



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTAD DE CIENCIAS



CICA | CENTRO DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS AVANZADAS

Grao en Química

Memoria del trabajo de fin de grado

Diseño de sondas moleculares. Síntesis de análogos de sideróforos para preparación de conjugados

Design of molecular probes: Chemical synthesis of siderophore analogs for the preparation of conjugates

Diseño de sondas moleculares: Síntese química de análogos de sideróforos para a preparación de conxugados

Director(es): Jaime Rodríguez González

Carlos Jiménez González

Luis López Veres

Curso: 2015/2016 – Convocatoria: Julio

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography

UV: Ultravioleta-Visible

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

Cbz: Carbobenziloxi

ⁱPr: isopropilo

^tBu: *tert*-butilo

DHBA : ácido 2,3-dihidroxibenzoico

TBTU: *N,N,N',N'*-Tetramethyl-*O*-(benzotriazol-1-yl)uronium tetrafluoroborate

PhFI: 9-fenilfluoreno

DMF: Dimetilformamida

AcOEt: Acetato de etilo

THF: Tetrahidrofurano

ppm: partes por millón

uma: unidades de masa atómica

s: singlete

d: doblete

dd: doble doblete

t: triplete

hept: heptaplete

dhept: doble heptaplete

m: multiplete

μmol: micromoles

kg: kilogramos

g: gramos

mg: miligramos

ESI: Electro Spray Ionization

δ: Desplazamiento químico

°C: Grados centígrados

h: horas

Hz: Hercios

RF: Factor de retención

Agradecimientos:

En primer lugar a los profesores Jaime Rodríguez González y Carlos Jiménez Gonzales por darme la posibilidad de participar en su grupo de investigación, y sin cuya ayuda no sería posible este Trabajo de Fin de Grado. Todos sus conocimientos transmitidos y disponibilidad a la hora de resolver las dudas que iban surgiendo durante el proyecto fueron indispensables y de gran ayuda.

A la doctora Rosa, los doctorandos Diana, Katherine y Juan Carlos y los alumnos de master Alejandra y Javier, con quien compartir laboratorio fue un auténtico placer debido al buen ambiente que mantienen en el laboratorio. También por guiarme en el trabajo del día a día en todo lo que podían, enseñándome todo la rutina de trabajo que se lleva en el grupo de investigación.

A todos mis compañeros del grado, que me han ayudado en momentos de dificultad y me han hecho mucho más amena toda la estancia en la carrera durante todos estos años.

A mis amigos de Guitiriz, que en los momentos de mayor agobio, siempre estaban ahí para levantar la moral y hacer que viera las cosas con una mejor perspectiva.

Y por supuesto a toda mi familia, que ha depositado en mí toda la confianza e impuesto la motivación necesaria para alcanzar mis metas

A todos vosotros, gracias.

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
RESUMO	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. Química de Productos Naturales.....	10
1.2. Importancia de la acuicultura.....	11
1.3. Principales enfermedades producidas por bacterias en peces.....	12
1.4. Mecanismos de captación de hierro por bacterias. Los sideróforos.....	13
1.5. Características estructurales de los sideróforos	15
1.6. Aplicaciones de los sideróforos.....	18
1.7. Presencia de aminoácidos en productos naturales: Aminoácidos y polipéptidos	22
1.8. Métodos de secuenciación de péptidos y proteínas	23
1.9. Métodos de identificación de la secuencia de un aminoácido. Método de Marfey ...	24
1.10. Presencia de 3-metilhomoserina en compuestos naturales	25
2. Objetivos.....	27
3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	29
3.1. Síntesis de un análogo de vancrobactina: Planteamiento retrosintético	30
3.2. Desarrollo de la síntesis de un análogo de vancrobactina (1).....	31
3.2.1. Síntesis de los intermedios para la obtención del análogo de vancrobactina....	32
3.3. Aproximación a la síntesis de la 3-metilhomoserina: Planteamiento retrosintético ..	34
3.4. Planteamiento de síntesis para la 3-metilhomoserina	34
3.4.1. Síntesis de los intermedios para la obtención de la 3-metilhomoserina.....	35
4. Parte Experimental.....	37
General.....	38
4.1. Síntesis del 2,3-dihidroxibenzoato de metilo.....	39
4.2. Síntesis de 2,3-di- <i>iso</i> -propoxibenzoato de metilo.....	43
4.3. Síntesis del ácido 2,3-di- <i>iso</i> -propoxibenzoico	47
4.4. Síntesis del pentanoato de terc-butyl (R)-2-amino-5-(((benzyloxy)carbonyl)amino...51	
4.5. Síntesis de (R)-5-(((benziloxy)carbonil)amino)-2-(2,3-diisopropoxibenzamido)pentanoato de terc-butilo.....	53
4.6. Síntesis de ácido 2-amino-4-metoxi-4-oxobutanoico.....	55
4.7. Síntesis del ácido 4-metoxi-oxo-2-((9-fenil-9H-fluoren-9-il)metil)butanoico	58
5. CONCLUSIONES.....	60

RESUMEN

En este trabajo de fin de grado se ha procurado adquirir los conocimientos necesarios para llevar a cabo reacciones de síntesis de compuestos orgánicos en el laboratorio, sus posteriores formas de purificación así como familiarizarse con las técnicas de determinación estructural para el análisis de dichos compuestos.

El trabajo se distribuyó en dos partes diferenciadas

Parte I: Se procedió a la síntesis y caracterización de un análogo del sideróforo vancrobactina, intermedio que será utilizado por el grupo de investigación para la posterior obtención de un compuesto análogo al sideróforo. Para ello se partió del ácido 2,3- dihidroxibenzoico para llegar al compuesto deseado el (*R*)-5-(((benziloxi)carbonil)amino)-2-(2,3-diisopropoxibenzamido)pentanoato de *terc*-butilo.

Parte II: Aproximación a la síntesis de la 3-metilhomoserina como muestra estándar para comparación de aminoácidos que se obtengan después de una hidrólisis de péptidos. Se partió del aminoácido aspartato para llegar al ácido 4-metoxi-oxo-2-((9-fenil-9H-fluoren-9-il)metil)butanoico, el cual se convertirá en la 3-metilhomoserina.

ABSTRACT

In this TFG work I have learnt the basic techniques in organic synthesis as well as the purification and characterization methods that are used in a day a day basis for the analysis of the obtained compounds.

This work was divided in two main parts:

Part I: The synthesis and characterization of a vanchrobactin analogue was performed. This intermediate will be used by other members of the research group to obtain a final siderophore derivative. For the synthesis, the 2,3-dihydroxybenzoic acid was used as a precursor to prepare the sought after *tert*-butyl (*R*)-5-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-2-(2,3-diisopropoxybenzamide)pentanoate.

Part II: An approach to the synthesis of 3-methylhomoserine as a standard compound for the analysis of amino acids from hydrolyzed peptides was done. Aspartate was used as the starting material to obtain the 4-methoxy-oxo-2-((9-phenyl-9H-fluoren-9-yl)methyl)butanoic acid, which will be used to prepare the 3-methylhomoserine.

RESUMO

Neste traballo de Fin de Grao tratouse de adquirir os coñecementos necesarios para levar a cabo reaccións de síntese de compostos orgánicos no laboratorio, as súas posteriores formas de purificación e a familiarización coas distintas técnicas de determinación estrutural para a análise de ditos compostos.

O traballo distribúese en dúas partes diferenciadas:

Parte I: Procedeuse á síntese e caracterización dun análogo do sideróforo vancrobactina, que será usado posteriormente polo grupo de investigación para a obtención dun intermedio desexado. Para levalo a cabo pátese do ácido 2,3-dihidroxibenzoico para chegar ao composto desexado, o (*R*)-5-(((benziloxi)carbonil)amino)-2-(2,3-diisopropoxibenzamido)pentanoato de *terc*-butilo.

Parte II: Aproximación á síntese da 3-metilhomoserina como mostra estándar para a comparación de aminoácidos que se obteñan despois dunha hidrólise de péptidos. Parteuse do aminoácido aspartato para chegar ao ácido 4-metoxi-oxo-2-((9-fenil-9H-fluoren-9-il)metil)butanoico, o cal se usará para sintetizar a 3-metilhomoserina.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Química de Productos Naturales

Los productos naturales tanto de origen animal como vegetal han sido usados desde la antigüedad como fuentes de remedio para enfermedades o dolencias.

Se conoce como producto natural a aquella sustancia producida por un ser vivo¹. La mayor fuente sustancias de este tipo hasta ahora han sido los organismos terrestres. Sin embargo, desde los últimos 25 años los organismos marinos están adquiriendo una interesante importancia como nuevas fuentes de compuestos desconocidos. En una escala menor, también se pueden considerar una fuente de productos naturales lo que proceden de hongos y microorganismos.

Las ventajas que tiene el estudio de productos naturales son diversas. Entre ellas, está la obtención de productos muy útiles de bajo peso molecular². Permite conseguir compuestos de manera fácil y con menor coste de productos que serían inviables de conseguir en el laboratorio, ya sea por laboriosidad de ser obtenidos mediante síntesis o por razones económicas. Además el desarrollo de las nuevas técnicas de separación está facilitando la obtención de dichas sustancias de los organismos correspondientes, haciendo más fácil el aislamiento de los productos deseados³.

Los productos naturales son una fuente enorme de fármacos, ya sea tal como se encuentran en la naturaleza o introduciendo en estos ciertas modificaciones en su estructura. Sin embargo, la utilización como fármacos no es el único fin de los productos naturales, ya que cuanto mayor conocimiento se tenga en torno a un la interacción producto natural-organismo que lo produce, se podrá actuar de una forma o más efectiva en caso de que surja un problema en torno a él. Este es punto que será discutido en esta memoria cuando se hable de bacterias.

¹ Gutiérrez Ravelo, A.; Estévez Braun, A., *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat* , **2009**, 103, 409-419

² Dias, D.; Urban, S. ; Roessner, U., *Metabolites*, **2012**, 2, 303-336

³ Lahlou, M., *Pharmacology&Pharmacy*, **2013**, 4, 17-31

1.2. Importancia de la acuicultura

En el mundo moderno, en donde 800 millones de personas padecen malnutrición crónica y con expectativas de que la población mundial siga aumentando, la capacidad de alimentar a toda esta población es un factor de vital importancia que debe ser estudiado por todos los sectores que incluyen el suministro de alimentos.

Actualmente, el consumo de pescado se encuentra en un máximo nunca alcanzado anteriormente. La gente come más pescado que nunca, haciendo este hecho que la sociedad sea ampliamente dependiente del bienestar de este sector. El pescado es un gran alimento debido a su alto contenido en proteínas y nutrientes esenciales. Y no solo eso, sino que el aumento de este sector en los últimos años han repercutido enormemente en la economía de países productores creando además gran cantidad de puestos de trabajo.

En el año 2012 el sector acuícola estableció su nuevo máximo de producción, en el que produjo la mitad del pescado total consumido. Se espera que siga aumentando esta producción, hasta alcanzar en 2030 un 62% de la producción, siendo la estabilización de la pesca salvaje y el establecimiento de las prioridades alimenticias los factores de crecimiento a nivel global⁴.

Para ver la importancia de la acuicultura en España, veamos unos datos: En el año 2010 el consumo per capita de pescado se estableció en 43,3 kg. Aun así, el rendimiento neto de las exportaciones e importaciones fue negativo, superando la cantidad de pescado que entraba en el país a la cantidad que salía.

La producción acuícola en España supone un 22% aproximadamente de la actividad pesquera. Existen 5029 empresas dedicadas a este negocio. Las principales producciones son dorada, trucha arcoíris, lubina y rodaballo. También adquiere una marcada importancia el atún rojo del Atlántico, un gran foco de exportación ya que la mayor parte de este producto está destinado a China. Aunque el pescado comprende una parte importante de este negocio, en realidad el producto más cultivado es el mejillón, albergando un 71% de la producción total⁵.

⁴ <http://www.fao.org/3/a-i3720s.pdf> (05/07/2016, 19:24)

⁵ <http://www.fao.org/fishery/facp/ESP/es#CountrySector-ProductionSector> (05/07/2016, 11:37)

Teniendo la importancia de este sector, uno de los grandes problemas que se encuentran a la hora de cultivar especies es las posibles enfermedades. En los tanques una reproducción a gran escala de una determinada bacteria puede conllevar a que las especies contraigan determinadas infecciones. Para ello, es muy importante estudiar los métodos de control de bacterias para impedir la mortandad de los animales en las piscifactorías.

1.3. Principales enfermedades producidas por bacterias en peces

Como ya hemos dicho, uno de los principales problemas en las granjas de cultivo de peces son las enfermedades. Estas enfermedades son a menudo causadas por organismos bacterianos. Algunas de las más importantes son la yersiniosis, la vibriosis y la forunculosis

Debido a que la síntesis del sideróforo que se quiere realizar proviene de una especie de *Vibrio*, en este trabajo de investigación se profundizará en la vibriosis. Esta enfermedad está producida por *Vibrio anguillarum* y deriva normalmente en una septicemia hemorrágica fatal para el organismo que la padece. Puede presentarse en forma aguda o crónica. Los síntomas habituales son lesiones de piel, úlceras, inflamación, necrosis hemorrágica en tejido muscular, hemorragia en la base de las aletas u oscurecimiento de la piel.

Es una enfermedad bastante extendida que afecta a organismos tanto de agua dulce como de agua salada a lo largo de todo el mundo. La expansión de esta enfermedad afecta a numerosas empresas de la industria acuícola.

El tratamiento más común son una serie de antibióticos como oxitetraciclina, nitrofurantoina y sulfasoxazol, aunque los organismos que las padecen presentan anemia y no consumen el antibiótico suministrado, por lo que este tratamiento no resulta muy eficiente⁶. Estos antibióticos conllevan también el desarrollo de cierta

⁶ Segade Parrado, Y. Síntesis de sideróforos y análogos de dos bacterias patógenas en peces. Modificación del método de Murata en compuestos acíclicos con equilibrios conformacionales complejos. Tesis doctoral. Universidade da Coruña, 2015

resistencia por parte de las bacterias que pueden afectar negativamente al entorno y a la salud de los consumidores. Muchos de los países afectados por este problema están intentando recurrir a otras técnicas de tratamiento como el desarrollo de vacunas. El problema es que, debido a la existencia de múltiples cepas de este tipo de bacterias, se necesita desarrollar diversas vacunas, ya que no todas son eficaces contra la misma cepa⁷.

1.4. Mecanismos de captación de hierro por bacterias. Los sideróforos

Una de las partes en las que está basada este trabajo es el entorno en el que la bacteria crece y se reproduce. Estos microorganismos necesitan iones Fe(III) que son imprescindibles en la fase de crecimiento y reproducción. Su capacidad para activar el oxígeno y la posesión del par redox reversible Fe(III)/Fe(II) lo convierte en el elemento más adecuado para la catalizar un amplio rango de reacciones redox y para mediar en procesos de transferencia de electrones⁸.

Como parte de la evolución, y debido a las bajas concentraciones en las que se encuentra el Fe^{3+} en disolución (no mayor a 10^{-8} M), las bacterias han desarrollado un mecanismo de captación de este elemento. Se trata de una sustancia llamada sideróforo.

Los sideróforos (del griego “transportadores de hierro”) son definidos como compuestos de bajo peso molecular, quelatadores de hierro elaborados por bacterias y hongos para captar el Fe(III) en entornos donde no es muy abundante. Estos compuestos son producidos por las bacterias y se liberan al medio, donde son capaces de quelatar el hierro debido a la gran estabilidad termodinámica que tiene el complejo que se forma⁹.

Las bacterias Gram- negativas cuentan con unos receptores situados en el exterior de la membrana capaces de reconocer y transportar el complejo sideróforo- Fe(III) dentro del periplasma, en donde se unen a un sistema de transporte de la membrana citoplasmática para avanzar hacia el citoplasma.

