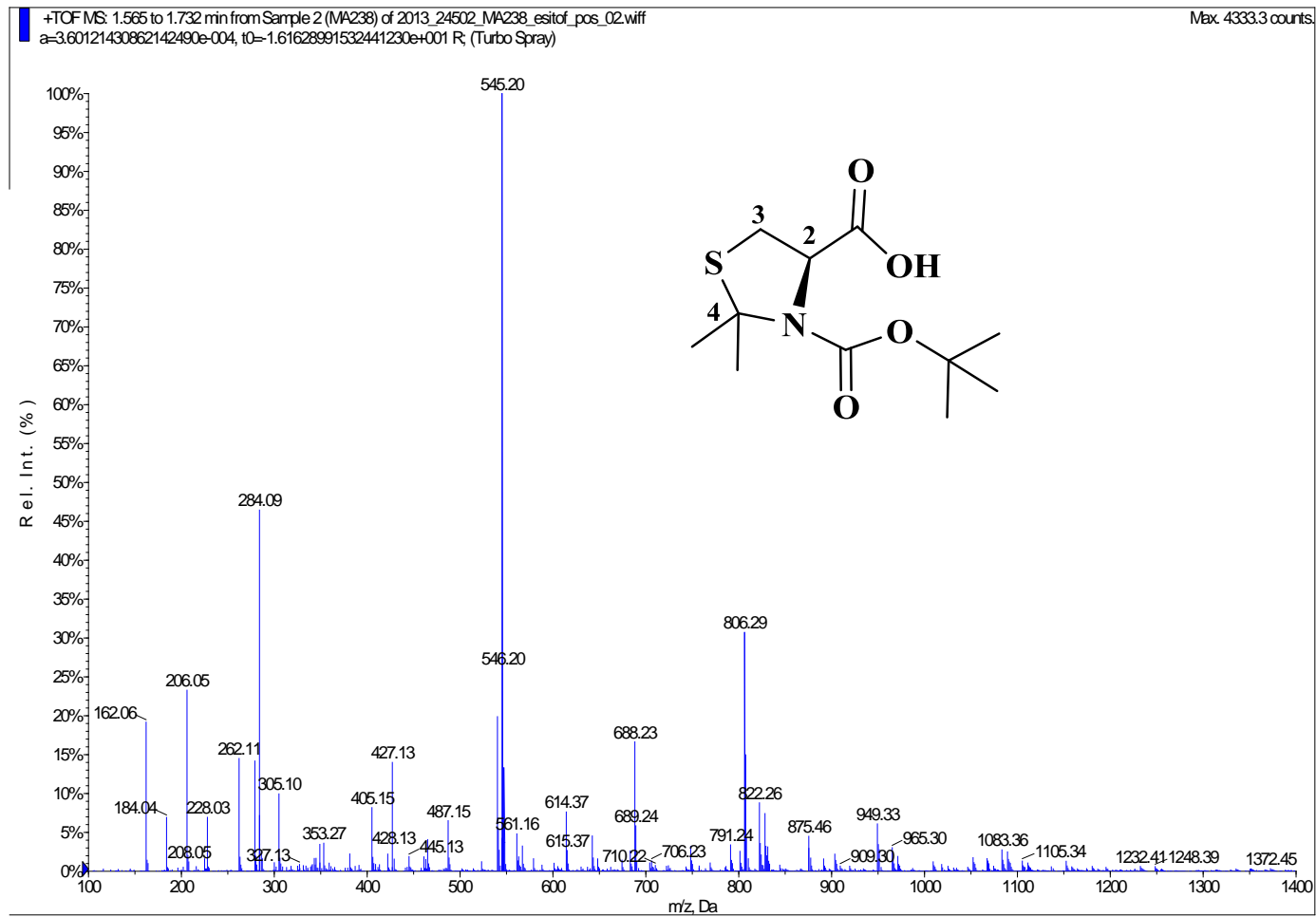


Figura 20. Espectro de masas ESI positivo de baja resolución del compuesto **5**.

PARTE EXPERIMENTAL

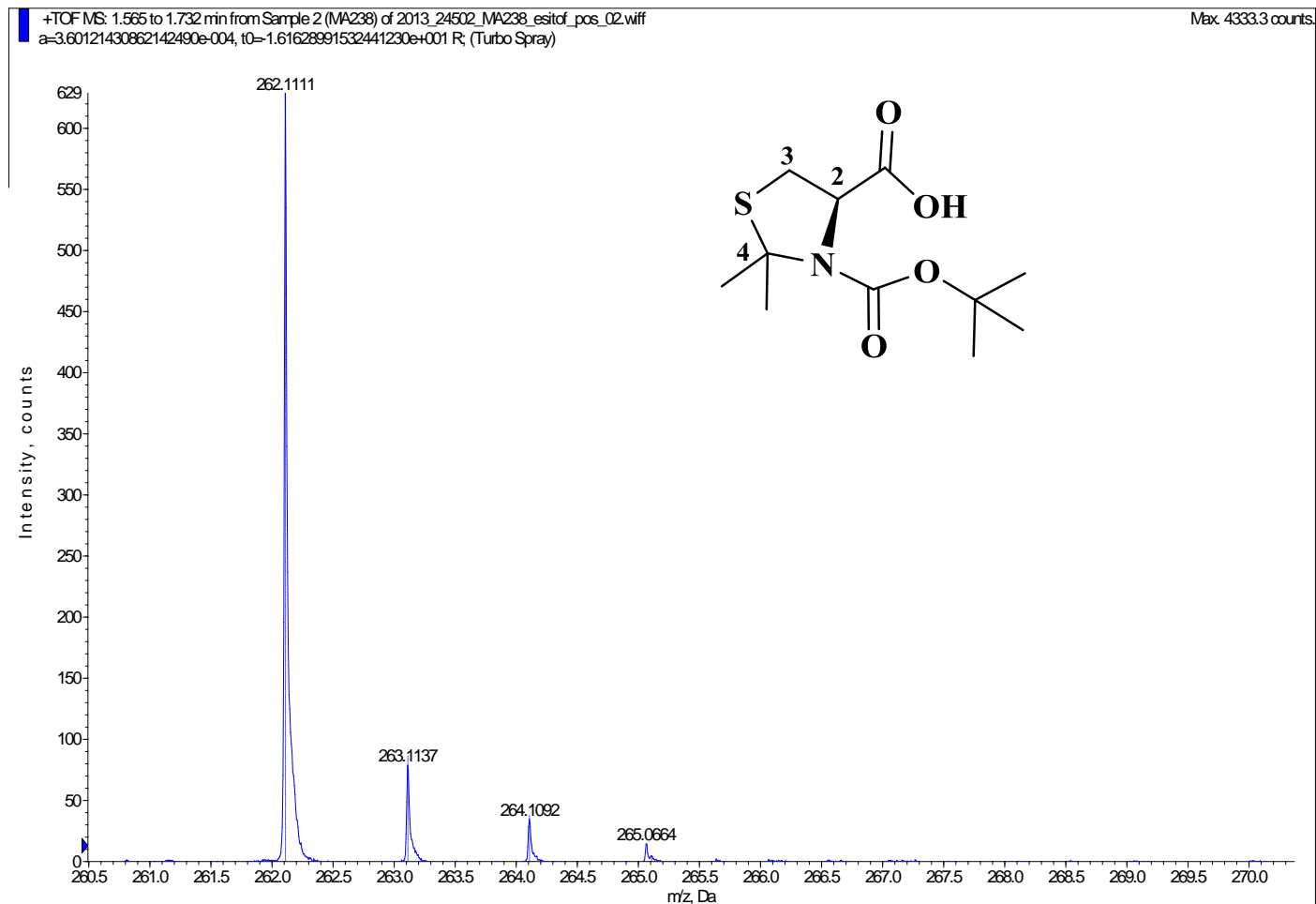
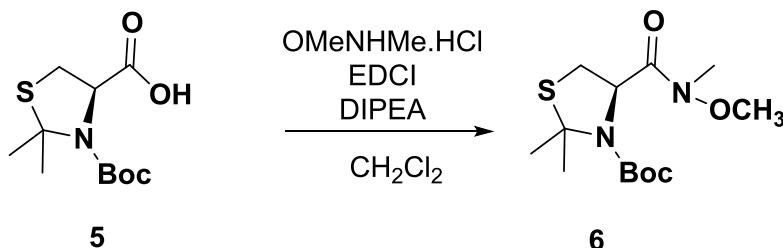


Figura 21. Espectro de masas ESI positivo de alta resolución del compuesto **5**.

