

UNIVERSIDAD DE A CORUÑA



MÁSTER INTERUNIVERSITARIO EN INVESTIGACIÓN
QUÍMICA Y QUÍMICA INDUSTRIAL

MARÍA ALEJANDRA PÉREZ QUINTIANA

“DETERMINACIÓN DE LA ESTEREOQUÍMICA DE
MACROCICLOS PROCEDENTES DE ESPONJAS MARINAS
Y SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DEL SIDERÓFORO
ANGUIBACTINA”

DIRECTORES: JAIME RODRÍGUEZ GONZÁLEZ Y
CARLOS JIMÉNEZ GONZÁLEZ

CENTRO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
AVANZADAS (CICA)



PERÍODO DE EVALUACIÓN: JULIO DE 2016

AGRADECIMIENTOS

Punto y a parte.

Con este trabajo termina un capítulo de mi vida que me ha aportado muchas cosas buenas. Cinco años de alegrías, de alguna decepción, de decisiones, de valentía, de aprendizaje personal. Cinco años de crecimiento y de esperanza, donde todo el esfuerzo ha merecido la pena.

¿Cambiaría alguna cosa? Pues no. Creo que haría todo tal y como lo he hecho, son las experiencias las que nos convierten en las personas que somos. Está claro que mejorar siempre se puede, pero para eso amanece cada día, para hacer balance del día anterior y seguir caminando con un paso más firme y más seguro.

Quisiera expresar aquí mi gratitud a las personas que, de diferentes maneras, han contribuido a la gestación de este Trabajo de Fin de Máster. Comenzando por mis tutores, Carlos Jiménez y en especial a Jaime Rodríguez quien me descubrió la Química Orgánica y el RMN. A mis compañeros del grupo de investigación, de los que me llevo solo buenos recuerdos, sobre todo a Diana, que me ayudó siempre y con la que compartí muy buenos momentos. Quería hacer especial mención a aquellas que nunca me han dejado caer, que han estado ahí día si, día también, que han creído en mí y me han apoyado en todo momento, papá y mamá, GRACIAS, lo sois todo para mí. También me gustaría dar las gracias a mis amigos, destacando a mi amiga, compañera de piso y de aventuras, Lucía, ha sido genial poder compartir mis años universitarios a tu lado, y todos los que vendrán. Por último, no podía olvidarme de la persona que hace que quiera ser mejor cada día, superarme y lograr todos mis propósitos, la que me ha acompañado en este viaje y siempre, Dani, te quiero.

Digo punto y a parte, y no punto final, esto solo ha sido el comienzo para lograr mi objetivo, mi sueño y por el que no dejaré de luchar hasta alcanzarlo.

Y sí, el que la sigue, la consigue.

A mis abuelos

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

1D	monodimensional
2D	bidimensional
δ	desplazamiento químico en ppm (RMN)
δ_c	desplazamiento químico de ^{13}C (RMN)
δ_H	desplazamiento químico de ^1H (RMN)
λ	longitud de onda
Bn	bencilo
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
°C	grado Celsius
col.	colaboradores
d	doblete
DCM	diclorometano
COSY	<i>correlation spectroscopy</i> , espectroscopia de correlación
dd	doble doblete
ddd	doble doblete de dobletes
DEPT	<i>distorsionless enhancement by polarization transfer</i>
DHBA	ácido 2,3-dihidroxibenzoico
DMF	N,N-dimetilformamida
ESI	<i>electrospray ionization</i> , ionización por electrospray
Exp.	experimental
g	gramos
h	hora
HECADE	<i>heteronuclear couplings from ASSCI-domain experiments with E. COSY-type cross peaks</i>
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
Hz	hercio
<i>i</i>Pr	iso-propilo
J	constante de acoplamiento
JBCA	<i>J-based conformational analysis</i> , análisis configuracional basado en las constantes de acoplamiento o método de Murata
Kps	producto de solubilidad
L	<i>large</i> , grande (referido a constante de acoplamiento)
LR	<i>low resolution</i> , baja resolución
m	multiplete
M	<i>medium</i> , mediana (referido a constante de acoplamiento)
M⁺	ion molecular
Me	metilo
MHz	megahercio
mmol	milimoles
min	minuto
mL	mililitro
MS	<i>mass spectroscopy</i> , espectrometría de masas

m/z	relación masa/carga del ion
NOE	<i>nuclear overhäuser effect</i> , efecto nuclear Overhauser
NOESY	espectroscopia de aumento nuclear Overhauser
RMN	resonancia magnética nuclear
RMN de ¹³C	resonancia magnética nuclear de carbono trece
RMN de ¹H	resonancia magnética nuclear de protón
s	singulete
S	<i>small</i> , pequeña (referido a constante de acoplamiento)
sa	singulete ancho
Ser	serina
t	triplete
T.a.	temperatura ambiente
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
UV	ultravioleta

ÍNDICE

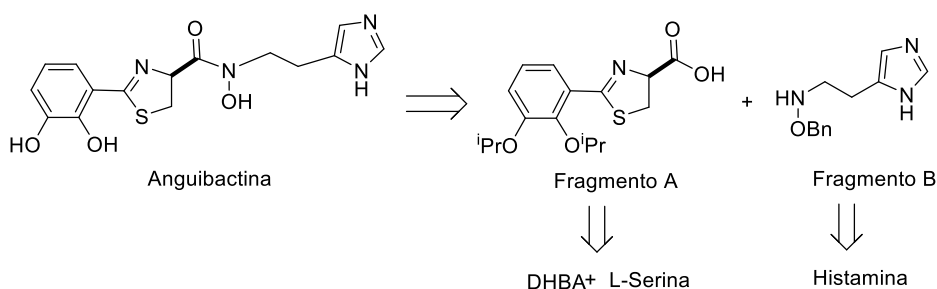
Resumen.....	1
Resumo.....	2
Abstract.....	3
1. Introducción.....	4
1.1 El papel de la química de los productos naturales.....	5
1.2 Determinación de la configuración relativa.....	5
1.2.1 Análisis configuracional basado en las constantes de acoplamiento “JCBA”: el método de Murata.....	6
1.2.1.1 Las constantes de acoplamiento y el ángulo diedro.....	6
1.2.1.2 Fundamentos del análisis configuracional basado en J.....	8
1.2.1.3 Análisis configuracional basado en las constantes de acoplamiento de sistemas 1,2 y 1,3-disustituidos.....	9
1.2.2 Aplicación de la metodología de Murata a modelos quirales con átomos de carbono y oxígeno.....	10
1.2.3 Medida experimental de las constantes de acoplamiento.....	12
1.3 Importancia de la acuicultura.....	14
1.4 <i>Vibrio anguillarum</i> como agente causal de la vibriosis.....	15
1.5 Importancia del hierro en los procesos infecciosos.....	16
1.6 Sideróforos.....	17
1.6.1 Mecanismo de actuación de los sideróforos.....	17
1.6.2 Tipos de sideróforos.....	18
1.6.3 Aplicaciones terapéuticas de los sideróforos.....	22
2. Objetivos.....	23
3. Discusión de resultados.....	25
3.1 Obtención de la estructura plana y determinación de la estereoquímica relativa.....	26
3.1.1 Obtención de la estructura plana inicial.....	26
3.1.2 Análisis configuracional a través de $^3J(\text{H,H})$ y $^{2,3}J(\text{C,H})$	27
3.1.3 Fragmentos A-D con la estereoquímica relativa deducida.....	37
3.2 Aproximación a la síntesis total de anguibactina (15).....	38
3.2.1 Planteamiento retrosintético.....	38
3.2.2 Propuesta sintética para la obtención de los intermedios objetivo.....	39
3.2.3 Preparación del Fragmento A	40
3.2.4 Preparación del Fragmento B	41
4. Parte experimental.....	43
5. Conclusiones.....	54
6. Bibliografía.....	58
7. Anexos.....	61

RESUMEN

El presente Trabajo de Fin de Máster se divide en dos partes diferenciadas, la determinación de la estereoquímica relativa de dos compuestos de origen marino y la aproximación a la síntesis total del producto natural anguibactina.

En la primera parte de esta memoria, se resalta la importancia de la determinación de la configuración relativa, siendo el análisis configuracional basado en las constantes de acoplamiento, JCBA (J Configurational Based Analysis), conocido como el método de Murata, una de las estrategias más importantes para la determinación de la estereoquímica relativa en macrociclos que presentan gran libertad conformacional. Este método se aplicó a la resolución de la estereoquímica relativa de dos nuevos productos naturales de origen marino.

La segunda parte de este TFM, está enfocada en la aproximación a la síntesis total del producto natural anguibactina, un sideróforo aislado de la bacteria patógena *Vibrio anguillarum* responsable de la vibriosis, una enfermedad que causa graves pérdidas económicas en peces de acuicultura en todo el mundo. Los sideróforos, pequeñas biomoléculas sintetizadas por algunos microorganismos para captar hierro del medio, constituyen una herramienta fundamental en la lucha contra dichas bacterias. En base a esto, se propone para la síntesis del sideróforo la obtención de dos intermedios clave (Fragmentos A y B) de acuerdo con lo mostrado en el **Esquema 1**.



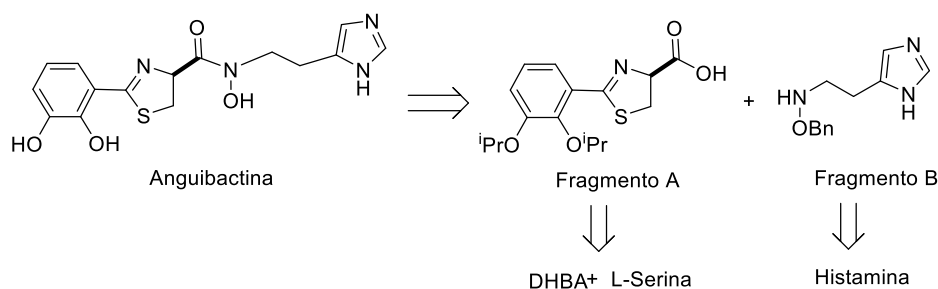
Esquema 1: Análisis retrosintético parcial del sideróforo anguibactina.

RESUMO

O presente Traballo de Fin de Máster divídese en dúas partes diferenciadas, a determinación da estereoquímica relativa de dous compostos de orixe mariño e a aproximación á síntese total do produto natural anguibactina.

Na primeira parte desta memoria, resáltase a importancia da determinación da configuración relativa, sendo a análise configuracional baseada nas constantes de acoplamento, JCBA (J Configurational Based Analysis), coñecido como o método de Murata, unha das estratexias máis importantes para a determinación da estereoquímica relativa en macrociclos que presentan gran liberdade conformacional. Este método foi aplicado á resolución da estereoquímica relativa de dous novos produtos naturais de orixe mariño.

A segunda parte deste TFM, enfocouse na aproximación á síntese total do produto natural anguibactina, un sideróforo illado da bacteria patóxena *Vibrio anguillarum* responsable da vibriosis, unha enfermidade que causa graves perdas económicas en peixes de acuicultura en todo o mundo. Os sideróforos, pequenas biomoléculas sintetizadas por algúns microorganismos para captar ferro do medio, constitúen unha ferramenta fundamental na loita contra ditas bacterias. En base a isto, propónse para a síntese do sideróforo a obtención de dous intermedios clave (Fragmentos A e B) de acordo co mostrado no **Esquema 1**.



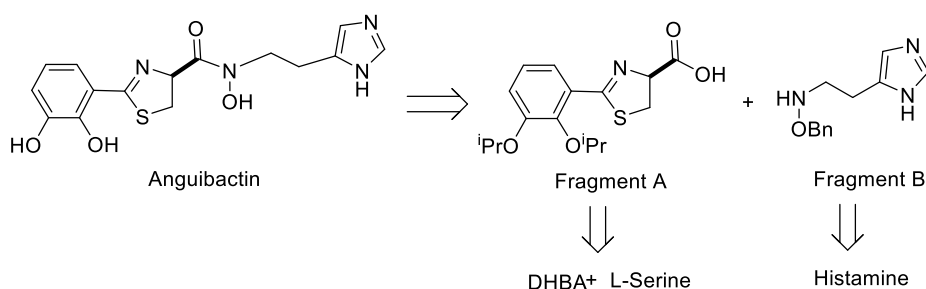
Esquema 1: Análisis retrosintético parcial do sideróforo anguibactina.

ABSTRACT

The present work is divided in two different parts, the relative stereochemistry determination of two marine natural products and an approximation of the total synthesis of anguibactin.

The first goal paid attention the importance of the relative configuration in a natural product, being the configurational analysis based on coupling constants, also known as JCBA or also Murata methodology, one of the most important strategies to find the relative stereochemistry in acyclic compounds or in systems with a lot conformational freedom. This method was applied to the resolution of the relative stereochemistry of two natural products with a macrocyclic skeleton.

As a second aim of the project, we focused our studies in the synthesis of anguibactin, a siderophore produced by *Vibrio anguillarum* (serotype O1), a pathogen responsible of vibriosis, a disease which causes severe economic losses worldwide. Siderophores are low molecular weighted compounds, which specifically chelate ferric ions. They are used by bacteria to grow under low iron conditions. The siderophore above mentioned could be obtained from two synthetic intermediates (Fragments A and B) as is reported in **Scheme 1**.



Scheme 1: Partial retrosynthesis of anguibactin.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El papel de la química de los productos naturales

La naturaleza representa un arsenal sin fin de nuevos compuestos bioactivos y el estudio de estos metabolitos ha demostrado ser fundamental a lo largo de la historia en el proceso de descubrimiento de fármacos. El uso de estos compuestos naturales tanto de origen terrestre como marino para el tratamiento de múltiples enfermedades, ha acompañado a la humanidad desde las primeras civilizaciones. Un producto natural (PN) podría definirse como cualquier compuesto orgánico producido por un ser vivo, sin embargo el término suele identificarse con el de un compuesto químico de bajo peso molecular (generalmente menor de 1500 uma) que es sintetizado por organismos biológicos.¹

A finales de los años 90 se produjo un declive en la búsqueda de nuevos fármacos a partir de PNs, achacado al desinterés por parte de la industria farmacéutica que se volcó hacia nuevas tecnologías, particularmente la química combinatoria.² Sin embargo, en los últimos años se han publicado una serie de artículos en los que se pone de manifiesto que los PNs todavía se pueden seguir considerando estructuras privilegiadas y una fuente inagotable de moléculas activas en la búsqueda de nuevas cabezas de serie.^{3,4} Además de suponer una importante aproximación en el descubrimiento de nuevos fármacos y en los procesos de su desarrollo, los PNs constituyen una de las quimiotecas de compuestos químicos de mayor diversidad estructural y bioactividad de las que se conocen en la actualidad.⁵

1.2. Determinación de la configuración relativa

En el descubrimiento de nuevos productos naturales bioactivos, la determinación de la configuración relativa se convierte en el primer paso hacia el conocimiento de la configuración absoluta de un nuevo compuesto, ya que el conocimiento de sólo uno de sus centros asimétricos, conduce a la determinación de la absoluta del resto de los centros quirales relacionados con él. La problemática de la estereoquímica relativa es bien distinta si se trata de sistemas rígidos o de sistemas flexibles. Con sistemas rígidos como compuestos cíclicos con anillos de tres a seis miembros con varios centros quirales, puede ser llevada a cabo a partir de los valores de las constantes de acoplamiento homonucleares protón-protón y las medidas de efecto nuclear Overhäuser (NOE).

En el caso de estructuras acíclicas flexibles, la asignación de su configuración es más compleja, ya que la posibilidad de múltiples conformeros a través de los enlaces carbono-carbono, hace que no se pueda aplicar una estrategia directa para el análisis configuracional.

1.2.1. Análisis configuracional basado en las constantes de acoplamiento “JCBA”: el método de Murata

Murata y col. desarrollaron una metodología que permite determinar la estereoquímica relativa de los centros quirales en sistemas flexibles 1,2 y 1,3-disustituidos basándose en el estudio de los valores experimentales de las constantes de acoplamiento homo y heteronucleares.

Aunque fueron los pioneros en emplear las constantes de acoplamiento homo y heteronucleares para la determinación de la estereoquímica relativa de productos naturales, no fue hasta 1999 cuando publicaron una descripción de la metodología.^{6,7} Lograron despertar un gran interés y consiguieron que se aplicase exitosamente a sistemas 1,2 y 1,3-dimetínicos con sustituyentes hidroxilo/metoxilo y posteriormente también con sustituyentes amino, cloro y azufre unidos a carbonos asimétricos. Aunque originalmente el método de Murata se desarrolló para compuestos acíclicos polioxigenados, a lo largo de los años su uso se ha ido extendiendo a otros productos naturales, incluyendo los macrociclos.

1.2.1.1 Las constantes de acoplamiento y el ángulo diedro

El parámetro más importante en la espectroscopia de RMN lo constituyen las constantes de acoplamiento escalares puesto que nos permiten realizar estudios conformacionales y configuracionales de compuestos orgánicos, de los que podemos obtener la información necesaria para saber la disposición de los grupos funcionales presentes en los mismos. Resulta una medida fiable, ya que no dependen de la intensidad del campo magnético aplicado, y reproducible, pues son independientes del espectrómetro que se utilice.

A partir del espectro ¹H-RMN se obtienen las constantes de acoplamiento vecinales protón-protón ³J(H,H) que son muy útiles para la determinación de la estereoquímica en sistemas rígidos. No obstante, cuando se estudian sistemas flexibles, dichas constantes

homonucleares ^1H - ^1H no son suficientes y es necesario emplear las constantes de acoplamiento heteronucleares a dos y tres enlaces carbono-protón $^2J(\text{C,H})$ y $^3J(\text{C,H})$ para poder deducir la posición relativa entre átomos.^{8,9}

Las constantes de acoplamiento $^3J(\text{C,H})$, al igual que $^3J(\text{H,H})$, son una herramienta muy valiosa ya que dependen del ángulo diedro siguiendo una ecuación tipo Karplus.¹⁰ Las constantes $^2J(\text{C,H})$ también proporcionan información conformacional valiosa cuando el carbono acoplado lleva un sustituyente electronegativo como puede ser un átomo de oxígeno o un halógeno.

A continuación, se representa mediante proyecciones de Newman la dependencia de las constantes de acoplamiento con el ángulo diedro. En el caso de las $^3J(\text{H,H})$, cuando el ángulo diedro formado entre los protones implicados es de 180° (disposición antiperiplanar), su valor es grande, mientras que cuando el ángulo diedro es de 60° (disposición sinclinal), su valor es pequeño (**Figura 1A**). La misma tendencia la siguen las constantes de acoplamiento $^3J(\text{C,H})$ (**Figura 1B**). Por otro lado, el valor de $^2J(\text{C,H})$ es pequeño cuando el átomo electronegativo X unido al carbono se encuentra en disposición antiperiplanar al protón, mientras que es grande cuando se encuentra en disposición sinclinal (**Figura 1C**).

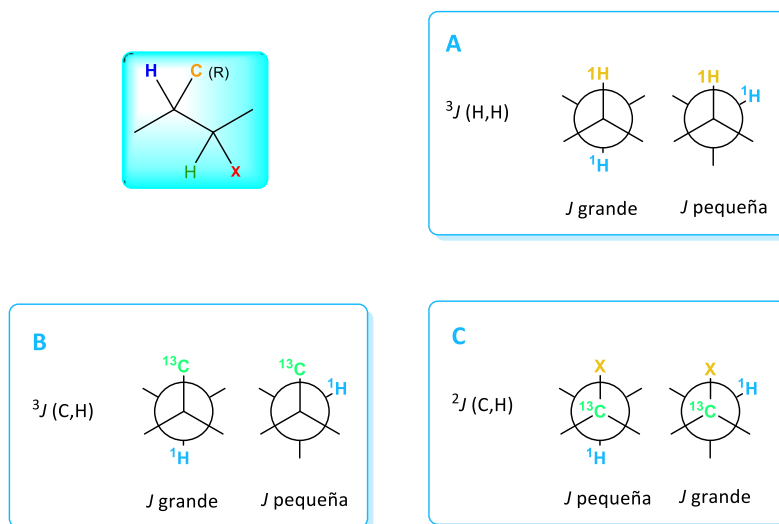


Figura 1. Dependencia del ángulo diedro con las constantes de acoplamiento protón-protón. (1A) Constante de acoplamiento homonuclear vecinal $^3J(\text{H,H})$. (1B) Constante de acoplamiento heteronuclear vecinal $^3J(\text{C,H})$. (1C) Constante de acoplamiento heteronuclear geminal $^2J(\text{C,H})$.

Los valores de las constantes de acoplamiento homo y heteronucleares dependen de los sustituyentes del segmento molecular de interés, y poseen valores comprendidos en un intervalo entre 0 a 16 Hz en el caso de ${}^3J(\text{H,H})$, de 0 a 9 Hz en el caso de las ${}^3J(\text{C,H})$, y de -6 a 3 Hz en el caso de las ${}^2J(\text{C,H})$. Desde un punto de vista cualitativo y con el fin de describirlas de una forma más directa, las constantes se pueden clasificar en pequeñas, medianas o grandes.

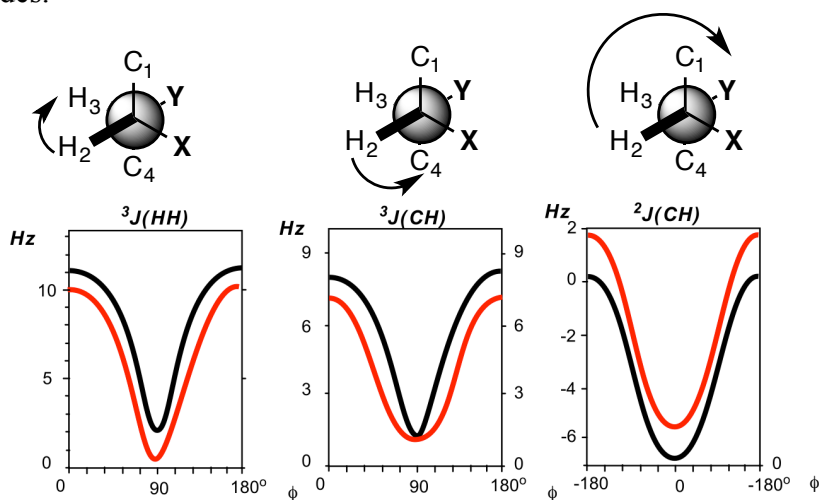


Figura 2. Representación en forma de curvas tipo Karplus de los valores de las constantes de acoplamiento para el caso de sistemas con un sustituyente oxigenado (representado en negro) o con dos sustituyentes oxigenados (representado en rojo).

1.2.1.2. Fundamentos del análisis configuracional basado en J

El análisis configuracional basado en las constantes de acoplamiento de un sistema lineal 1,2 o 1,3-disustituido por X e Y, supone que las conformaciones más probables en torno a un enlace son aquellas que implican conformeros alternados ya que son los más estables. En estos sistemas son posibles dos configuraciones diastereoisoméricas relativas, *sin* o *anti*, y cada una de ellas se puede describir mediante tres conformeros alternados, hay un total de seis conformeros posibles.

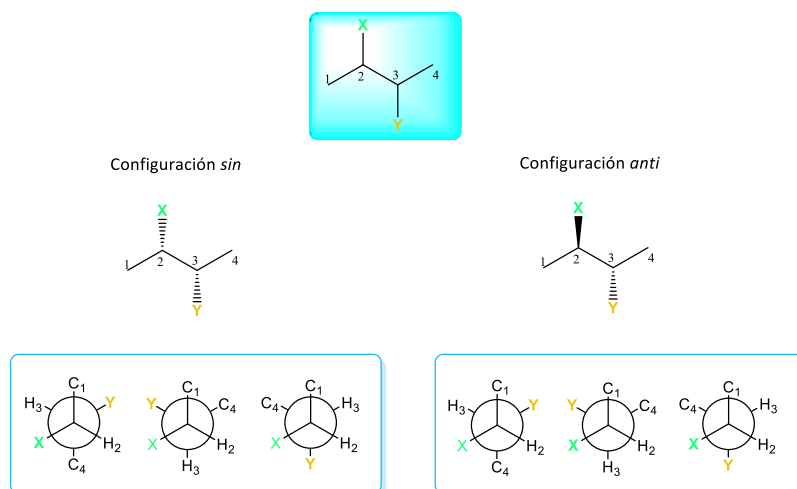


Figura 3. Posibles conformeros en torno al enlace C2—C3.

El conjunto de valores de $^3J(\text{H,H})$ y $^{2,3}J(\text{C,H})$ en torno a un enlace permite diferenciar estos conformeros alternados presentes para cada enlace de entre los 6 posibles, 3 para cada una de las dos configuraciones relativas, permitiendo establecer así la relación entre los dos centros quirales.

Murata y col. han estudiado sistemas 1,2 y 1,3-dimetínicos que contienen sustituyentes metoxilo y/o metilo a través de modelos moleculares diseñados para reproducir los conformeros de sistemas que aparecen en productos naturales con grupos hidroxilo y metoxilo en cadenas lineales.

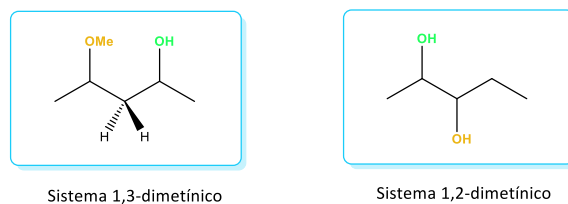


Figura 4. Sistemas estudiados por Murata.