⁷ Kwon, H.C., Kang, Y.J., *Aquaculture* **2016**, 454,125–129

⁸ (a) Ratledge, C.; Dover, G. L. *Annu. Rev. Microbiol.* **2000**, 54, 881-941. (b) Kornreich-Leshem, H.; Ziv, C.; Gumienna-Kontecka, E.; Arad-Yellin, R. C.; Chen, Y.; Elhabiri, M.; Albrecht-Gary, A.; Hadar, Y.; Shanzer, A. J. *Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 1137-1145

⁹ Neilands J. B, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 26723–26726

INTRODUCCIÓN

Una vez dentro, el modo más común de liberación de hierro es mediante una enzima reductasa, que tiene mucha mayor afinidad por Fe(III) que Fe(II). Un segundo mecanismo precede al anterior por medio de enzimas específicas que catalizan la hidrólisis del complejo, desprendiendo el hierro. Posteriormente, el sideróforo es degradado o segregado otra vez por transporte activo¹⁰.

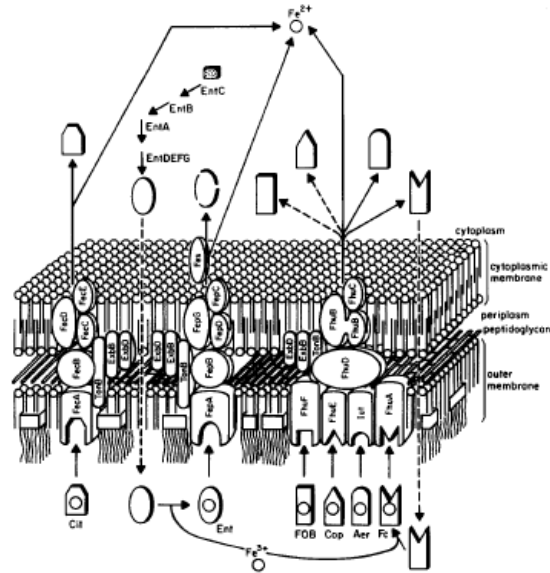


Figura 1. Esquema del transporte del complejo sideróforo-Fe(III) dentro de una bacteria gram-negativa¹¹.

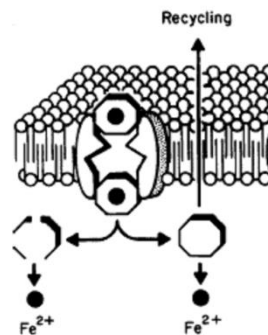


Figura 2 Esquema del transporte de un complejo sideróforo-Fe(III) dentro e una bacteria gram-positiva¹¹.

¹⁰ Górská, A.; Sloderbach, A.; Marszall, M. A. *Trends Pharmacol. Sci.* **2014**, 35, 442-449

¹¹ D.E. Crowley; Y.C. Wang; C.P.P. Reid; P. J. Szaniszlo; *Plant and Soil* **1991**,130, 179-198

Las bacterias Gram-positivas carecen de membrana externa, por lo que solo disponen de un sistema de transporte activo del complejo sideróforo-Fe(III) para introducir el complejo en el citoplasma.

Los sideróforos no son extremadamente selectivos. Muchas bacterias pueden utilizar incluso otros que no hayan sido producidos por una especie diferente.

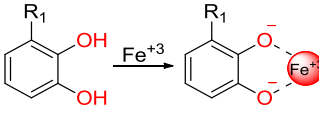
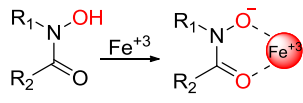
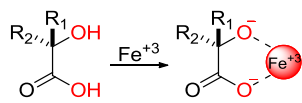
Los sideróforos, además de cumplir una función de captar hierro, también son capaces de captar otro tipo de metales que podrían ser tóxicos para el microorganismo. El sideróforo los capta, pero después, debido a la conformación que adquiere el complejo sideróforo-metal, no es reconocido por los sistemas de transporte en las membranas de las bacterias, por lo que no se transportan dentro de la membrana.

1.5. Características estructurales de los sideróforos

Las propiedades químicas del hierro han dictado el diseño de los sideróforos. La geometría que adquieren normalmente los complejos sideróforo-Fe(III) es octaédrica, lo que permite la orientación adecuada de seis ligandos alrededor del hierro minimizando las repulsiones. El Fe(III) de alto espín y entorno octaédrico se quelata de forma muy eficaz con tres ligandos bidentados con átomos de oxígenos dadores. En algunos casos una estructura puede contener más de dos puntos de enlace posibles con el Fe(III) como es el caso de la enterobactina, la agrobactina o la ferroxamina. Aunque normalmente los átomos dadores del ligando son oxígenos, hay ocasiones en donde el dador puede ser otro átomo como el azufre o el nitrógeno, aunque en estos casos el complejo sideróforo-Fe(III) es más inestable.

Existen actualmente más de 500 sideróforos reconocidos, producidos por diferentes organismos como bacterias, hongos o plantas. Dependiendo de la naturaleza de los ligandos, estos se pueden clasificar en tres grandes grupos: catecolatos, hidroxamatos y α -hidroxicarboxilatos. Todos ellos presentan una gran afinidad por el hierro.

Tabla 1 Tipos de sideróforos más comunes según el tipo de ligando

Tipo de sideróforo	pK _{a1}	pK _{a2}	Estructura y complejo con Fe(III)
Catecolato	9.2	13.0	
Hidroxamato	9.0	—	
α-Hidroxicarboxilato	3.0	14.5	

En los hidroxamatos la afinidad por el hierro se debe a la deslocalización de la carga en por sus formas resonantes. Un ejemplo es el ferricromo. Son producidos tanto por hongos como por bacterias y procariotas relacionadas, aunque estas últimas también producen catecolatos. Los α-hidroxicarboxilato se caracterizan por tener como grupo quelatante un α-hidroxiácido que generalmente deriva del ácido cítrico. Ejemplo de estos compuestos son el avenato.

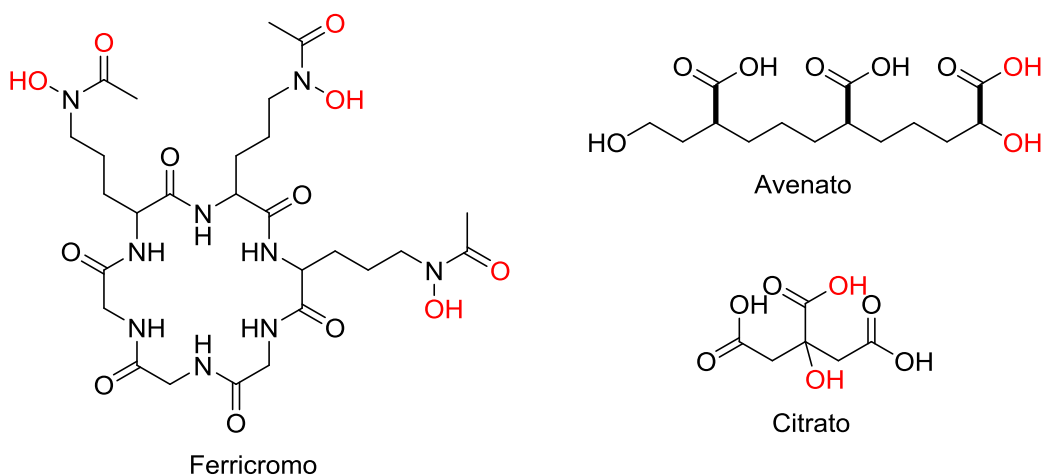


Figura 3 Ejemplos de sideróforo tipo hidroxamato y α-hidroxicarboxilato

Los sideróforos tipo catecolato son los derivados del ácido 2,3-dihidroxibenzoico. Su elevada afinidad por el Fe(III) se debe a la alta densidad de carga que poseen los grupos hidroxilo fenólicos (cuanto mayor sea la carga del oxígeno mayor será la

interacción con el metal). También incrementa la afinidad por el Fe la posición de los OH, que en este caso están en orto. Uno de los ejemplos de este tipo de estructuras es la enterobactina, producida por enterobacterias como *E. Colli* o *Salmonella*. Está formada por 2,3-dihidroxibenzoico/serina⁶.

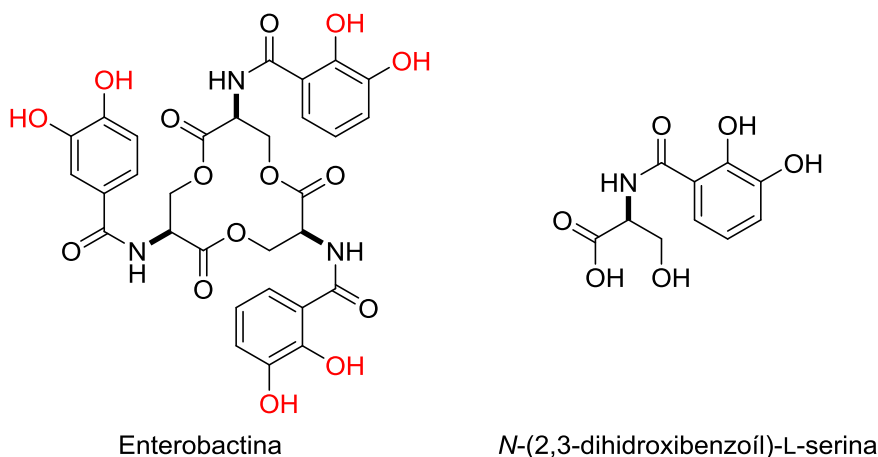


Figura 4 Enterobactina y monómero que la forma

Otro ejemplo de sideróforo catecolato es la vancrobactina, producido por la bacteria *Vibrio anguillarum*, responsable de la enfermedad vibriosis, una de las enfermedades que más afecta al sector acuícola. La vancrobactina es uno de los sideróforos más importantes producidos por esta bacteria, junto a la anguibactina.

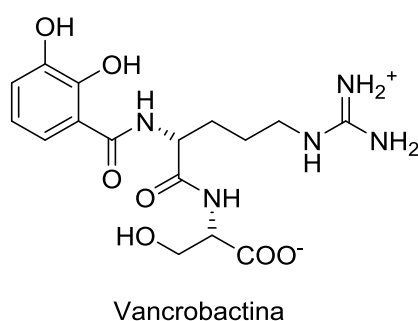


Figura 5 Estructura del sideróforo vancrobactina

La identificación y la elucidación estructural de este sideróforo han conducido a la síntesis y obtención de análogos de este compuesto que mantienen su actividad de sideróforo.

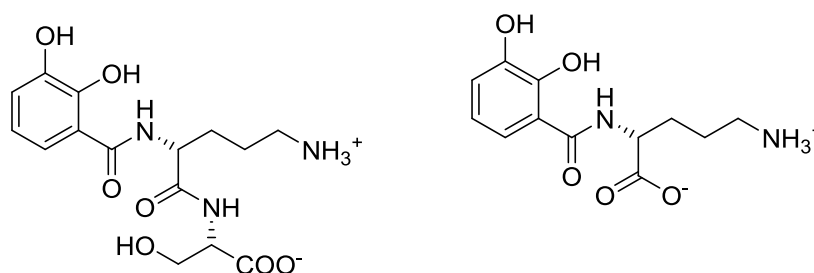


Figura 6 Estructura de análogos de vancrobactina

Así, el extremo amino de estos análogos ha sido usado como grupo funcional para anclar otro tipo de agentes bioactivos a la estructura. Dentro de esta posibilidad se ha considerado la idea de adherir un antibiótico para aumentar la eficiencia de este mediante la estrategia del caballo de Troya, más adelante descrita. Uno de los antibióticos que ha sido probado en este tipo de pruebas ha sido el norfloxacin, que presenta un fuerte poder antimicrobiano contra *V. anguillarum*, además de que su función amino en el anillo piperazinil facilita su conjugación. Este tipo de experimento no resultó demasiado efectivo debido a que el norfloxacin, por sí solo, mostraba mejores resultados de impedimento de crecimiento en las bacterias que el conjugado sideróforo norfloxacin, deduciendo que este tratamiento innovador no estaba funcionando eficazmente con este tipo de bacterias¹².

1.6. Aplicaciones de los sideróforos

Una de las principales aplicaciones de sideróforos es utilización en clínica. Son usados en determinados tipos de enfermedades causadas por un exceso de hierro en el organismo. Algunas de las enfermedades tratadas son la talasemia (un tipo de anemia hereditaria que consiste en una disminución de síntesis de hemoglobina) y la anemia sideroblástica (trastorno de médula ósea que produce sideroblastos anillados en vez de glóbulos rojos sanos). Estas dos enfermedades se tratan con múltiples transfusiones que suben los niveles de hierro en el individuo. Por otro lado, tenemos otro tipo de enfermedades como la hemocromatosis (un desorden que produce un incremento del hierro en el organismo, que se acumula peligrosamente en hígado, corazón y páncreas). En todos estos casos, podemos hacer uso de los sideróforos teniendo en cuenta su afinidad por el Fe(III) para regular la cantidad presente en el organismo¹³.

¹² Fujii, K.; Ikai, Y.; TMayumi, T.; Oka, H.; Suzuki, M.; Harada, K., *Anal. Chem.* **1997**, 69, 3346-3352

¹³ Nagoba, B.; Vedpathak, D. *Eur. J. Gen. Med.* **2011**, 8, 229-235

Otra de las aplicaciones es el desarrollo de antimicrobianos. El uso en el pasado de antibióticos y otros productos de exterminio de microorganismos ha concluido con la resistencia de estos a la acción de determinados compuestos. Debido a que el hierro es un elemento clave a la hora del desarrollo y reproducción de las especies virulentas, se puede llegar a pensar en nuevas estrategias que tengan en cuenta esta necesidad¹⁴.

Existen tres principales estrategias de desarrollo de antimicrobianos, las cuales veremos a continuación

Inhibición de la biosíntesis de sideróforos: El amplio estudio de la biosíntesis del sideróforo dentro del microorganismo ha permitido el diseño de inhibidores que impiden el proceso en el que es sintetizado el compuesto afín al hierro. La idea es utilizar pequeñas moléculas inhibidoras de las primeras etapas del proceso, impidiendo que se lleve a cabo la síntesis del sideróforo, deteniendo así el crecimiento bacteriano y la expansión de la enfermedad¹⁵.

Inducción de un déficit de hierro usando antagonistas: Se trata de una técnica que consiste en la síntesis de análogos de un sideróforo que actúan como antagonistas, en los que el receptor de la bacteria reconoce el compuesto, resultando en una unión irreversible que bloquea el tránsito de complejos sideróforo-Fe(III) dentro del microorganismo, y con ello, el crecimiento¹⁶.

Aplicación de la estrategia “Caballo de Troya” Todo comenzó alrededor de 1960, con el descubrimiento de las sideromicinas. Estos compuestos están formados por la unión covalente de un sideróforo con un antibiótico y son de origen natural. En medios bacterianos, el conjugado es reconocido por el receptor de la membrana de la célula debido a su parte de sideróforo, y una vez dentro el antibiótico surte efecto. Esto tiene una eficacia extremadamente superior que en el caso de usar el antibiótico por sí solo. La permeabilidad de la membrana de los microorganismos es limitada, por lo que la capacidad del antibiótico en forma libre de penetrar en el interior es reducida¹⁸.

Tomando como modelo los conjugados anteriores, se comenzó a desarrollar una estrategia que consistía en la unión de sideróforos (tanto naturales como de procedencia sintética) con fármacos, con el fin de acelerar la absorción de estos por parte de las bacterias (mencionado anteriormente en los usos de la vancrobactina).