PARTE EXPERIMENTAL

4.2.2.3. Síntesis de (R)-tert-butil-4-(metoxi(metil)carbamoil)-2,2-dimetiltiazolidina-3-carboxilato (6).



Se hacen reaccionar 0.501 gramos (1.91 mmoles) del ácido **5**, disueltos en 50 mL de CH_2Cl_2 seco a 0°C en baño de agua-hielo, con una disolución preparada con 0.224 gramos (2.3 mmoles) de MeONHMe.HCl , 0.4 mL (2.3 mmoles) de DIPEA y 0.403 gramos de EDCI en 45 mL de CH_2Cl_2 seco. La mezcla se dejó con agitación 12 horas a temperatura ambiente.

Se comprobó que la reacción se completa por cromatografía en capa fina, se eliminó el disolvente a presión reducida y se purificó el producto por cromatografía en columna a presión reducida (eluyente: AcOEt/Hex : 1/2, disolución reveladora de Ce). Se obtuvieron 0.203 gramos (35%) de un sólido amarillento que fue identificado por sus datos espectroscópicos como el compuesto **6**

(R)-tert-butil-4-(metoxi(metil)carbamoil)-2,2-dimetiltiazolidina-3-carboxilato (6):

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 , Rotámeros *E/Z* 1:1), δ_{H} ppm: 5.17 y 5.05 (2_{sa}, 1H, H₂), 3.77 y 3.73 (2_s, 3H, - OCH_3), 3.33 (dd, $J = 12.2, 7.3$ Hz, 1H, H_{3L}), 3.22 (2_s, 3H, - NCH_3), 2.98 (dd, $J = 12.2, 4.0$ Hz, 1H, H_{3H}), 1.79, 1.83, 1.89, 1.90 (4_s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}-4$), 1.49 y 1.41 (2_s, CH_3)₃CO).

(+)-LR-ESIMS m/z , (%): 305.15. ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 35)

(+)-HR-ESIMS m/z : Encontrada: 305.1530, calculada: 305.1529.

PARTE EXPERIMENTAL

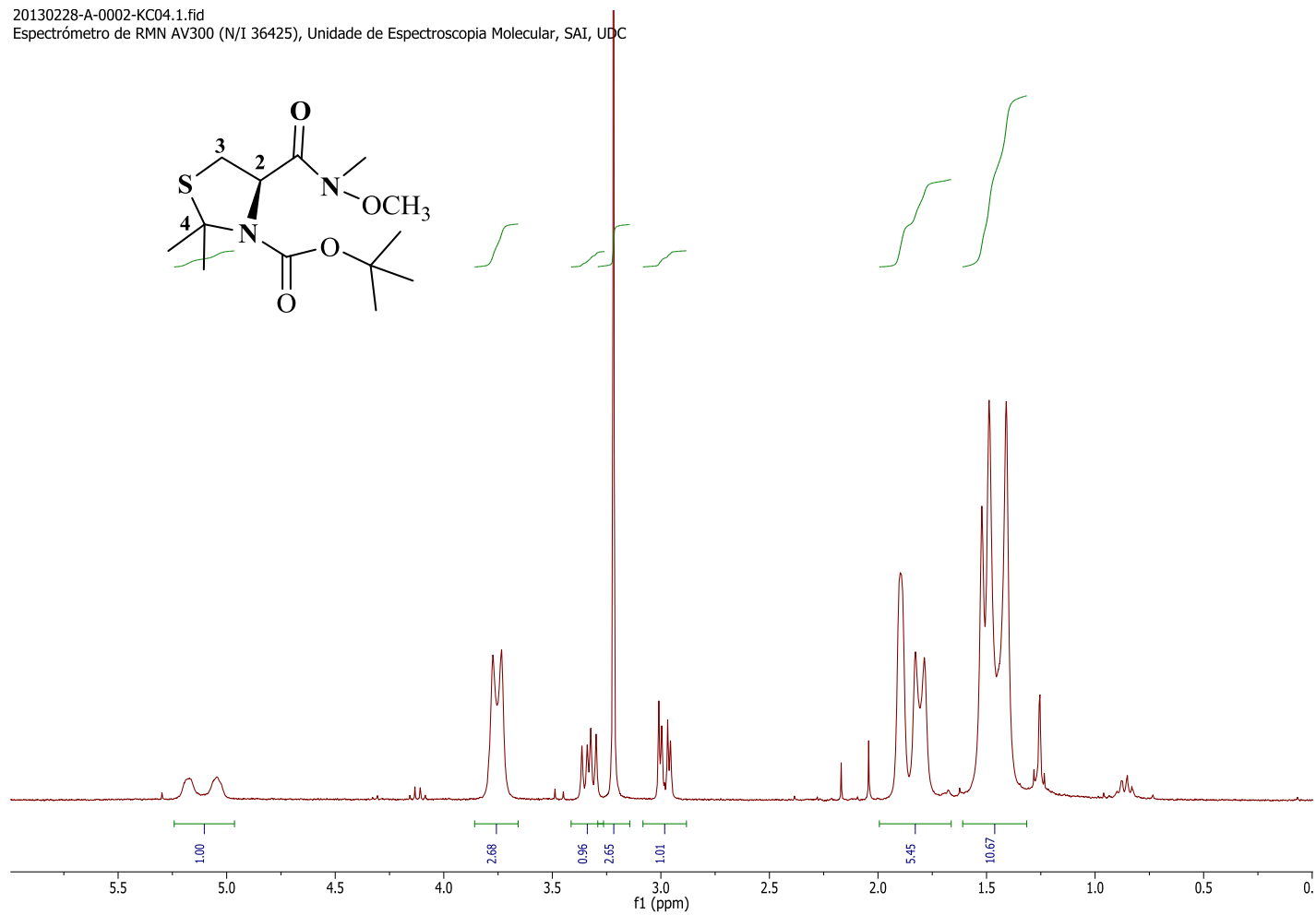


Figura 22. Espectro de ^1H RMN del compuesto 5.