1.2.1.3. Análisis configuracional basado en las constantes de acoplamiento de sistemas 1,2 y 1,3-disustituídos.

Esta metodología se aplica a sistemas donde los centros asimétricos están separados por uno o dos enlaces. En el caso de que los centros estén separados por dos enlaces es necesario que los protones diastereotópicos del grupo metileno intermedio tengan desplazamientos químicos claramente diferenciados. De este modo, en función del número de enlaces que separan los centros asimétricos se obtienen los distintos sistemas con las

posibles relaciones con sus ángulos diedros.

a) **Sistemas 1,2-disustituídos.** En la metodología empleada, el primer paso es dividir el compuesto, cuya configuración relativa se desea conocer, en varios fragmentos (enlaces C—C), para posteriormente llevar a cabo la aplicación de reglas simples a cada conformero alternado para cada enlace carbono-carbono, logrando así realizar una fácil elucidación de la configuración relativa.

b) **Sistemas 1,3-disustituídos.** El análisis anterior se puede aplicar para la determinación de la disposición relativa de sistemas 1,3-disustituídos. Como ya se ha explicado, es necesario que los dos protones diastereotópicos del grupo metileno intermedio aparezcan a desplazamientos químicos diferentes para que puedan ser etiquetados como si fueran sustituyentes. Para diferenciar los dos protones metilénicos, se utiliza la nomenclatura Ha para nombrar al protón que resuena a mayor desplazamiento químico y Hb al que lo hace a menor desplazamiento químico. Al combinar el análisis de los dos fragmentos por separado, se consigue determinar la disposición relativa de los dos sustituyentes en el espacio.

1.2.2 Aplicación de la metodología de Murata a modelos quirales con átomos de carbono y oxígeno

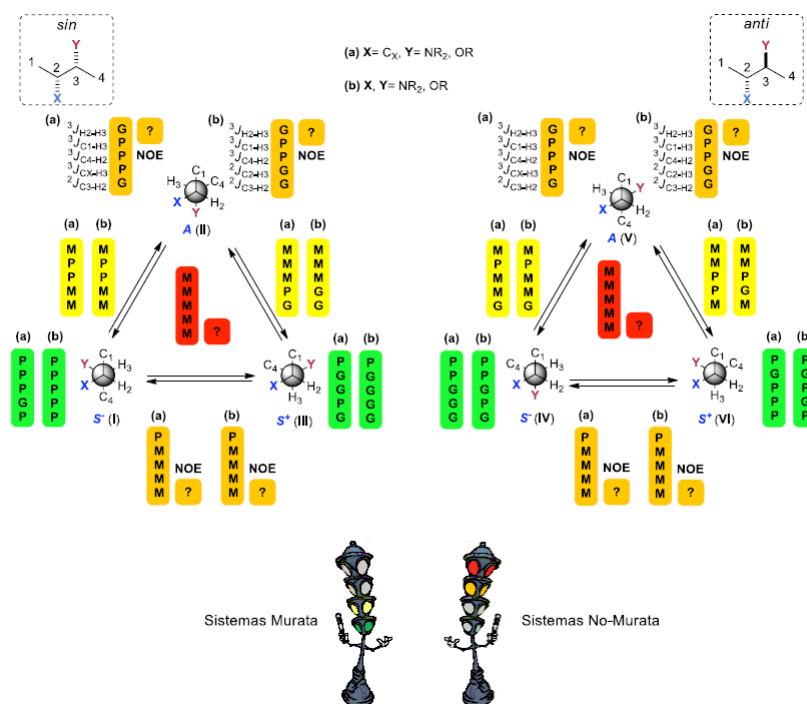
En el **Esquema 2** se muestra para cada conformero el conjunto de constantes de acoplamiento homonucleares y heteronucleares al que se denomina “etiqueta”. Se emplea la siguiente nomenclatura para los valores de $^3J(\text{H,H})$, $^3J(\text{C,H})$ y $^2J(\text{C,H})$: P, M y G que indican un valor pequeño, mediano y grande de la constante de acoplamiento en valor absoluto.

La situación más simple ocurre cuando los valores de las constantes son pequeños (**P**) o grandes (**G**), ya que indican la presencia de un conformero mayoritario. De los seis conformeros alternados posibles en torno a cada enlace (tres para la configuración *sin* y tres para la configuración *anti*), cuatro de ellos poseen un conjunto de valores de constantes de acoplamiento diferentes (conformeros **I**, **III**, **IV** y **VI**), representados con etiquetas de color verde. Por el contrario, los conformeros **II** y **V** poseen el mismo conjunto de constantes de acoplamiento, representados con etiquetas de color naranja, por lo que en este caso la

metodología de Murata no permite determinar a priori cuál de los dos está presente en el compuesto objeto de estudio. Para resolver este problema se recurre al experimento NOE que nos permitiría saber si los protones correspondientes a los carbonos antiperiplanares se encuentran a 60 o 180°, pudiendo de este modo distinguirlos perfectamente. Cuando al menos alguno de los valores de las $^3J(\text{H,H})$, $^3J(\text{C,H})$ y/o $^2J(\text{C,H})$ presenta un valor mediano (**M**), estamos ante la presencia de una interconversión rápida entre dos o más conforméromos en lugar de una conformación predominante, distinguiéndose dos situaciones:

- Existencia de un equilibrio conformacional entre dos de los tres conforméromos de una configuración, que sería el caso más sencillo.
- Existencia de un equilibrio conformacional de los tres conforméromos posibles, que imposibilitan la determinación de la configuración relativa mediante la aplicación tradicional de esta metodología.

Adicionalmente, y debido a que las etiquetas no son las mismas, se debe distinguir entre dos tipos de sistemas en función de la presencia de uno o dos heteroátomos: aquellos en los que está presente un sólo heteroátomo, a los que denominaremos sistemas **(a)**, y aquellos que presentan dos heteroátomos en las posiciones 2 y 3, a los que denominaremos sistemas **(b)**.



Esquema 2. Metodología de Murata o análisis basado en las constantes de acoplamiento.¹¹

En función de si el sustituyente objeto de estudio se ajusta o no a la metodología de Murata, se pueden distinguir los denominados:

Sistemas Murata. La estereoquímica relativa puede ser determinada claramente por dicha metodología. Lo engloban aquellos sistemas en los que existe un sólo conformero mayoritario (etiqueta verde) o bien un equilibrio entre dos pero todavía pueden ser distinguidos (etiquetas amarillas).

Sistemas No-Murata. La estereoquímica relativa *sin* o *anti* no puede ser determinada por esta metodología porque o bien tenemos dos conformeros en equilibrio cuyo conjunto de valores presentan la misma etiqueta (naranjas en el **Esquema 2**) no pueden ser distinguidas mediante NOE, o bien existe un equilibrio entre los tres conformeros (etiquetas rojas).

1.2.3 Medida experimental de las constantes de acoplamiento

Las constantes de acoplamiento homonucleares $^3J(\text{H,H})$ se pueden medir directamente del espectro de RMN de protón, siempre y cuando no exista solapamiento de señales o los multipletes no sean demasiado complejos. En estos casos se puede recurrir a experimentos de irradiación selectiva como puede ser el 1D-TOCSY.

La medida de las constantes de acoplamiento heteronucleares $^{2,3}J(\text{C,H})$ proporcionan información estructural muy valiosa, pero en la práctica las dificultades a la hora de medirlas han limitado su utilización. Estas dificultades se achacan por un lado a la escasa abundancia natural del núcleo del isótopo ^{13}C (un 1.1% con respecto al ^{12}C) y a su baja sensibilidad (cuatro veces menor que la de ^1H). De entre los diversos métodos para obtener dichos valores, el experimento de RMN bidimensional HSQC-HECADE es el que se ha utilizado en el presente trabajo.

Aunque la constante $^nJ(\text{C,H})$ se puede medir y extraer directamente de dicho espectro bidimensional, el empleo de un programa de interpretación de espectros de RMN permite obtener una mayor precisión si se extraen las componentes α y β correspondientes a los cruces de correlación.

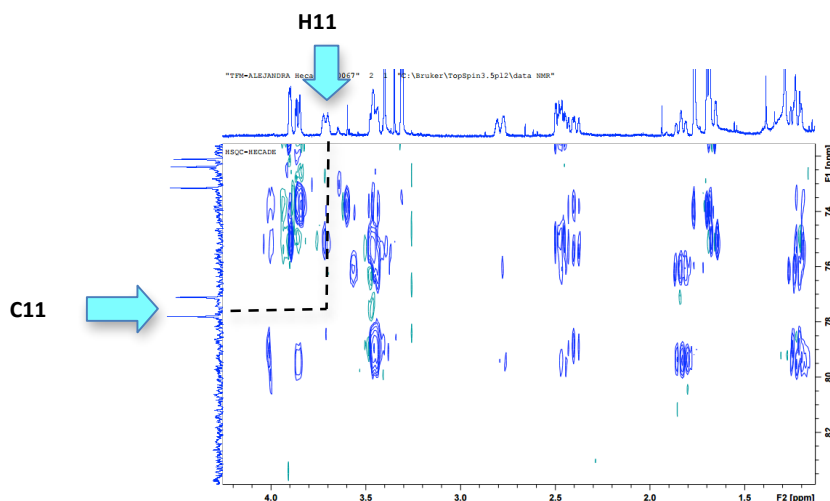


Figura 5. Visualización de las señales en un experimento HSQC-HECADE.

Mediante el comando `rser2d` del programa TopSpin se pueden extraer las componentes α y β . Se generan de esta forma dos espectros monodimensionales, que al superponerlos permiten calcular el desplazamiento de la señal de un espectro frente a otro debido a ${}^nJ(\text{CA},\text{HB})$, y por tanto determinar el correspondiente valor de la constante.

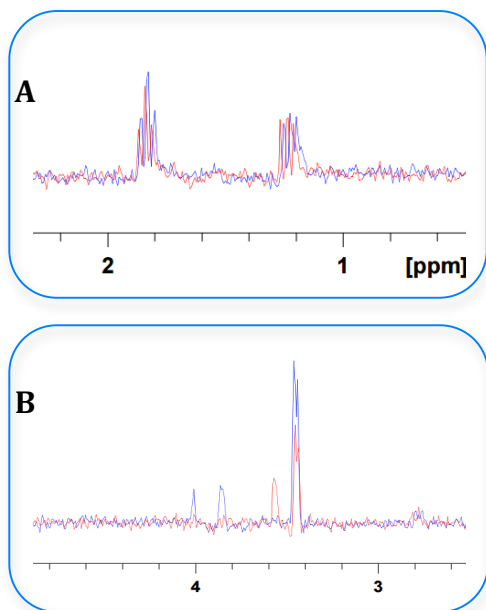


Figura 6. Espectros monodimensionales extraídos de un HSQC-HECADE. En azul se representa el espectro correspondiente a la componente α y en rojo el correspondiente a la componente β . En el caso **A** la ${}^nJ(\text{CA},\text{HB})$ tiene un valor negativo mientras que en el caso **B** es positiva.

1.3. Importancia de la acuicultura

El mayor reto al que se enfrenta la humanidad para las próximas décadas es el de alimentar a los 9.600 millones de personas que habitarán el planeta tierra hacia el año 2050. La limitada disponibilidad de los recursos naturales y la necesidad de respetar los ecosistemas y la persistencia, aun hoy, de los más de 800 millones de personas que sufren desnutrición crónica hace que el reto sea muy complejo. Para ello, será necesario incrementar el rendimiento de la producción de alimentos que requerirá nuevos métodos, sostenibles y respetuosos con el medio ambiente, en un contexto de cambio climático y en un mundo con grandes desigualdades económicas y de acceso a la tecnología.

El bienestar de las personas depende, en gran medida, del consumo de productos acuáticos. El pescado es extraordinariamente nutritivo y contiene varios aminoácidos esenciales. Así mismo, la composición lipídica del pescado es excepcional, al comprender ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga que ofrecen múltiples efectos beneficiosos para la salud y es fuente de micronutrientes esenciales, vitaminas A, B y D, y minerales (calcio, fósforo, yodo, zinc, hierro y selenio).

La acuicultura puede definirse como la producción de organismos acuáticos con técnicas encaminadas a hacer más eficiente su rendimiento. Es una actividad que abarca una amplia gama de especies y técnicas de producción y junto a la pesca son dos actividades complementarias que hacen frente al reto de la creciente demanda de alimentos de origen acuático. La acuicultura ha superado en producción a la pesca extractiva por primera vez en 2013 con 97.20 millones de toneladas a nivel mundial, frente a las 93.8 millones de toneladas de las capturas. Por tanto, más del 50% de los productos acuáticos en 2013 provenían de la acuicultura.¹²

España dispone de una variedad de recursos hídricos sobre los que es posible la realización de la acuicultura, tanto en ámbito marino como continental. La producción de acuicultura en España en 2013 supuso un total de 223.709 toneladas y alcanzó un valor en su primera venta de 408,3 millones de euros. La principal especie producida ha sido el mejillón y en relación con la acuicultura de peces, las tres primeras especies fueron dorada, trucha arcoíris y lubina.¹³

Para resolver de forma satisfactoria los retos a los que se enfrenta la acuicultura, se deben dirigir iniciativas de investigación e innovación encaminadas a aumentar la

sostenibilidad y productividad de la misma. Dichas investigaciones deben mejorar los conocimientos sobre la salud de los animales criados, la optimización de los piensos y de sus materias primas, mejoras en la gestión de las granjas, así como la mejora genética de las especies actuales.

1.4. *Vibrio anguillarum* como agente causal de la vibriosis

Existen varias bacterias patógenas de peces, pero sólo algunas representan un verdadero problema a nivel mundial. Entre las principales enfermedades infecciosas más dañinas y que originan mayores pérdidas económicas en peces, son las causadas por bacterias Gram-negativas. Entre las más importantes se encuentran la yersiniosis, la pasteurelosis, la forunculosis y la vibriosis que constituyen el centro de nuestras investigaciones.

La vibriosis es una de las enfermedades que más pérdidas económicas causa en la acuicultura marina con un alto índice de mortalidad, entorno al 10-20% de la población, incluso aplicando el tratamiento adecuado, y de curso rápido. Esta enfermedad está causada por distintas especies bacterianas pertenecientes al género *Vibrio*, siendo la especie *Vibrio anguillarum* la principal responsable de la vibriosis en una gran variedad de peces, crustáceos y moluscos.¹⁴

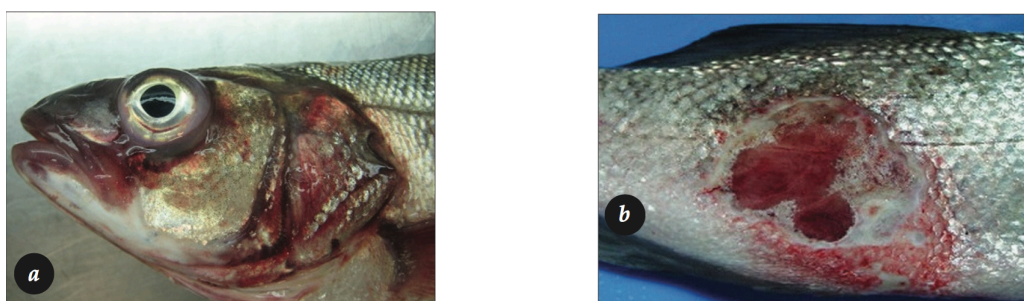


Figura 7. a) Lesiones oftálmicas, hemorragias, b) Úlceras en la cola.

En Galicia, la vibriosis ha sido un problema limitante en la acuicultura marina. Desde 1985 *Vibrio anguillarum* ha sido el principal agente causal de vibriosis en alevines de rodaballo, siendo aislado esporádicamente a partir de salmón y de trucha arcoíris. La sintomatología de la enfermedad depende de la especie hospedadora, de su edad y del estadio de la enfermedad. Los peces afectados por vibriosis suelen presentar una septicemia generalizada con hemorragias en la parte ventral y base de las aletas, exoftalmia y opacidad

de la córnea.¹⁵

El tratamiento estandarizado se realiza a base de antibióticos como oxitetraciclina, nitrofurantoina y sulfasoxazol, sin embargo no son muy eficientes debido a la existencia de cepas resistentes a estos compuestos y a que los peces enfermos presentan anorexia y no consumen el antibiótico que se suministra.^{16,17} También existe un gran número de vacunas comerciales para prevenir la enfermedad, pero la mayoría sólo incluyen el serotipo O1, que son aquellas en las que la bacteria patógena es *V. anguillarum*.¹⁸

1.5 Importancia del hierro en los procesos infecciosos

El hierro es un nutriente esencial para prácticamente todas las formas de vida. Juega un papel crucial en muchos procesos biológicos importantes, como son la fotosíntesis, respiración, fijación de N₂, metanogénesis, transporte de oxígeno, regulación de genes y biosíntesis de ADN.¹⁹

A pesar de su abundancia en la tierra, su disponibilidad biológica es limitada en ambientes aeróbicos. Bajo estas condiciones, el hierro se encuentra precipitado en forma de Fe(OH)₃ cuyo producto de solubilidad es 10⁻³⁹, provocando que la concentración de iones férricos a pH 7 sea en torno a 10⁻¹⁸ M, y por tanto, extremadamente baja. Para superar esta extrema indisponibilidad del Fe (III), las bacterias han diseñado varios mecanismos para solubilizarlo y obtenerlo del entorno, como son a partir de glicoproteínas y hemoproteínas, mediante la adquisición en forma de Fe (II) mucho más soluble que el Fe (III), o por medio de la producción de unos agentes que “secuestran” el Fe (III) llamados sideróforos, que poseen una alta afinidad por el mismo.²⁰

En los procesos infecciosos, todas las bacterias y hongos compiten con el organismo al que infectan por los nutrientes que necesitan para su supervivencia. El Fe³⁺ 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. Para asegurar una efectiva captación de hierro muchos de ellos emplean sideróforos.

1.6 Sideróforos

Los sideróforos se definen como agentes quelatantes de bajo peso molecular (500-1500 Da) específicos de hierro Fe^{+3} ($K_f > 10^{30}$), sintetizados por bacterias y hongos que crecen bajo condiciones limitadas de hierro. El papel de estas moléculas es el de “secuestrar” hierro del ambiente y solubilizarlo de modo que sea adecuado para las células microbianas.²¹

Se sintetizan y secretan al medio extracelular donde quelatan al metal. Tras su quelatación, los complejos de Fe (III) con sideróforos son absorbidos en la célula por receptores altamente específicos situados en la membrana externa de las bacterias que reconocen el sideróforo específico. Una vez que el complejo es transportado al interior de la célula, es liberado por un mecanismo reductor o hidrolítico, para incorporarse al metabolismo de reproducción y proliferación de la bacteria.²²

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

1.6.1 Mecanismo de actuación de los sideróforos

Los sideróforos quelatan los iones Fe^{3+} dando lugar a complejos metálicos que son transportados mediante un sistema de alta afinidad dependiente del ATP a través de receptores de membrana y proteínas específicos. El transporte del complejo es impulsado termodinámicamente desde el citoplasma a través del sistema de proteínas transportadoras denominado tonB que transduce la energía necesaria desde el citosol hasta el receptor de membrana externo.

Los sideróforos coordinados al ion Fe^{3+} son transportados hasta los microorganismos por transporte activo, empleando receptores de membrana. Una vez ubicado en el citoplasma de las células, el complejo Fe^{3+} - sideróforo es reducido para formar un complejo Fe^{2+} sideróforo a partir del cual el Fe^{2+} es liberado finalmente en el citoplasma, dado que la afinidad del sideróforo por el Fe^{2+} es mucho menor que hacia el Fe^{3+} , lográndose introducir de esta forma el metal en el interior del organismo.²³

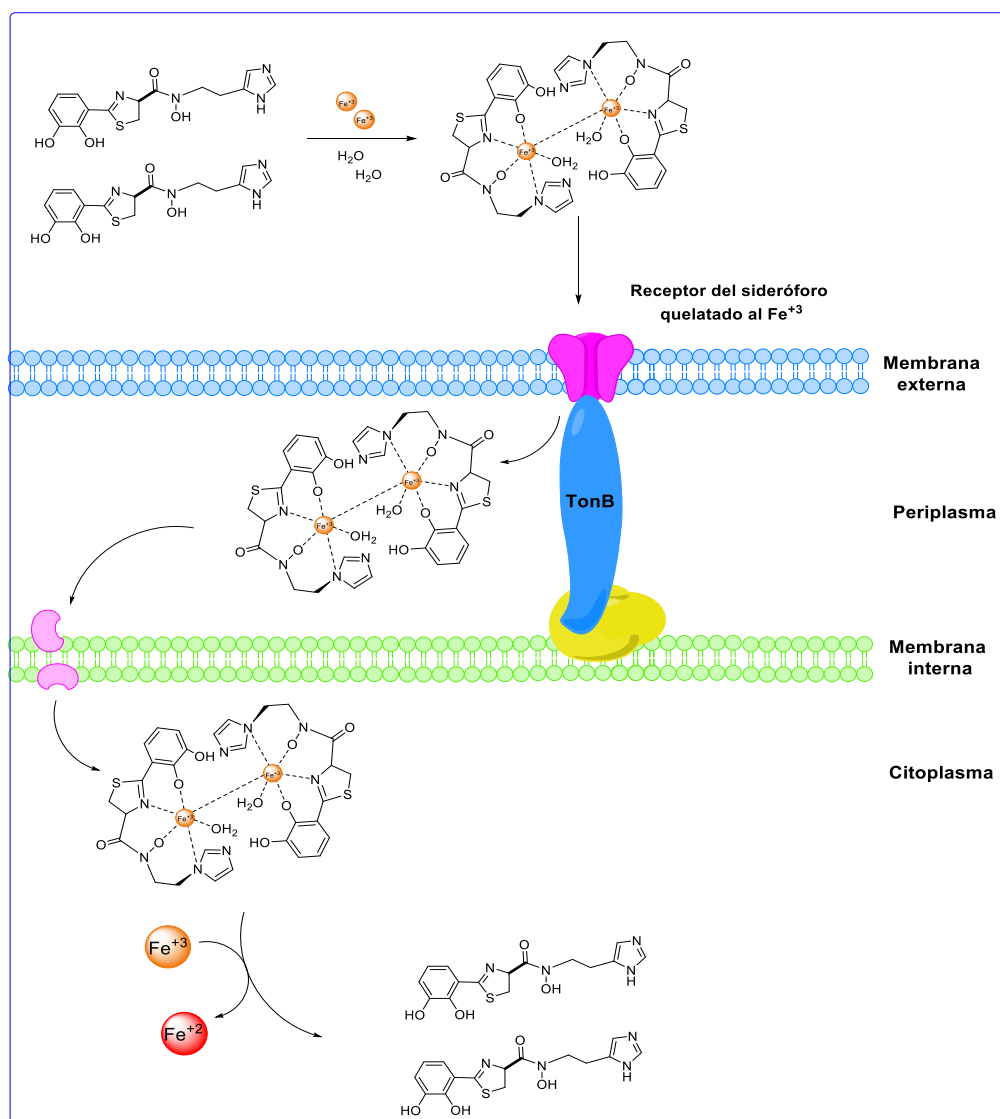


Figura 8. Mecanismo de introducción de $\text{Fe}(\text{III})$ en bacterias Gram-negativas mediante sideróforos.

1.6.2 Tipos de sideróforos¹⁸

Casi todos los sideróforos que se han identificado hasta la fecha presentan una gran variedad de estructuras químicas y actualmente forman una familia de más de 500 compuestos diferentes producidos por bacterias, hongos y plantas. Sin embargo, la diversidad de grupos funcionales que coordinan el ión férrico es escasa debido a la necesidad de grupos dadores duros que se coordinen con la forma más oxidada del hierro, como son los oxoaniones. Contienen como ligando al ácido hidroxámico, catecol o al ácido hidroxicarboxílico. Por ello, de acuerdo con el grupo funcional quelatador del hierro, los sideróforos pueden clasificarse en tres grandes grupos: catecolatos/fenolatos, α -

hidroxicarboxilatos, hidroxamatos y sideróforos mixtos, presentando cada uno de ellos una alta afinidad por el hierro.²⁴ La geometría que generalmente adoptan los complejos sideróforo-Fe (III) es la octaédrica, lo que favorece una orientación adecuada formada por seis ligandos alrededor del átomo de hierro, minimizando las repulsiones entre ellos. La forma más eficaz de quelatar el ión férrico de alto espín Fe^{+3} es mediante un entorno octaédrico con tres ligandos bidentados con átomos de oxígeno dadores.²⁵

Los sideróforos tipo catecolato/fenolato proceden del ácido salicílico y del ácido 2,3-dihidroxibenzoico (DHBA), respectivamente. Su centro de unión deriva del corismato y poseen una elevada afinidad por el Fe (III) debido a la alta densidad de carga electrónica de los grupos hidroxilo fenólicos. En el caso del grupo catecolato, al poseer dos átomos dadores de oxígeno en *orto*, la afinidad por el Fe (III) es muy elevada. La enterobactina es el sideróforo más estudiado de este grupo, producido por enterobacterias como *Escherichia coli* y *Salmonella*. Constituye uno de los sideróforos que presenta una de las mayores capacidades de quelatación de Fe (III) y es el representante más importante de los sideróforos tipo catecolato, con una de las constantes de disociación del hierro más elevadas (10^{52}), lo que le permite competir con las transferrinas.