¹⁴ Weinberg, E. D. *Microbiol. Rev.* **1978**, 42, 45-66

¹⁵ Górka, A.; Sloderbach, A.; Marszał, M. A. *Trends Pharmacol. Sci.* **2014**, 35, 442-449

¹⁶ Hu, J.; Miller, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 3462-3468

En este tipo de estrategia, los conjugados poseen tres fragmentos diferenciados. Se trata de una unión Sideróforo-Espaciador-Fármaco. El sideróforo es el responsable de captar el Fe(III) y de cumplir el reconocimiento por parte del receptor de la membrana de la bacteria. El espaciador es un fragmento muy importante que separa el fármaco lo suficiente del sideróforo con el objetivo de que este no interfiera en el proceso de quelatación del hierro ni en el del reconocimiento por parte del receptor. El espaciador también puede estar diseñado para que una vez dentro de la bacteria libere el fármaco o lo mantenga pegado. Esto dependerá sobre todo en el tipo de dianas farmacológicas a las que se quiera hacer frente considerando el tipo de microorganismo.

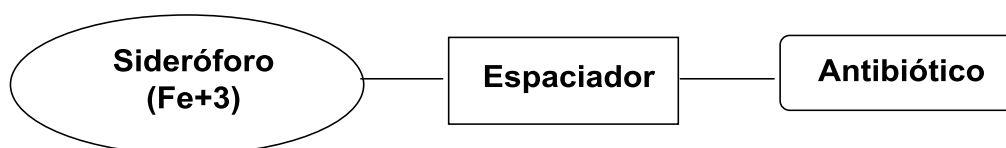


Figura 7 Estructura del conjugado siderofo-ro-antibiótico

Para el diseño de conjugados se hacen multitud de pruebas con compuestos sencillos que funcionen como sideróforos, estableciendo relaciones estructura/actividad que determinaran como enlazar el espaciador. La elección del fármaco vendrá determinada por el tipo de diana farmacológica. En la mayoría de los casos y teniendo en consideración el precedente de las sideromicinas, se toma como punto de unión entre el sideróforo y el antibiótico un enlace peptídico^{6,17}.

Actualmente, el grupo de investigación en donde se llevó a cabo este trabajo de fin de grado, estudia la preparación de un conjugado entre nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄ recubiertas de gel de sílice y análogos de vancrobactina y enterobactina.

El interés de este proyecto radica en que la mayoría de tratamientos contra bacterias se basa en el uso de antibióticos, que causan con el tiempo desarrollo de resistencias por parte de cepas de las bacterias. El papel de la nanopartícula en este conjugado sería la sensibilidad a la exposición de un campo magnético. De esta forma, el sideróforo, unido a la nanopartícula, sería reconocido por la bacteria e introducido dentro de su membrana. Posteriormente el uso de un imán en el agua podría arrastrar las nanopartículas y con ellas, las bacterias, eliminando el contenido bacteriano de medios acuáticos en una gran proporción. La gran ventaja de este método sería que este método no da cabida a una posible resistencia de las bacterias, como los antibióticos.

¹⁷ Zähler, H.; Diddens, H.; Keller, W.; Nageli, H. U. *J. Antibiot.* **1977**, *30*, 201-205

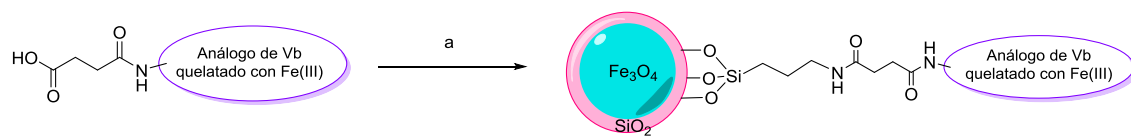


Figura 8 Estructura del sideróforo unido a la nanopartícula recubierta de gel de sílice

1.7. Presencia de aminoácidos en productos naturales: Aminoácidos y polipéptidos

En los productos naturales pueden encontrarse una gran variedad de subestructuras. Una de las más abundantes y la que vamos a tratar son los aminoácidos.

Los aminoácidos son sustancias orgánicas que habitualmente poseen un carbono central (el carbono- α , asimétrico) que está unido a un grupo amino, un grupo carboxilo, un hidrógeno y un grupo funcional R.

Existen un grupo de 20 aminoácidos que son los principalmente encontrados formando la mayoría de las proteínas. Son los denominados aminoácidos esenciales. Sin embargo existen otro tipo denominados aminoácidos no esenciales. Estos a menudo han sufrido algún tipo de modificación después de su incorporación a un polipéptido, o simplemente son sintetizados en organismos sin poseer ningún tipo de función estructural dentro de las proteínas. Su procedencia viene dada por errores asociados a la síntesis, por lo que pueden encontrarse en determinados péptidos¹⁸.

Los aminoácidos pueden encontrarse tanto como aminoácidos individuales unidos a una estructura, como formando cadenas de aminoácidos mediante enlaces peptídicos, pudiéndose clasificar en péptidos o proteínas. La diferencia entre estos no está muy clara, aunque si una cadena excede los 40 aminoácidos suele considerarse como proteína. En cualquier caso se puede referir a ambos con el nombre de polipéptidos.

Existen polipéptidos de una amplia variación de tamaños: desde péptidos formados por dos aminoácidos, más grandes, como la hormona insulina, que contiene dos cadenas de 30 y 21 aminoácidos, y el glucagón, otra hormona pancreática de 29, hasta los que contienen miles de unidades monoméricas. Una de las cadenas más largas conocidas es la titina, con una estructura formada por aproximadamente 27 000 aminoácidos. Aunque haya ejemplos de estructuras tan grandes, la mayoría de las proteínas producidas por organismos vivos no superan los 2 000 aminoácidos¹⁹.

Algunos de estos productos son extraordinariamente difíciles de obtener, y su obtención se da en cantidades ínfimas. Muchos de los compuestos marinos que pueden ser aislados de esponjas u organismos del fondo del océano presentan muchas veces problemas a la hora de su obtención. Además, en el caso de conseguir

¹⁸http://global.oup.com/us/companion.websites/fdscontent/uscompanion/us/static/companion.websites/9780199730841/McKee_Chapter5_Sample.pdf (7/7/16 12:35)

¹⁹ <http://jpkc.gmu.cn/swhx/book/shyl/3.pdf> (7/7/16,11:57)

el organismo, las técnicas usadas en el laboratorio para su extracción pueden no ser de todo correctas o ser las indicadas, por lo que eso puede disminuir la cantidad de producto que se va a obtener.

El avance de la química orgánica ha permitido, a través del estudio de la estructura de un compuesto aislado, el reconocimiento de toda su conformación, para el diseño de una ruta de síntesis del compuesto en el laboratorio. Sin embargo, esto no es una tarea fácil. Este tipo de estructuras son realmente complejas de analizar, debido a su tamaño.

1.8. Métodos de secuenciación de péptidos y proteínas

El problema de la determinación de una secuencia de aminoácidos en péptidos ha atraído el interés de muchos investigadores en el pasado debido a la necesidad de caracterizar la estructura de proteínas. Numerosos métodos han sido desarrollados usando hidrólisis parcial. Sin embargo las aplicaciones de estos métodos son limitadas, debido a que cada uno de ellos tiene considerables restricciones, creando la necesidad de otros métodos alternativos.

En general, para determinar la composición de aminoácidos de determinado péptido se sigue el siguiente procedimiento. Se hidroliza el compuesto, con unas condiciones fuertes que permitan la rotura de todos los enlaces peptídicos que conforman la estructura. Esto conllevará que todos los aminoácidos se encuentren de forma libre. Lo que significa que lo siguiente llevado a cabo será la separación de estos. Para ello, las técnicas más utilizadas son la cromatografía de intercambio iónico o la cromatografía de interacción hidrofóbica. Posteriormente, se recorre al reconocimiento de su estructura mediante técnicas espectroscópicas como masas, la más utilizada en este ámbito. Cada residuo o fragmento posee un patrón que permite su identificación.

Este tipo de técnica general nos lleva al conocimiento de la composición de cada aminoácido que forma el péptido. Sin embargo, existen otro tipo de técnicas para conocer la posición de cada aminoácido dentro de la cadena.

Uno de los métodos más usados a la hora de secuenciación de proteínas es el método de Edman. En este método el aminoácido terminal es escindido de la cadena sin afectar al resto de enlaces peptídicos de la estructura. Para esto se usa el reactivo fenil isotiocianato, que reacciona con el extremo N-terminal sin carga en condiciones

alcalinas para formar un derivado del fenilcarbamoil cíclico. A continuación, bajo condiciones ácidas, este derivado del aminoácido terminal se separa de la cadena como un derivado de tiazolina, que es extraído con un disolvente orgánico y tratado con ácido para que adquiera la forma más estable, pudiendo ser identificado por cromatografía o electroforesis. Este proceso se repite con el siguiente aminoácido. Es un método que requiere tiempo y no productivo usarlo con cadenas de más de 50 aminoácidos. Estos péptidos largos además generan problemas, y a veces no se produce una escisión eficiente. La ventaja de este método es que se necesita muy poca cantidad de la estructura a analizar (en sistemas automatizados puede llegar a gastar de 10-100 picomoles de péptido. Si el péptido contuviera puentes disulfuro o de otro tipo, sería necesario romperlos antes de comenzar la secuencia²⁰.

Otro tipo de técnica utilizada en la caracterización de proteínas es la de conocer que aminoácido es el correspondiente extremo N-terminal. En caso de seccionar el péptido en varios trozos, conocer el extremo ayuda enormemente al ordenamiento de los fragmentos. El reactivo de Sanger (1-fluoro-2,4- dinitrobenceno) es el más conocido para llevar a cabo este método. Es un compuesto muy sensible de ser atacado por un nucleófilo por lo que reacciona fácilmente con el extremo N, antes de hidrolizar la proteína. Después el fragmento es analizado por cromatografía comparando la muestra con standards²¹.

1.9. Métodos de identificación de la secuencia de un aminoácido.

Método de Marfey

En 1984, Marfey propuso un método para la determinación de la configuración absoluta en aminoácidos usando el HPLC. El método está basado en que el aminoácido D y L pueden ser separados en cada enantiómero mediante la utilización de un reactivo quiral como la (1-fluor-2,4-dinitrofenil-5)-L-alaninamida (FDAA), conocido como el reactivo de Marfey. Los derivados de aminoácidos resultantes se separan por fase reversa en HPLC. Los aminoácidos L normalmente salen antes de la columna que sus derivados D, y son detectados con luz UV de 340 nm. Este método permite la identificación simultánea de los aminoácidos con la configuración correcta y es altamente sensible. Por esta razón, el método de Marfey ha sido ampliamente

²⁰ http://acta-chem-scand.org/pdf/acta_vol_04_p0283-0293.pdf (19/7/16 11:37)

²¹ <https://www.quora.com/How-does-Sangers-reagent-work> (19/7/16 12:06)

usado para caracterización estructural de componentes de péptidos, confirmación de las mezclas racémicas en síntesis y detección de pequeños D-aminoácidos²².

Sin embargo, aunque se ha hablado de la separación de los dos isómeros, se necesita contrastar con compuestos conocidos cada uno de las estructuras separadas. Para eso se necesita disponer de standards de comparación que nos permitan determinar con certeza un compuesto determinado.

La presencia de aminoácidos inusuales en péptidos y proteínas ha supuesto un reto para los químicos sintéticos, que se ven obligados a desenvolver una nueva estrategia de síntesis para alcanzar una determinada nueva estructura que posteriormente será usada para la comparación²³.

1.10. Presencia de 3-metilhomoserina en compuestos naturales

La 3-metilhomoserina o γ -hidroxivalina, como muchos la conocen, es un aminoácido que fue hallado en un producto natural por primera vez en la planta *Kalanchoe daigremontiana*, una especie endémica de Madagascar²⁴ más conocida como Espinazo del Diablo. Sin embargo, su presencia en otros productos naturales no ha sido muy abundante desde su descubrimiento.

En 2005 se encontraron en el veneno de un par de especies de caracoles marinos. El veneno de estos moluscos es una mezcla compleja de conopéptidos, que estimula un amplio rango de respuestas neuropsicológica. Muchos de estos conopéptidos han mostrado un comportamiento valioso como agentes terapéuticos contra el tratamiento de problemas neurológicos.

Estas dos especies mencionadas son el *Conus gladiator* y el *Conus mus*. La identificación de la estructura de estos dos compuestos fue llevada a cabo con un método que combinaba espectroscopia de RMN y masas.

En el estudio se encontró la 3-metilhomoserina en secuencias de cuatro de los conopéptidos. La gld-V y gld-V' fueron aisladas del *Conus Gladiator*, mientras que del

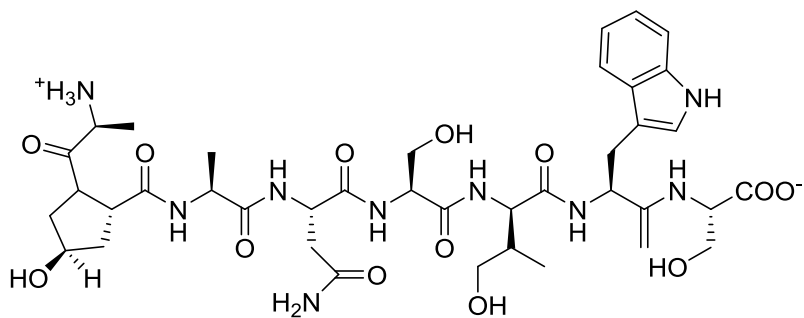
²² Fujii, K.; Ikai, Y.; Mayumi, T.; Oka, H.; Suzuki, M.; Harada, K.; Anal. Chem. **1997**, 69, 3346-3352

²³ Wipf P., *Chem. Rev.* **1995**, 95, 211,2134

²⁴ Pollard, J. K.; Sondheimer, E. ; Steward, F. C. , *Nature*, **1958**, 182, 1356 - 1358

Conus mus se aislaron la mus-V y la mus-V'. También fueron aislados sus correspondientes análogos conteniendo D-Valina.

La 3-metilhomoserina es un aminoácido inesperado en cadenas peptídicas, debido a la presencia del grupo hidroxilo. Este podría partir un enlace peptídico fácilmente mediante intraciclación para formar la lactona. Su estabilidad en conopeptidos ha sido explicada mediante la D-configuración del carbono α y la conformación establecida sobre los demás L-aminoácidos que lo rodean en la secuencia²⁵.



β -Hidroxyconophan gld-V*: Ala-Hyp-Ala-Asn-Ser-D-Hyv-Trp-Ser

Figura 9. Conformación de la secuencia gld-V' aislada del molusco *Conus Gladiator*

²⁵ Pisarewicz, K.; Mora, D.; Pflueger, F.; Fields, G.B.; Mari, F., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 6207-6215

2. Objetivos

En este Trabajo de Fin de Grado, el objetivo principal es la síntesis parcial de dos compuestos de origen natural. El trabajo está repartido en dos partes, considerando los dos compuestos que se desea obtener.

1. Síntesis del análogo del sideróforo vancrobactina. El objetivo es la obtención de un producto intermedio para la posterior síntesis de un análogo de vancrobactina que será conectado a nanopartículas de hierro con cubierta de sílice.
2. Obtención del aminoácido 3-metilhomoserina. Debido a la importancia de los polipéptidos como productos naturales, y partiendo de que la elucidación de la estructura de estos es uno de los procesos más importantes de la obtención de este tipo de productos naturales, el grupo de investigación debe disponer del aminoácido para ser utilizado como estándar para el reconocimiento de este en una estructura polipeptídica.

Estos objetivos se alcanzaron mediante estos objetivos específicos:

- Síntesis de un análogo de la vancrobactina a partir del ácido 2,3-dihidroxibenzoico mediante el acoplamiento al aminoácido N'-Cbz-L-ornitina.
- Síntesis de la 3-metilhomoserina, aminoácido no esencial para su uso como standard en procesos de determinación estructural de productos naturales a partir del aspartato.
- Correcta caracterización de los productos formados mediante técnicas de RMN y espectrometría de masas.