PARTE EXPERIMENTAL

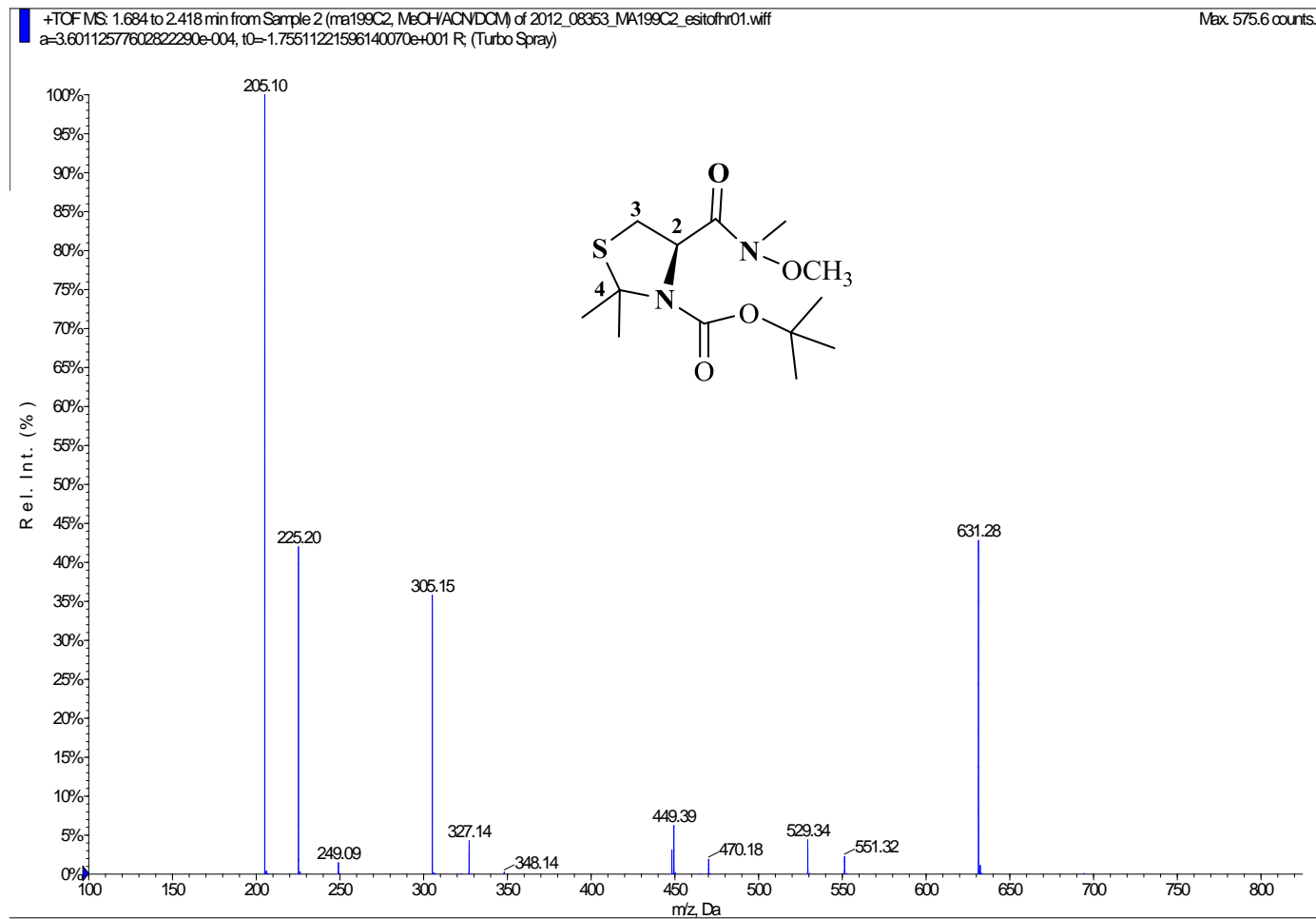


Figura 23. Espectro de masas ESI positivo de baja resolución del compuesto **6**.

PARTE EXPERIMENTAL

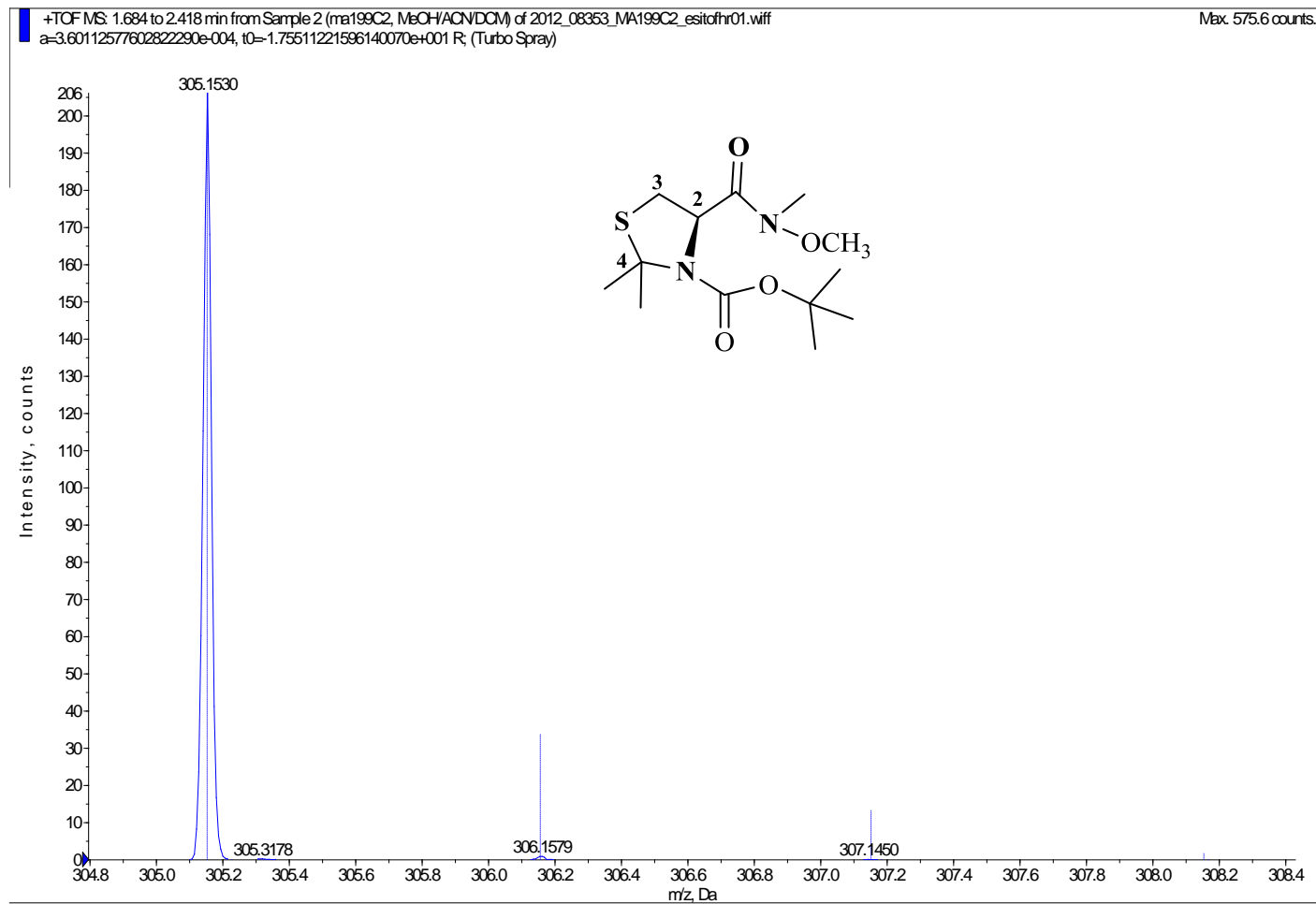
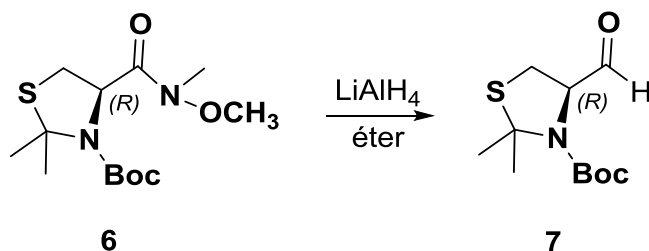


Figura 24. Espectro de masas ESI positivo de alta resolución del compuesto **6**.