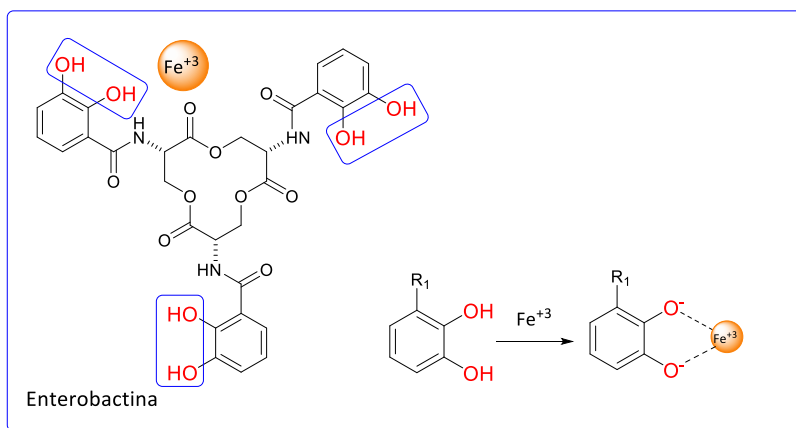


Figura 9. Estructura de enterobactina.

Uno de los sideróforos de tipo α -hidroxicarboxilatos es el sideróforo acromobactina. Se caracteriza por tener como grupo quelatante un α -hidroxiácido que generalmente deriva del ácido cítrico. Este sideróforo lo genera *Erwinia chrysanthemi*, especie que produce simultáneamente dos sistemas de sideróforos diferentes: acromobactina y crisobactina (de tipo catecol).

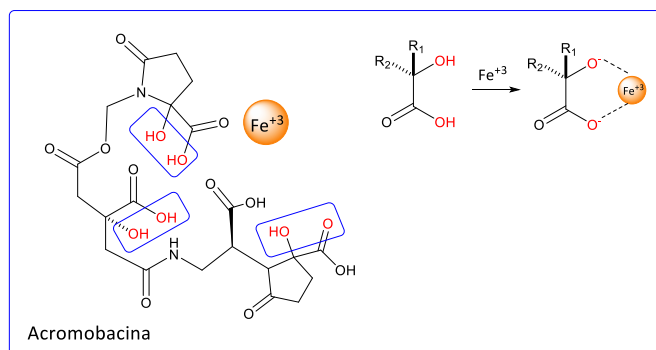


Figura 10. Grupo funcional y ejemplo de sideróforo tipo α -hidroxicarboxilato.

Los hidroxamatos del tipo de la aerobactina son producidos 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 que presenta una constante de disociación muy parecida a las transferrinas ($\sim 10^{25}$) por lo que compete con otras proteínas como la ferritina.

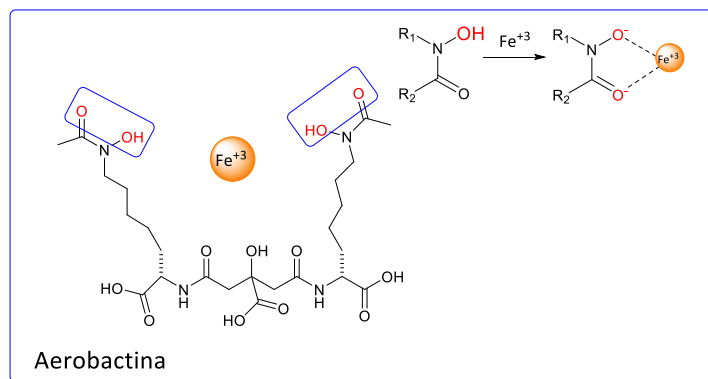


Figura 11. Sideróforo tipo hidroximato.

Los sideróforos mixtos son aquellos en los que en una misma molécula se combinan dos grupos quelatantes diferentes. Un ejemplo es la anguibactina, que contiene un grupo catecol y otro hidroxamato.

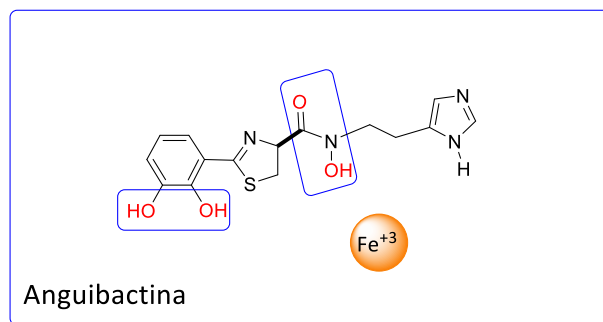


Figura 12. Sideróforo mixto anguibactina.

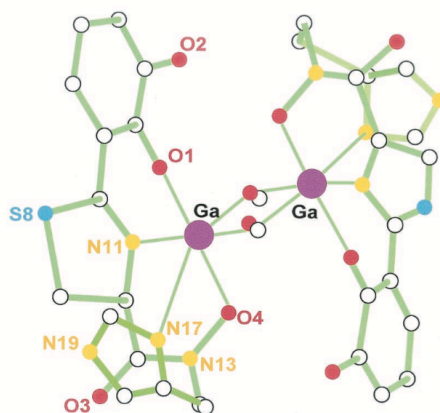


Figura 13. Estructura de Rayos X del sideróforo anguibactina coordinado a Galio (III).

Esta estructura fue determinada mediante difracción de Rayos X a partir de cristales del complejo anguibactina- Ga^{+3} . El complejo requiere de dos moléculas de anguibactina y dos moléculas de metanol para que tenga lugar la cristalización en disolución de metanol. En fluidos biológicos, el complejo se compone de dos moléculas de anguibactina, dos iones Fe^{+3} y dos moléculas de H_2O .²⁶

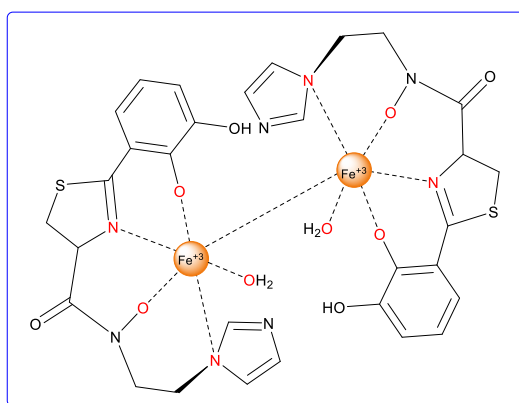


Figura 14. Sideróforo mixto anguibactina coordinado a Fe^{+3} .

1.6.3 Aplicaciones terapéuticas de los sideróforos

En los últimos tiempos, los sideróforos han llamado mucho la atención debido a sus posibles aplicaciones en diferentes campos, incluyendo ecología, agricultura, biorremediación, biosensores, y en medicina.²⁷

- Ecología. Los sideróforos tienen aplicación en ecología microbiana para mejorar el crecimiento de varios microorganismos no cultivables y pueden alterar las

comunidades microbianas.

- Agricultura. En el campo de la agricultura, los diferentes tipos de sideróforos promueven el crecimiento de varias especies de plantas y aumentan su rendimiento mediante la mejora de la absorción de Fe en las plantas.
- Biorremediación. Los sideróforos actúan como agentes de control biológico potencial contra fitopatógenos nocivos y tienen la capacidad de sustituir plaguicidas peligrosos. Las muestras contaminadas con metales pesados pueden ser desintoxicados mediante su aplicación.
- Biosensores. Los sideróforos pueden detectar el contenido de hierro en diferentes entornos, exhibiendo su papel como un biosensor.
- Medicina. En el campo de la medicina, los sideróforos utilizan la "estrategia de caballo de Troya" para formar conjugados con antibióticos e incrementar su acción selectiva a las bacterias resistentes a ellos. Ciertas enfermedades provocadas por la presencia de una sobrecarga de hierro, como la anemia de células falciformes, se pueden tratar con la ayuda de sideróforos. Otras aplicaciones médicas incluyen actividad antipalúdica, la eliminación de elementos transuránicos del cuerpo, y como antitumorales.



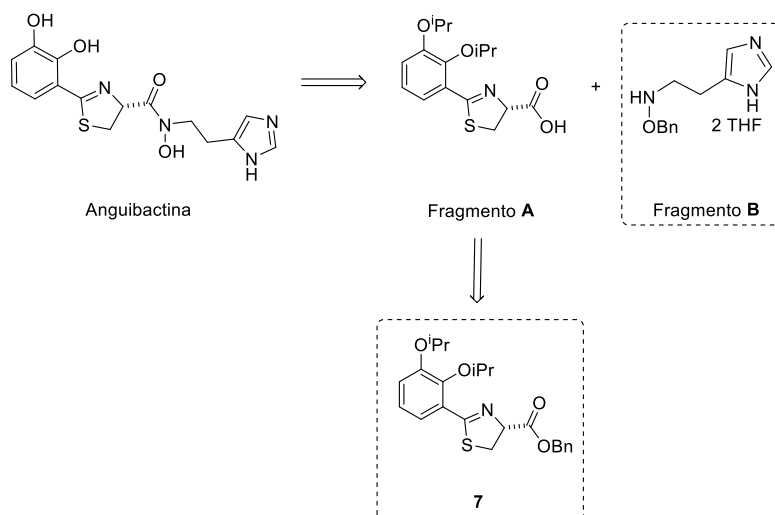
Figura 15. Esquema estructural del conjugado empleando la estrategia del "Caballo de Troya".

2. OBJETIVOS

En este Trabajo de Fin de Máster se han propuesto dos objetivos principales:

1. Se pretende aplicar el método del análisis conformacional basado en las constantes de acoplamiento, también conocido como método de Murata, a un fragmento estructural de *dos compuestos de origen marino*. Para lograr dicho propósito se plantearon dos objetivos específicos:
 - a. Determinación de la estructura plana de los fragmentos de los dos productos naturales.
 - b. Estudio de la stereoquímica de los sistemas 1,2 y 1,3-disustituidos presentes en sus estructuras mediante análisis configuracional basado en las constantes de acoplamiento “JCBA” o Método de Murata.

2. El segundo objetivo principal de este TFM se encuadra en el proyecto de síntesis del sideróforo anguibactina, para que posteriormente pueda ser aplicado en el diseño de nuevos fármacos antibacterianos y/o vacunas contra la vibriosis.



Esquema 3. Retrosíntesis parcial de anguibactina mostrando los intermedios clave objetivo 7 y B.

Como objetivos específicos de esta segunda parte se plantean:

- a. Síntesis del intermedio 7, precursor a su vez del Fragmento A, a través de un acoplamiento entre un derivado protegido del ácido dihidroxibenzoico y L-serinato de bencilo, con posterior ciclación/deshidratación para conseguir la tiazolina presente en anguibactina.
- b. Síntesis del Fragmento B mediante la formación de una amina que porta un derivado de histamina.
- c. Correcta caracterización de todos los compuestos sintetizados.

3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 Obtención de la estructura plana y determinación de la estereoquímica relativa

Uno de los objetivos de este Trabajo de Fin de Máster fue el estudio de la estereoquímica relativa de centros quirales que pueden estar presentes en compuestos macrocíclicos y que contengan sistemas dimetínicos quirales 1,2 ó 1,3-disustituídos con átomos de oxígeno. Este estudio nos permitirá deducir la disposición *sin* o *anti* de los sustituyentes en este tipo de estructuras. Tal y como se ha discutido en la introducción, este paso supone el reto estructural más difícil en la elucidación completa de un compuesto desconocido.

3.1.1 Obtención de la estructura plana inicial

La elucidación de la estructura plana de todos los sistemas que puedan estar presentes en los compuestos macrocíclicos se lleva a cabo mediante el estudio estandarizado de espectroscopia de RMN (experimentos 1D ^1H , ^{13}C y 2D COSY, HSQC, HMBC). Se encuentran entonces los sistemas de espín (ver **Figura 16** en donde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 y R_6 son heteroátomos) que pueden tener configuraciones *sin* o *anti*. Dado que estos sistemas presentan gran libertad conformacional, se les aplica la metodología del análisis configuracional basado en las constantes de acoplamiento (JCBA ó método de Murata).

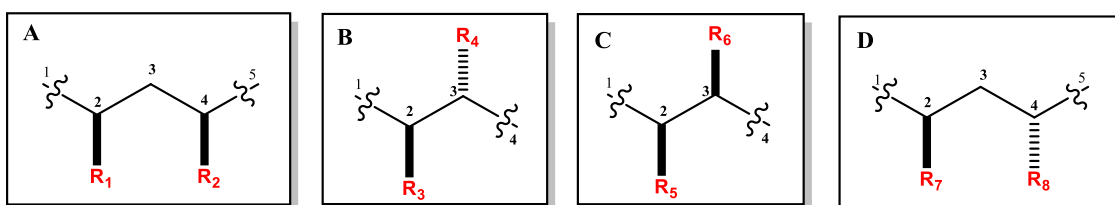


Figura 16. Sistemas de espín 1,2 y 1,3-disustituídos que pueden ser encontrados en compuestos de naturaleza macrocíclica.

Del análisis de los experimentos de RMN de ^1H y ^{13}C junto con los experimentos COSY y HSQC, se llegó a las siguientes conclusiones:

- Se asignaron inequívocamente las señales correspondientes a CH de los carbonos C-2 y C-4 del fragmento **A** y **D**, así como los carbonos C-2 y C-3 de los fragmentos **B** y **C**.

- Se dedujo la presencia de dos grupos metilenos correspondientes al carbono C-3 del fragmento **A** y del fragmento **D**, cuyos protones diastereotópicos mostraron desplazamientos químicos claramente diferenciados.
- El espectro de RMN de ^{13}C , junto con el espectro bidimensional ^1H - ^{13}C HSQC-editado que proporciona el acoplamiento directo carbono-protón, permitió correlacionar cada protón unido directamente a su carbono.
- El experimento ^1H - ^1H COSY, mediante el cual cada protón se conectó con otros protones que están a tres enlaces de distancia entre sí, protones vecinales, o a dos enlaces de distancia, protones geminales, permitió establecer los sistemas de espín.

Estos fragmentos junto con otros presentes, pudieron ser interconectados a partir de las correlaciones ^1H - ^{13}C a dos y tres enlaces observadas en el experimento HMBC.

3.1.2 Análisis configuracional a través de $^3J(\text{H}, \text{H})$ y $^{2,3}J(\text{C}, \text{H})$

Para deducir la estereoquímica de los 8 centros quirales que se presentan en los fragmentos 1,3-dimetínicos **A** y **D** y los 1,2-dimetínicos **B** y **C** se utiliza el análisis configuracional basado en constantes de acoplamiento. Esta metodología se conoce también como método de Murata en donde se pueden deducir las posiciones relativas de cada uno de los enlaces implicados en los centros quirales mediante las constantes de acoplamiento $^3J(\text{H}, \text{H})$ y $^{2,3}J(\text{C}, \text{H})$.

Las constantes de acoplamiento homonucleares protón-protón y la multiplicidad de cada señal, se obtienen de sus espectros de RMN de ^1H . Se asigna en dicho espectro los grupos metilenos como Ha al que aparece a más ppm y Hb al que lo hace a menos. Las constantes de acoplamiento heteronucleares ^1H - ^{13}C a dos y tres enlaces de distancia se obtienen del espectro HSQC-HECADE.

3.1.2.1 Estereoquímica relativa en torno a los carbonos C-2 y C-4 del fragmento **A**

En las tablas que se muestran a continuación, se recogen los valores esperados para cada uno de los conformeros alternados en torno a los enlaces C2—C3 y C3—C4 con configuración *sin* (**Tablas 1 y 3**) y *anti* (**Tablas 2 y 4**) y los valores experimentales obtenidos para dichos enlaces.

El fragmento **A** contiene un sistema 1,3-dimetínico con dos heteroátomos, por lo que estudiamos cada enlace por separado. El caso que se muestra a continuación es el

de un sistema con equilibrio conformacional.

Estudio del enlace C2—C3:

Para estudiar este enlace, se plantean dos disposiciones distintas: la **a** donde H-2 está en disposición *sin* respecto a H-3a y la **b** en donde ambos protones se encuentran en disposición *anti*:

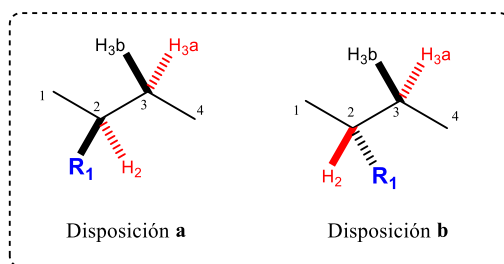
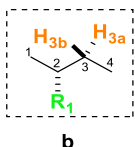


Figura 17. Disposiciones en torno al enlace C2—C3.

Tabla 1. Constantes de acoplamiento homo y heteronucleares para la configuración **a** en torno al enlace C2—C3 del fragmento A.

J	I	II	III	
$^3J(\text{H2,H3b})$	G	P	P	G
$^3J(\text{H2,H3a})$	P	G	P	P
$^3J(\text{C1,H3b})$	P	G	P	P
$^3J(\text{C1,H3a})$	P	P	G	P
$^3J(\text{C4,H2})$	P	P	G	P
$^2J(\text{C2,H3b})$	G	G	P	M
$^2J(\text{C2,H3a})$	P	G	G	G

Tabla 2. Constantes de acoplamiento homo y heteronucleares para la configuración **b** en torno al enlace C2—C3 del fragmento **A**.



b

J	IV	V	VI	
$^3J(\text{H2,H3b})$	P	P	G	G
$^3J(\text{H2,H3a})$	G	P	P	P
$^3J(\text{C1,H3b})$	P	G	P	P
$^3J(\text{C1,H3a})$	P	P	G	P
$^3J(\text{C4,H2})$	P	G	P	P
$^2J(\text{C2,H3b})$	P	G	G	M
$^2J(\text{C2,H3a})$	G	P	G	G

El valor de las constantes de acoplamiento experimentales en torno al enlace entre las posiciones C-2 y C-3 indica que no existe un conformero mayoritario. Los valores de las constantes de acoplamiento homonucleares (grande y pequeña) son muy claros y coinciden con los valores teóricos esperados para el conformero **I** y el conformero **VI**. Sin embargo, los valores medianos de algunas de las constantes heteronucleares indican la existencia de un equilibrio conformacional. De estos datos se deduce la existencia de equilibrio entre los conformeros **IV** y **VI** (etiquetas verdes de la **Tabla 2**) en una proporción 1:3 respectivamente, y por lo tanto, el enlace C2—C3 presenta la disposición **b**, representada como etiqueta amarilla.

- *Estudio del enlace C3—C4:*

Para el enlace C3—C4 también se plantean dos disposiciones distintas: la **c** donde H-4 está en disposición *sin* respecto a H-3b, y la **d** donde ambos protones se encuentra en *anti* (**Figura 18**).

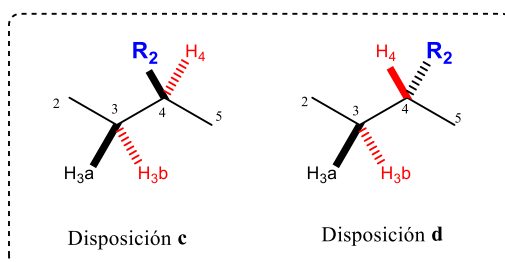
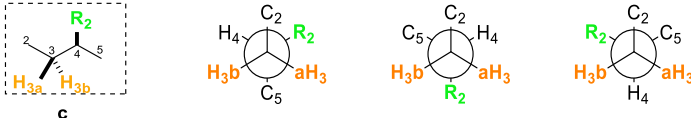


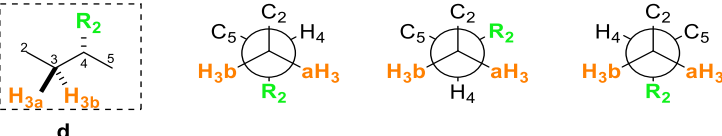
Figura 18. Disposiciones en torno al enlace C3—C4.

Tabla 3. Constantes de acoplamiento homo y heteronucleares para la disposición **c** en torno al enlace C3—C4 del fragmento A.



<i>J</i>	I	II	III	
$^3J(\text{H4}, \text{H3b})$	P	G	P	P
$^3J(\text{H4}, \text{H3a})$	G	P	P	G
$^3J(\text{C2}, \text{H4})$	P	P	G	-
$^3J(\text{C5}, \text{H3b})$	P	P	G	G
$^3J(\text{C5}, \text{H3a})$	P	G	P	-
$^2J(\text{C4}, \text{H3b})$	P	G	G	P
$^2J(\text{C4}, \text{H3a})$	G	G	P	G

Tabla 4. Constantes de acoplamiento homo y heteronucleares para la disposición **d** en torno al enlace C3—C4 del fragmento A.



<i>J</i>	IV	V	VI	
$^3J(\text{H4}, \text{H3b})$	G	P	P	P
$^3J(\text{H4}, \text{H3a})$	P	P	G	G
$^3J(\text{C2}, \text{H4})$	P	G	P	-
$^3J(\text{C5}, \text{H3b})$	P	P	G	G
$^3J(\text{C5}, \text{H3a})$	P	G	P	-
$^2J(\text{C4}, \text{H3b})$	G	P	G	P
$^2J(\text{C4}, \text{H3a})$	P	G	G	G

Si observamos los valores de las constantes de acoplamiento en torno al enlace C3—C4 (**Tablas 3 y 4**), apreciamos la presencia de un conformero mayoritario, ya que no se observan valores medianos de las constantes de acoplamiento. Del valor pequeño para la $^3J(\text{H4}, \text{H3b})$ y el grande para la $^3J(\text{H4}, \text{H3a})$, se deduce que H-4 posee una disposición *sinclinal* con respecto a H-3b y *antiperiplanar* con respecto a H-3a, que se corresponde con la presencia de los conformeros **I** o **VI**. Por último, las constantes vecinales a dos enlaces pequeña y grande correspondientes a $^2J(\text{C4}, \text{H3b})$ y $^2J(\text{C4}, \text{H3a})$

respectivamente, descartando la presencia del conformero **VI**. De estos datos se deduce que el conformero **I** es el único que cumple con todas las condiciones (etiqueta verde de la **Tabla 3**) y por tanto, en torno al enlace C3—C4 está presente la disposición **c**.

Si se combinan los resultados obtenidos para los enlaces C2—C3 (**b**: disposición *anti* entre H-2 y H-3a) y C3—C4 (**c**: disposición *sin* entre H-4 y H-3b), se deduce una configuración relativa *sin* entre los sustituyentes R₁ y R₂ en las posiciones C-2 y C-4.

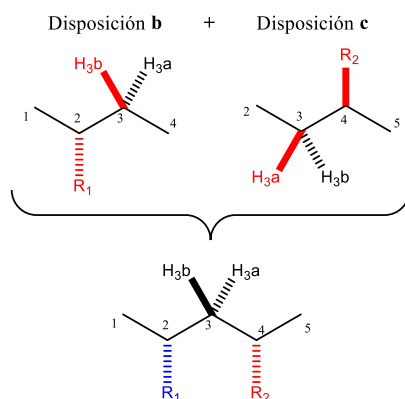


Figura 19. Combinación del análisis de los enlaces C2—C3 y C3—C4 para obtener la estereoquímica relativa entre C-2 y C-4 en el fragmento **A**.

3.1.2.2 Estereoquímica relativa en torno a los carbonos C-2 y C-3 del fragmento **B**

A continuación, se realizó un análisis similar en torno a los carbonos C-2 y C-3 del fragmento **B**.

Tabla 5. Constantes de acoplamiento homo y heteronucleares para la configuración *sin* en torno al enlace C2—C3 del fragmento **B**.

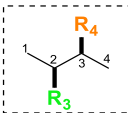
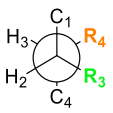
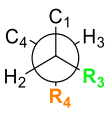
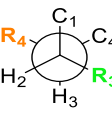
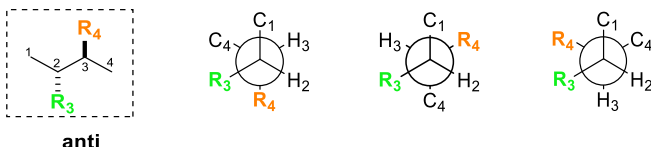
					
	<i>sin</i>	I	II	III	
<i>³J</i>(H2,H3)		P	G	P	P
<i>³J</i>(C1,H3)		P	P	G	P
<i>³J</i>(C4,H2)		P	P	G	-
<i>²J</i>(C2,H3)		P	G	G	P
<i>²J</i>(C3,H2)		P	G	G	G

Tabla 6. Constantes de acoplamiento homo y heteronucleares para la configuración *anti* en torno al enlace C2—C3 del fragmento **B**.

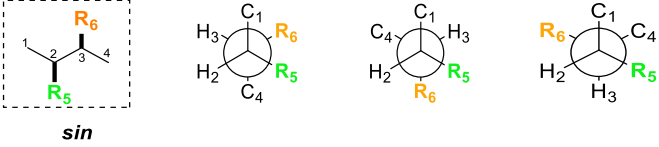


<i>J</i>	IV	V	VI
$^3J(\text{H2,H3})$	P	G	P
$^3J(\text{C1,H3})$	P	P	G
$^3J(\text{C4,H2})$	G	P	P
$^2J(\text{C2,H3})$	P	G	G
$^2J(\text{C3,H2})$	G	G	P

Los valores pequeños de $^3J(\text{H2,H3})$, $^3J(\text{C1,H3})$ y $^2J(\text{C2,H3})$, así como el grande para $^2J(\text{C3,H2})$ indican que en torno a este enlace hay un conformero mayoritario en el que los protones H-2 y H-3; el carbono C-1 y el protón H-3 se encuentran en disposición *sinclinal*, mientras que el carbono C-4 y el protón H-2 se encuentran en disposición *antiperiplanar*. El pequeño valor de la constante a dos enlaces $^2J(\text{C2,H3})$ y el valor grande de $^2J(\text{C3,H2})$, indican que H-2 se encuentra en disposición *sinclinal* respecto al heteroátomo, mientras que H-3 está *antiperiplanar*. Todos estos requisitos los cumple solamente el conformero **IV** (etiqueta verde de la **Tabla 6**), confirmando de este modo la configuración relativa *anti* entre los protones H-2 y H-3.