3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1. Síntesis de un análogo de vancrobactina: Planteamiento retrosintético

Vancrobactina es un sideróforo producido por el patógeno *Vibrio anguillarum*, bacteria responsable de la enfermedad vibriosis, una enfermedad que causa hemorragias en los peces. Es una de las principales enfermedades que más afectan a las plantas de cultivo de peces, produciendo una gran mortalidad y acarreando unas elevadas pérdidas económicas a estas empresas.

La elucidación de la estructura y la síntesis de este compuesto ha supuesto el desarrollo de nuevas estrategias de combatir la *Vibrio anguillarum* mediante la estrategia del Caballo de Troya²⁶

En primer lugar, a partir de la estructura del intermedio para la síntesis del análogo de vancrobactina (**1**) se propuso el siguiente planteamiento retrosintético:

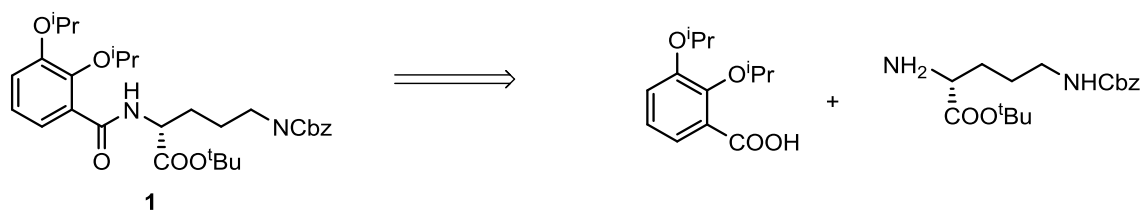


Figura 10. Análisis retrosintético del compuesto intermedio para la síntesis del análogo de vancrobactina

En este caso, los fragmentos necesarios para la obtención del intermedio serían obtenidos de la siguiente manera.

²⁶ Soengas, R.G.; Anta, C.; Espada, A.; Nieto, R.M.; Larrosa, M.; Rodríguez, J. ; Jiménez, C., *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48,3021–3024

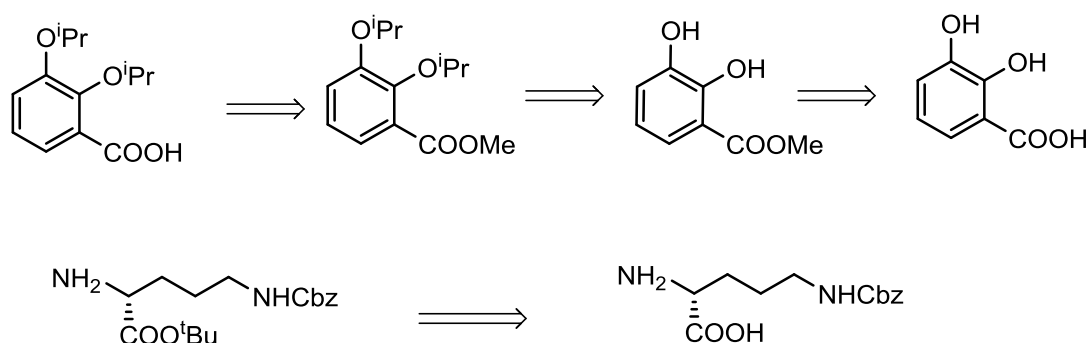


Figura 11. Análisis retrosintético de los fragmentos para síntesis del análogo

Esta metodología sintética fue propuesta en un artículo de colaboración entre el Departamento de Química Fundamental de la Facultad de Ciencias de la Universidad da Coruña con Analytical Technologies DCR&T de Lilly en Alcobendas²⁶ y también mencionado en la tesis doctoral de la Dra. Yuri Segade⁶.

3.2. Desarrollo de la síntesis de un análogo de vancrobactina (1).

Para la síntesis del compuesto intermedio necesario para la síntesis de vancrobactina se propone el siguiente mecanismo:

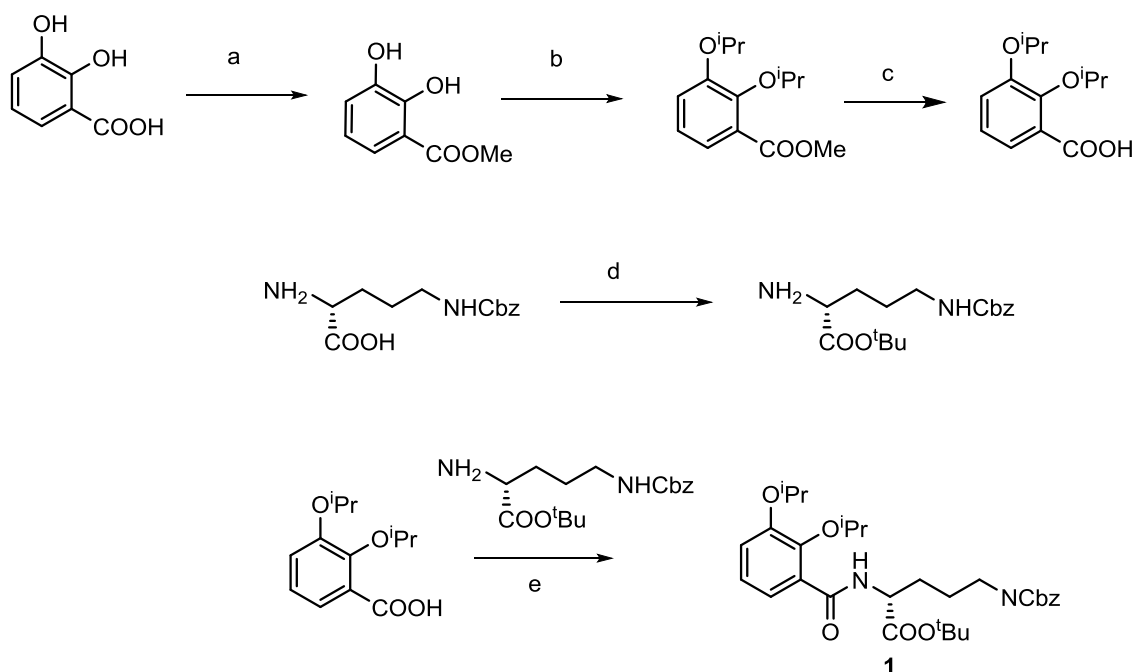


Figura 12. Propuesta de síntesis para el intermedio en la síntesis del análogo de vancrobactina

Reactivos y condiciones

- a) $\text{SOCl}_2/\text{MeOH}$, 24h, 65°C
- b) $^i\text{PrBr}$, K_2CO_3 , KI/DMF , 24h, 50°C
- c) $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}/\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$, 24h, 50°C
- d) $\text{HClO}_4/^t\text{BuOAc}$, 72h, rt
- e) TBTU, $\text{Et}_3\text{N}/\text{DM}$, 16h, rt

3.2.1. Síntesis de los intermedios para la obtención del análogo de vancrobactina

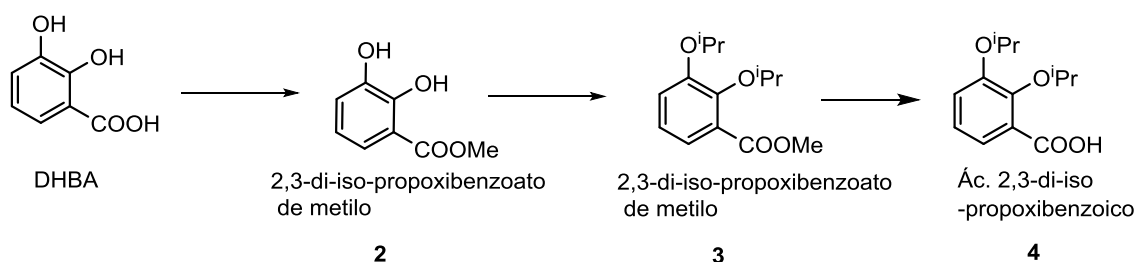


Figura 13 Primera parte de la ruta de síntesis del intermedio para la obtención del sideróforo, con la obtención del ácido 2,3-di-iso-propoxibenzoico

Para la primera parte de la síntesis del intermedio 4, está compuesta de tres pasos. Se parte de DHBA el cual es metilado para obtener un éster que se protege a continuación los dos fenoles mediante la reacción con bromuro de isopropilo. El tercer paso consiste en la desprotección a ácido mediante hidrólisis básica del éster. Todas las reacciones fueron relativamente sencillas y no necesitaron condiciones demasiado específicas. Las elaboraciones de las reacciones fueron unos lavados sencillos en el embudo de decantación, mientras que el tercero necesitó la utilización de una resina para retener el ácido. En las veces que se realizó esta reacción, esta resina no parecía retener el ácido demasiado bien, pudiendo ser un problema de las condiciones de activación, las cuales en este caso, fueron la acidificación previa de la resina con HCl 5%. Aun así, los rendimientos fueron altos.

Los espectros de RMN permitieron identificar el compuesto con facilidad. En el caso de la primera reacción en el producto se observa claramente el grupo la presencia del grupo OMe; en el caso de la segunda reacción, el RMN del producto mostraba dos septupletes distinguidos, correspondientes a los dos grupos fenoles que se habían protegido, mientras en el producto final de este paso, se observa la desaparición de la señal característica del éster metílico OMe a 3.7 ppm aproximadamente que sí aparecía en los anteriores.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los espectros de masas realizados mediante el método de ionización de electrospray en modo ion positivo, confirmaron la presencia de todos los productos.

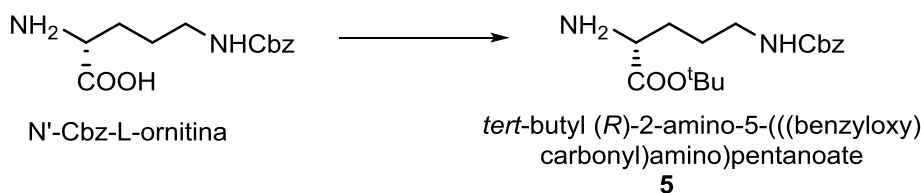


Figura 14 Segunda parte para la obtención del intermedio (**5**) empleado en la síntesis de la Vancrobactina, correspondiente a la *tert*butilación de la *N'*-Cbz-L-ornitina

Se siguió la metodología descrita por Benjamin Gruber, Stefan Balk, Stefan Stadlbauer, and Burkhard Kçnig²⁷. Aunque parecía tener un desarrollo especialmente fácil, pero por algún motivo, no se consiguió en ninguna de las repeticiones hechas un rendimiento alto. A pesar de eso, se consiguió obtener cantidad suficiente para llevar a cabo el siguiente paso de síntesis.

En el espectro de RMN se apreciaba la señal enorme correspondiente al grupo *tert*-butilo, interpretando que ese ha formado el producto deseado.

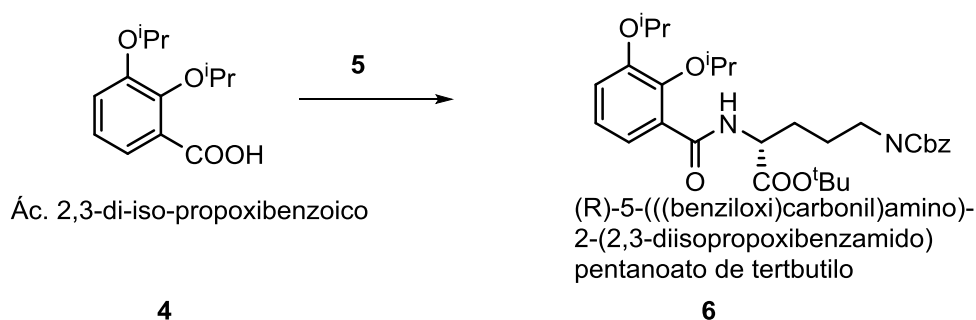


Figura 15 Obtención del intermedio empleado para la síntesis de la Vancrobactina

Esta reacción de acoplamiento de los compuestos **4** y **5** resultó más compleja que el resto de la ruta. Fue extraída de la misma publicación que la primera parte²⁶. Para la unión se usó como agente complejante TBTU, tomándose un cuidado adecuado con la humedad dentro del medio de reacción, siguiendo las pautas de reacciones en condiciones anhidras descritas en la parte de Desarrollo Experimental. Después de la purificación por columna cromatográfica, el espectro de RMN del compuesto de

²⁷ Gruber, B.; Balk, S.; Stadlbauer, S.; Kçnig, B., *Angew. Chem. Int.* **2012**, 51, 10060–10063

acoplamiento se concluyó que se había obtenido el compuesto deseado con elevada pureza, comparándose con las señales obtenidas en la bibliografía.

3.3. Aproximación a la síntesis de la 3-metilhomoserina: Planteamiento retrosintético

La segunda parte del trabajo de este TFG se basó en una aproximación síntesis de la 3-metilhomoserina. A partir de su estructura se plantea el siguiente análisis retrosintético:

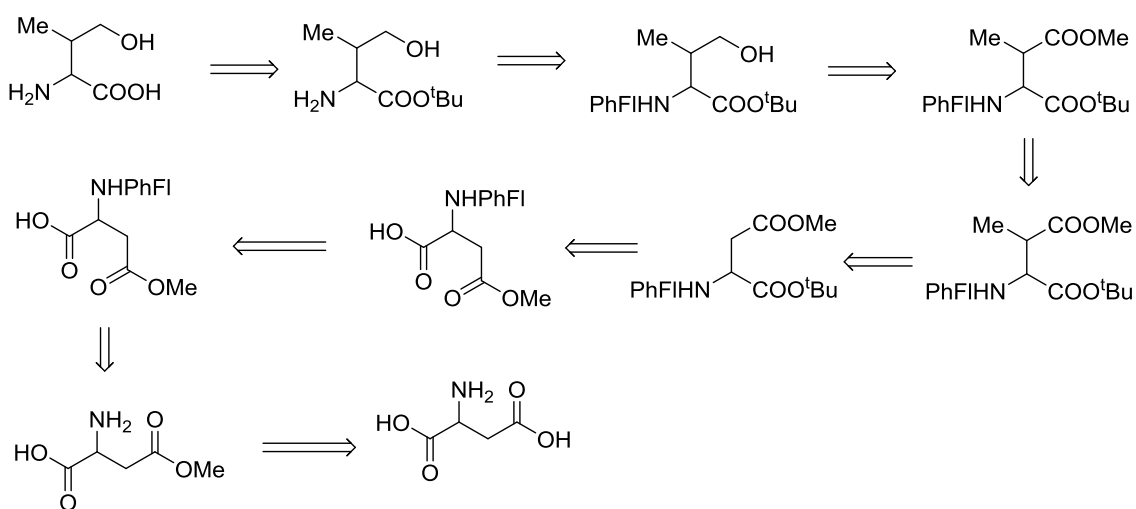


Figura 16 Planteamiento retrosintético para la síntesis de la 3-metilhomoserina

Este planteamiento ha sido establecido basándose en una amplia cantidad de fuentes bibliográficas. Lo primero que llama la atención en esta reacción es el grupo protector. Se necesita un grupo protector muy voluminoso para prevenir la multimetilación en el paso cuarto de la ruta sintética. En un estudio realizado por Stephen Hanessian, Roberto Margarita, Adrian Hall y Xuehong Luo, demostraron que en una estructura similar, al intentar metilar el carbono de la posición 3, se producía una polialquilación cuando el grupo protector era Cbz, otro de los grupos voluminosos que se suele usar en protección de aminas²⁸. Eso nos lleva a la necesidad de buscar un grupo más voluminoso, como es el 9-bromo-9-fenilfluoreno.