PARTE EXPERIMENTAL

4.2.2.4. Síntesis de (*R*)-*tert*-butil 4-formil-2,2-dimetiltiazolidina-3-carboxilato (**7**).



Se hicieron reaccionar 0.200 gramos (0.658 mmoles) de la amida **6** con 0.075 gramos (197 mmoles) de LiAlH_4 en 5 mL de éter seco, a 0°C en baño de agua-hielo y durante 2 horas. Se comprobó que se había consumido todo el material de partida mediante CCF, elaborando la muestra de mezcla de reacción que se toma como testigo con AcOEt y HCl 5% antes de realizar la capa fina.

En la elaboración se añadieron 2.5 mL AcOEt gota a gota a la mezcla de reacción a 0°C , 1.49 gramos de NaH_2PO_4 y 1 mL de una disolución saturada de NaHCO_3 . Se formó un precipitado gris en la mezcla. Una vez finalizada la reacción se añadió 15 mL de CH_2Cl_2 y MgSO_4 formándose una suspensión. La mezcla se filtró sobre celita y se eliminó el disolvente a presión reducida en baño a T^a ambiente.

Se realizó una columna corta y rápida con Eluyente: AcOEt/Hex (1:6) y disolución de Ce como revelador.

Las fracciones que presentaron la misma composición por CCF fueron juntadas y el disolvente eliminado a presión reducida a temperatura ambiente. Se obtuvieron así 0.151 gramos (94%) de un aceite amarillento transparente que fue identificado como el aldehído **7** por sus datos espectroscópicos de ^1H RMN.

(*R*)-*tert*-butil 4-formil-2,2-dimetiltiazolidina-3-carboxilato **7**:

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , Rotámetros E/Z), δ_H ppm: 9.58 (s, 1H, -COH), 4.71 y 4.54 (m, 1H, H2), 3.0-3.24 (m, 2H, H3), 1.80 y 1.86 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 1.49 y 1.44 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$).

PARTE EXPERIMENTAL

20130503-A-0002-KC22.1.fid
Espectrómetro de RMN AV300 (N/I 36425), Unidade de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC

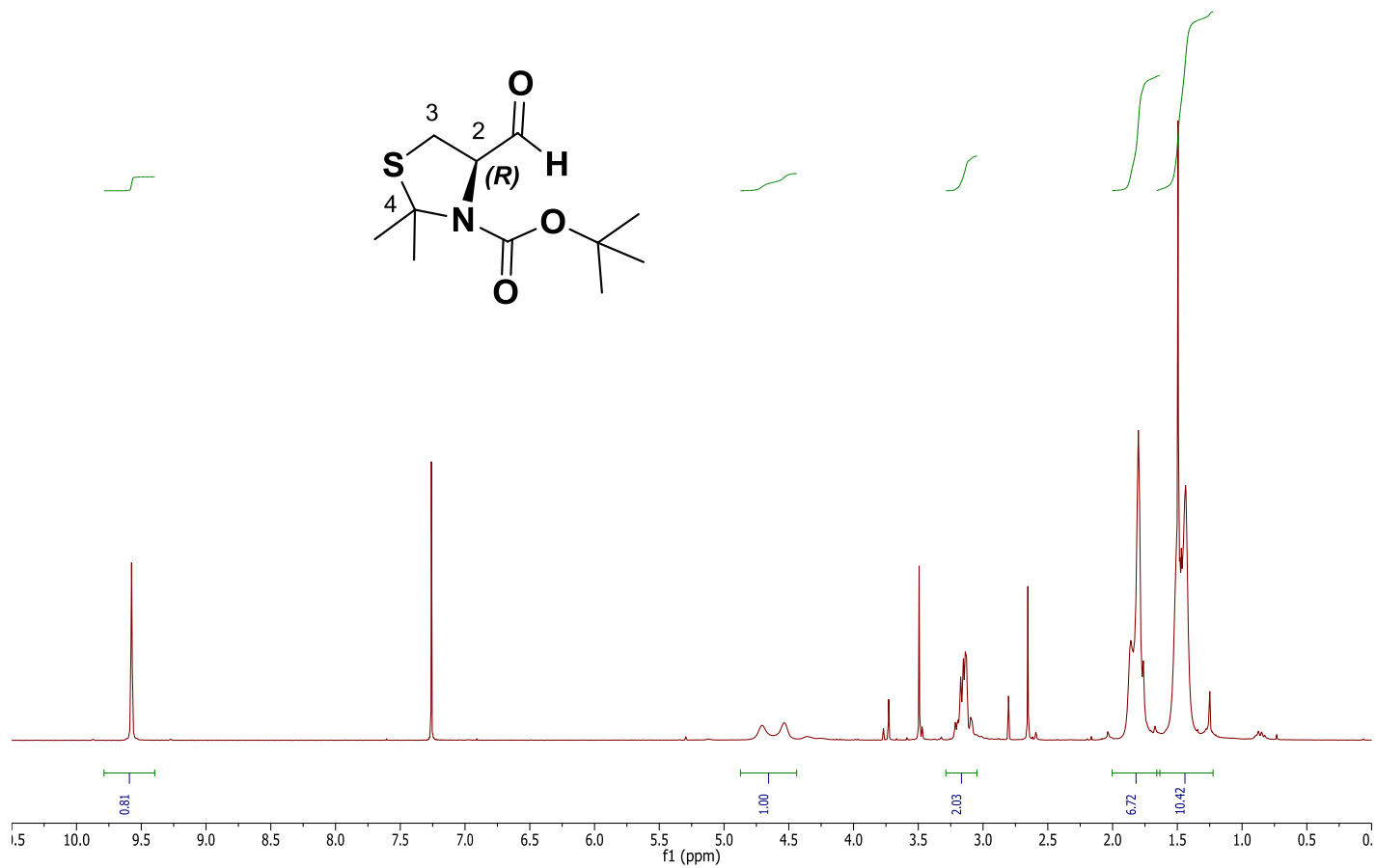
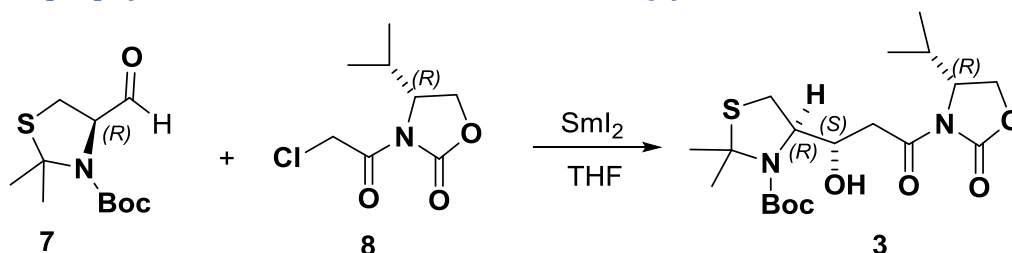


Figura 26. Espectro de ¹H RMN del compuesto 7.

PARTE EXPERIMENTAL

4.2.2.5 Síntesis de (R)-tert-butil 4-((S)-1-hidroxi-3-((R)-4-isopropil-2-oxooxazolidin-3-il)-3-oxopropil)-2,2-dimetiltiazolidina-3-carboxilato (3).