3.1.2.3 Estereoquímica relativa en torno a los carbonos C2 y C3 del fragmento C

Tabla 7. Constantes de acoplamiento homo y heteronucleares para la configuración *sin* en torno al enlace C2—C3 del fragmento **C**.



<i>J</i>	I	II	III
$^3J(\text{H2,H3})$	P	G	P
$^3J(\text{C1,H3})$	P	P	G
$^3J(\text{C4,H2})$	P	P	G
$^2J(\text{C2,H3})$	P	G	G
$^2J(\text{C3,H2})$	P	G	G

Tabla 8. Constantes de acoplamiento homo y heteronucleares para la configuración *anti* en torno al enlace C2—C3 del fragmento C.

El diagrama muestra el fragmento C en configuración *anti* (estructura en zigzag con R₅ y R₆ en verde y naranja) y tres conformeros rotacionales: IV, V y VI. En IV, C₁ y C₄ están en el plano del enlace C₂-C₃, con H₃ y H₂ en posiciones *syn* y *anti* respectivamente. En V, C₁ y C₄ están fuera del plano, con H₃ y H₂ en posiciones *syn* y *anti*. En VI, C₁ y C₄ están fuera del plano, con H₃ y H₂ en posiciones *anti* y *syn*.

<i>J</i>	IV	V	VI
³ <i>J</i> (H ₂ ,H ₃)	P	G	P
³ <i>J</i> (C ₁ ,H ₃)	P	P	G
³ <i>J</i> (C ₄ ,H ₂)	G	P	P
² <i>J</i> (C ₂ ,H ₃)	P	G	G
² <i>J</i> (C ₃ ,H ₂)	G	G	P

En torno al enlace C2—C3 también se puede identificar un conformero mayoritario, pero no podemos distinguir de forma inequívoca de cuál se trata. El valor grande de ³*J*(H₂,H₃) indica que ambos protones se encuentran en disposición *antiperiplanar*. En cuanto a las constantes heteronucleares vecinales, muestran una disposición *sinclinal* de C-1 con respecto a H-3 y de C-4 con respecto a H-2. Por último, los valores grandes de las constantes heteronucleares a dos enlaces sugieren que el átomo electronegativo está en disposición *sinclinal* a H-2 y a H-3. Todos estos requisitos los cumplen los conformeros **II** y **V** (etiquetas naranjas de las **Tablas 7 y 8**), tratándose el enlace C2—C3 de un sistema No-Murata. Como esta metodología no nos permite discernir entre ambas configuraciones, se recurre al experimento NOESY que muestra las correlaciones entre protones a través del espacio. La existencia de un NOE entre los protones que están unidos a los carbonos C-1 y C-4, permitió deducir que se trata del conformero **II**.

3.1.2.4 Estereoquímica relativa en torno a los carbonos C-2 y C-4 del fragmento D

Dado que el fragmento **D** es un sistema 1,3-dimetínico que contiene los heteroátomos (R₇ y R₈), se estudia cada enlace por separado:

- Estudio del enlace C2—C3:

Para estudiar este enlace, se plantean dos disposiciones distintas: la **a** donde H-2 está en disposición *sin* respecto a H-3a y la **b** donde ambos protones se encuentran en disposición *anti*:

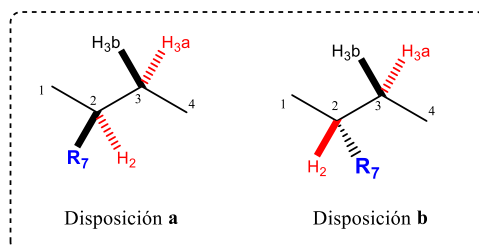


Figura 20. Disposiciones en torno al enlace C2—C3 del fragmento **D**.

Tabla 9. Constantes de acoplamiento homo y heteronucleares para la configuración **a** en torno al enlace C2-C3 del fragmento **D**.

<i>J</i>	I	II	III	
$^3J(\text{H2,H3b})$	G	P	P	P
$^3J(\text{H2,H3a})$	P	G	P	P
$^3J(\text{C1,H3b})$	P	G	P	P
$^3J(\text{C1,H3a})$	P	P	G	G
$^3J(\text{C4,H2})$	P	P	G	G
$^2J(\text{C2,H3b})$	G	G	P	P
$^2J(\text{C2,H3a})$	P	G	G	G

Tabla 10. Constantes de acoplamiento homo y heteronucleares para la configuración **b** en torno al enlace C2-C3 del fragmento **D**.

<i>J</i>	IV	V	VI	
$^3J(\text{H2,H3b})$	P	P	G	P
$^3J(\text{H2,H3a})$	G	P	P	P
$^3J(\text{C1,H3b})$	P	G	P	P
$^3J(\text{C1,H3a})$	P	P	G	G
$^3J(\text{C4,H2})$	P	G	P	G
$^2J(\text{C2,H3b})$	P	G	G	P
$^2J(\text{C2,H3a})$	G	P	G	G

En torno al enlace C2—C3 (**Tablas 9 y 10**), las constantes de acoplamiento indican la presencia de un conformero mayoritario. Los valores pequeños de $^3J(\text{H}_2,\text{H}_3\text{b})$ y de $^3J(\text{H}_2,\text{H}_3\text{a})$, indican que H-2 está en disposición *sinclinal* con respecto a H-3a y a H-3b, condiciones que tan sólo cumplen los conformeros **III** y **V**. En cuanto a las constantes heteronucleares, el valor grande de $^3J(\text{C}_1,\text{H}_3\text{a})$ y el pequeño para $^3J(\text{C}_1,\text{H}_3\text{b})$ indican que C-1 se encuentra en disposición *antiperiplanar* a H-3a y *sinclinal* a H-3b, que coincide con la presencia de los rotámeros **III** ó **VI**. Por otro lado, las constantes a dos enlaces muestran que el átomo electronegativo (O) está en disposición *sinclinal* a H-3a, ya que $^2J(\text{C}_2,\text{H}_3\text{a})$ es grande, y en disposición *antiperiplanar* con respecto a H-3b, ya que $^2J(\text{C}_2,\text{H}_3\text{b})$ es pequeña. Todas estas relaciones se cumplen únicamente en el conformero **III** (etiqueta verde de la **Tabla 9**), por lo que la disposición entorno al enlace C2—C3 es la **a**.

- *Estudio del enlace C3—C4:*

Para el enlace C3—C4 también se plantean dos disposiciones distintas: la **c** donde H-4 está en disposición *sin* respecto a H-3b, y la **d** donde ambos protones se encuentra en *anti* (**Figura 21**).

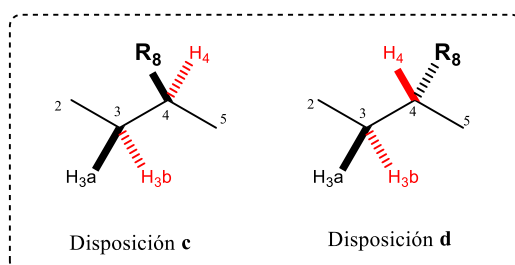
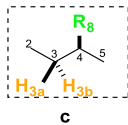
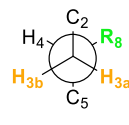
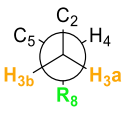
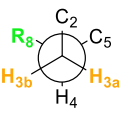


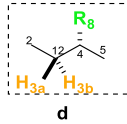
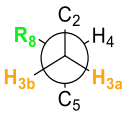
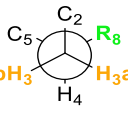
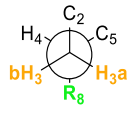
Figura 21. Disposiciones en torno al enlace C3—C4.

Tabla 11. Constantes de acoplamiento homo y heteronucleares para la configuración c en torno al enlace C3-C4 del fragmento D.

<i>J</i>	I	II	III
$^3J(\text{H4}, \text{H3b})$	P	G	P
$^3J(\text{H4}, \text{H3a})$	G	P	P
$^3J(\text{C2}, \text{H4})$	P	P	G
$^3J(\text{C5}, \text{H3b})$	P	P	G
$^3J(\text{C5}, \text{H3a})$	P	G	P
$^2J(\text{C4}, \text{H3b})$	P	G	G
$^2J(\text{C4}, \text{H3a})$	G	G	P

Tabla 12. Constantes de acoplamiento homo y heteronucleares para la configuración d en torno al enlace C3-C4 del fragmento D.

<i>J</i>	IV	V	VI
$^3J(\text{H4}, \text{H3b})$	G	P	P
$^3J(\text{H4}, \text{H3a})$	P	P	G
$^3J(\text{C2}, \text{H4})$	P	G	P
$^3J(\text{C5}, \text{H3b})$	P	P	G
$^3J(\text{C5}, \text{H3a})$	P	G	P
$^2J(\text{C4}, \text{H3b})$	G	P	G
$^2J(\text{C4}, \text{H3a})$	P	G	G

Observando los valores de las constantes de acoplamiento en torno al enlace C3—C4, se puede apreciar de nuevo la presencia de un conformero mayoritario, ya que no se observan valores medianos de las constantes de acoplamiento. Del pequeño valor de $^3J(\text{H4}, \text{H4b})$ y del grande de $^3J(\text{H4}, \text{H3a})$, se deduce que H-4 posee una disposición *sinclinal* con respecto a H-3b y *antiperiplanar* con respecto a H-3a, indicando la presencia de los conformeros I o VI. Por otro lado, el pequeño valor observado para $^3J(\text{C5}, \text{H3b})$, indica que C-5 está en disposición *sinclinal* con respecto a H-3b, por lo que se decanta la presencia del conformero VI, ya que en ese caso la disposición de

ambos debería ser *antiperiplanar*. Dado que el conformero **I** es el único que cumple con todas las condiciones (etiqueta verde de la **Tabla 11**), en torno al enlace C3—C4 está presente la disposición **c**.

Al combinar las disposiciones en torno a los enlaces C2—C3 (**b**: disposición *anti* entre H-2 y H-3a) y C3—C4 (**c**: disposición *sin* entre H-4 y H-3b), se obtiene como resultado una configuración relativa *sin* entre los dos heteroátomos en las posiciones C-2 y C-4.

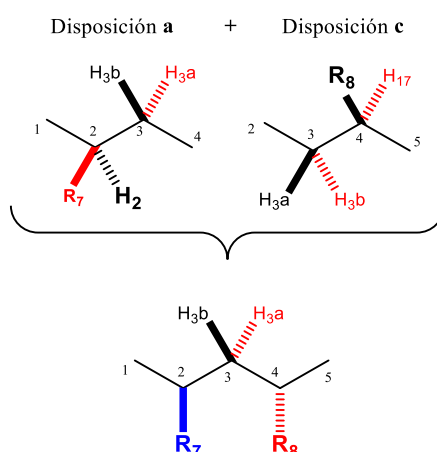


Figura 22. Combinación del análisis de los enlaces C2 – C3 y C3 – C4 para obtener la estereoquímica relativa entre C2 y C4 en el fragmento **D**.

3.1.3 Fragmentos A-D con la estereoquímica relativa deducida

A la vista de los estudios realizados, se presenta el resultado final que muestra los centros quirales asignados.

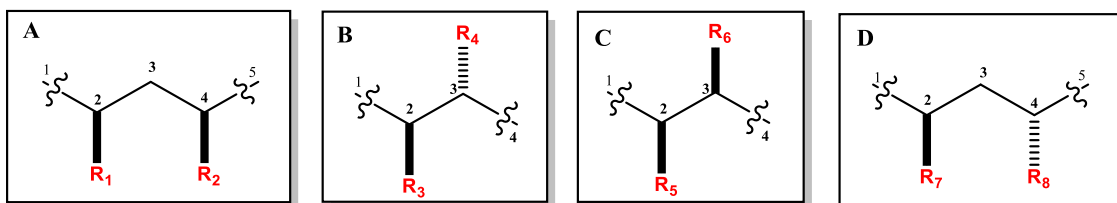


Figura 23. Estereoquímica relativa deducida para los fragmentos A, B, D y D.

Queda definida la estereoquímica relativa de los sistemas de espín, como se ha dicho anteriormente, era uno de los objetivos planteados para este Trabajo de Fin de Máster.

3.2 Aproximación a la síntesis total de *anguibactina* (15)

El sideróforo *anguibactina* se clasifica como un sideróforo mixto ya que posee dos grupos funcionales (catecol e hidroxamato) como agentes quelatantes del ion Fe^{+3} .

Teniendo en cuenta la biogénesis, se propone la estereoquímica que se muestra a continuación, ya que no hay evidencias sintéticas de la misma.²⁸

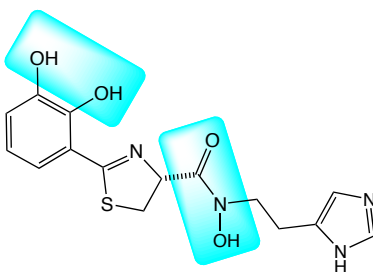
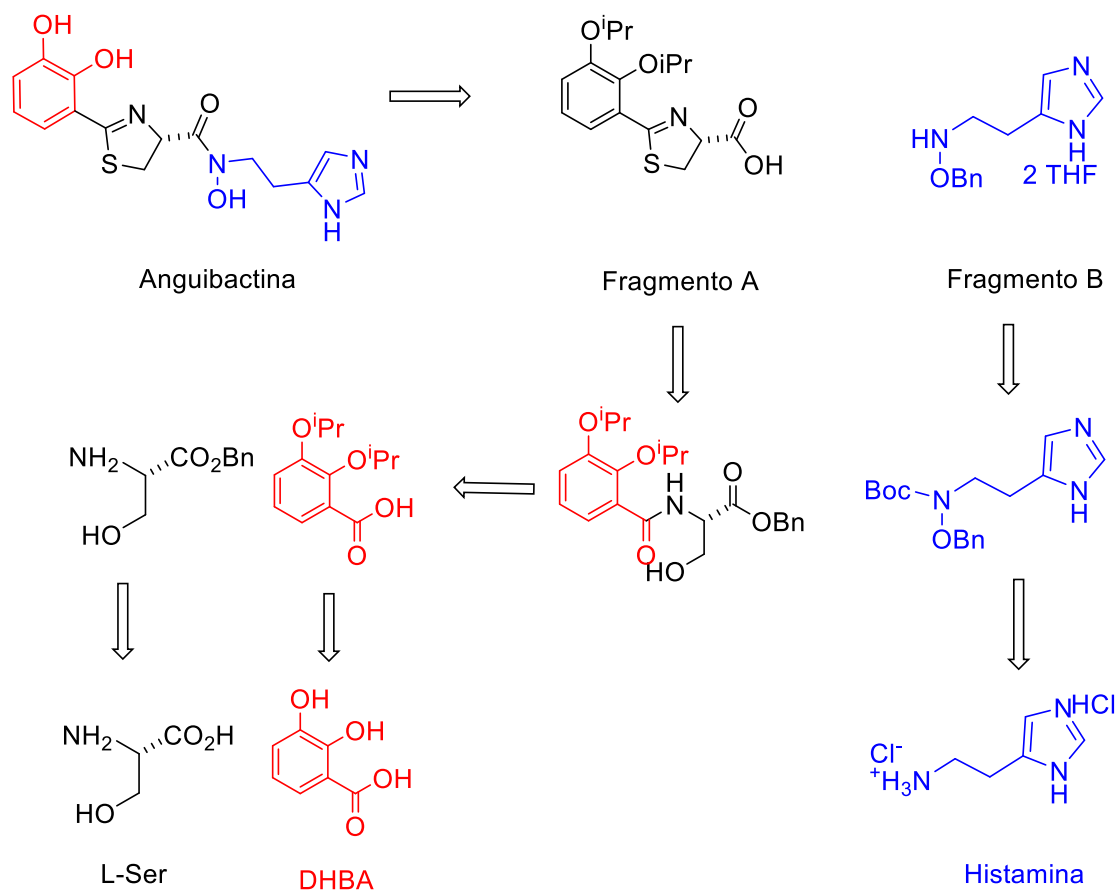


Figura 24. Estructura química de *anguibactina* (15).

3.2.1 Planteamiento retrosintético

Con el objetivo de diseñar una estrategia para la síntesis del sideróforo *anguibactina* **15**, se siguió la metodología propuesta por Takeuchi y col.²⁹ Para ello, se plantea la obtención de dos fragmentos clave **A** y **B**, de tal forma que el grupo catecol se obtendría a partir del ácido 2,3-dihidroxibenzoico **1**, el anillo de imidazol a partir del dihidrocloruro de histamina **9**, mientras que el anillo de tiazolina se formaría a partir de la L-serina **5**. El análisis retrosintético se muestra a continuación en el **Esquema 4**.

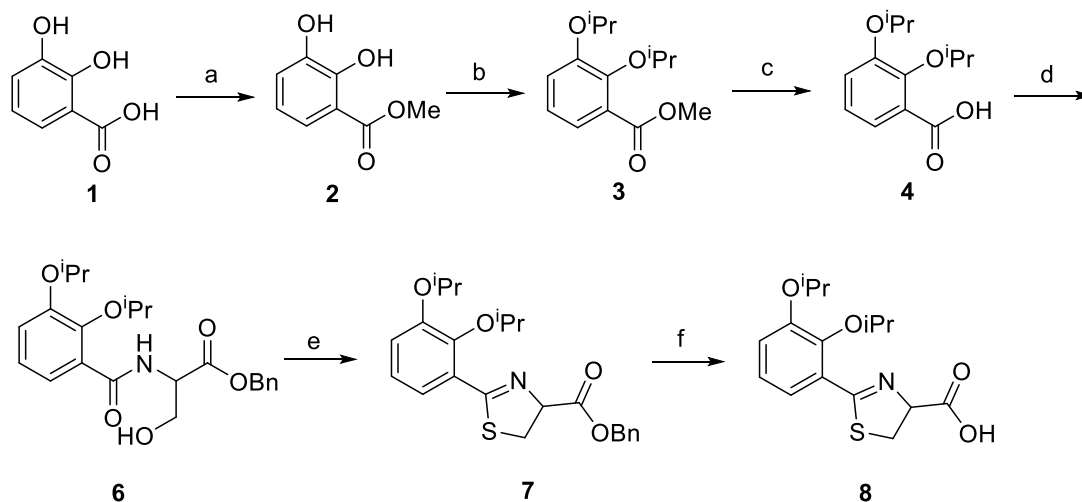


Esquema 4. Análisis retrosintético de anguibactina.

3.2.2 Propuesta sintética para la obtención de los intermedios objetivo

La estrategia sintética propuesta para la obtención del fragmento **A** implica la preparación del intermedio **7** a través de una ruta sintética que utiliza como reactivo de partida L-serinato de bencilo y el ácido 2,3 dihidroxibenzoico (**Esquema 5**). Por otro lado, la obtención del fragmento **B** consiste en una síntesis lineal en tres pasos a partir de histamina, disponible comercialmente, como se muestra en el **Esquema 6**.

3.2.3 Preparación del fragmento A



Esquema 5. Reactivos y condiciones para la obtención del fragmento A: (a) SOCl_2 , MeOH; (b) $i\text{PrBr}$, K_2CO_3 , KI, DMF, 50°C ; (c) $\text{Ba}(\text{OH})_2$, THF/ H_2O , 50°C ; (d) L-Ser-OBn, TBTU, Et_3N , DMF; (e) SOCl_2 , CH_2Cl_2 ; (f) H_2 , Pd/C, MeOH.

Según la ruta sintética propuesta, el éster metílico **2** se obtiene fácilmente a partir de DHBA comercial. La protección del grupo catecol del compuesto **2** con bromuro de *iso*-propilo empleando carbonato potásico y yoduro potásico en DMF a 50°C , condujo al éster **3** con un 86.2% de rendimiento, que seguido de saponificación con hidróxido de bario en THF/ H_2O a 50°C dio lugar al ácido carboxílico **4** con un rendimiento del 80%.³⁰ El acoplamiento del ácido **4** con L-Serinato de bencilo **5** empleando TBTU y Et_3N en DMF, rindió la amida **6** con un rendimiento del 83.5%. En su espectro ^1H -RMN se observó el desplazamiento del protón en α H-8 a 4.84 ppm y la aparición de un doblete ($J = 6.7$ Hz) a 9.03 ppm correspondiente al protón del grupo NH. La formación del enlace amida se confirmó también por la señal del carbonilo a 170.3 ppm que aparece en su espectro de RMN de ^{13}C y por el (+)-ESIMS de alta resolución que mostró el ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ a m/z 416.2077 (masa calculada para $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{NO}_6\text{H}^+$: 416.2068), indicando la formación del producto.

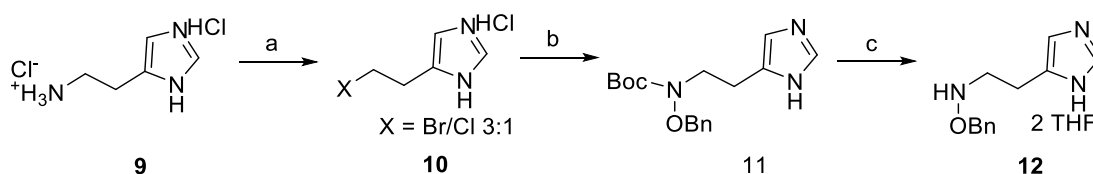
La ciclación de **6** tuvo lugar empleando el reactivo de Lawesson, que convierte la amida precursora en una tiazolina **7**. El mecanismo es una ciclación/deshidratación, en el que el grupo hidroxilo se convierte en un buen grupo saliente, mientras que el azufre actúa como nucleófilo para completar la ciclación. La reacción transcurrió con un 50% de

rendimiento. El espectro de RMN de ^1H de **7** muestra el desplazamiento del protón H-8 y de los protones geminales H-9 a 5.18 y 3.55 ppm respectivamente. La formación del anillo de tiazolina se confirmó por el desplazamiento a menor frecuencia (35.8 ppm) de la señal asignada C-9 en el espectro de RMN de ^{13}C de **7** con respecto al desplazamiento de dicho carbono en el precursor **6** a 63.7 ppm. Además, el (+)-ESIMS de alta resolución de **7** mostró el ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ a m/z 414.1728 (masa calculada para $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{NO}_4\text{SH}^+$: 414.1734), corroborando la obtención del producto.

Queda pendiente la eliminación del grupo bencilo del compuesto **7** mediante la realización de una hidrogenación catalítica.

3.2.4 Preparación del fragmento B

De forma paralela se llevó a cabo la preparación de *O*-benciloxihistamina **12** a partir de la histamina **9** siguiendo el proceso desarrollado por Takeuchi y col. en la síntesis de acinetobactina (**Esquema 6**).



Esquema 6. Reactivos y condiciones para la obtención del fragmento B: (a) $\text{NaNO}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$, KBr; (b) NaH, BnONHBoc, DMF, 0°C a T.a.; (c) TFA/ CH_2Cl_2 (1:4).

El primer paso de esta ruta sintética supuso la obtención de la mezcla de haluros **10**, a partir de la histamina comercial **9** al ser tratada con nitrito sódico y bromuro potásico en ácido sulfúrico 1,5 M a -15°C .³¹ De esta forma se logra obtener una mezcla 3:1 de los derivados bromado y clorado. Para evitar reacciones intramoleculares en su almacenamiento, fue necesaria la adición de ácido clorhídrico 0,5 M en acetato de etilo. El (+)-ESIMS de **10** confirmó la formación de los dos haluros por la aparición de los picos a m/z 131.04 y 133.03 con intensidades relativas 3:1, correspondiente al ión $[\text{M}+\text{H}]^+$ del derivado clorado, y de los picos a m/z 175.99 y 176.98, de intensidades relativas 1:1, correspondiente al ión $[\text{M}+\text{H}]^+$ del derivado bromado. El espectro de RMN de ^1H de **10** muestra dos tripletes a 3.79 y 3.64 ppm que integran por 1 y 3 protones, y otros dos

tripletes a 3.26 y 3.16 ppm que integran por 3 y 1 protones, respectivamente, confirmando la relación bromuro/cloruro 3:1.

La *N*-alquilación de **10** con *N-tert*-butoxicarbonil-*O*-benciloxiamina, empleando hidruro sódico en DMF a 0°C, ³² permitió obtener la hidroxilamina bencilada **11** con un 50% de rendimiento. Su espectro de RMN de ¹H confirmó la sustitución de los halógenos por el grupo hidroxilamino protegido, al mostrar la aparición de dos singuletes a 1.42 y 4.81 ppm correspondientes a los metilos del grupo *tert*-butoxicarbonilo y a los protones bencílicos, respectivamente. Adicionalmente, en el espectro de RMN de ¹³C de **11** se observó la desaparición de las señales de los carbonos C-1 y C-2 de los derivados clorado y bromado **10** a 42.8/30.7 y 27.3/27.2 ppm respectivamente, y la consecuente aparición de las señales de dichos carbonos a 49.3 y 24.7 ppm.