3.4. Planteamiento de síntesis para la 3-metilhomoserina

²⁸ Hanessian, S.; Margarita, R.; Hall, A.; Luo, X., *Tetrahedron Lett.* **1998** 39, 5883-5886

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para la síntesis de 3-metilhomoserina se ha propuesto la siguiente ruta de síntesis:

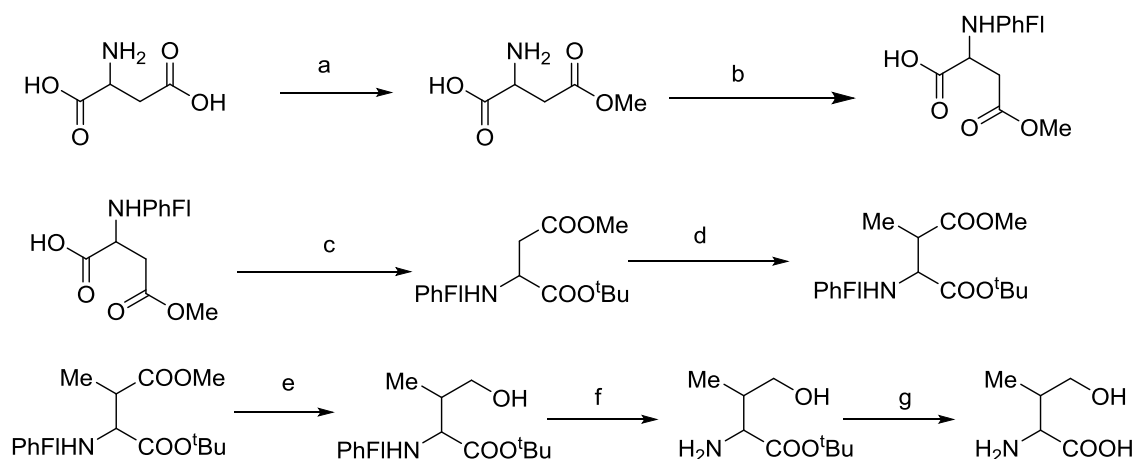


Figura 17 Propuesta para la síntesis de 3-metilhomoserina

Reactivos y condiciones

- a) $\text{SOCl}_2/\text{MeOH}$, 3h, rt
- b) 9-bromo-9-fenilfluoreno, SiMe_3Cl , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Et}_3\text{N}/\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{CN}$, 72h, rt
- c) O-tricloroacetamidato de tBu / ciclohexano, 120h, rt
- d) KHDMS, MeI / THF, 1h, -78°C
- e) DIBAL-H / THF, 1h, -35°C
- f) H_2/Pt / MeOH/AcOH, 16h, rt
- g) $\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}$, 2h, 30°C

3.4.1. Síntesis de los intermedios para la obtención de la 3-metilhomoserina

La ruta de síntesis de este compuesto requirió una búsqueda bibliográfica más elaborada que el anterior descrito. Debido a la imposibilidad de llevarla a cabo completamente, se irá describiendo reacción a reacción con sus aspectos más importantes a tener en cuenta.

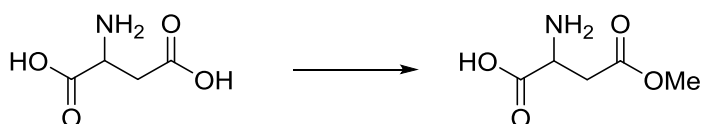


Figura 18 Metilación del aminoácido Aspartato.

En esta reacción lo más importante a tener en cuenta fue mantener el balón de reacción bien frío al añadir el SOCl_2 . El crudo de reacción se obtiene una mezcla de

compuestos. En el espectro de RMN se puede apreciar claramente la presencia de estos dos compuestos, que corresponde a la formación del éster en cada uno de los dos ácidos. Se puede cuantificar la proporción en la que se encuentran los dos compuestos, basándose en la intensidad de los picos del RMN. De aquí, se saca que la proporción de las dos productos es 85-15%. Viendo la estructura de estas, se observa por integración de las señales que la que está en mayor proporción es el compuesto deseado, debido a que el otro al tener el grupo amino más cerca estaría más impedido, por lo que la reacción no sería tan favorable²⁹.

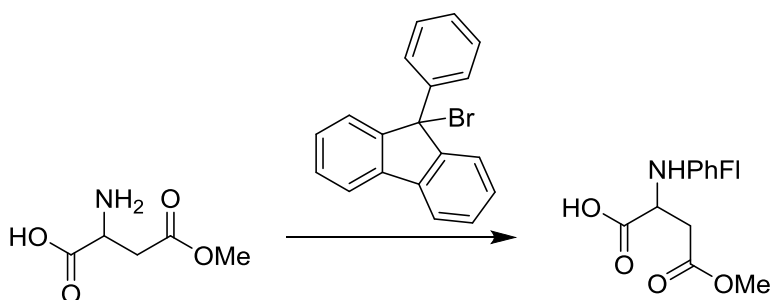


Figura 19 Protección del grupo amino con el 9-bromo-9-fenilfluoreno

Después de los múltiples intentos que se llevaron a cabo, el factor más importante para que la reacción funcionara, aparte de mantener unas condiciones anhidras lo mejores posibles, fue la temperatura.

En el momento de añadir el ClSiMe_3 al aspartato metilado en la posición β , la reacción se agita durante 4 horas a temperatura ambiente. En otras publicaciones este paso aparecía relatado a reflujo, a cierta temperatura, considerando unos 60°C . Esto favorecía la formación de un producto secundario formado por la unión de la NEt_3 y el 9-bromo-9-fenilfluoreno. Sin embargo, al mantener la temperatura ambiente en este paso, si se consiguió observar en un análisis RMN los picos correspondientes al producto deseado, comparando las señales obtenidas con las del compuesto puro obtenidas de la bibliografía³⁰.

En esta reacción, también llevada a cabo en condiciones anhidras, debemos tener en cuenta que estas podrían haber sido ligeramente alteradas debido a la NEt_3 , que no presentaba septum de seguridad para asegurar la sequedad del reactivo.

²⁹ Brown, F.K.; Brown, P.J.; Bickett, D.M.; Chambers, C.L.; Davies, H.G.; Deaton, D.N.; Drewry, D.; Foley, M.; McElroy, A.B.; Foley, J.M.; McElroy, A.B.; Gregson, J.M.; McGeehan, G.M.; Myers, P.L.; Norton, D.; Salovich, J.M.; Schoenen, F.J.; Ward, P., *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 674-688

³⁰ Sim, T.B.; Rapoport, H., *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2532-2536

4. Parte Experimental

General

Sólo las reacciones que lo indican se han llevado en condiciones anhidridas. Estas se han llevado a cabo bajo atmosfera de argón. El material de vidrio, los agitadores magnéticos y las jeringas de disolvente se secaron en la estufa de 60°C al menos durante 5 horas. Al retirarlo de la estufa, se deja secar en un desecador usando lentejas de NaOH como agente desecante. Las jeringas de capacidad igual o menor a 1mL simplemente se dejaron secar en el desecador. Los matraces esféricos donde se llevaron estas reacciones se purgaron haciendo pasar corriente de argón con entrada y salida mediante una aguja.

Los disolventes usados en reacciones anhidridas fueron secados previamente mediante reflujo con el agente desecante adecuado: CaH_2 para el CHCl_3 ; para CH_3CN se deja toda la noche con abundantes tamices moleculares Sieves 4Å en la estufa de 60°C, al día siguiente se filtra y se pone a refluir con CaH_2 . La DMF es adquirida anhidrida en su envase comercial sellado con un septum.

La cromatografía en columna se ha realizado empleando Sílica Flash®P60 de 40-63µm (230-400mesh) como fase estacionaria. Para cromatografía en capa fina se han usado placas TLG Sílica Gel 60 F₂₅₄ de aluminio de la marca Merck, usando como revelante luz UV de 254 nm y de 365nm o como solución reveladora sulfato de cerio (IV) con posterior calentamiento.

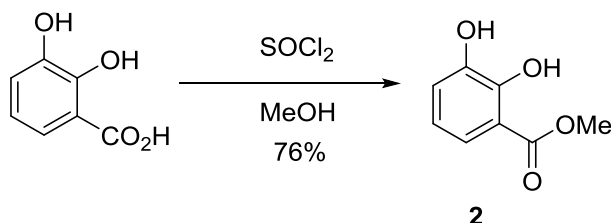
Los espectros de ^1H y ^{13}C RMN se realizaron tanto en los Servicios de Apoyo á Investigación de la Universidade da Coruña en el espectrómetro Bruker AVANCE de 400 MHz, como en el aparato de RMN Bruker Avance 300MHz en el Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA) que funciona en régimen de autoservicio. Los disolventes usados fueron CDCl_3 (99.8% D) y CD_3OD (99.8% D)

Los desplazamientos químico fueron determinados en escala de δ partes por millón (ppm), con constantes de acoplamiento (J) en Hercios (Hz)

Los espectros de masas de electrospray (ESI) también fueron realizados en el Servicio de Apoyo á la Investigación de la Universidade da Coruña.

Los pasos donde se requería baja temperatura se llevaron a cabo en baños de agua-hielo a 0°C.

4.1. Síntesis del 2,3-dihidroxibenzoato de metilo



Sobre una disolución de ácido 2,3-dihidroxibenzoico comercial (1.00 g, 6.47mmol) en MeOH (20mL), se añade muy lentamente SOCl₂ (0.6 mL, 8.23 mmol). Posteriormente, la mezcla se agita a reflujo durante 24 horas a 65°C. Pasado este tiempo, la mezcla de reacción se ha vuelto de un leve color rojizo. Se deja alcanzar la temperatura ambiente y se añade K₂CO₃ hasta que la mezcla alcanza pH 7. El aspecto cambia y se vuelve una suspensión blanquecina. Una vez neutralizado, se filtra a gravedad, concentrándose la disolución resultante a presión reducida. El resultado es un aceite de color rojizo, que posteriormente cristaliza brevemente.

El residuo resultante se distribuye entre AcOEt (25 mL) y agua (40 mL). Se separan las fases y la acuosa se lava con AcOEt (3x10mL). Se juntan todas las fases orgánicas y se lavan con una disolución saturada de NaCl (20mL). La fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra a gravedad y se elimina el disolvente a presión reducida obteniéndose 0.83 g de 2,3-dihidroxibenzoato de metilo (**2**) (76% de rdto) como un sólido cristalino de color “beige” rosado pálido.

RMN-¹H (400MHz, CDCl₃) δ_H ppm = 3.98 (s, 3H, H_a), 5.68 (s, 1H, H_b), 6.83(t, 1H, H_c), 7.14 (dd, 1H, H_d), 7.39 (dd, 1H, H_e), 10.92 (s, 1H, H_f)

RMN-¹³C (400MHz, CDCl₃) δ_C ppm = 52.45 (C_a), 112.34(C_b), 119.15(C_c), 119.89(C_d), 120.63(C_e), 145.02 (C_f), 148.82 (C_h), 170.74(C_i)