Se preparó una disolución de 0.260 gramos (1.06 mmoles) de **7** y 0.198 gramos (0.965 mmoles) de **8** en 3 mL de THF, a la que se le añadió gota a gota a 30 mL de una disolución de SmI_2 (0.1M) en THF de color verde-azul oscuro enfriada en baño de metanol a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ con el equipo cryocool. Se dejó en agitación a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 min. Una vez transcurrido el tiempo de reacción se pasó por la disolución una corriente de O_2 a temperatura ambiente cambiando la disolución de verde-azul oscuro a naranja.

A la disolución resultante se le añadió 15 mL de una disolución saturada de NH_4Cl en agitación hasta llegar a temperatura ambiente. Se extrajo el producto con 3 fracciones de 30 mL de éter y las fases orgánicas se lavaron con Na_2SO_3 (15%), cambiando la disolución su coloración de naranja a amarillento transparente.

Las fases orgánicas se secaron con MgSO_4 , se filtraron y se eliminó el disolvente a presión reducida.

El producto se purificó por cromatografía en columna a presión utilizando como eluyente éter/Hex : 1/1) y polarizando a éter/Hex 2/1. Las fracciones con igual composición en CCF se concentraron a presión reducida obteniéndose 0.275 gramos (70%) de un sólido amorfo amarillento que fue identificado como el compuesto **3** por sus datos espectroscópicos.

(R)-tert-butil,4-((S)-1-hidroxi-3-((R)-4-isopropil-2-oxooxazolidin-3-il)-3-oxopropil)-2,2-dimetiltiazolidina-3-carboxilato **3**:

RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3), δ_{H} ppm: 4.52 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H, H9), 4.45 (ddd, $J = 8.0, 3.9, 3.3$ Hz, 1H, H4), 4.38 (m, 1H, 10), 4.27 (dd, $j = 9.1, 8.1$) 4.20 (dd, $J = 9.1, 3.3$ Hz, H11), 3.25 (dd, $J = 15.8, 3.3$ Hz 1H, H11), 3.19 (d, $J = 12.5, 6.4$ Hz, 1H, H8'), 3.12 (dd, $j = 15.8, 9.1$) 2.82 (d, $J = 12.5, 1$ H, H8), 2.38 (m, 1H, H3), 1.79 (s, 3H, H14), 1.77 (s, 3H, H13) 1.47 (s, 9H, Boc), 0.91 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, H2), 0.88 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H, H1)

RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), δ_{C} ppm: 171.55 (CO), 154.13 (CO), 81.21 (C), 70.73 (CH), 67.26 (CH), 63.49 (CH_2), 60.37 (C), 58.44 (CH), 40.87 (CH_2), 30.30 (CH), 29.24 (CH_2), 28.45 (2- CH_3), 28.40 (C), 17.97 (CH_3), 14.72 (CH_3).

(+)-LR-ESIMS m/z , (%): 417.21 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 73)

(+)-HR-ESIMS m/z : Encontrada: 417.2046, calculada: 417.2053.

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -66.0$ (CHCl_3 , $c = 1.25$)

PARTE EXPERIMENTAL

SAMARIO.1.fid
Espectrómetro de RMN AV300 (N/I 36425), Unidade de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC

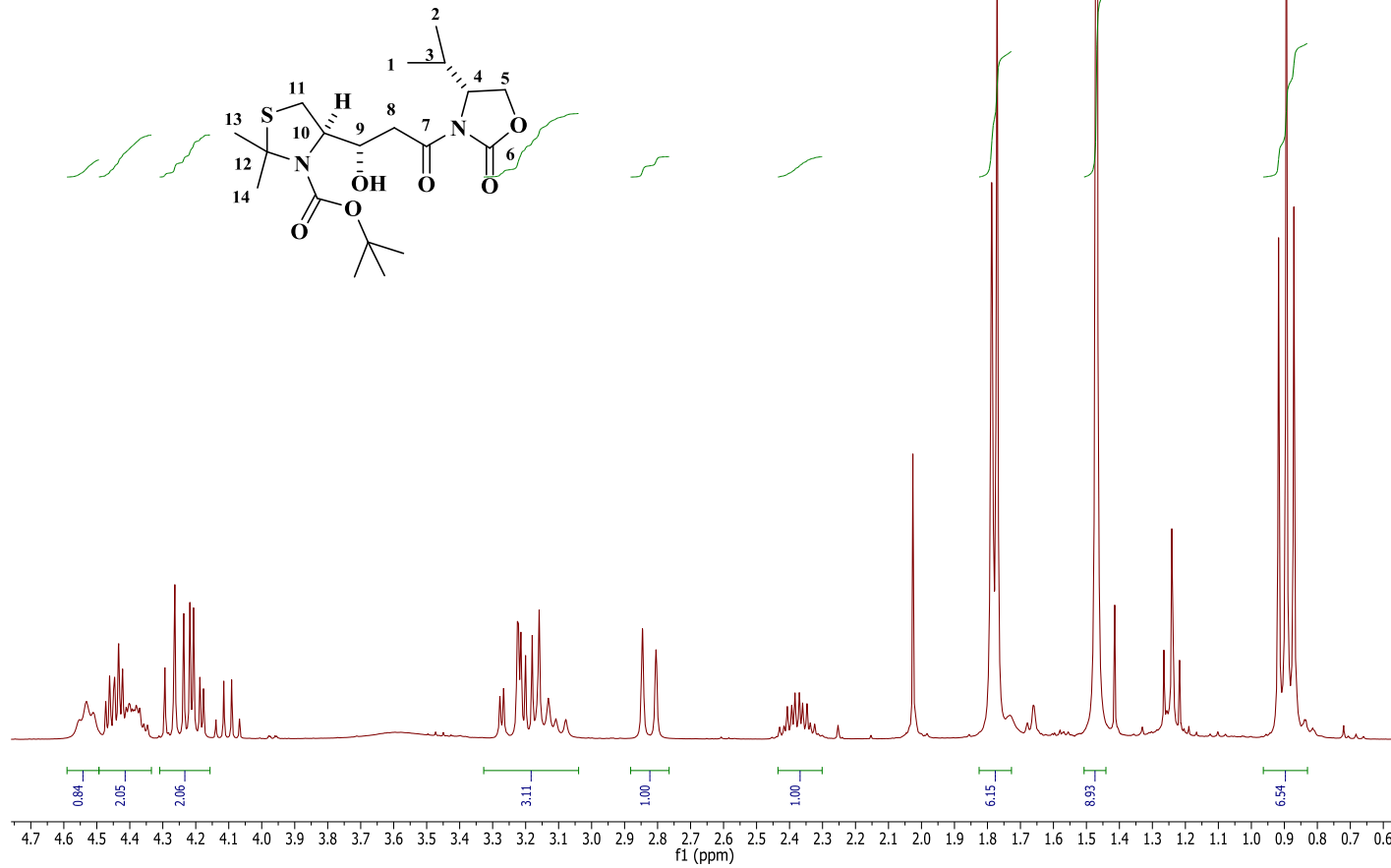
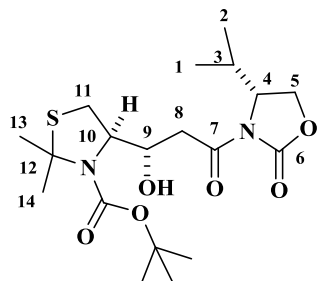


Figura 27. Espectro de ¹H RMN del compuesto 3.