La hidroxilamina **12** fue obtenida por eliminación del grupo protector *tert*-butoxicarbonilo en medio ácido, con rendimiento del 87%. La desprotección se confirmó por medio de RMN de ¹H que mostró la desaparición del singulete a 1.42 ppm, correspondiente al grupo *tert*-butilo y por espectrometría de masas de baja resolución (+)-ESIMS que mostró la aparición del pico a *m/z* 218.13 correspondiente al ion [M+H]⁺.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Metodología General

Todas aquellas reacciones que requieren condiciones anhidras se realizaron bajo atmósfera de argón desoxigenado seco (Argón C-C50) con agitación magnética y a temperatura ambiente, salvo que se indique lo contrario. El material de vidrio empleado se secó en una estufa a 120°C durante 12 horas. Al retirarlo de la estufa se dejó enfriar bajo atmósfera de argón durante 1 h. Las reacciones se realizaron en balones de una o dos bocas según correspondiera, adaptándoles un septum al que se le hizo pasar una corriente de argón con entrada y salida mediante una aguja. En el momento de su uso, el material se purgó con corriente de argón.

Las reacciones a 0°C se llevaron a cabo en un baño de agua-hielo. Para las reacciones a temperaturas inferiores a 0°C se utilizó un equipo cryocool.

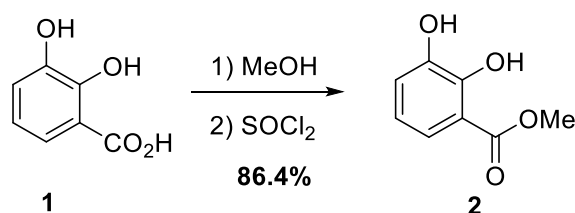
Los disolventes empleados en las reacciones fueron previamente secados mediante reflujo en atmósfera inerte con un agente desecante adecuado: Na para tolueno y CaH₂ para DCM. La DMF seca se adquirió anhidra en su envase comercial sellado con septum, al igual que la Et₃N.

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 utilizaron placas de gel de sílice Merck 60 F254, empleando como luz reveladora la UV de 254 nm o como disolución reveladora cerio molibdeno con posterior calentamiento.

Los espectros de ¹H y ¹³C RMN se realizaron en los Servicios de Apoyo á Investigación da Universidade da Coruña (SAI) y en el Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA), en los espectrómetros Bruker Avance 400 MHz y Bruker Avance 300 MHz respectivamente. Como disolventes deuterados para RMN se emplearon CDCl₃, CD₃OD y D₂O. Los desplazamientos químicos se calcularon en la escala δ como partes por millón (ppm), y las constantes de acoplamiento (*J*) en Hercios (Hz).

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

Síntesis de 2,3-di-hidroxi-propoxibenzoato de metilo (2)



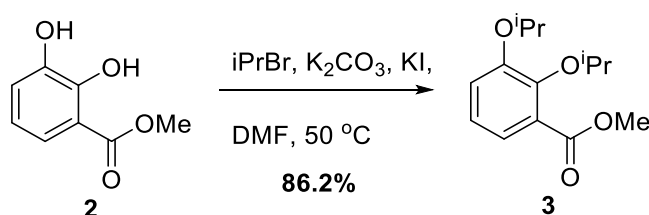
Sobre una disolución de ácido 2,3-dihidroxibenzoico comercial **1** (1.00 g, 6.49 mmol) en MeOH (20 mL), se añadió SOCl₂ gota a gota (567.89 μL, 7.79 mmol). La mezcla se sometió a reflujo (60°C) con agitación durante 24 h. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se dejó alcanzar temperatura ambiente y se neutralizó con K₂CO₃. Una vez a pH 7 se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se distribuyó entre EtOAc (25 mL) y H₂O (40 mL). La fase acuosa se lavó con 30 mL de EtOAc (10 mL x 3 veces). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con una disolución saturada de NaCl, se secaron sobre MgSO₄ anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida, obteniéndose el 2,3-dihidroxibenzoato de metilo **2** como un sólido cristalino de color marrón claro (864.1 mg, rendimiento del 86.4%).

RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃), δ_H ppm: 7.36 (dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz, 1H, H-6); 7.11 (dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H, H-4); 6.80 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-5); 3.95 (s, 3H, OCH₃).

RMN-¹³C (400 MHz, CDCl₃), δ_C ppm: 170.9 (CO, C-7); 148.9 (C, C-2); 145.1 (C, C-3); 120.7 (CH, C-4); 119.9 (CH, C-5); 119.4 (CH, C-6); 112.5 (C, C-1); 52.6 (CH₃, OCH₃).

(+)-LR-ESIMS *m/z*: 191.03 [M+Na]⁺ (masa calculada para C₈H₈O₄Na⁺: 191.0315).

Síntesis de 2,3-di-*iso*-propoxibenzoato de metilo (3)



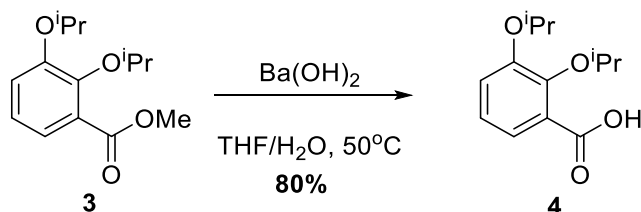
Sobre una suspensión del compuesto **2** (864.1 mg, 5.14 mmol) en DMF (10 mL), se añadió KI (3.25 g, 19.58 mmol), K₂CO₃ (3.20 g, 23.15 mmol) y finalmente ⁱPrBr (1.93 mL, 20.56 mmol). A continuación, la mezcla se sometió a reflujo (50°C) con agitación 24 h bajo atmósfera de argón. Transcurrido este tiempo, se dejó enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente y se distribuyó entre CH₂Cl₂ (50 mL) y H₂O (50 mL). Se separaron las fases, la fracción orgánica se lavó con una disolución acuosa de HCl al 5% en v/v (30 mL) y con una disolución acuosa saturada de NaCl (30 mL), y finalmente se secó con MgSO₄ anhidro. Después de eliminar el disolvente a presión reducida, se recogieron 1.12 g de 2,3-di-*iso*-propoxibenzoato de metilo **3** como un aceite marrón (rendimiento del 86.2%).

RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃), δ_H ppm: 7.29 (dd, *J* = 6.3, 2.9 Hz, 1H, H-6); 7.06-6.98 (m, 2H, H-4/H-5); 4.52 (dhept, *J* = 12.2, 6.1 Hz, 2H, ⁱPr); 3.88 (s, 3H, OMe); 1.33 (d, *J* = 6.1 Hz, 6H, ⁱPr); 1.27 (d, *J* = 6.1 Hz, 6H, ⁱPr).

RMN-¹³C (400 MHz, CDCl₃), δ_C ppm: 167.6 (CO, C-7); 151.9 (C, C-2); 148.2 (C, C-3); 127.6 (C, C-1); 123.2 (CH, C-4); 122.7 (CH, C-5); 120.1 (CH, C-6); 76.2 (CH, ⁱPr); 71.7 (CH, ⁱPr); 52.1 (CH₃, OMe); 22.5 (CH₃, ⁱPr); 22.3 (CH₃, ⁱPr).

(+)-LR-ESIMS *m/z*: 275.13 [M+Na]⁺ (masa calculada para C₁₄H₂₀O₄Na⁺: 275.1254).

Síntesis del ácido 2,3-di-*iso*-propoxibenzoico (4)



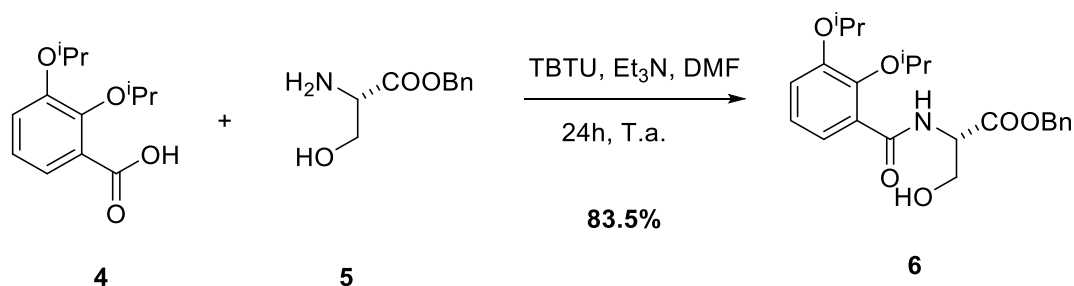
El éster **3** (1.12 g, 4.44 mmol) se disolvió en 20 mL de una mezcla THF/H₂O 1:1 y seguidamente se añadió el Ba(OH)₂·8H₂O (4.20 mg, 13.31 mmol). La suspensión se sometió a reflujo (50°C) con agitación durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, se realizó una capa fina en EtOAc/Hex 1:1 y no se observó producto de partida, por lo que se dejó alcanzar temperatura ambiente. Se activó la resina de intercambio iónico Dowex® 50WX8 con HCl 5% y se añadió a la mezcla de reacción hasta que se consiguió pH 4. A continuación, se filtró a vacío y se eliminó el disolvente a presión reducida, recogiendo 851.0 mg de ácido 2,3-di-*iso*-propoxibenzoico **4** como un aceite marrón claro (rendimiento del 80%).

RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃), δ_H ppm: 7.74 (dd, *J* = 6.8, 2.7 Hz, 1H, H-6); 7.17-7.11(m, 2H, H-4/H-5); 5.00 (hept, *J* = 6.3 Hz, 1H, ⁱPr); 4.58 (hept, *J* = 6.1 Hz, 1H, ⁱPr); 1.39 (d, *J* = 6.3 Hz, 6H, ⁱPr); 1.38 (d, *J* = 6.1 Hz, 6H, ⁱPr).

RMN-¹³C (400 MHz, CDCl₃), δ_C ppm: 165.4 (CO, C-7); 150.0 (C, C-2); 146.5 (C, C-3); 124.2 (CH, C-4); 123.9 (CH, C-5); 123.4 (C, C-1); 120.1 (CH, C-6); 77.8 (CH, ⁱPr); 71.6 (CH, ⁱPr); 21.9 (CH₃, ⁱPr); 21.8 (CH₃, ⁱPr).

(+)-LR-ESIMS *m/z*: 261.11 [M+Na]⁺ (masa calculada para C₁₃H₁₈O₄Na⁺: 261.1097).

Síntesis de 2,3-bis(isopropoxi)benzamido)-3-hidroxiopropanoato de bencilo (6)



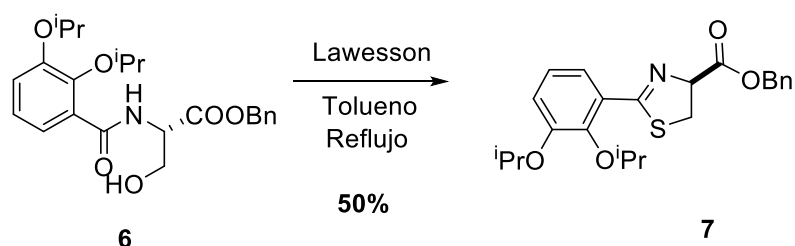
Sobre una disolución de L-serinato de bencilo **5** (573.7 mg, 1.62 mmol) en DMF (5 mL) se añadió una disolución del ácido 2,3-di-*iso*-propoxibenzoico (425.5 mg, 1.79 mmol) en DMF (5 mL), el agente acoplante TBTU (573.4 mg, 1.79 mmol) y Et₃N (339.41 mL, 2.44 mmol), dejándose agitar a temperatura ambiente durante toda la noche en condiciones anhidras. Transcurrido este tiempo, y una vez que se observó que la reacción había concluido por medio de una capa fina en AcOEt/Hex 1:2 y revelando con Cerio, se diluyó la mezcla de reacción con EtOAc (20 mL). A continuación, se lavó dos veces con 15 mL de cada una de las siguientes disoluciones: disolución acuosa saturada de NaHCO₃, H₂O, disolución de ácido cítrico (0.1 M) y una disolución acuosa saturada de NaCl. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice en Hexano/EtOAc 3:1, recogiendo 563.1 mg de **6** como un sólido blanco cristalino (rendimiento del 83.5%).

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃), δ_H ppm: 9.03 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, NH); 7.62 (dd, *J* = 7.3, 2.3 Hz, 1H, H-6); 7.26 (m, 1H, H-5); 7.25 (m, 1H, Ph); 6.96 (m, 1H, H-4); 5.14 (s, CH₂, OBn); 4.84 (m, 1H, H-8); 4.72 (hept, CH₂, ⁱPr); 4.46 (hept, *J* = 6.1 Hz, CH₂, ⁱPr); 1.27 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, ⁱPr); 1.19 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, ⁱPr).

RMN-¹³C (300 MHz, CDCl₃), δ_C ppm: 170.3 (CO, C-7); 166.1 (CO, C-10); 150.8 (C, C-2); 146.8 (C, C-3); 135.3 (C); 128.6 (CH); 128.4 (CH); 128.2 (CH); 127.3 (C, C-1); 123.5 (CH, C-4); 123.1 (CH, C-5); 119.5 (CH, C-6); 76.4 (CH₂, ⁱPr); 71.4 (CH₂, ⁱPr); 67.3 (CH₂, C-11); 63.7 (CH₂, C-9); 55.5 (CH, C-8); 21.1 (CH₃, ⁱPr).

(+)-LR-ESIMS *m/z*: 416.21 [M+H]⁺. **(+)-HR-ESIMS *m/z*:** 416.2077 [M+H]⁺ (masa calculada para C₂₃H₂₉NO₆H⁺: 416.2068).

Síntesis de 2,3-diisopropoxifenil-4,5-dihidrotiazol-4-carboxilato de bencilo (7)



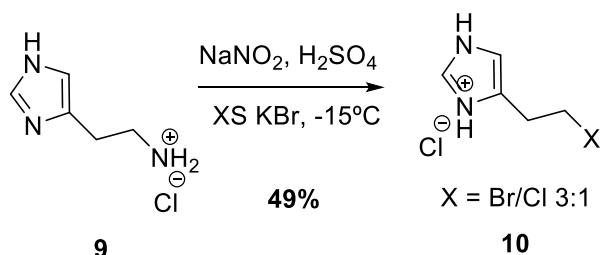
Se disolvieron 230 mg de **6** en 20 mL de tolueno y se añadió el reactivo de Lawesson (179.11 mg, 0.44 mmol). La disolución se sometió a reflujo (120°C) con agitación durante 9 h en condiciones anhidras y bajo atmósfera de argón. Transcurrido este tiempo, se comprobó que la reacción había finalizado por cromatografía en capa fina empleando AcOEt/Hexano 1:1 y revelando con cerio. Se concentró la mezcla de reacción a presión reducida y se purificó empleando cromatografía en columna de gel de sílice. Se recogieron 112.3 mg de 2,3-diisopropoxifenil-4,5-dihidrotiazol-4-carboxilato de bencilo **7** como cristales blancos (rendimiento del 50%).

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃), δ_H ppm: 7.48(dd, J = 6.7,2.7 Hz, H-5); 7.37(sa, OBn); 7.33(m, H-3), 6.98(m, H-4); 5.26(s, CH₂, OBn); 5.18(t, J = 9,2 Hz, H-8); 4.69 (sept, J = 6.2 Hz, H ⁱPr); 4.54 (sept, J = 6;.1 Hz, H ⁱPr); 3.55(ddd, J = 7.5, 8.9, 11.2 Hz, CH₂ – S); 1.34(d, J = 6.1, 3H ⁱPr); 1.27 (d, J = 6.2, 3H ⁱPr).

RMN-¹³C (300 MHz, CDCl₃), δ_C ppm: 171.1 (CO, C-7); 169.6 (CO, C-10); 151,3(C-2); 147(C-1); 135.7(C); 129.1(CH); 128.7(CH); 128.5(CH); 128.4(CH, C-5); 123.3(CH, C-4); 121.9(C, C-3); 118.6(C, C-6); 75.9(CH, C-8); 71.4(CH ⁱPr); 67.2(CH₂, OBn); 35.8 (CH₂, S); 21.9 (CH₃, ⁱPr).

(+)-LR-ESIMS *m/z*: 414.17 [M+H]⁺. **(+)-HR-ESIMS *m/z*:** 414.1728 [M+H]⁺ (masa calculada para C₂₃H₂₇NO₄SH⁺: 414.1734).

Síntesis de hidrocioruro 4-(2-cloroetil)-1*H*-imidazol e hidrocioruro 4-(2-bromoetil)-1*H*-imidazol (10)



Se disolvió el dihidrocioruro de histamina comercial **9** (500 mg, 2.72 mmol) y KBr (1.07 g, 8.98 mmol) en una disolución acuosa 1.5 M de H₂SO₄ (4 mL) y se enfrió a -15°C. La mezcla de reacción adquirió un color amarillo oscuro tras adicionar una disolución acuosa saturada de NaNO₂. Esta disolución se agitó a -15°C durante un período de 30 minutos, tras los cuales se dejó alcanzar temperatura ambiente, manteniéndose así durante 3 horas. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción que presentó un color amarillo tenue, se volvió a enfriar a -15°C y se añadió, gota a gota una disolución de NaOH 5 M hasta pH 10. Se extrajo con CHCl₃ (5 x 15 ml) y los extractos orgánicos reunidos se vertieron sobre un matraz que contenía una disolución de HCl 0,5 M en AcOEt para evitar la reacción intramolecular. Se evaporó el disolvente a presión reducida y se obtuvieron 280 mg de la sal de hidrocioruro **10** en relación 1:3, como un sólido cristalino blanco (rendimiento del 49%).

Hidrocioruro 4-(2-cloroetil)-1*H*-imidazol:

RMN-¹H (300 MHz, D₂O), δ_H ppm: 8.56 (s, 1H, H-2 imidazol); 7.31 (s, 1H, H-4 imidazol); 3.79 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, Cl-CH₂-CH₂-imidazol); 3.16 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, Cl-CH₂-CH₂-imidazol).

RMN-¹³C (300 MHz, D₂O), δ_C ppm: 133.0 (CH, C-2 imidazol); 130.9 (C, C-5 imidazol); 116.5 (CH, C-4 imidazol); 42.7 (CH₂, Cl-CH₂-CH₂-imidazol); 27.2 (CH₂, Cl-CH₂-CH₂-imidazol).

(+)-LR-ESIMS *m/z*: 131.04 (Cl³⁵)/133.04 (Cl³⁷) (3:1) [M+H]⁺ (masa calculada para C₅H₈ClN₂⁺:131.0371).

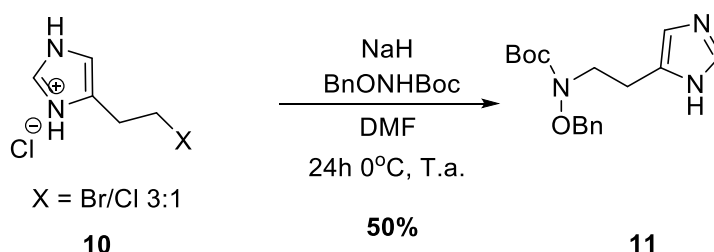
Hidrocloruro 4-(2-bromoetil)-1*H*-imidazol:

RMN-¹H (300 MHz, D₂O), δH ppm: 8.56 (s, 1H, H-2 imidazol); 7.31 (s, 1H, H-4 imidazol); 3.64 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, Br-CH₂-CH₂-imidazol); 3.26 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, Br-CH₂-CH₂-imidazol).

RMN-¹³C (300 MHz, D₂O), δC ppm: 133.0 (CH, C-2 imidazol); 130.9 (C, C-5 imidazol); 116.5 (CH, C-4 imidazol); 30.7 (CH₂, Br-CH₂-CH₂-imidazol); 27.3 (CH₂, Br-CH₂-CH₂-imidazol).

(+)-LR-ESIMS *m/z*: 174.99 (Br⁷⁹)/175.99 (Br⁸¹) (1:1) [M+H]⁺ (masa calculada para C₅H₈BrN₂⁺:174.9865).

Síntesis de (2-(1H-imidazol-4 il) etil)(benciloxi)carbamato de terc-butilo (**11**)



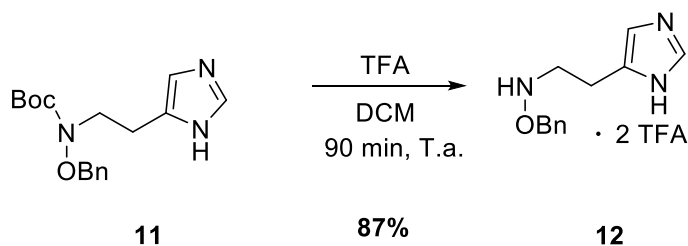
Sobre una disolución de benciloxicarbamato de *tert*-butilo (254.6 mg; 1,14 mmoles) en 8 mL de DMF anhídrida a 0°C se añadió NaH (82.1 mg, 2.85 mmoles) en dos porciones. La mezcla resultante se agitó durante 30 minutos, dejando que alcanzara temperatura ambiente. Pasados los 30 minutos, se añadió **10** (199.7 mg, 0.95 mmoles) y la mezcla de reacción se dejó agitando durante toda la noche a 50°C. Transcurrido ese tiempo, se realizó una capa fina para comprobar que la reacción había finalizado y la mezcla se diluyó con 10 mL de H₂O y 10 mL de AcOEt. La fase orgánica se lavó con H₂O agua cinco veces, se secó sobre MgSO₄ y se eliminó el disolvente a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía en columna flash utilizando como eluyente DCM/MeOH 95:5 y polarizando hasta 80:20. El revelado de las capas finas se realizó con cerio molibdeno. Las fracciones que presentaron la misma composición por cromatografía en capa fina se reunieron y el disolvente de cada una de ellas se eliminó a presión reducida. Se obtuvieron 196.6 mg del producto **11** en forma de cristales blancos (rendimiento del 50%).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ_H ppm: 7.49 (s, 1H, H-2 Imidazol); 7.43-7.30 (m, 5H, Bn); 6.75 (s, 1H, H-4 Imidazol); 4.81 (s, 2H, OBn); 3.68 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂-CH₂-imidazol); 2.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂-CH₂-imidazol); 1.42 (s, 9H, ^tBu).

RMN de ¹³C (300 MHz, CDCl₃) δ_C ppm: 156.5 (CO, Boc); 135.5 (C, C-5 Imidazol); 134.7 (CH, C-2 Imidazol); 129.4 (CH); 128.6 (CH); 128.5 (CH); 117.7 (CH, C-4 Imidazol); 81.3 (C, ^tBu); 77.0 (CH₂, OBn); 49.3 (CH₂, CH₂-CH₂-imidazol); 28.1 (CH₃, ^tBu); 24.7 (CH₂, CH₂-CH₂-imidazol).

(+)-LR-ESIMS m/z: 318.18 [M+H]⁺ (masa calculada para C₁₇H₂₄N₃O₃: 318.1812).

Síntesis de ditriflato de N, N'-(2-(1H-imidazol-5-il) etil)-O- bencilhidroxilamonio (12)



El compuesto **11** (50 mg, 0.157 mmol) se disolvió en 5 mL de DCM anhidro. Sobre la disolución anterior, enfriada a 0°C se goteó 1 mL de TFA. La mezcla resultante se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 90 minutos, comprobándose mediante cromatografía en capa fina que la reacción había finalizado. Se evaporó el disolvente a presión reducida y se obtuvieron 60.7 mg de un aceite marrón que se correspondió con el producto esperado **12** en forma de la sal de amonio (rendimiento del 87%).

RMN-¹H (300 MHz, CD₃OD), δH ppm: 8.51 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H-2 imidazol); 7.14-7.05 (m, 6H); 4.66 (s, 2H, OBn); 3.23 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂-CH₂-imidazol); 3.13 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂-CH₂-imidazol).

RMN-¹³C (300 MHz, CD₃OD), δC ppm: 134.2 (C, C-5 Imidazol); 133.6 (CH, C-2 Imidazol); 130.0 (C); 128.8 (CH); 128.7 (CH); 128.3 (CH); 116.7 (CH, C-4 Imidazol); 75.8 (CH₂, OBn); 48.5 (CH₂, CH₂-CH₂-imidazol); 20.7 (CH₂, CH₂-CH₂-imidazol).

(+)-LR-ESIMS *m/z*: 218.13 [M+H]⁺ (masa calculada para C₁₂H₁₆N₃O: 218.1287).

5. CONCLUSIONES

Se ha realizado el análisis configuracional basado en las constantes de acoplamiento, JCBA o método de Murata de los cuatro sistemas 1,2 y 1,3-disustituídos presentes en los dos compuestos de origen marino. De acuerdo con esta metodología propuesta se dedujo la estereoquímica relativa de los cuatro fragmentos, llegándose a los siguientes resultados:

- Un sistema 1,3-disustituído correspondiente al fragmento **A**, en el que se dedujo una configuración relativa *sin* entre los sustituyentes R₁ y R₂ en las posiciones C-2 y C-4.
- Un sistema 1,2-disustituído perteneciente al fragmento **B**, en el que está presente como único conformero mayoritario el **IV**, confirmando una configuración relativa *anti* entre los sustituyentes R₃ y R₄ de dicho fragmento.
- Un sistema correspondiente al fragmento **C** 1,2-disustituído en el que coexiste un equilibrio entre dos conformeros indistinguibles **II** y **V**. Su estereoquímica relativa se dedujo empleando el experimento NOESY, que permitió discernir entre ambas configuraciones, estableciendo una disposición relativa *sin* entre los sustituyentes R₅ y R₆.
- Un sistema 1,3-disustituído presente en el fragmento **D**, en el que se obtuvo como resultado una configuración relativa *anti* entre los dos sustituyentes de las posiciones C-2 y C-4.