Masa exacta calculada: 168.04 uma

Pico espectro masas: 191.03 (M+Na)⁺

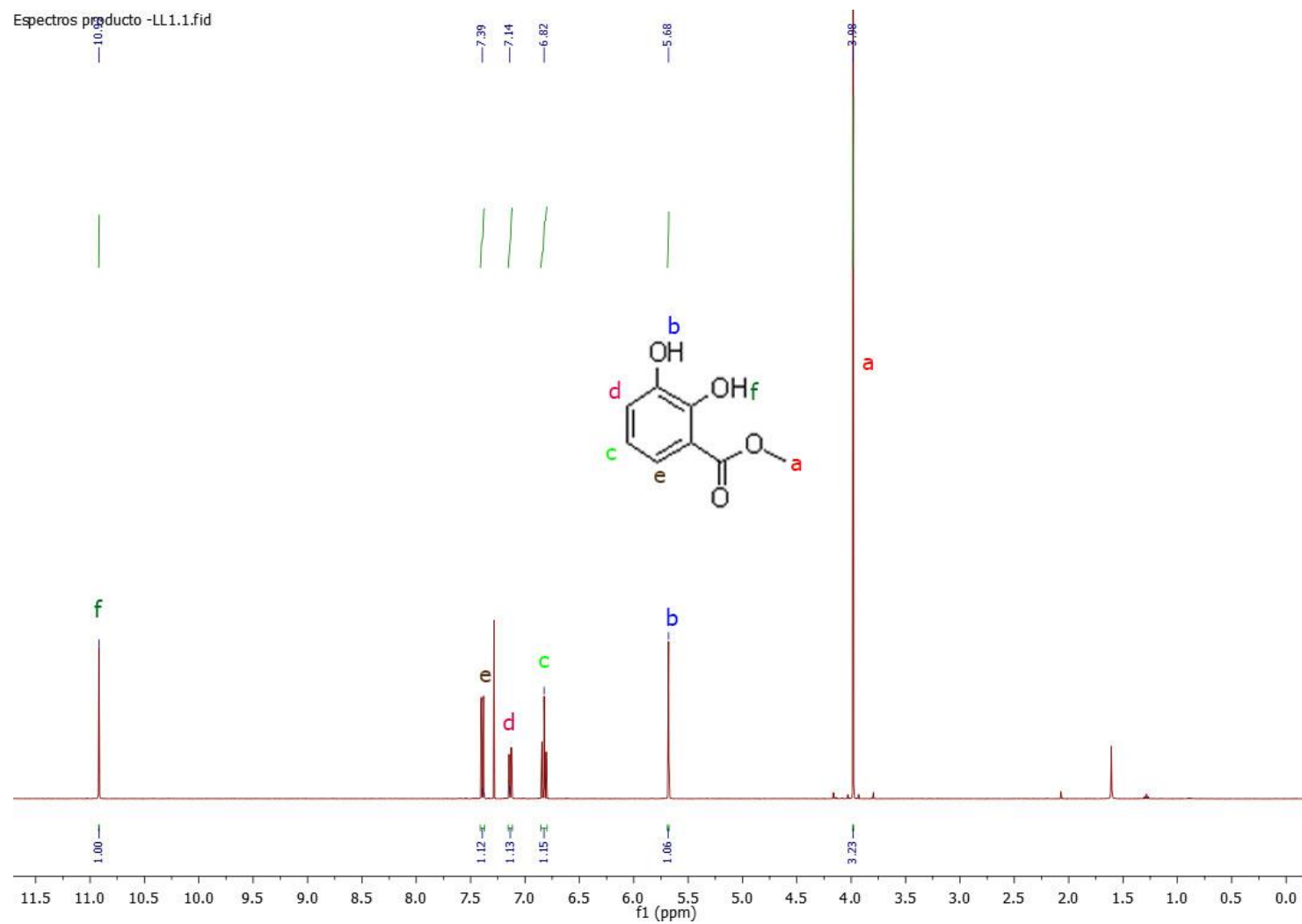


Figura 20 Espectro de RMN-¹H de 2

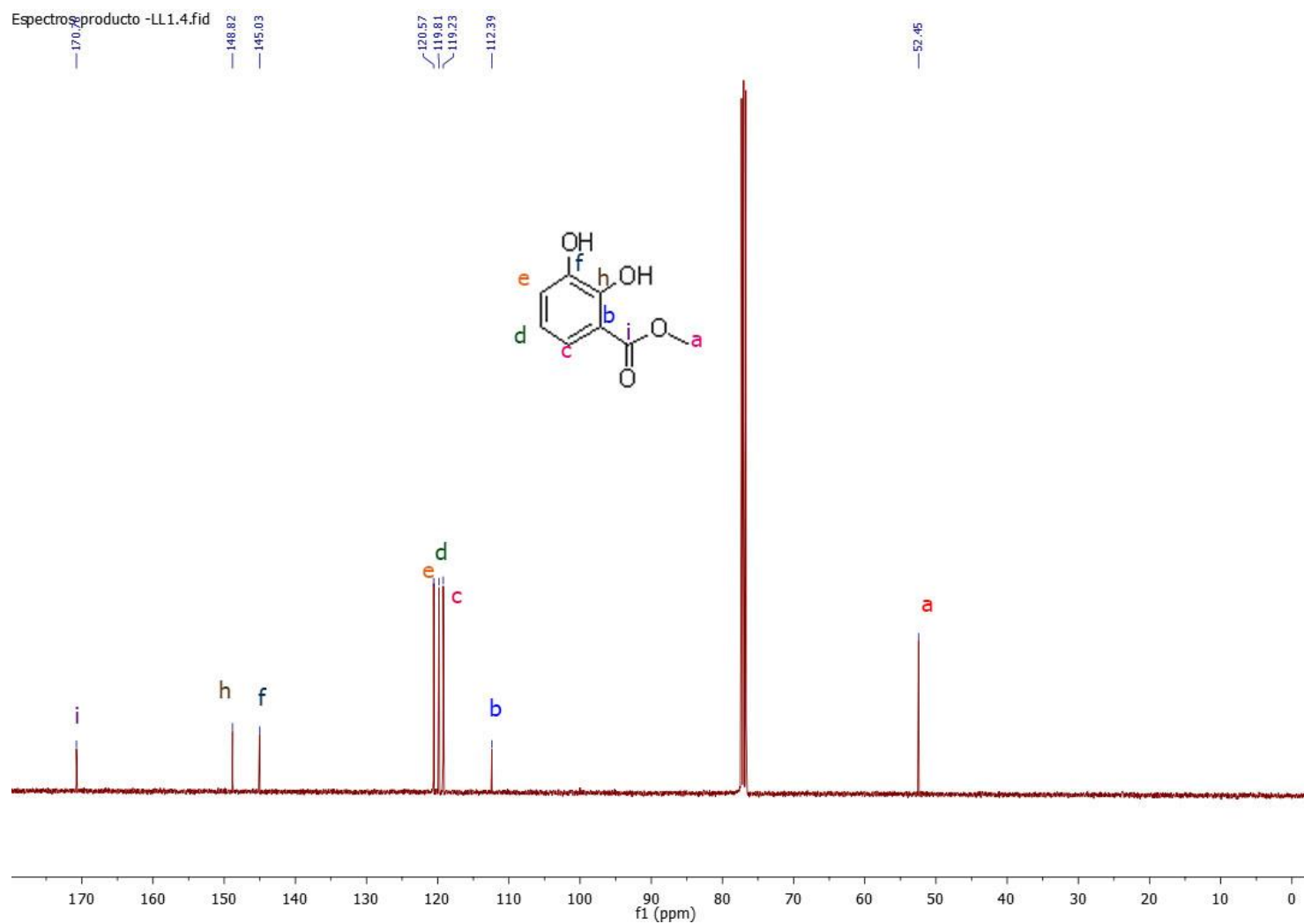


Figura 21 Espectro RMN- ^{13}C de 2

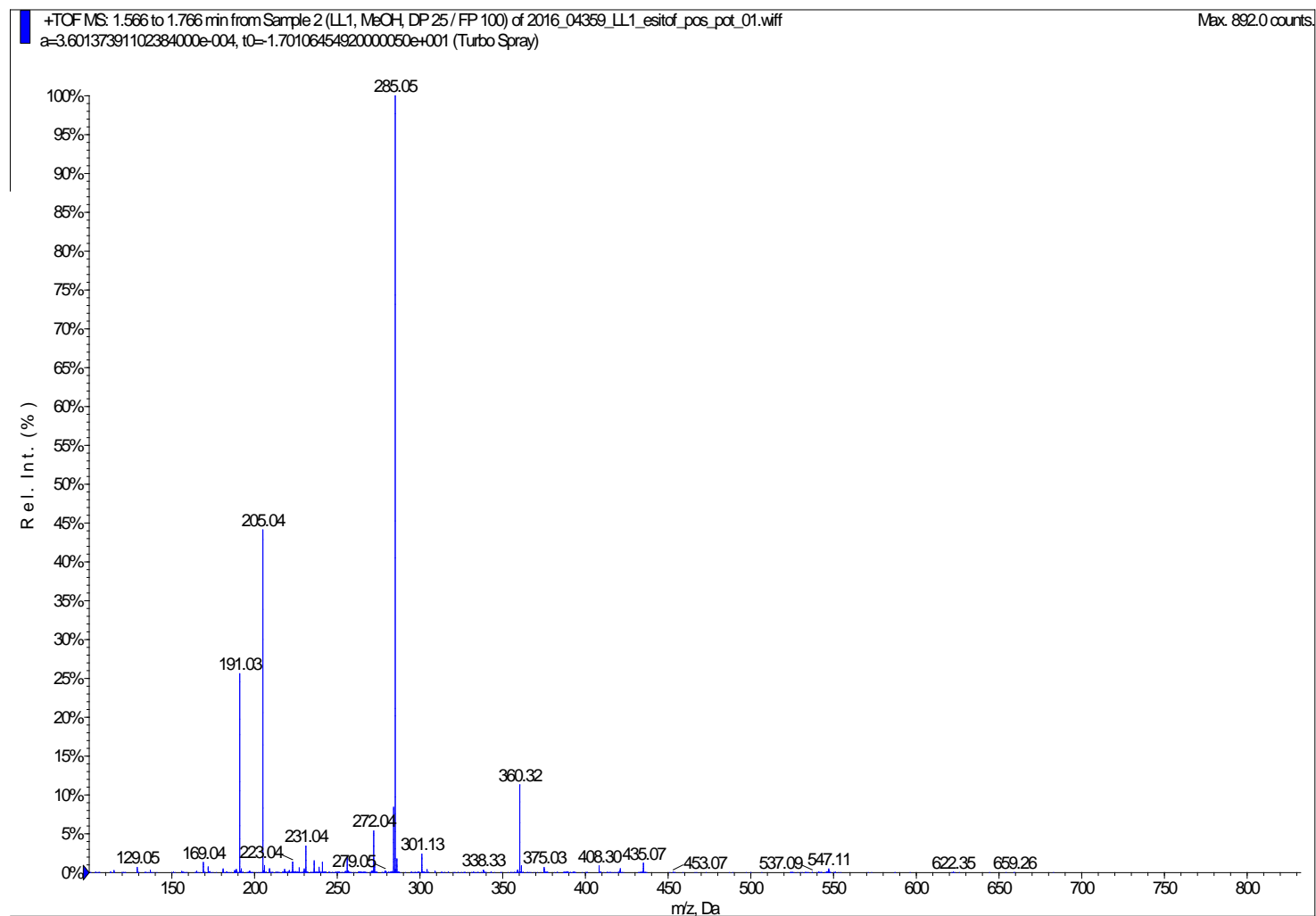
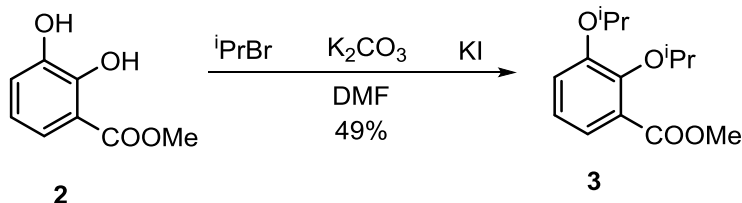


Figura 22 Espectro de masas de 2

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



Sobre una disolución de 2,3-dihidroxibenzoato de metilo (**2**) (0.79 g, 4,69 mmol) en DMF (7.5 mL), se añade con agitación KI (3.19 g, 17.47mmol) y K₂CO₃ (3.23 g, 23.12mmol). Posteriormente, se añade ⁱPrBr (2.4 mL, 25.56 mmol). A continuación se calienta con reflujo a 50°C durante 24 horas.

Se elimina a presión reducida el disolvente y toda la muestra se redisuelve en CH₂Cl₂. La mezcla se filtra a vacío con celita. Se concentra la muestra a presión reducida y se distribuye entre CH₂Cl₂ (20 mL) y agua (20 mL). Se separa la fase orgánica de color rojizo, y se lava con HCl 5% (15 mL) y posteriormente con disolución saturada de NaCl (15mL). La fase orgánica se seca con MgSO₄ y se filtra a gravedad. Se elimina el disolvente, obteniéndose 0.5763 g de 2,3-di-*iso*-propoxibenzoato de metilo (**3**) (49% de rdto).

R_f: (hexano/AcOEt 5:1) =0.76

RMN-¹H (400MHz, CDCl₃) δ_H ppm = 1.30 (d,6H, H_a), 1.36 (d, 6H,H_b), 3.90 (s, 3H, H_c), 4.54 (dhept, 2H,H_d), 7.03-7.08 (m, 2H,H_e), 7.31 (dd, 1H, H_f)

RMN-¹³C (400MHz, CDCl₃) δ_C ppm =22.12 (CH₃,C_a), 22.38 (CH₃, C_b), 51.95 (CH₃, C_c), 71.52 (CH, C_d), 76.06 (CH, C_e), 119.88 (CH,C_f), 122.6 (CH,C_g), 123.10 (CH,C_h), 127.36 (C, C_i), 148.01 (C, C_j), 151.75 (C, C_k), 167.39 (CO, C_l)