PARTE EXPERIMENTAL

SAMARIO.6.fid
Espectrómetro de RMN AV500 (N/I 59369), Unidade de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC 2



SAMARIO.5.fid
Espectrómetro de RMN AV500 (N/I 59369), Unidade de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC 1

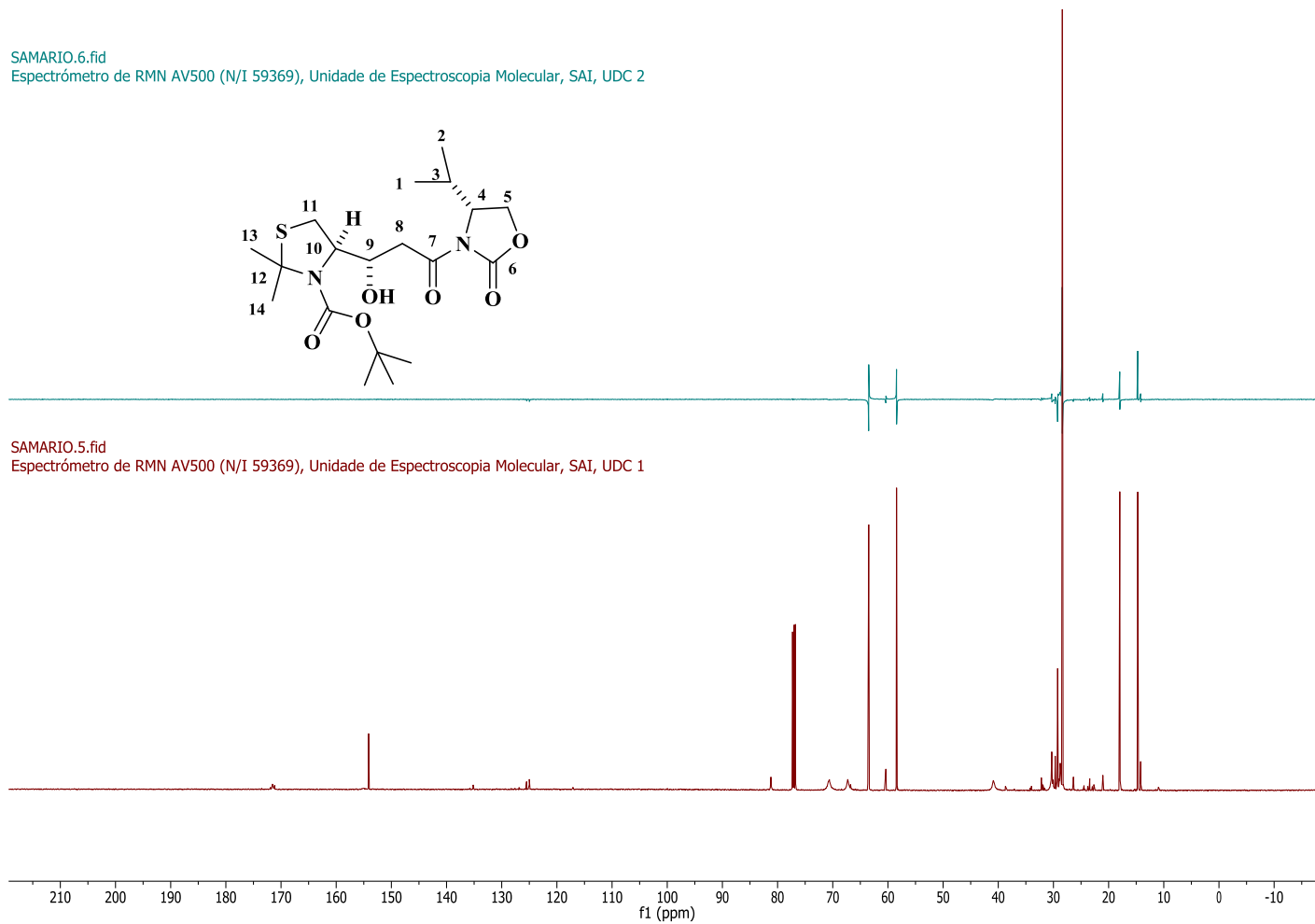


Figura 28. Espectro de ¹³C RMN del compuesto **3**

PARTE EXPERIMENTAL