En la segunda parte de este trabajo, se han desarrollado distintas secuencias sintéticas con el fin de obtener dos intermedios clave en la preparación del sideróforo anguibactina. En base a los objetivos propuestos se han cumplido los siguientes:

- Obtención del intermedio clave **7** precursor del Fragmento **A** mediante reacciones de formación de una amida con su posterior transformación en una tiazolina.
- Obtención del Fragmento **B** de manera efectiva a partir de histamina comercial.
- Correcta caracterización de todos los compuestos obtenidos en la síntesis de cada uno de los intermedios buscados, alcanzándose así de forma satisfactoria los resultados planteados en las rutas de síntesis propuestas en esta memoria.

Realizouse a análise configuracional baseada nas constantes de acoplamento, JCBA ou método de Murata dos catro sistemas 1,2 e 1,3-disustituídos presentes nos dous compostos de orixe mariño. De acordo con esta metodoloxía proposta dedúxose a estereoquímica relativa dos catro fragmentos, chegándose ás seguintes conclusións:

- Un sistema 1,3-disustituído correspondente ó fragmento **A**, no que se deduxo unha configuración relativa *sin* entre os sustituintes R₁ e R₂ nas posicións C-2 e C-4.
- Un sistema 1,2-disustituído pertencente ó fragmento **B**, no que está presente como único confórmero maioritario o **IV**, confirmando unha configuración relativa *anti* entre os sustituintes R₃ e R₄ de dito fragmento.
- Un sistema correspondente ó fragmento **C** 1,2-disustituído no que coexiste un equilibrio entre dous confórmeros indistinguíbles **II** e **V**. A súa estereoquímica relativa dedúxose empregando o experimento NOESY, que permitiu diferenciar ambas configuracións, establecendo unha disposición relativa *sin* entre os dous sustituintes R₅ e R₆.
- Un sistema 1,3-disustituído presente no fragmento **D**, no que se obtivo como resultado unha configuración relativa *anti* entre os dous sustituintes das posicións C-2 e C-4.

Na segunda parte deste traballo, desenvolvéronse diferentes secuencias sintéticas co fin de obter dous produtos intermedios clave na preparación do sideróforo anguibactina. En base ós obxectivos propostos cumpríronse os seguintes:

- Obtención do intermedio clave **7** precursor do Fragmento **A** mediante reaccións de formación dunha amida coa súa posterior transformación nunha tiazolina.
- Obtención do Fragmento **B** de xeito eficaz a partir de histamina comercial.
- Correcta caracterización de todos os compostos obtidos na síntese de cada un dos intermedios buscados, acadándose así de forma satisfactoria os resultados plantexados nas rutas de síntese propostas nesta memoria.

The configurational analysis was performed based on the coupling constants JCBA or Murata method of the 1,2 and 1,3-substituted systems present in two marine natural compounds. According to this methodology the stereochemistry of the four fragments was deduced, achieving the following results:

- One system 1,3-substituted belonging to fragment **A**, in which it was deduced a *syn* relative configuration between R₁ and R₃ substituents in the C-2 and C-4 positions.
- One system 1,2-substituted belonging to fragment **B**, in which only **V** conformer is present, displaying a *anti* relative configuration between R₃ and R₄ substituents of the fragment.
- One system corresponding to the fragment **C** 1,2-substituted in which coexist a balance between two indistinguishable conformers **II** and **V**. Their relative stereochemistry was deduced using NOESY experiment, which allow discerning between the two configurations, establishing a *syn* disposition between R₅ and R₆ substituents.
- One system 1,3-substituted in fragment **D**, in which it was obtained a *anti* relative configuration between C-2 and C-4 positions.

On the second part of this work, it was developed different synthetic sequences in order to achieve two key intermediate products in the preparation of the anguibactin siderophore, as a result, the following objectives were reached:

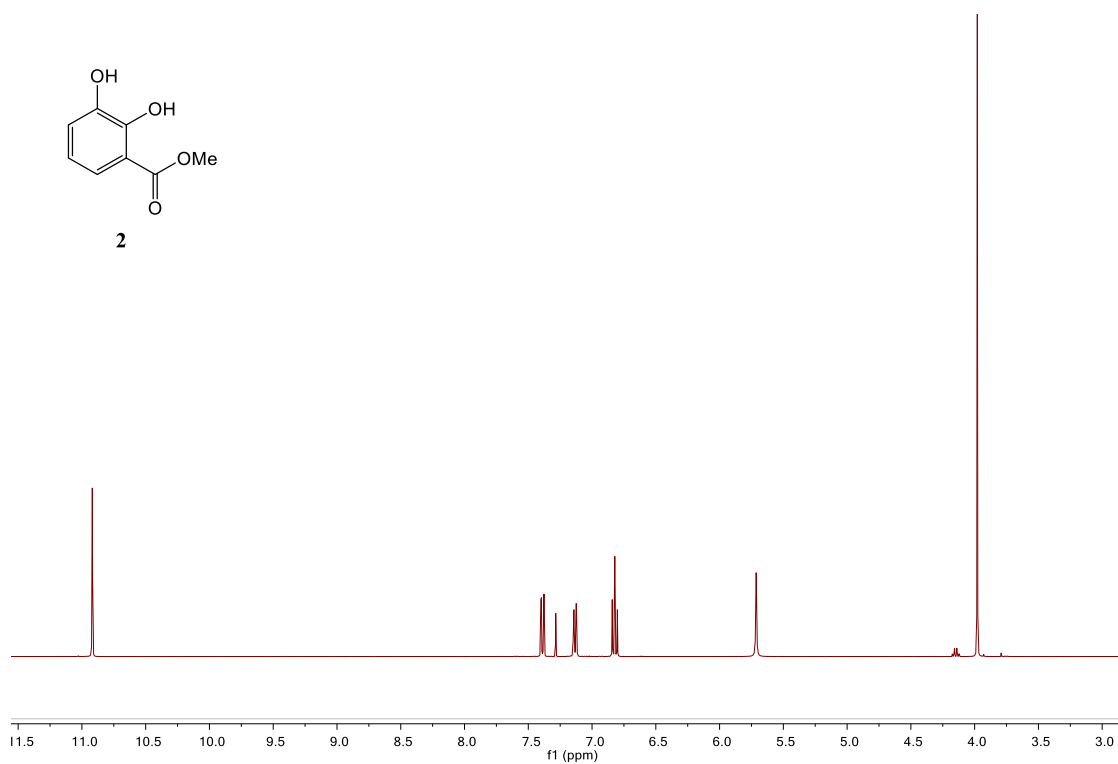
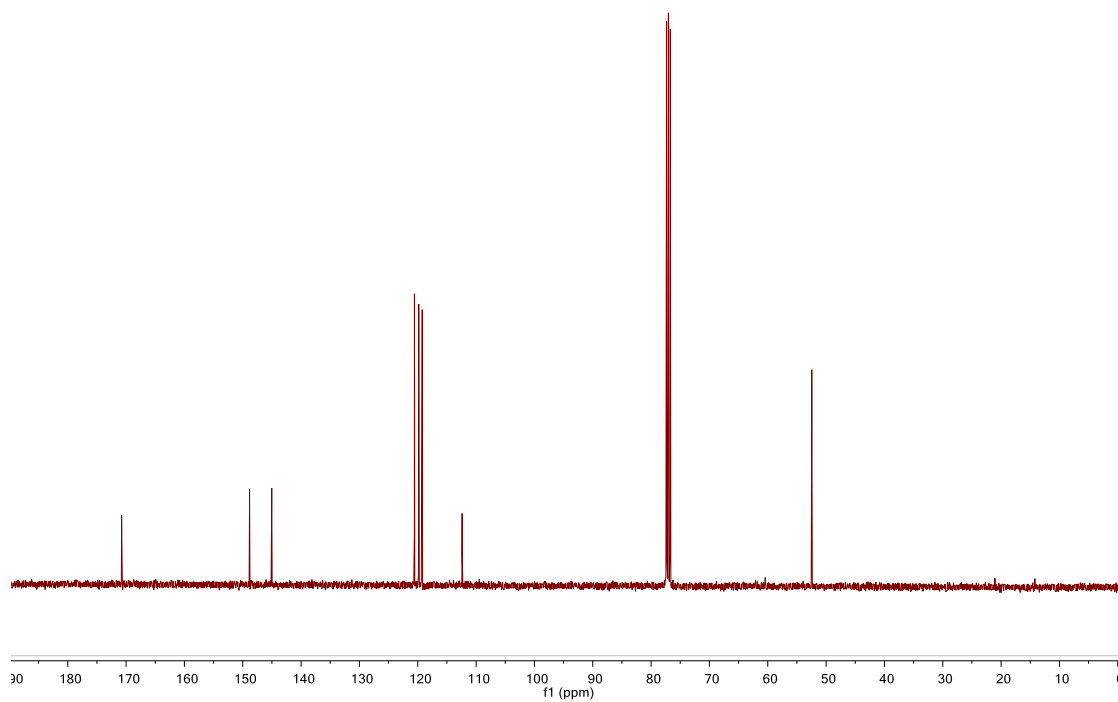
- Intermediate **7** was obtained by means of the formation of an amide with further transformation into a tiazoline.
- Fragment **B** was successfully obtained from histamine.
- Spectroscopic characterization of all the compounds obtained in the synthesis confirmed the formation of each one of the products.

6. BIBLIOGRAFÍA

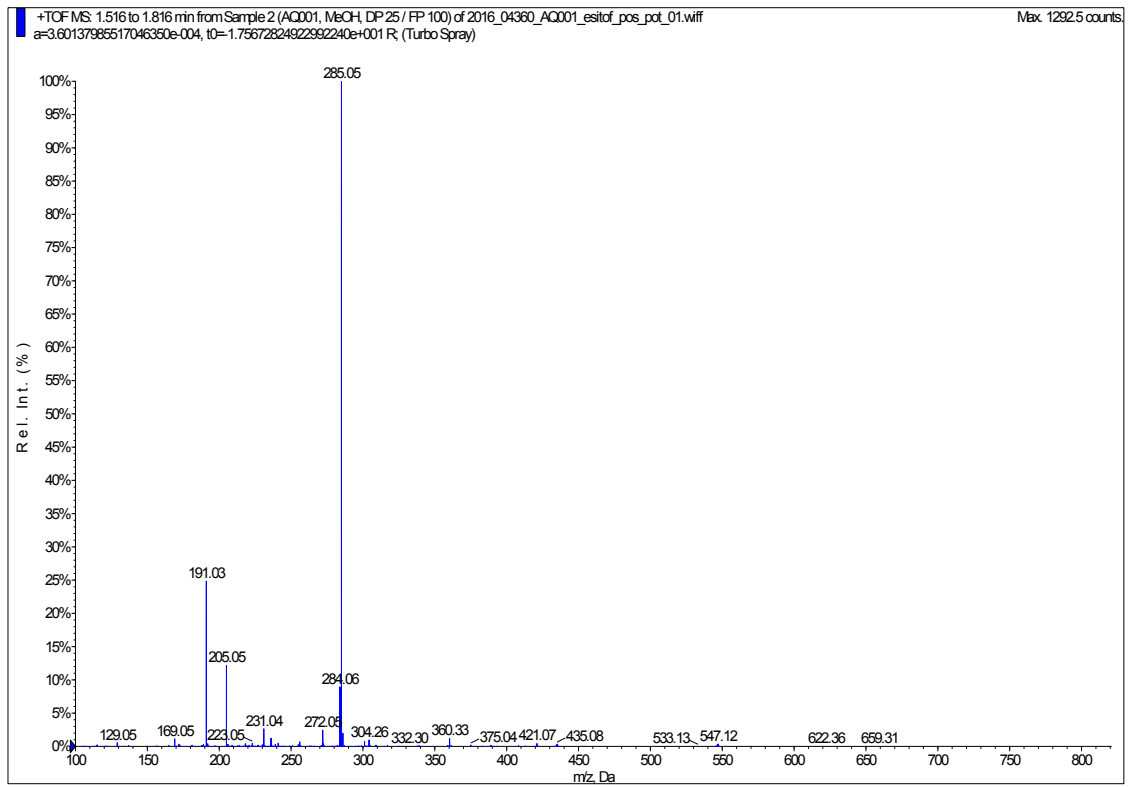
- (1) Breinbauer, R.; Vetter, I. R.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 2879–2890.
- (2) Butler, M. S. *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 162–195.
- (3) Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311–335.
- (4) Cragg, G. M.; Grothaus, P. G.; Newman, D. J. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 703–723.
- (5) Jiménez, C. *An. Química* **2013**, *109*, 134–141.
- (6) Matsumori, N.; Kaneno, D.; Murata, M.; Nakamura, H. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 866–876.
- (7) Bifulco, G.; Dambruoso, P.; Gomez-paloma, L.; Riccio, R. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3744–3779.
- (8) Hines, J.; Landry, S. M.; Varani, G.; Tinoco, I. *J. Am. Chem.* **1994**, *116*, 5823–5831.
- (9) Podlasek, C. A.; Wu, J.; Stripe, W. A.; Bondo, P. B.; Serianni, A. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8635–8644.
- (10) Karplus, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870.
- (11) María, B. M. Estudio de constantes de acoplamiento en sistemas acíclicos quirales con átomos de nitrógeno, Universidade da Coruña, **2015**.
- (12) FAO. *Fao.* 2014, p 253.
- (13) APROMAR. 2015, pp 1–97.
- (14) Frans, I.; Michiels, C. W.; Bossier, P.; Willems, K. A.; Lievens, B.; Rediers, H. *J. Fish Dis.* **2011**, *34*, 643–661.
- (15) Tolmasky, M. E.; Actis, L. A.; Toranzo A. E.; Barja, J. L.; Crosa, J. H. *J. Gen. Microbiol.* **1985**, *131*, 1989–1997.
- (16) Toranzo, A. E.; Magariños, B.; Romalde, J. L. *Aquaculture* **2005**, *246*, 37–61.
- (17) Johansen, L. H.; Jensen, I.; Mikkelsen, H.; Bjorn, P. A.; Jansen, P. A.; Bergh, O. *Aquaculture* **2011**, *315*, 167–186.
- (18) Balado Dacosta, M. Caracterización de un nuevo sistema de asimilación de hierro mediante sideróforos en *Vibrio anguillarum*., Universidad de Santiago de Compostela, 2009.
- (19) Andrews, S. C.; Robinson, A. K.; Rodríguez-Quñones, F. *FEMS Microbiol. Rev.* **2003**, *27*, 215–237.
- (20) Drechsel, H.; Jung, G. *J. Pept. Sci.* **1998**, *181*, 147–181.

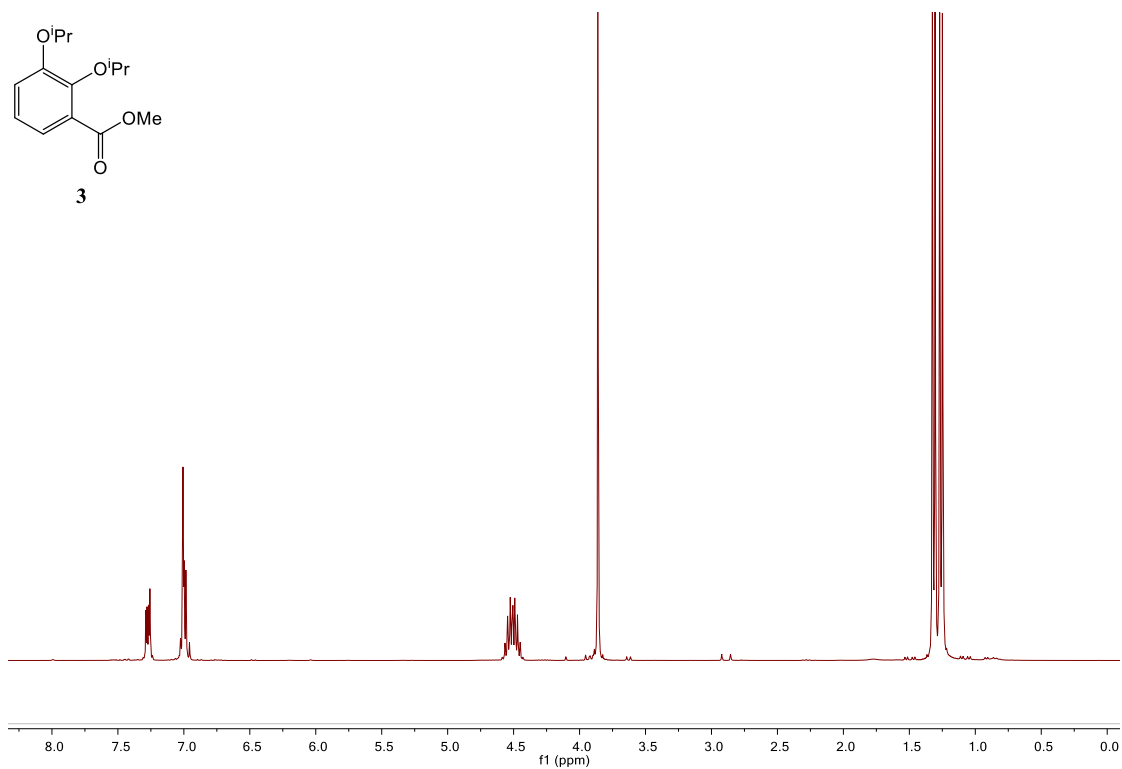
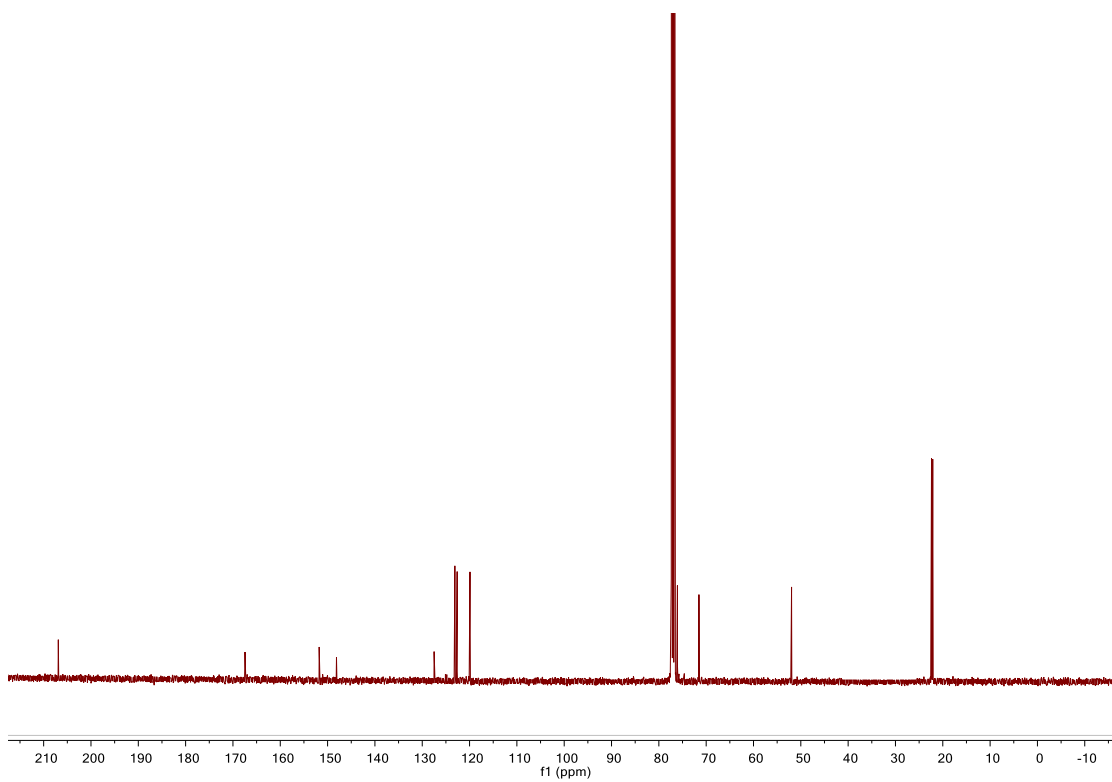
- (21) Neilands, J. B. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 26723–26726.
- (22) Franc, B. M. H. Æ.; Morel, M. M. *Biomaterials* **2009**, *22*, 659–669.
- (23) Boukhalfa, H.; Crumbliss, A. L. *BioMetals* **2002**, *15*, 325–339.
- (24) Miethke, M.; Marahiel, M. A. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2007**, *71*, 413–451.
- (25) Hider, R. C.; Kong, X. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 637–657.
- (26) Crosa, J. H.; Walsh, C. T. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2002**, *66*, 223–249.
- (27) Saha, M.; Sarkar, S.; Sarkar, B.; Sharma, B. K.; Bhattacharjee, S.; Tribedi, P. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23*, 3984–3999.
- (28) Wuest, W. M.; Sattely, E. S.; Walsh, C. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5056–5057.
- (29) Takeuchi, Y.; Ozaki, S.; Satoh, M.; Mimura, K.; Hara, S.; Abe, H.; Nishioka, H.; Harayama, T. *Chem. Pharm. Bull.* **2010**, *58*, 1552–1553.
- (30) Sargent, M. V. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1987**, *11*, 2553–2563.
- (31) Ting, R.; Lermer, L.; Perrin, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12720–12721.
- (32) Grigg, R.; Rankovic, Z.; Thoroughgood, M. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 8025–8032.

7. ANEXOS

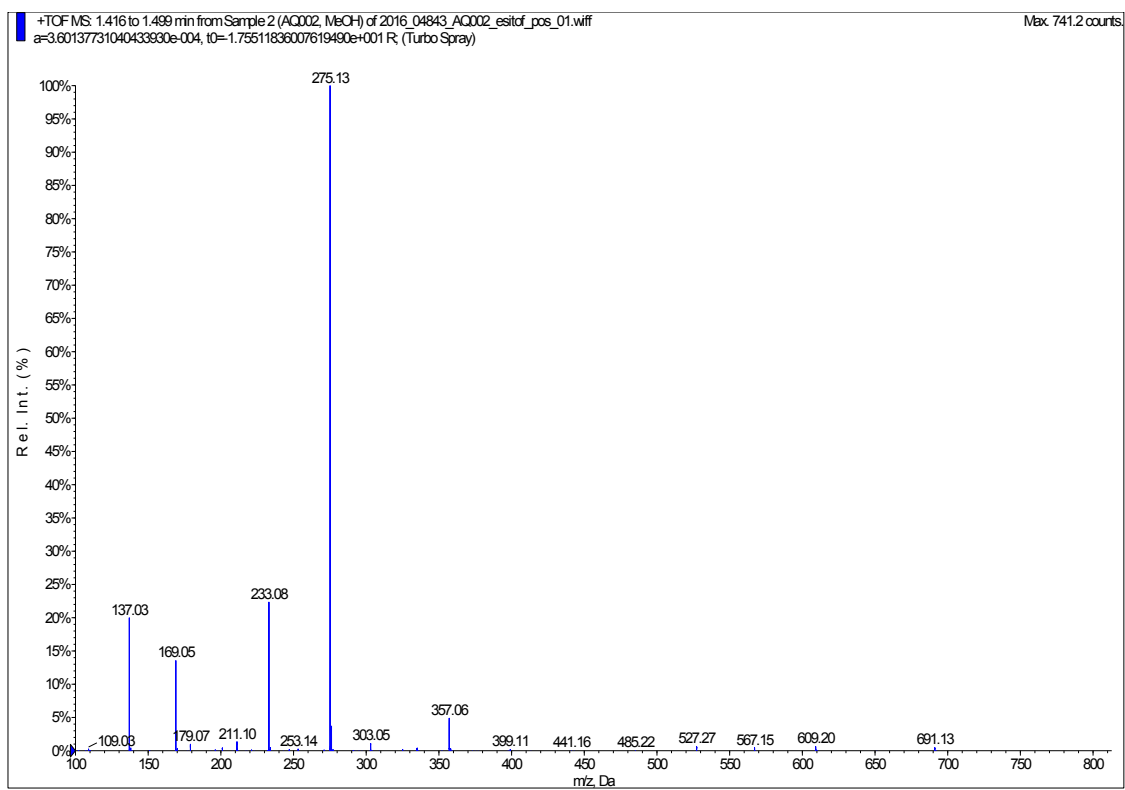
Espectros de RMN del compuesto **2**Espectro RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3)Espectro de RMN de ^{13}C (500MHz, CDCl_3)