Masa exacta calculada: 252.14 uma

Pico espectro masas: 275.13 (M+Na)⁺

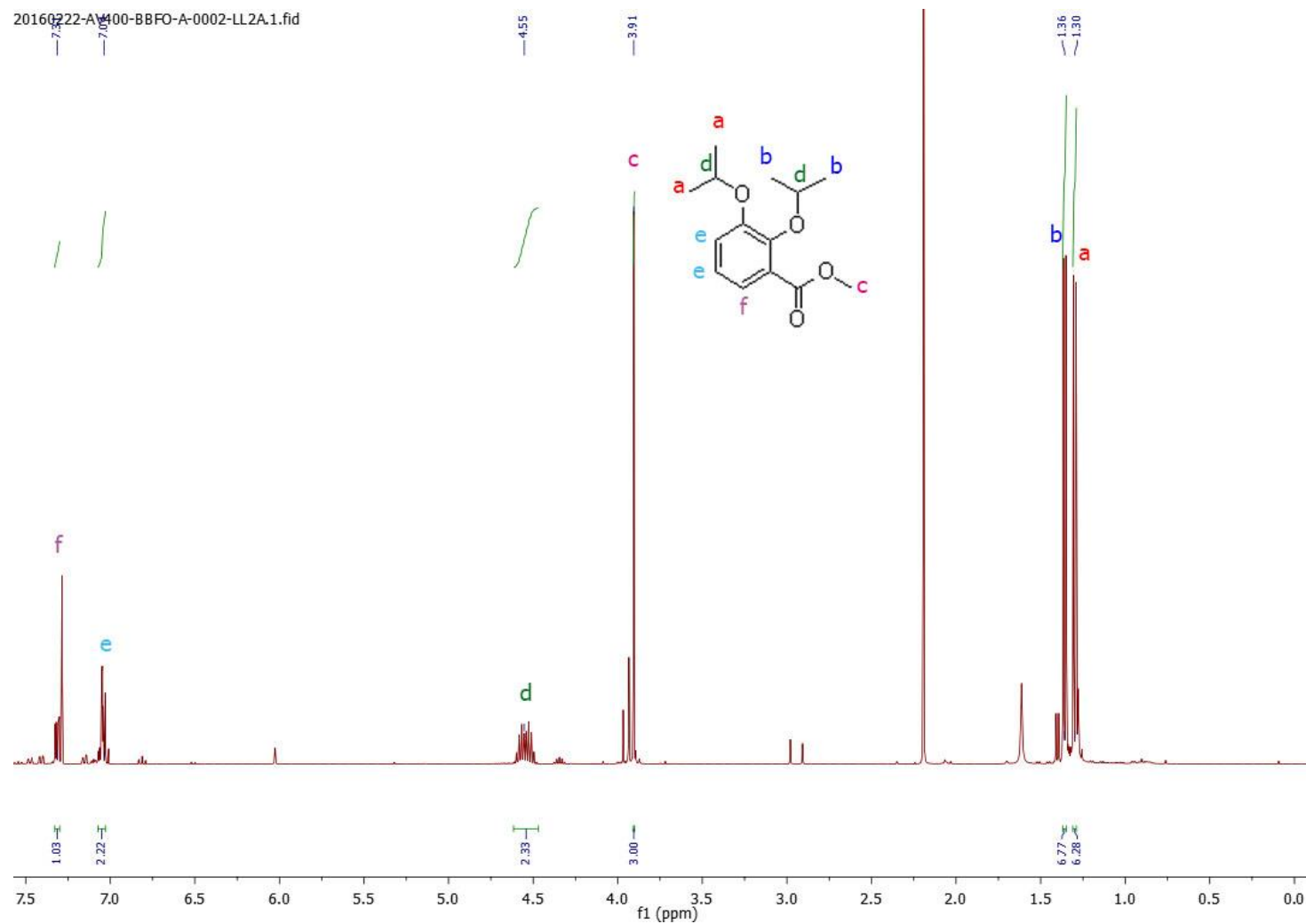


Figura 23 Espectro de RMN-¹H de 3

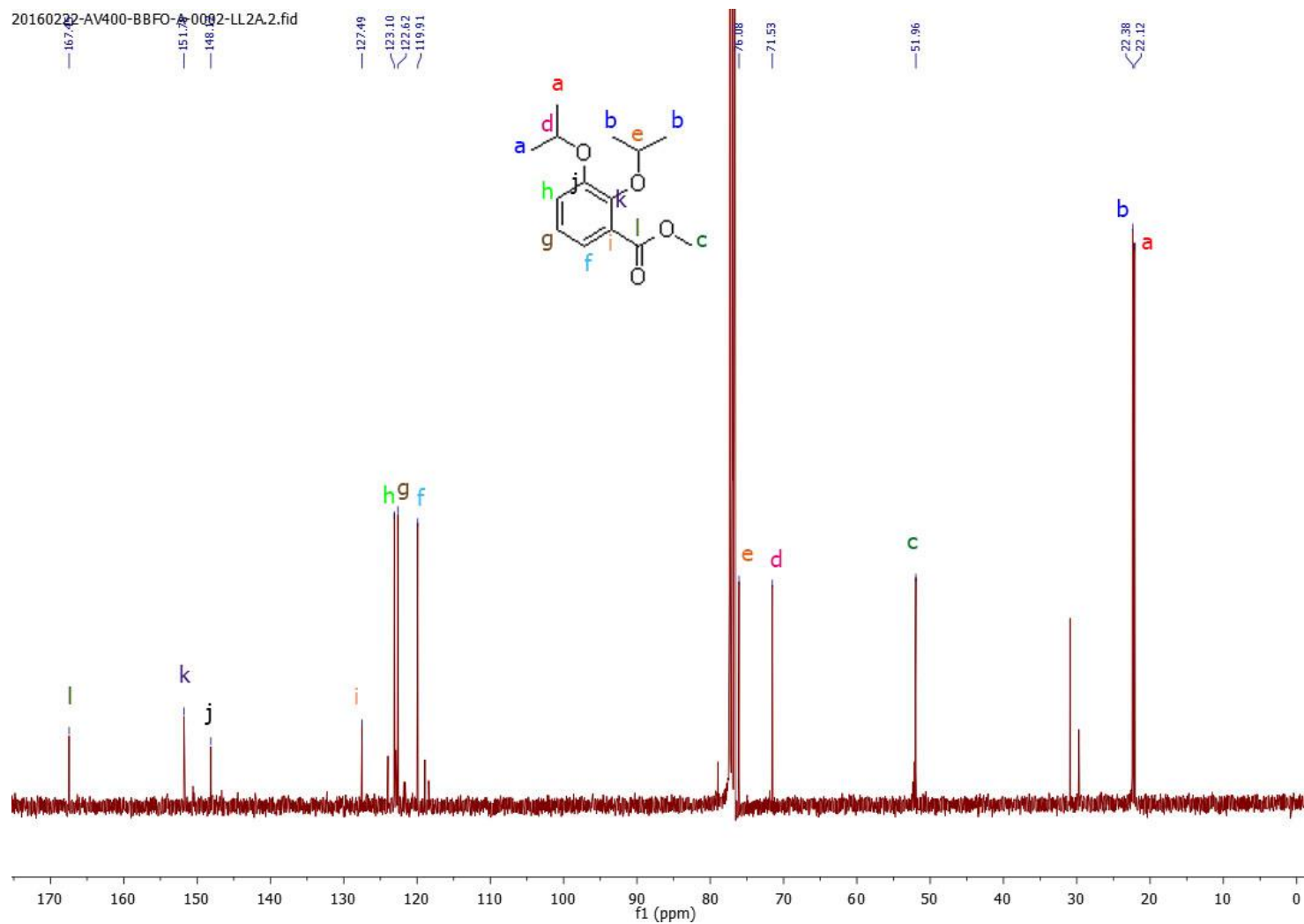


Figura 24 Espectro de RMN- ^{13}C de 3

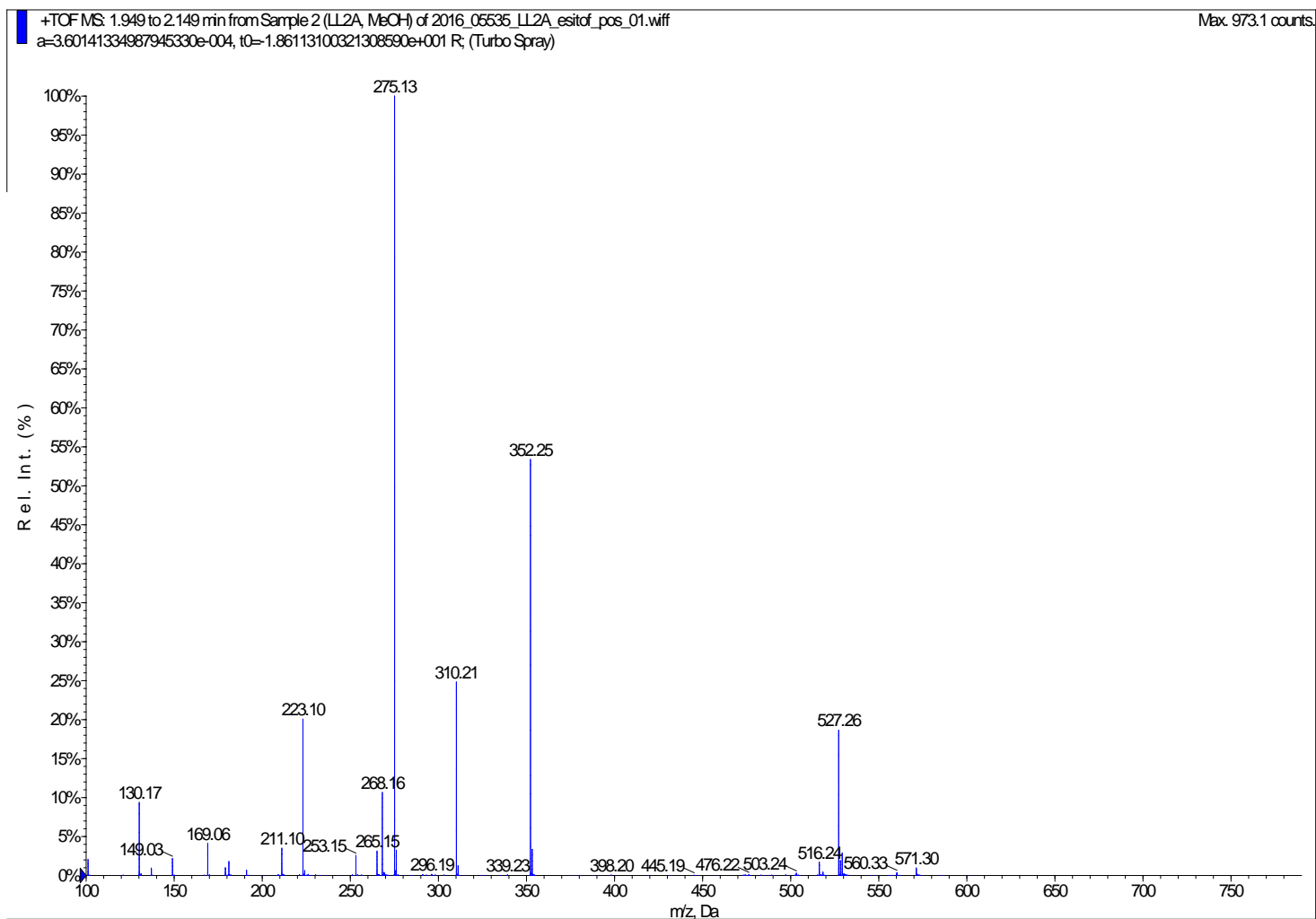
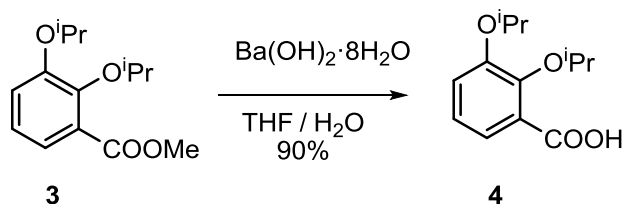


Figura 25 Espectro de masas de 3

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



Se añade $\text{Ba(OH)}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (0,4031 g, 1.28 mmol) sobre una disolución de 2,3-di-iso-propoxibenzoato de metilo (**3**) (0.1038 g, 411 μmol) en 10 mL de THF/ H_2O . La mezcla se agita a reflujo a 50°C durante 24 horas.

Pasado este tiempo, se añade resina de intercambio iónico Dowex® 50WX8 previamente acidulada con HCl 5%, hasta que la mezcla alcanza pH 3. Se filtra a vacío y la resina que queda en el embudo se extrae con 120 mL de THF. Este se seca con MgSO_4 , se filtra a gravedad y se concentra a presión reducida. El resultado es la obtención del ácido 2,3-di-iso-propoxibenzoico (**4**) (0.0880 g, 369 μmol) como un aceite marrón oscuro en un rendimiento del 90 %.

Rf: (hexano/AcOEt 1:1) =0.54

RMN- ^1H (400MHz, CDCl_3) δ_{H} ppm =7.76 (dd, 1H, H_a), 7.17 (m, 2H, H_b), 5.03 (hept, 1H, H_e), 4.61 (hept, 1H, H_c), 1.42 (d,6H, H_f), 1.40 (d,6H, H_d)

RMN- ^{13}C (400MHz, CDCl_3) δ_{C} ppm=22.05 (C_a), 22.12(C_b), 71.73 (C_c), 78.03(C_d), 120.34 (C_e), 123.65 (C_f), 124.12 (C_g), 124.41 (C_h), 146.68 (C_i), 150.18 (C_j), 165.66 (C_k)

Masa exacta calculada: 238.12 uma

Pico espectro masas: 261.11 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$