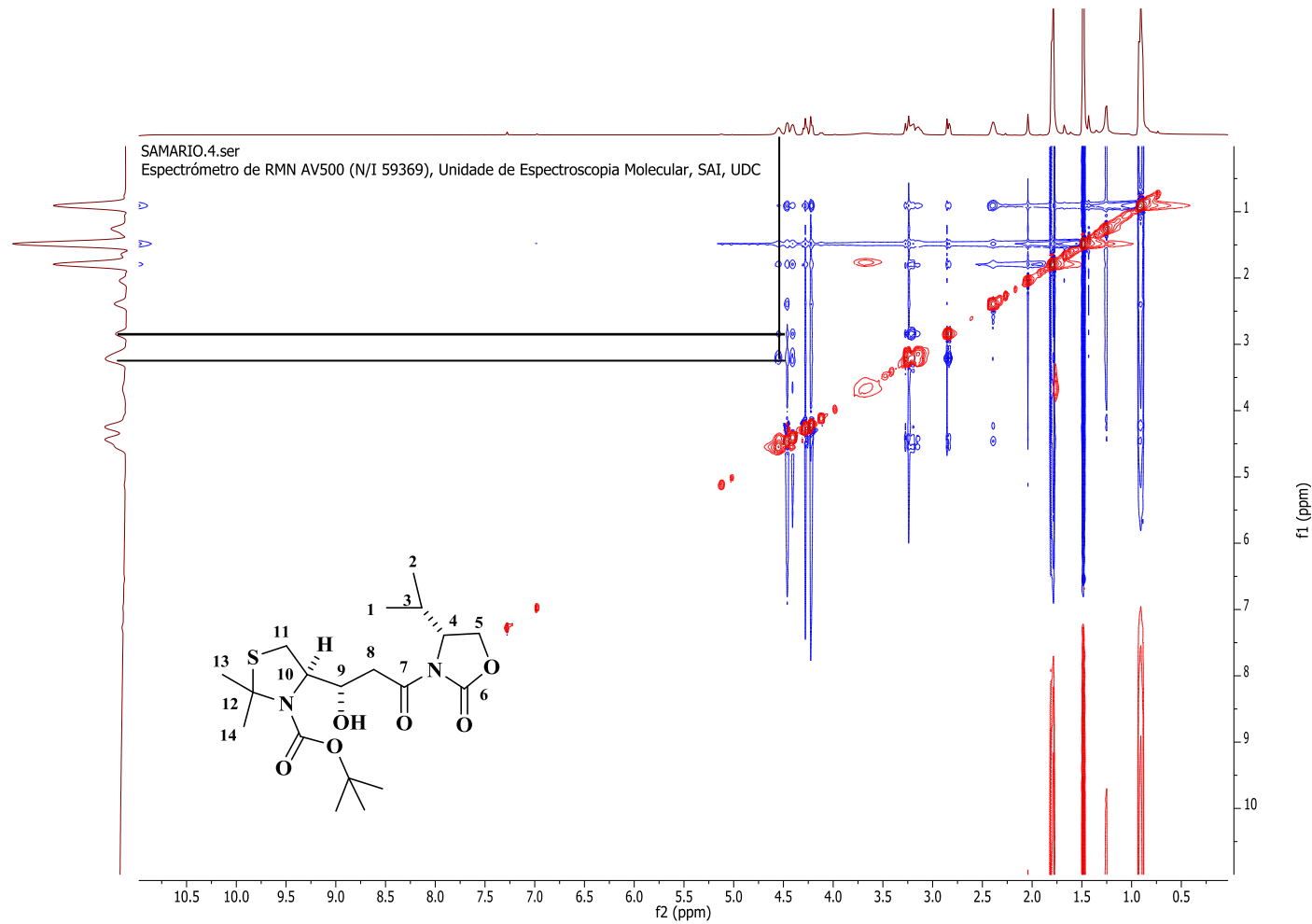


Figura 29. Espectro COSY del compuesto **3**

PARTE EXPERIMENTAL

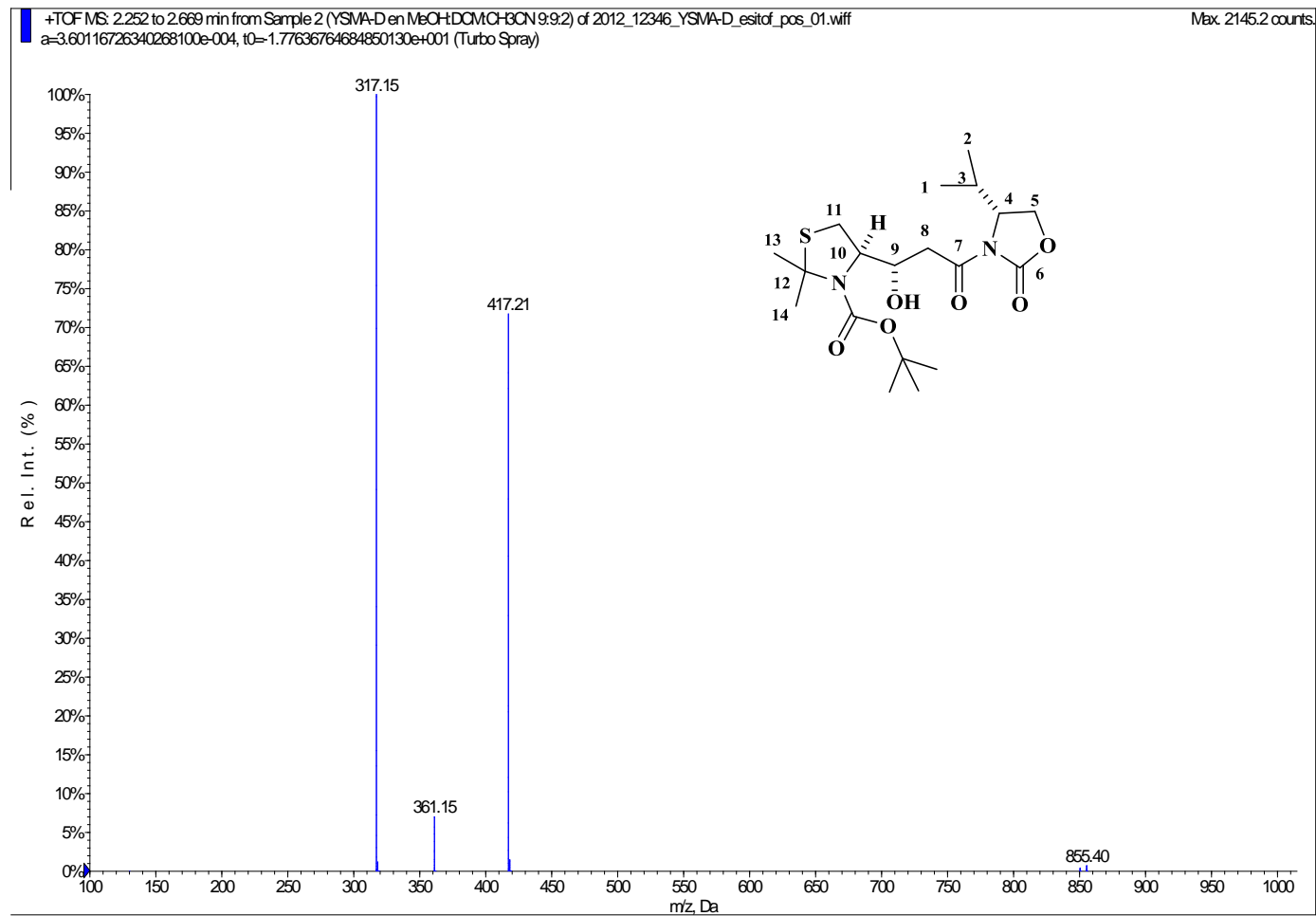


Figura 30. Espectro de masas ESI positivo de baja resolución del compuesto **3**.

PARTE EXPERIMENTAL

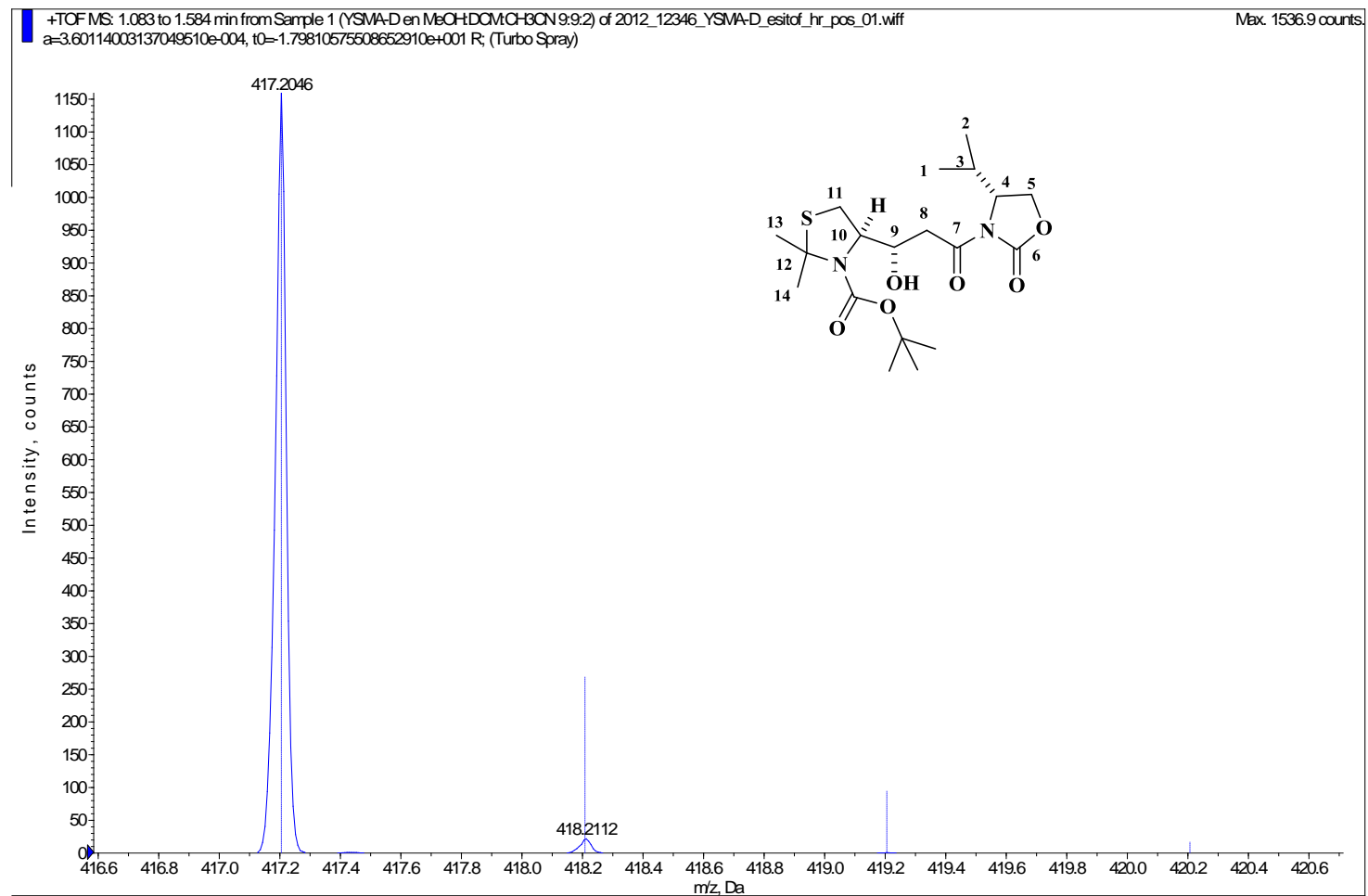


Figura 31. Espectro de masas ESI positivo de alta resolución del compuesto **3**.

5. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En este Trabajo Fin de Grado, se han llevado a cabo distintas secuencias sintéticas con el fin de obtener los intermedios objetivo **2** y **3**, que podrán utilizarse potencialmente en la producción de fragmentos claves en la síntesis total del sideróforo piscibactina, biosintetizado por la bacteria patógena de peces *Photobacterium damsela* subs *piscida* responsable de la Pasteurelosis La metodología puesta a punto serviría para la síntesis de sideróforos con estructura similar a la piscibactina o análogos de la misma.

Por tanto, en base a los objetivos planteados para este Trabajo de Fin de Grado se han llevado a cabo los siguientes:

- La obtención del compuesto intermedio clave **2**, precursor del fragmento **A** uno de los tres fragmentos necesarios para la síntesis total del sideróforo piscibactina.
- La obtención del compuesto intermedio clave **3**, precursor del fragmento **C**, uno de los tres fragmentos necesarios para la síntesis total del sideróforo piscibactina, mediante reacciones modernas como la formación de una amida de Weinreb con su posterior reducción selectiva a aldehído, o la reacción asimétrica de Reformatsky empleando un novedoso método que implica el uso de Yoduro de Samario (II) y el empleo del auxiliar quiral de Evans para el control estereoselectivo de la reacción.
- La caracterización correcta de todos los productos obtenidos en la síntesis de cada uno de los compuestos intermedios claves **2** y **3**, intermedios que se obtuvieron en escala de gramos, alcanzándose así de forma satisfactoria los resultados planteados en las rutas de síntesis propuestas en este trabajo.

Además, por parte de la autora del presente trabajo se han estado desarrollando las competencias objetivo planteadas para el Trabajo de Fin de Grado de las cuales, a modo de ejemplo, se pueden mencionar las siguientes:

- Tener un contacto directo con los proyectos en curso en un grupo de investigación
- Conocimiento de técnicas avanzadas en el laboratorio necesarias para llevar a cabo reacciones orgánicas en un laboratorio de investigación: reacciones en un laboratorio de investigación: reacciones en condiciones anhidras, a baja temperatura, etc.
- Aprendizaje y manejo de programas de RMN para la elucidación estructural de los compuestos obtenidos
- Desarrollo en la interpretación de resultados para elucidación estructural como $^1\text{H-RMN}$, $^{13}\text{C-RMN}$ y espectros de masas.
- Desarrollo en el perfeccionamiento del trabajo experimental.
- Mayor conocimiento en el uso de programas de búsqueda de información como Scifinder, revistas electrónicas, etc

CONCLUSIONES

In this “Trabajo Fin de Grado” various synthetic sequences were developed in order to obtain the target compounds **2** and **3**, which would be used in the production of key fragments in the total synthesis of the siderophore piscybactine, biosynthesized by the pathogenic bacterium fish *Photobacterium damsela* subs *piscicide*, responsible of the disease Pasteurellosis. The reported methodology would serve to synthesize other siderophores with similar structure to that of piscybactine or analogs.

Therefore, taking into account the proposed objectives set for this project, those were carried out as follows:

- Synthesis of the target key intermediate **2**, precursor of fragment A, one of the three fragments planned for the total synthesis of siderophore piscybactine.
- Synthesis of the target key intermediate **3**, precursor of fragment C, one of the three fragments planned for the total synthesis of siderophore through the use of modern reactions (for instance, the formation of a Weinreb amide followed by its reduction to the corresponding aldehyde, or the asymmetric Reformatsky reaction employing a novel method involving Samarium Iodide (II) and the use of Evans' chiral auxiliary in order to control the stereoselectivity of the reaction).
- Spectroscopic characterization of all the intermediate products obtained on the synthesis of each intermediate **2** and **3**, intermediates that were obtained in gram quantities, achieving therefore the results planned on the synthetic routes proposed this work.

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:

- Having direct contact with ongoing projects in a research group.
- Knowledge of advanced laboratory techniques necessary to carry out organic reactions in a research laboratory as: reactions in anhydrous conditions, low temperature, etc.
- Learning and program management RMN structural elucidation for the compounds obtained.
- Development in the interpretation of results for structural elucidation as ^1H -NMR, ^{13}C -RMN y mass spectroscopy.
- Development in the improvement of experimental work.
- Increased knowledge on the use of information search programs as Scifinder, electronic magazines, etc.

CONCLUSIONES

Neste Traballo de Fin de Grao, leváronse a cabo, distintas secuencias sintéticas co fin de obter os intermedios obxectivo **2** e **3**, que poderanse utilizar potencialmente na produción de fragmentos claves na síntese total do sideróforo piscibactina, biosintetizado pola bacteria patóxena de peixes *Photobacterium damsela* subs *piscida* responsable da Pasteurelosis. A metodoloxía empregada serviría para la síntese de sideróforos con estrutura similar á piscibactina ou análogos das mesmas.

Polo tanto, sobre a base dos obxectivos formulados para este traballo de fin de grao leváronse a cabo as seguintes:

- A obtención do composto intermedio crave **2**, precursor do fragmento A, un dos tres fragmentos necesarios para a síntese total do sideróforo piscibactina.
- A obtención do composto intermedio crave **3**, precursor do fragmento C, un dos tres fragmentos necesarios para a síntese total do sideróforo piscibactina, mediante reaccións modernas como a formación dunha amida de Weinreb coa súa posterior redución selectiva a aldehído, ou a reacción asimétrica de Reformatsky empregando un novidoso método que implica o uso de Ioduro de Samario (II) e o emprego de auxiliar quiral de Evans para o control estereoselectivo da reacción.
- A caracterización correcta de todos os produtos obtidos na síntese de cada un dos compostos intermedios claves **2** e **3**.
- Obtivéronse finalmente os produtos intermedio obxectivo en cantidades de gramo alcanzándose de forma satisfactoria as rutas de sínteses propostas formuladas neste traballo de fin de grao.

Ademais, por parte da autora do presente traballo estivéronse a desenvolver as competencias obxectivo formuladas para o Traballo de Fin de Grao das cales pódense mencionar, a modo de exemplo, as seguintes:

- Ter un contacto directo cos proxectos en curso nun grupo de investigación
- Coñecemento de técnicas avanzadas no laboratorio necesarias para levar a cabo reaccións orgánicas nun laboratorio de investigación: reaccións en condicións anhídridas, a baixa temperatura, etc.
- Aprendizaxe e manexo de programas de RMN para a elucidación estrutural dos compostos obtidos.
- Desenvolvemento na interpretación de resultados para elucidación estrutural como ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e espectros de masas.
- Desenvolvemento no perfeccionamento do traballo experimental.
- Maior coñecemento no uso de programas de busca de información como Scifinder, revistas electrónicas, etc.