Espectro de masas ESI positivo de baja resolución de 2

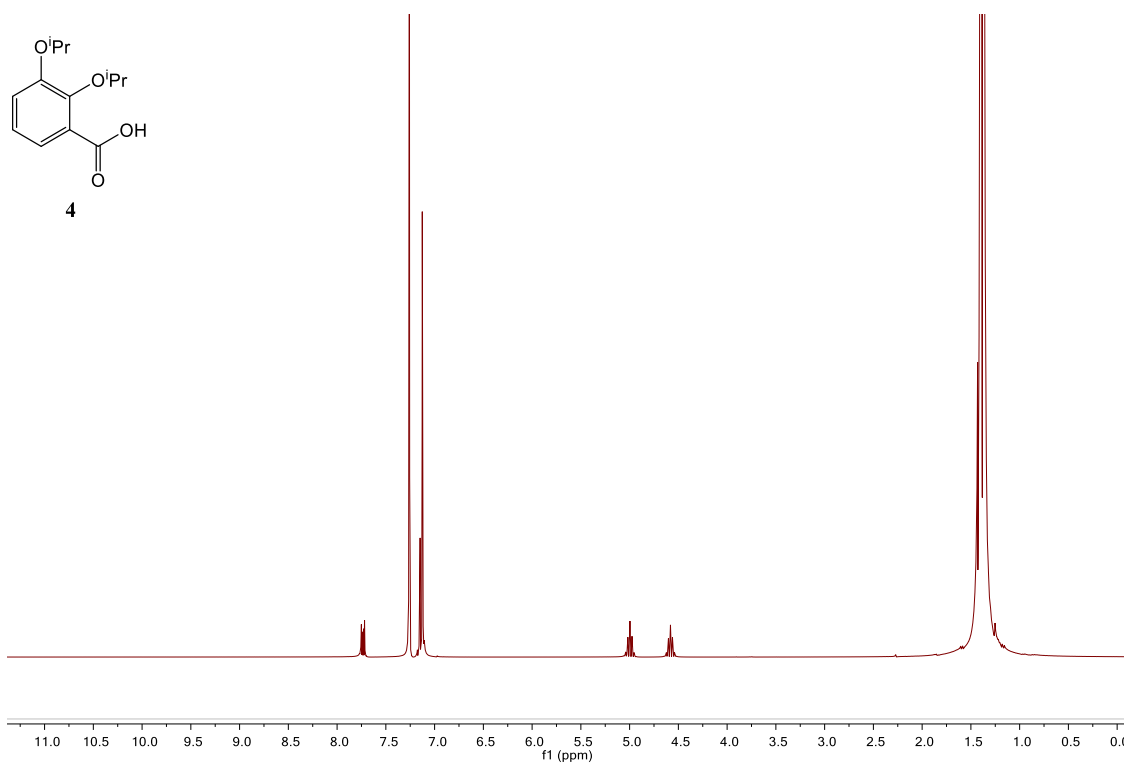
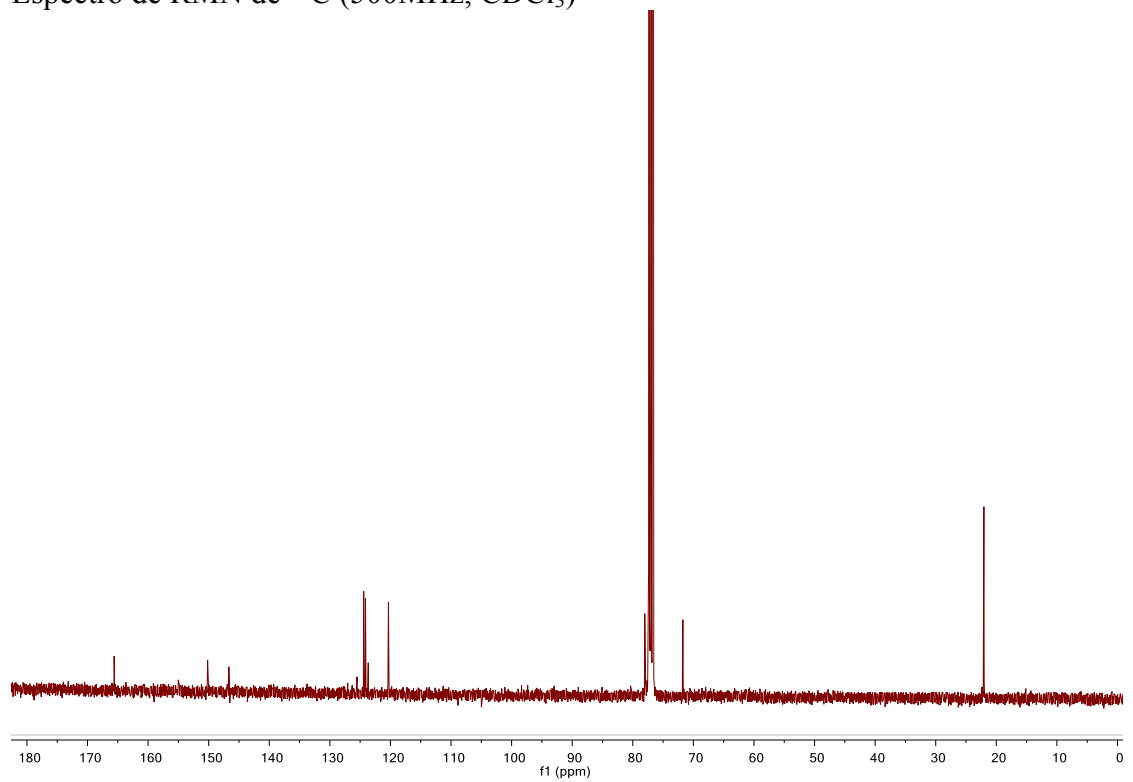


Espectros de RMN del compuesto **3**Espectro RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3)Espectro de RMN de ^{13}C (500MHz, CDCl_3)

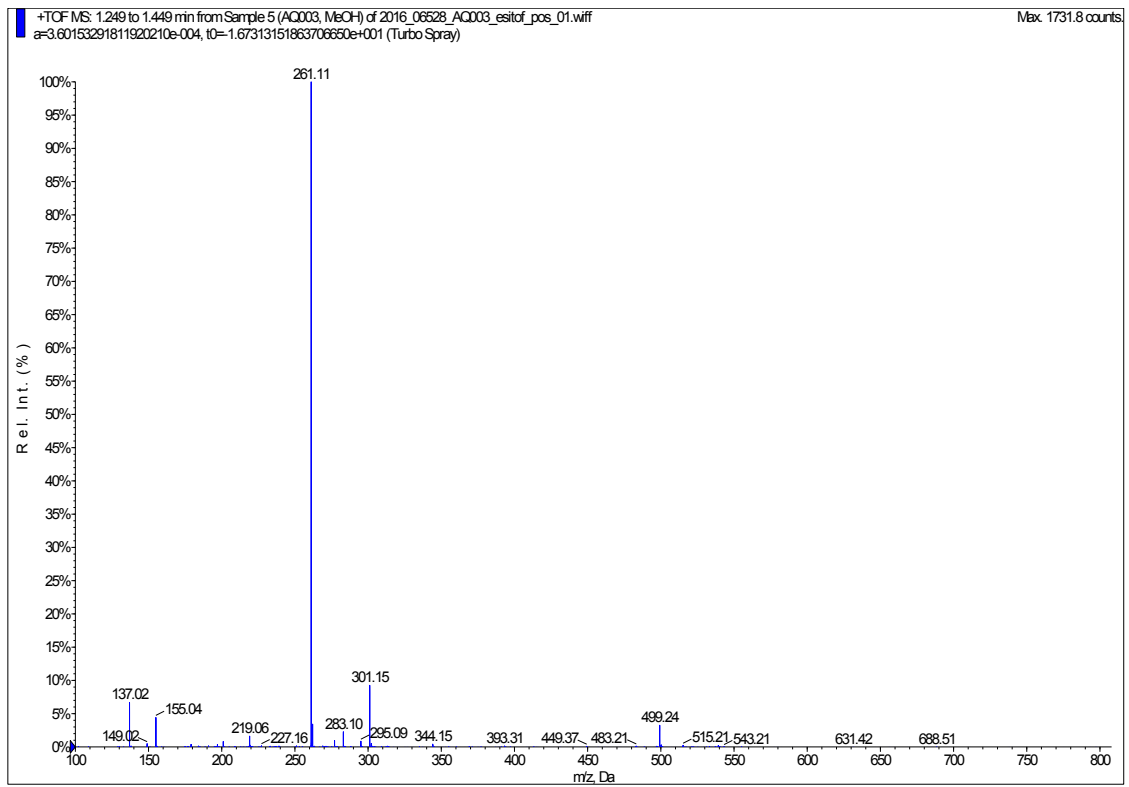
Espectro de masas ESI positivo de baja resolución de 3

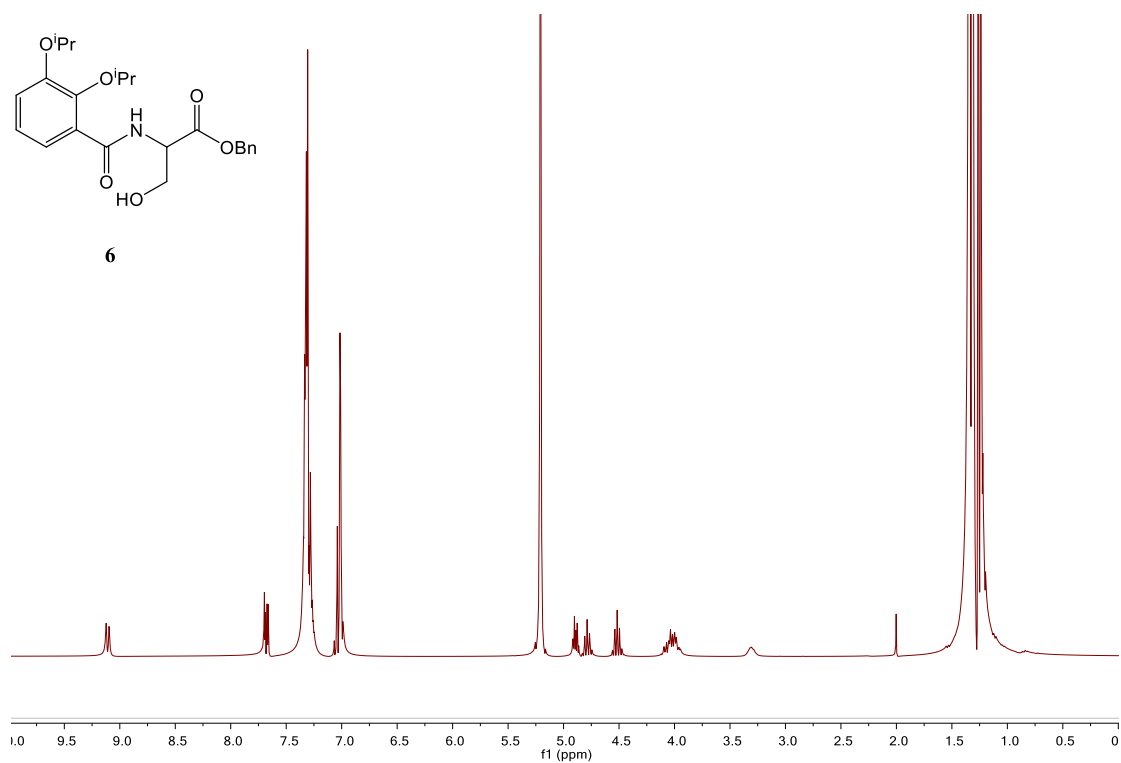
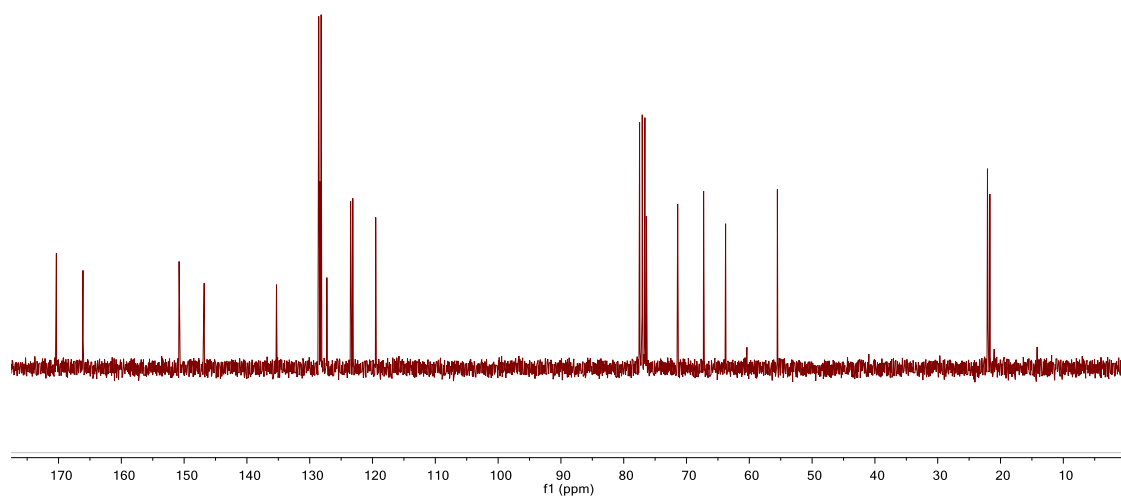


Espectros de RMN del compuesto 4

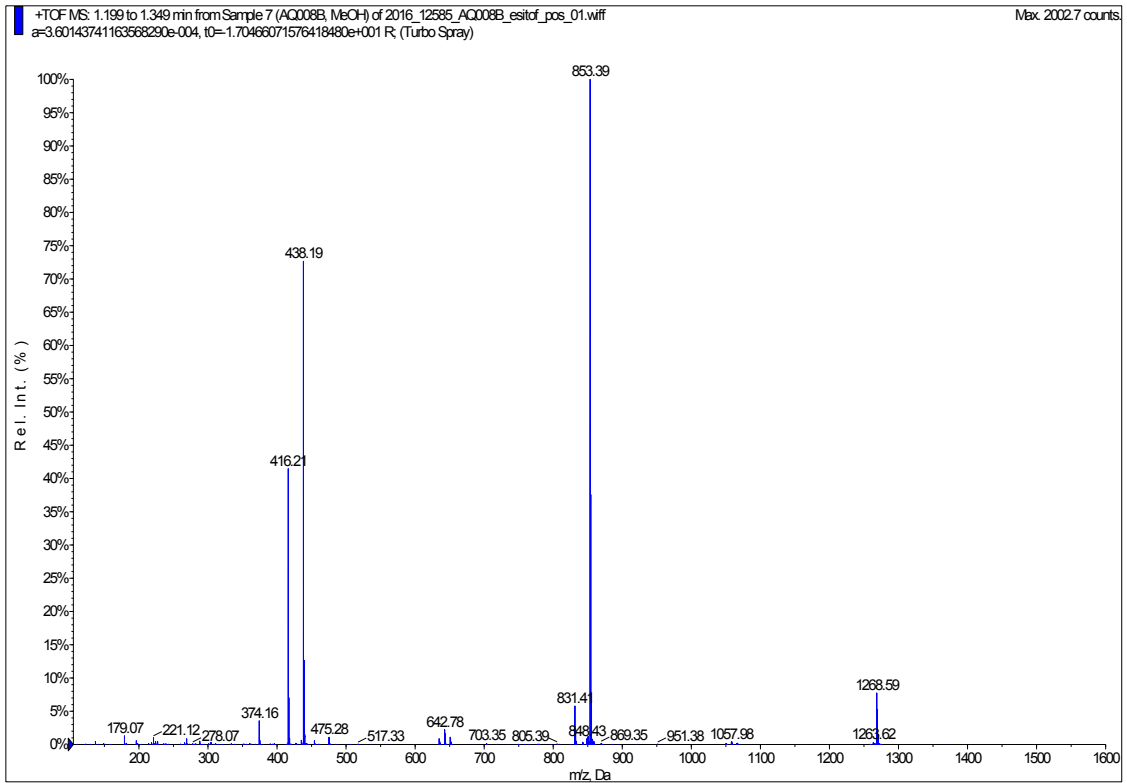
Espectro RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3)Espectro de RMN de ^{13}C (500MHz, CDCl_3)

Espectro de masas ESI positivo de baja resolución de 4

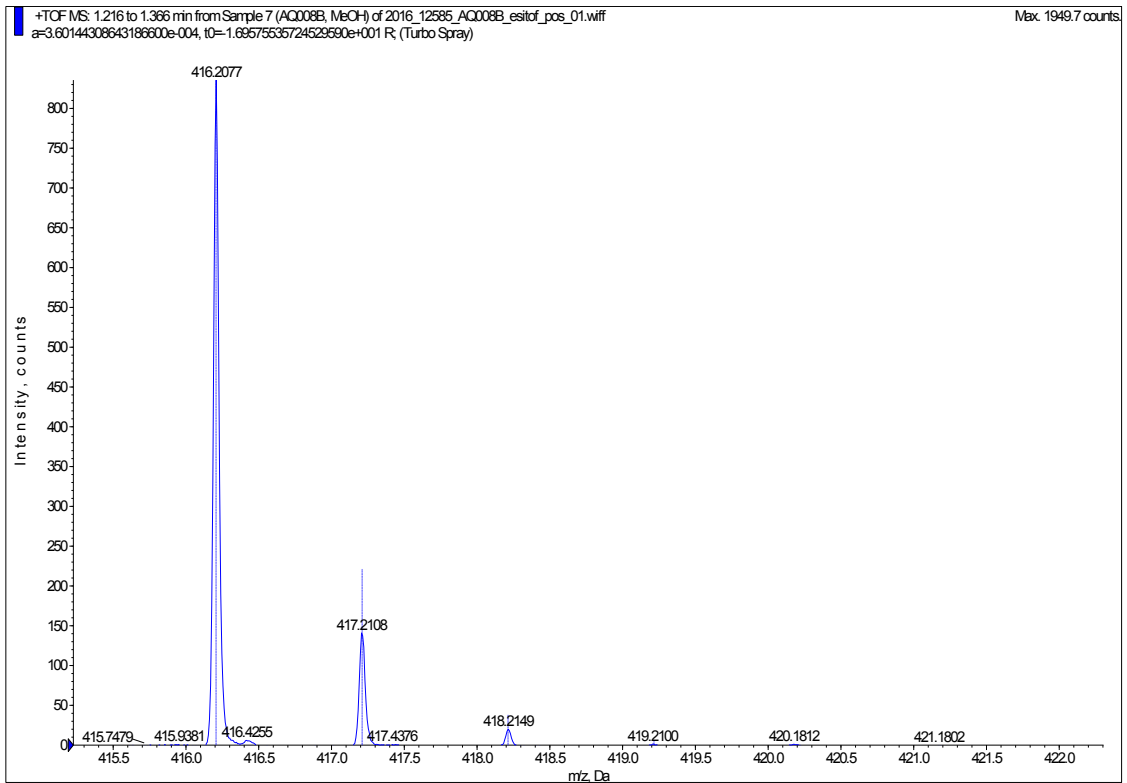


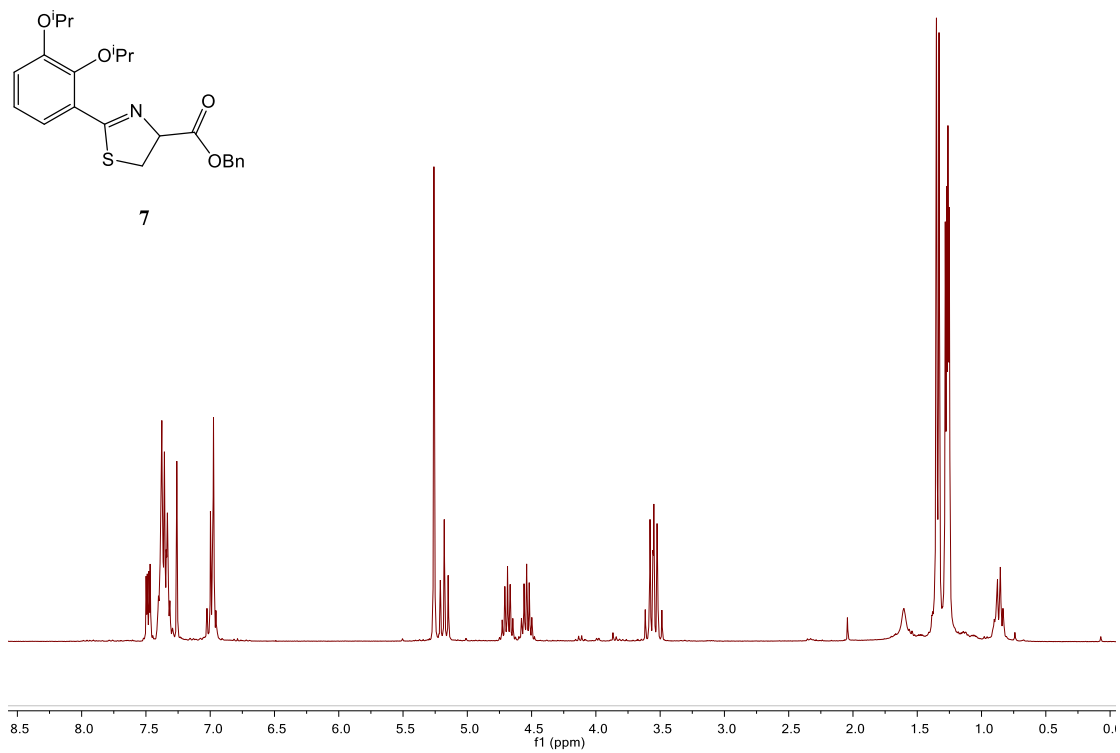
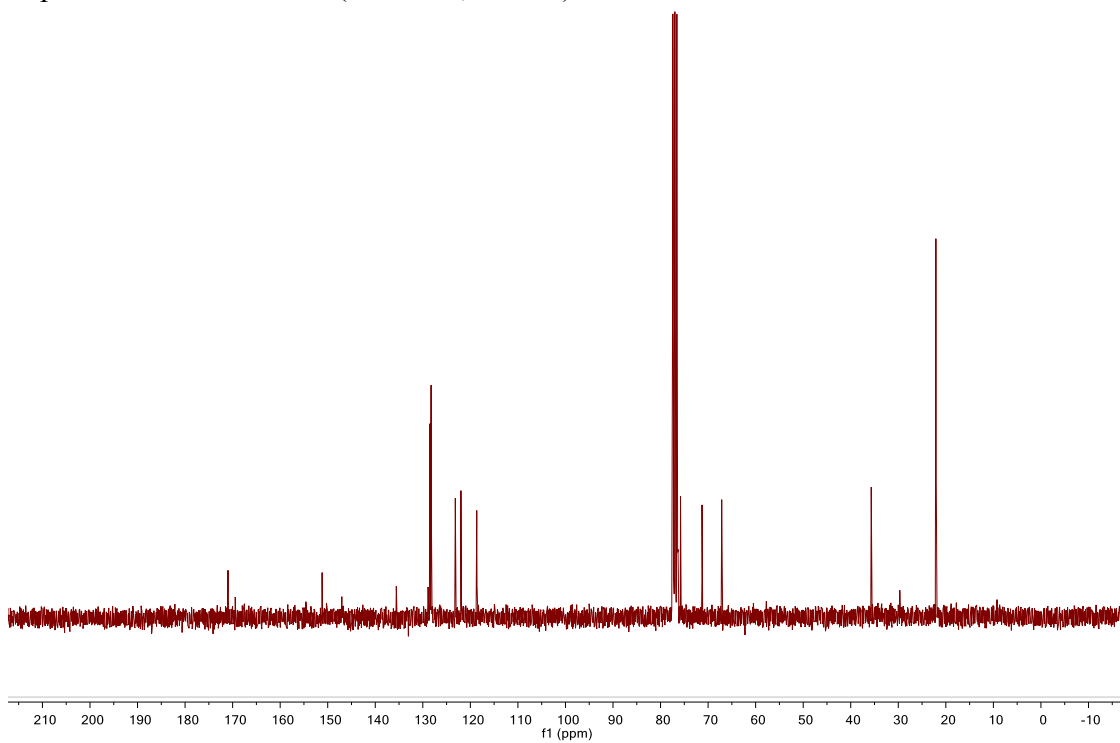
Espectros de RMN del compuesto **6**Espectro RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3)Espectro de RMN de ^{13}C (300MHz, CDCl_3)

Espectro de masas ESI positivo de baja resolución de 6

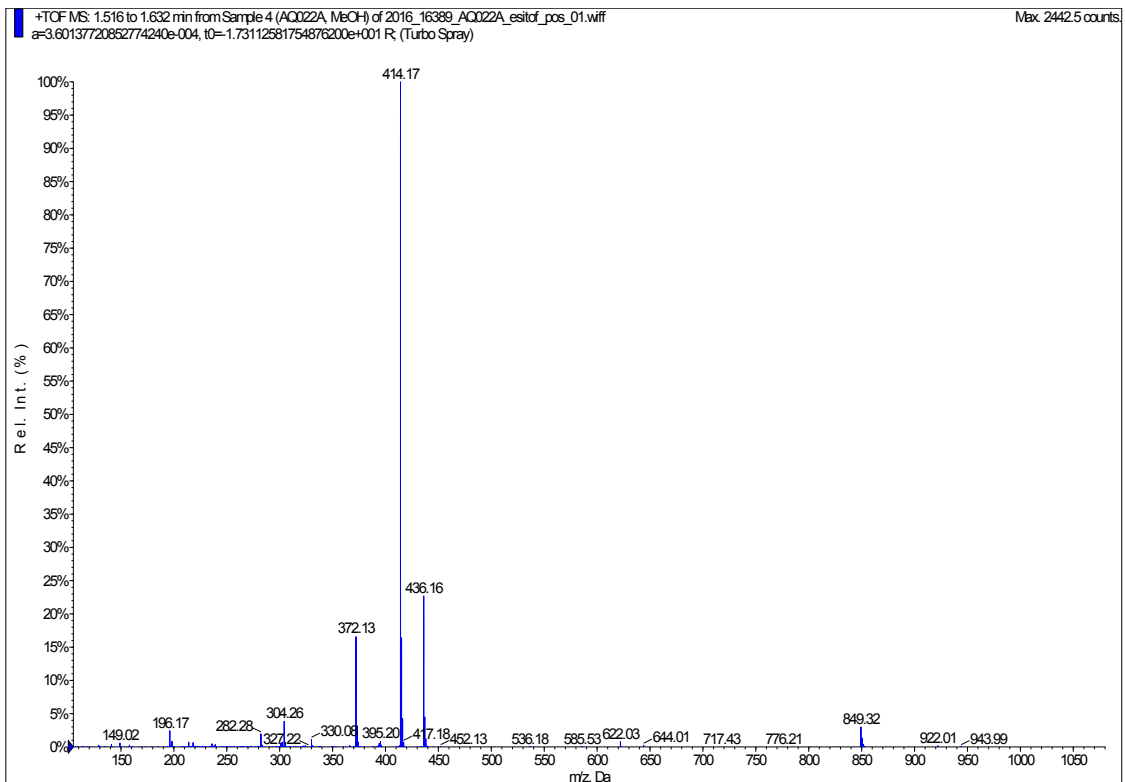


Espectro de masas ESI positivo de alta resolución de 6

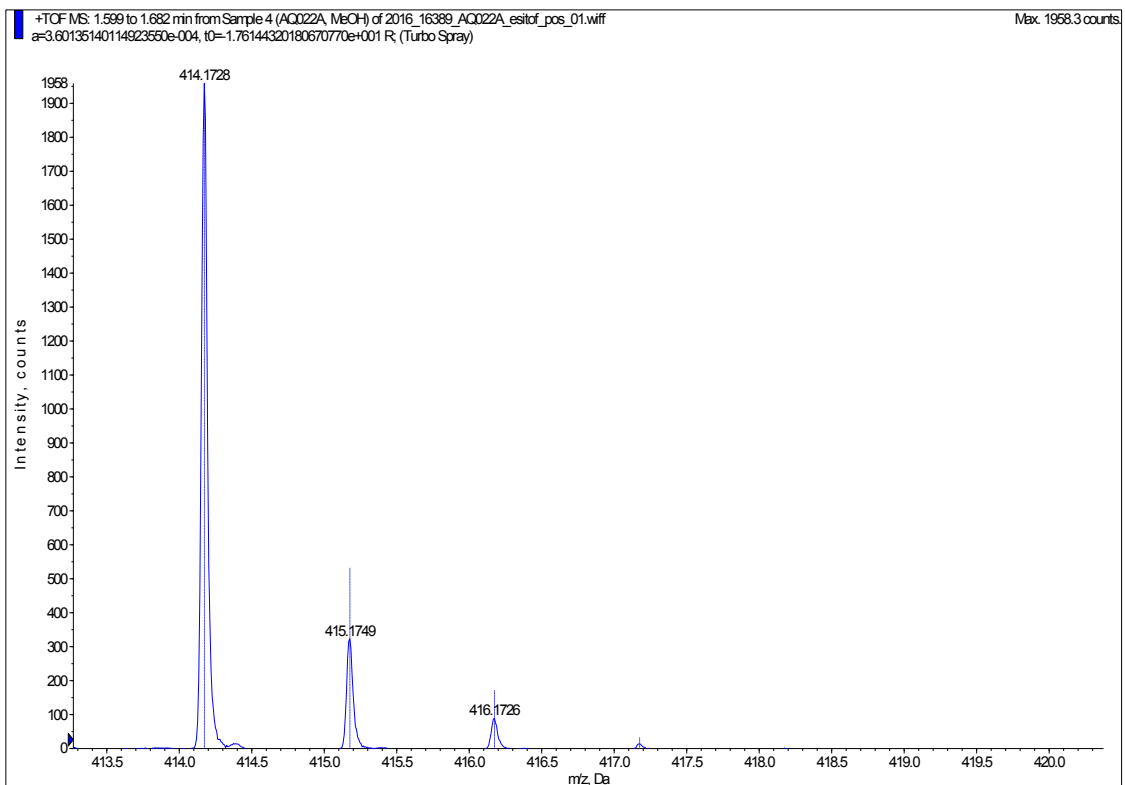


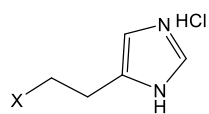
Espectros de RMN del compuesto **7**Espectro RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3)Espectro de RMN de ^{13}C (300MHz, CDCl_3)

Espectro de masas ESI positivo de baja resolución de 7

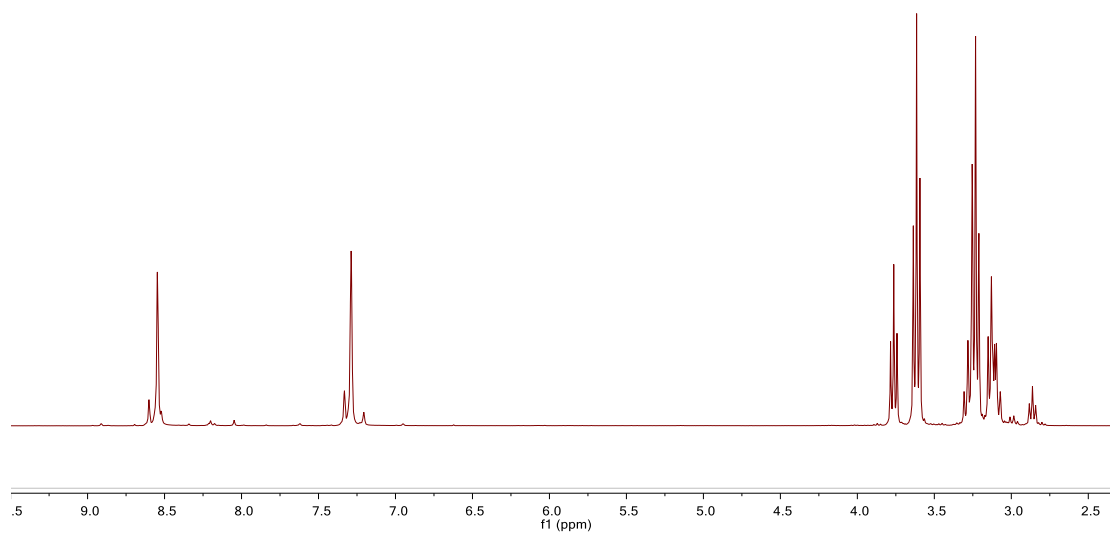
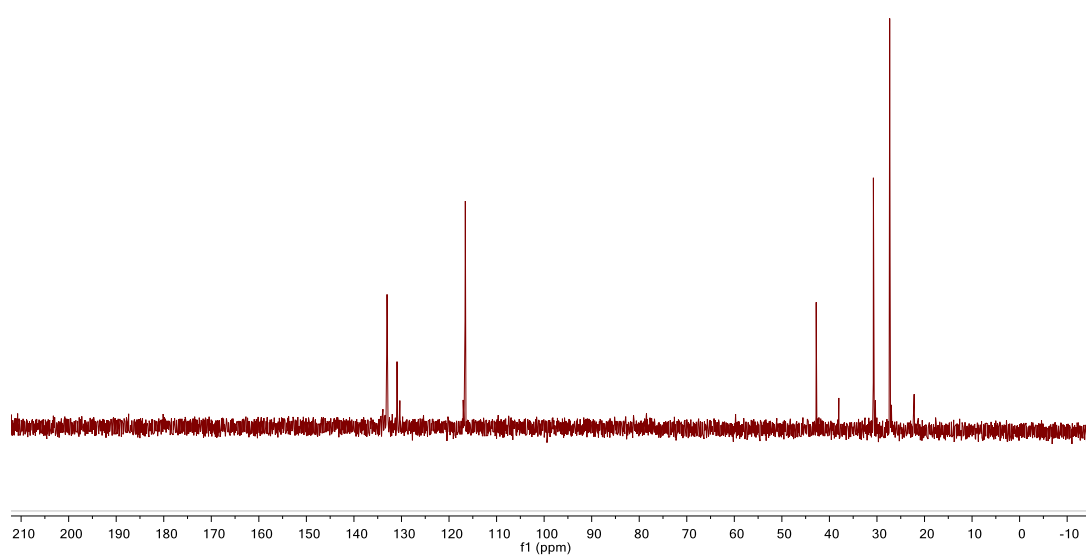


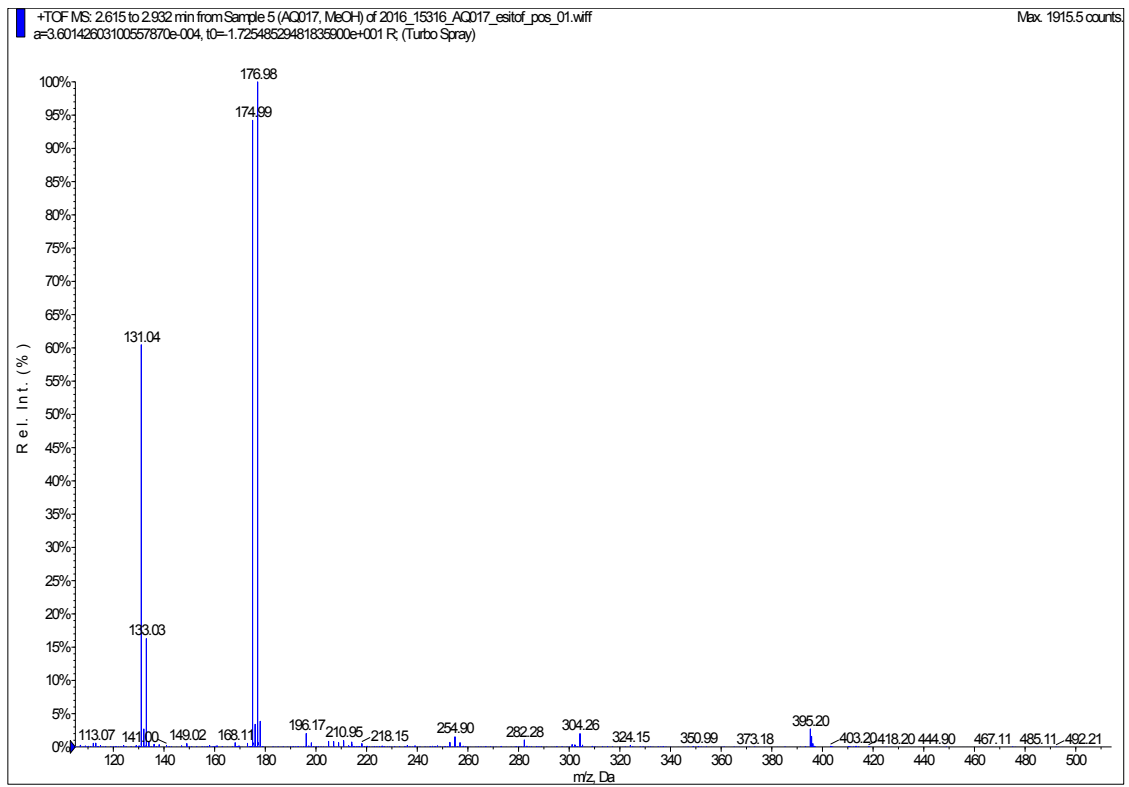
Espectro de masas ESI positivo de alta resolución de 7

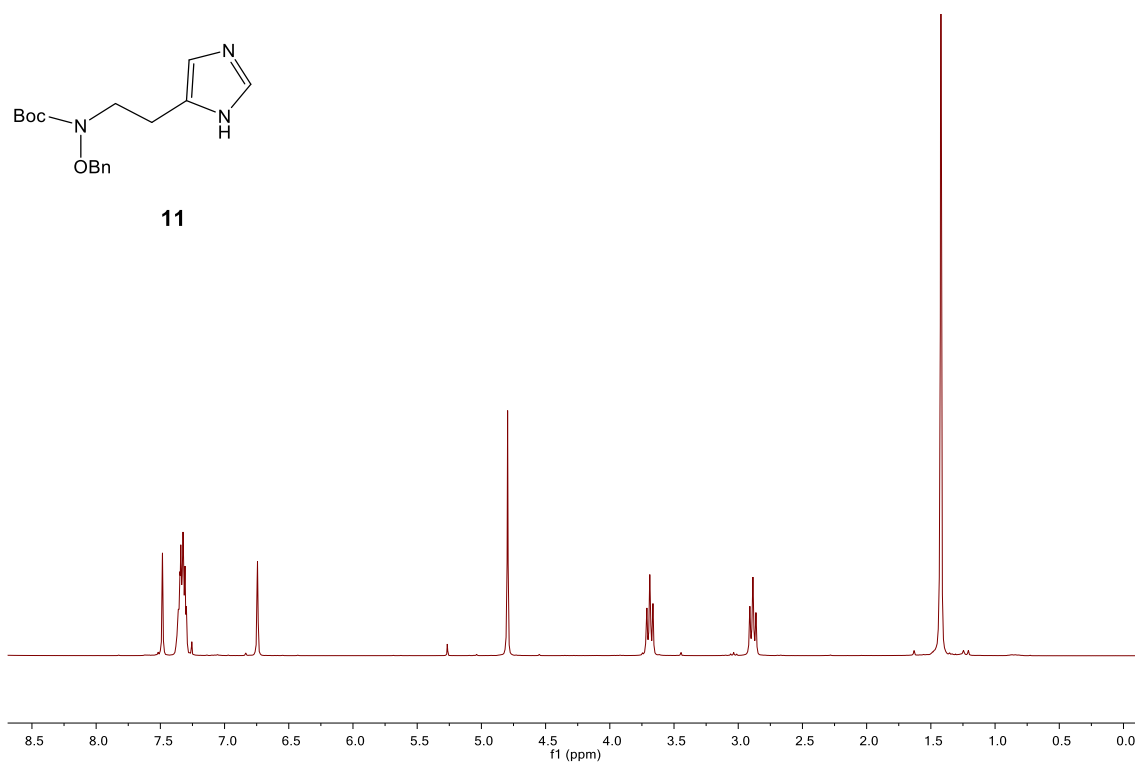
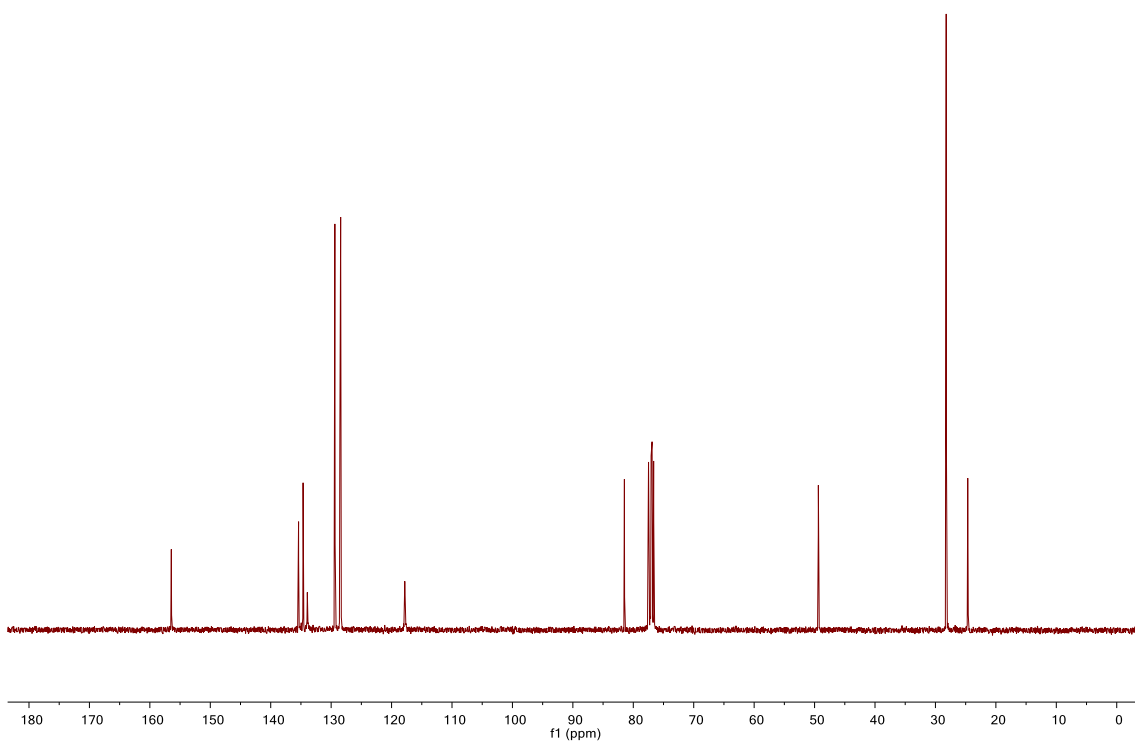


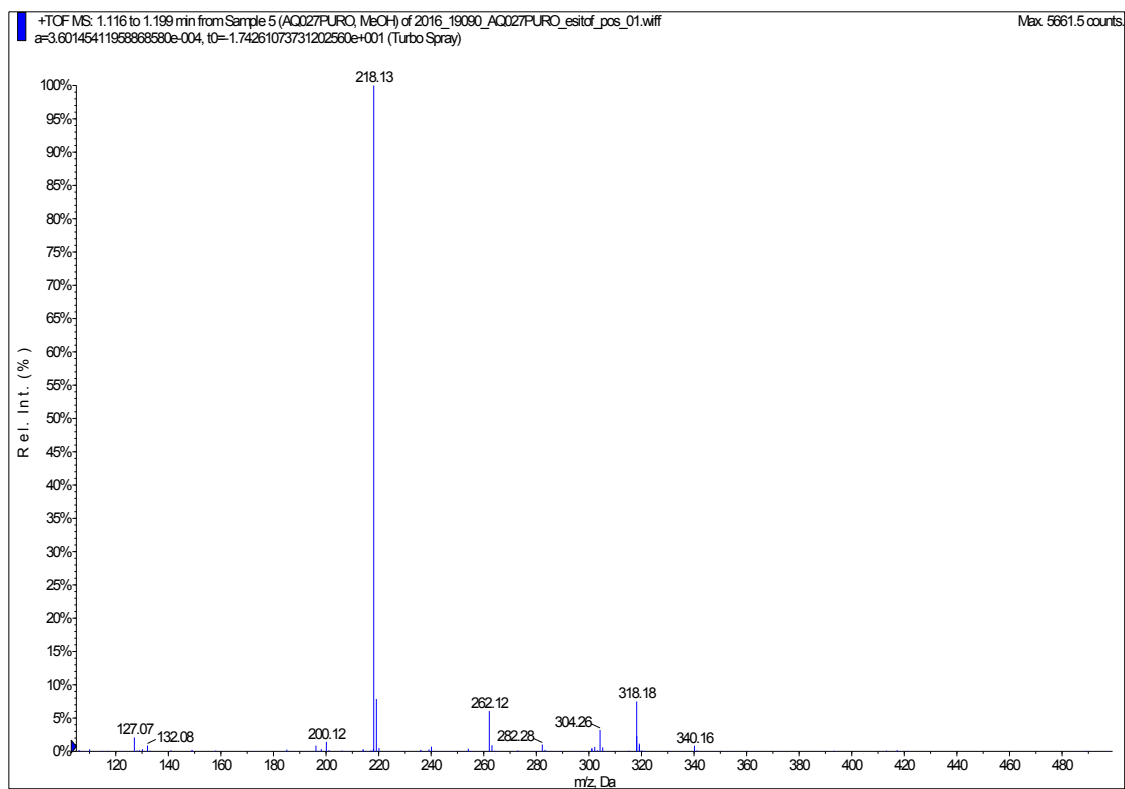
Espectros de RMN del compuesto **10**Espectro RMN de ^1H (300 MHz, D_2O)

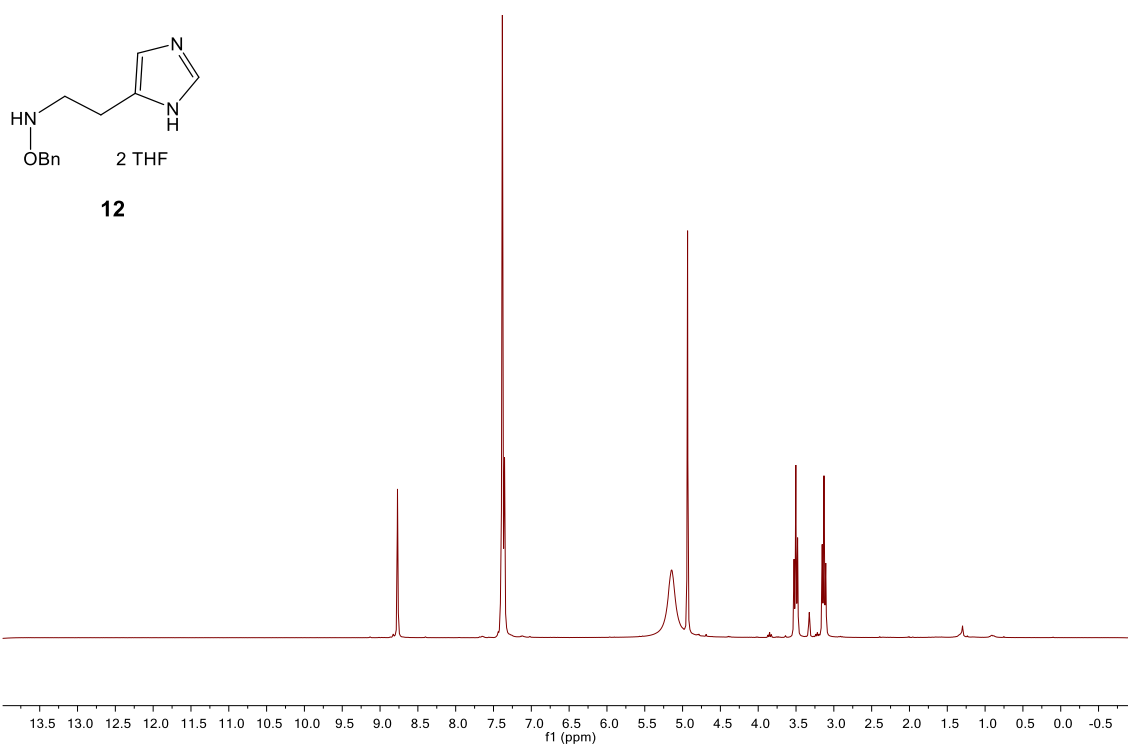
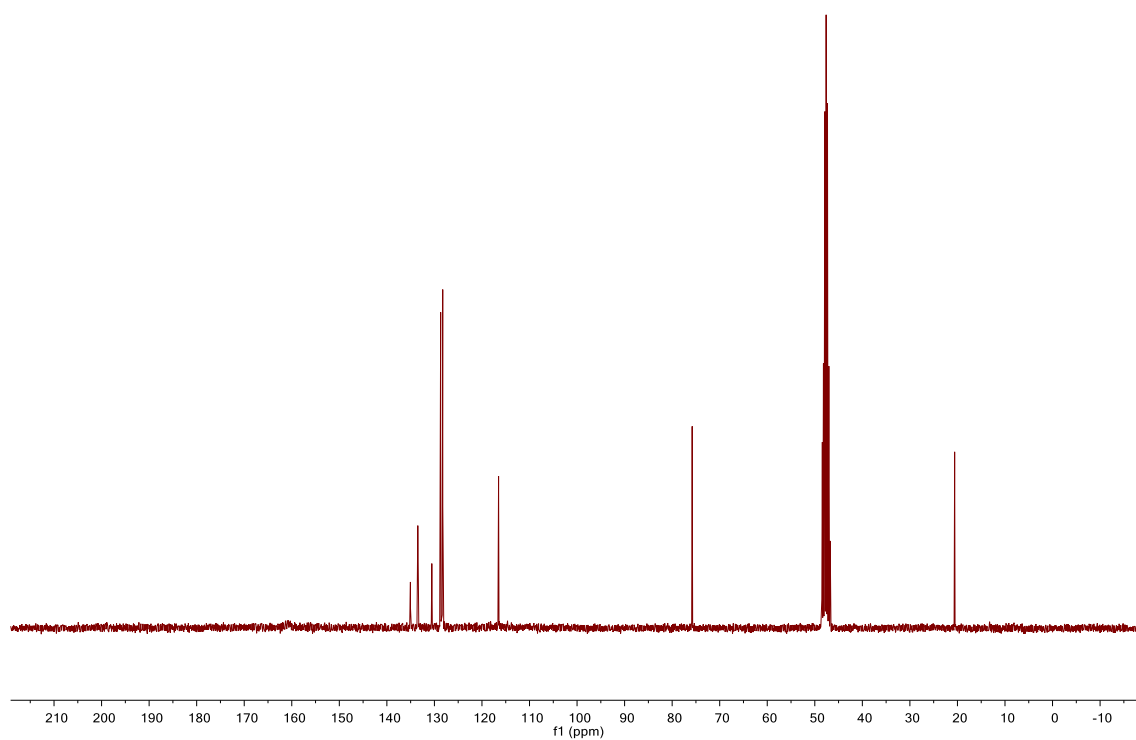
X = Br/Cl 3:1

10Espectro de RMN de ^{13}C (300MHz, D_2O)

Espectro de masas ESI positivo de baja resolución de **10**

Espectros de RMN del compuesto **11**Espectro RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3)Espectro de RMN de ^{13}C (300MHz, CDCl_3)

Espectro de masas ESI positivo de baja resolución de **11**

Espectros de RMN del compuesto **12**Espectro RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD)Espectro de RMN de ^{13}C (300MHz, CD_3OD)

Espectro de masas ESI positivo de baja resolución de 12