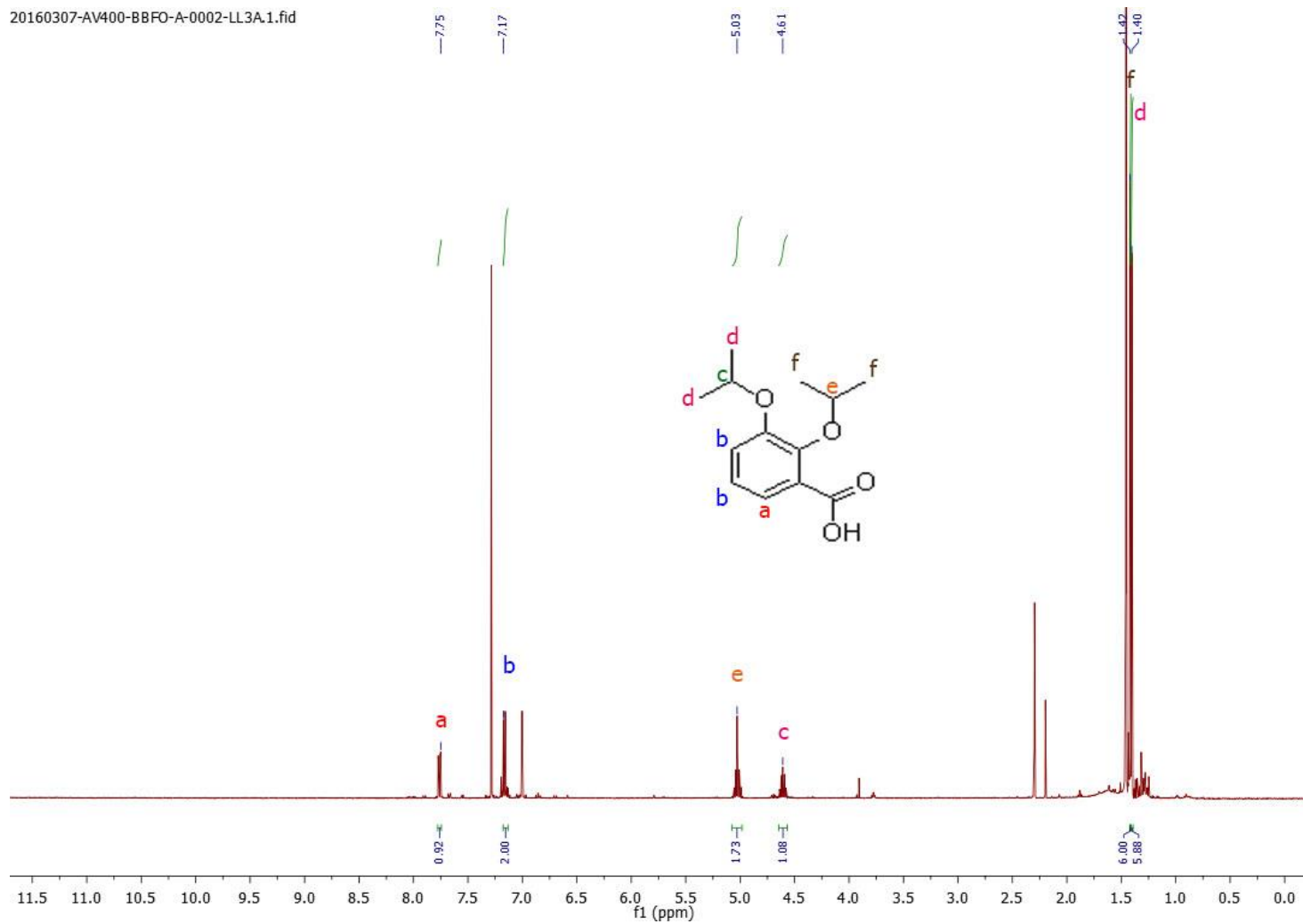


Figura 26 Espectro de RMN-¹H de 4

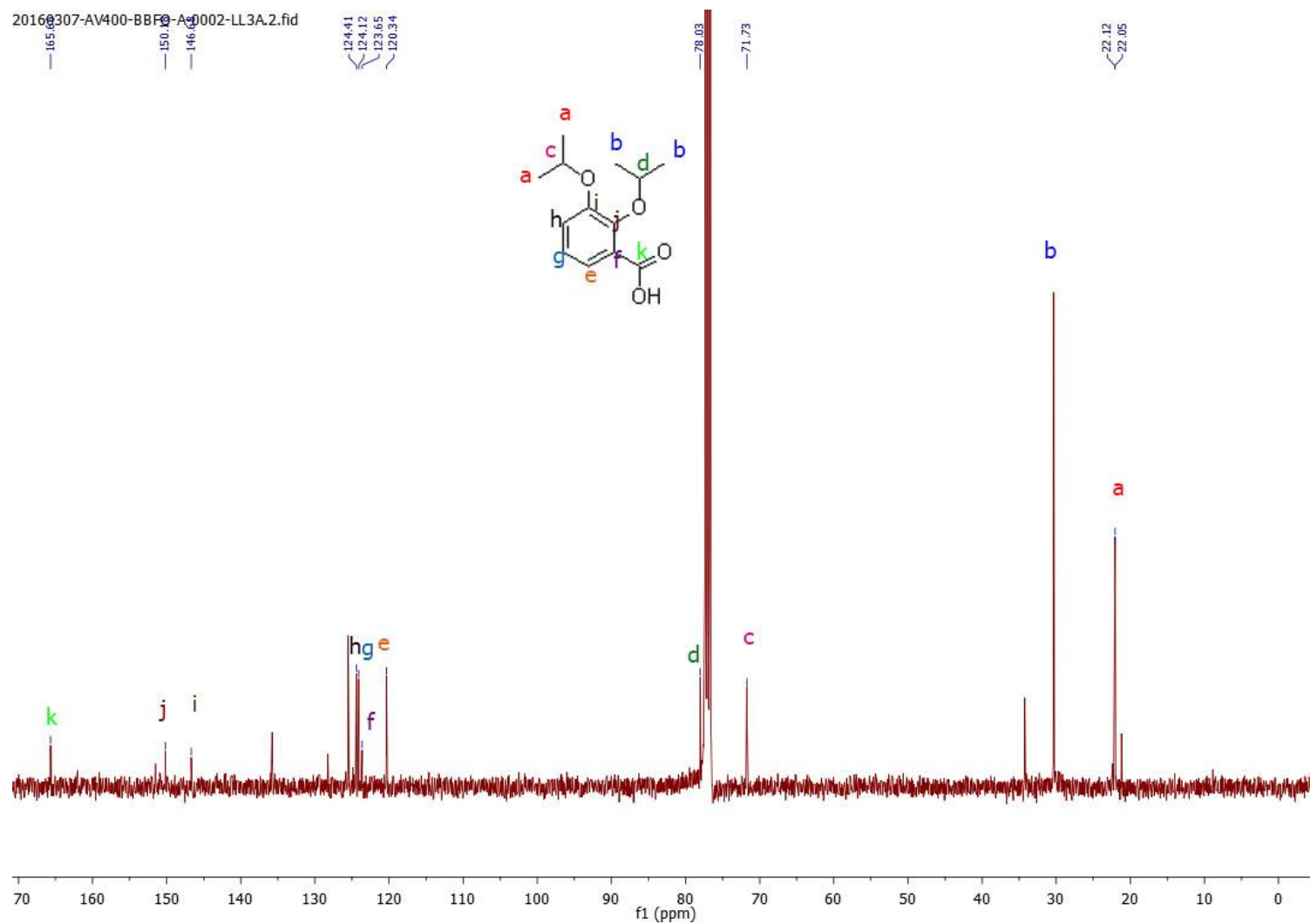


Figura 27 Espectro de RMN- ^{13}C de 4

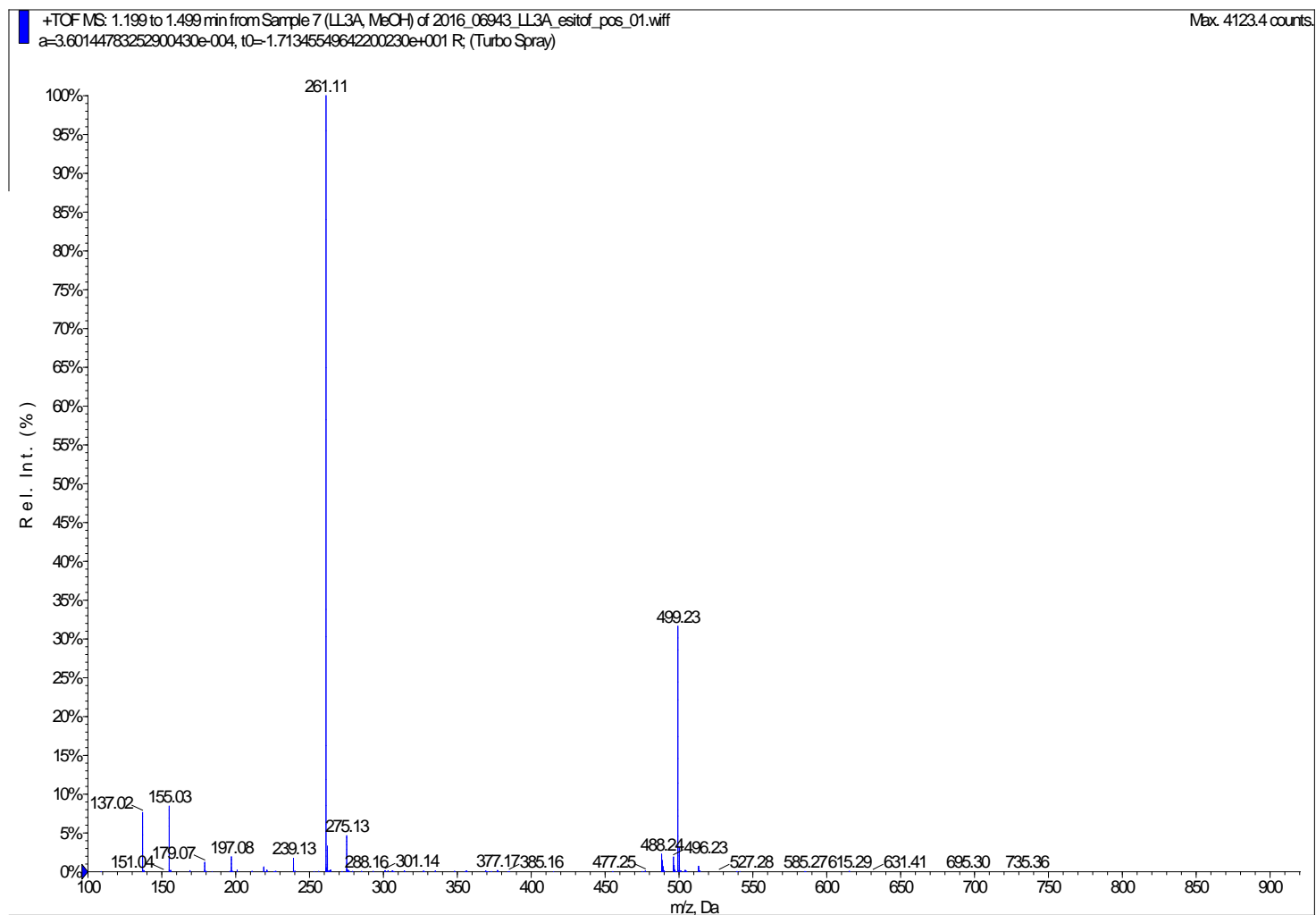
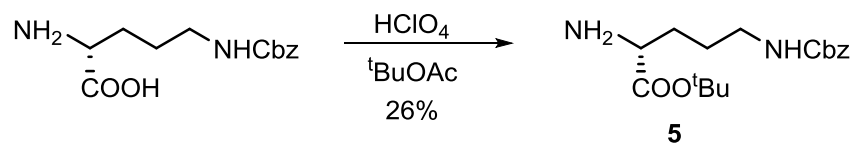


Figura 28 Espectro de masas de 4

4.4. Síntesis del pentanoato de terc-butyl (R)-2-amino-5-(((benzyloxy)carbonyl)amino (5)



Sobre una disolución de N'-Cbz-L-ornitina (196 mg, 739 μmol) en 10 mL de $^t\text{BuOAc}$, se añade con una jeringuilla el HClO_4 (0.2mL, 3.31mmol). La mezcla se agita vigorosamente durante 3 días a temperatura ambiente.

La mezcla de reacción se enfría a 0°C en baño de hielo y se extrae con HCl 0.5M (4x5mL). La fase acuosa de color blanco se basifica a continuación con NaOH 2M hasta pH 14. Se extrae con Et_2O (3x10mL). La fase orgánica se seca con MgSO_4 y se concentra en el rotavapor, obteniéndose el 2-amino-5(((benziloxi)carbonil)amino)pentanoato de tertbutilo como un aceite amarillo(**5**) (62.3 mg, 193 μmol) en un rendimiento del 26%.

$\text{RMN-}^1\text{H}$ (400MHz, CDCl_3) δH ppm =1.48 (s, 9H, ^tBu , H_a), 1.52-1.69 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$, H_b), 3.24 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$, H_c), 3.32 (m, 1H, CH-NH_2 , H_d), 5.11 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Cbz}$, H_e), 7.29-7.38 (m, 5H, aromáticos, H_f)

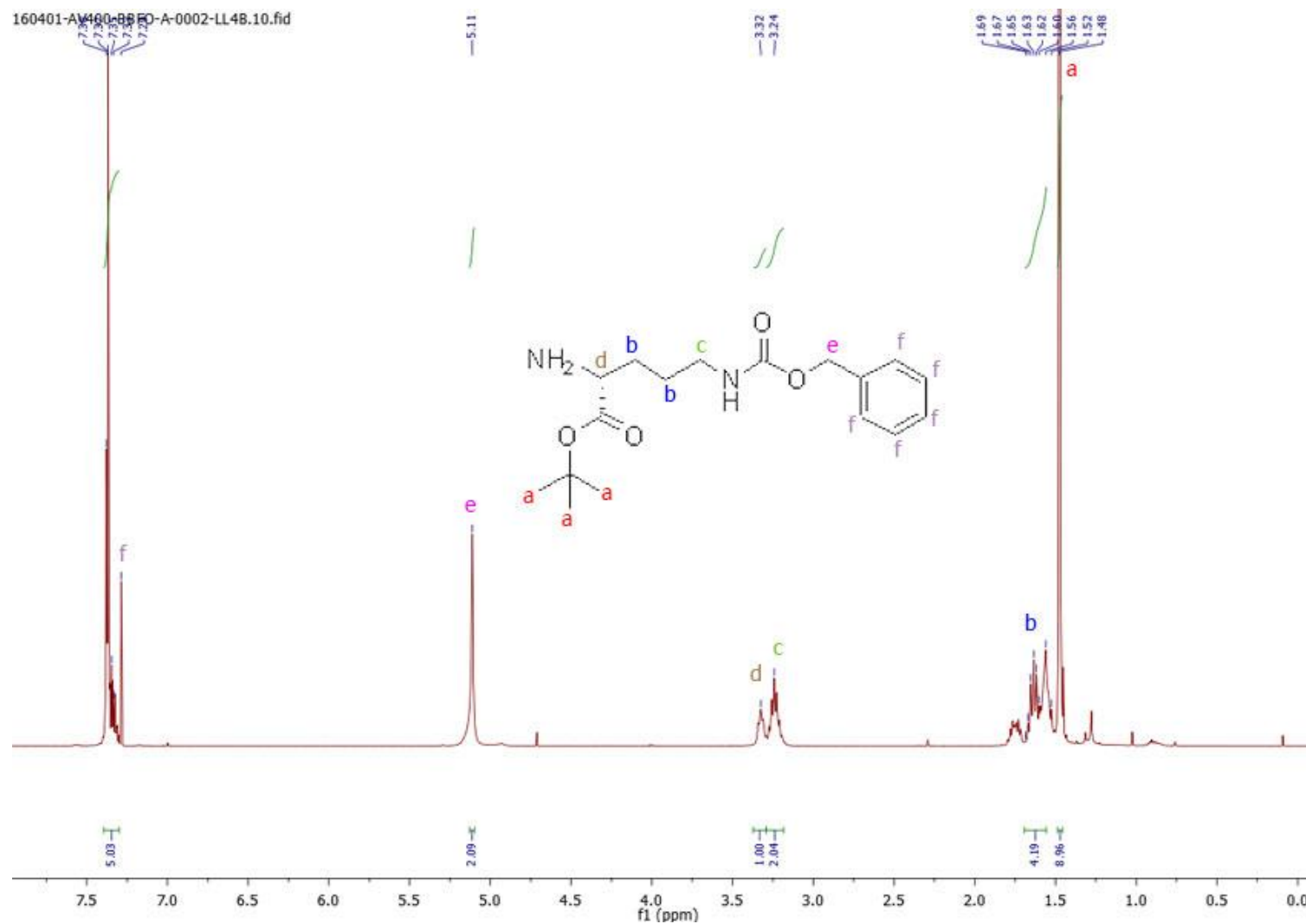
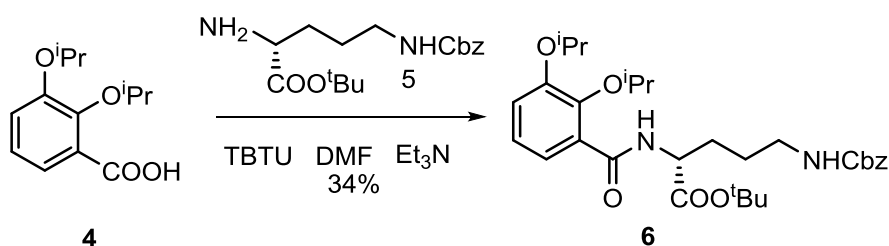


Figura 29 Espectro RMN- ^1H de 5

4.5. Síntesis de (R)-5-(((benziloxi)carbonil)amino)-2-(2,3-diisopropoxibenzamido)pentanoato de *tert*-butilo (6)



Reacción en condiciones anhidridas

Una mezcla compuesta de ácido 2,3-di-iso-propoxibenzoico(4) (58.8 mg, 247 μmol) y el agente acoplante TBTU (117 mg, 457 μmol) se disuelve en DMF (3mL). Con una jeringuilla se le añade NEt₃ (0.1 mL, 717 μmol). Una vez disuelto todo, se añade sobre una disolución de 2-amino-5 (((benziloxi)carbonil)amino)pentanoato de tertbutilo (5) (77.7mg, 241 μmol) disueltos en DMF (5mL). Se agita vigorosamente durante 16 horas. A continuación, se elimina el disolvente a presión reducida, quedando un residuo de color marrón. Este es preabsorbido en sílica y separado por columna cromatográfica, usando un eluyente hexano/AcOEt 3:2. Se obtiene (R)-5-(((benziloxi)carbonil)amino)-2-(2,3-diisopropoxibenzamido)pentanoato de tertbutilo (6) (45.6 mg, 84.0 μmol) como un aceite amarillo con rendimiento del 34%.

Rf: (hexano/AcOet 3:2) =0.67

RMN-¹H (300MHz, CDCl₃) δH ppm =1.27 (d, 3H, H_a), 1.34-1.39 (m, 9H, H_b), 1.49 (s, 9H, H_c), 1.62 (m, 2H, H_d), 1.79 (m, 1H, H_e), 1.93 (m, 1H, H_f), 3.24 (cuad, 2H, H_g), 4.54 (hept, 1H, H_h), 4.67 (m, 1H, H_i), 4.79 (hept, 1H, H_j), 5.08 (s, 2H, H_k), 6.98-7.10 (m, 2H, H_l), 7.24-7.37 (m, 4H, H_m), 7.68 (dd, 1H, H_n), 8.69 (d, 1H, H_o)

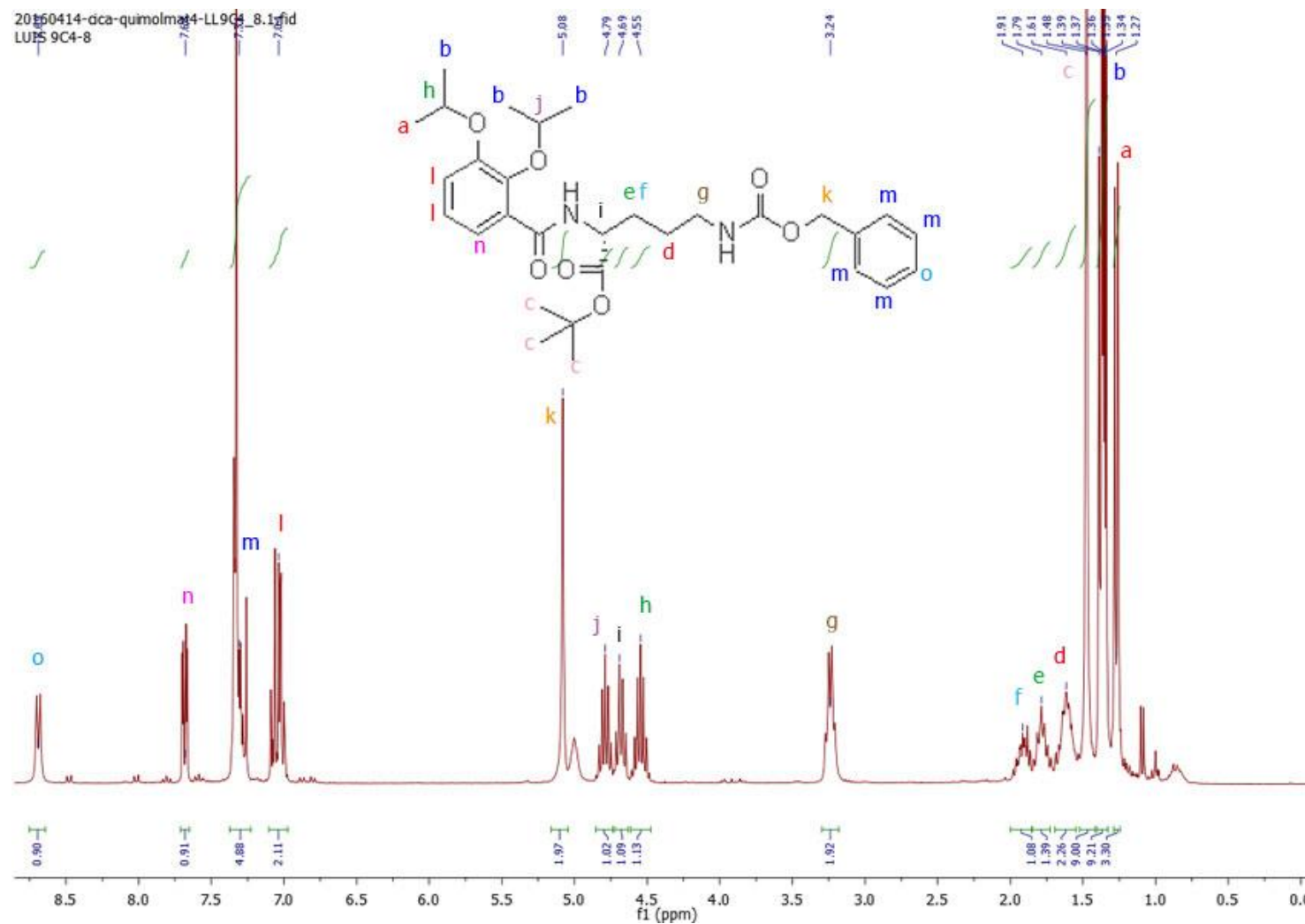
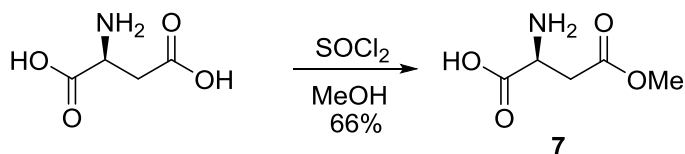


Figura 30 Espectro de RMN-¹H de 6

4.6. Síntesis de ácido 2-amino-4-metoxi-4-oxobutanoico (7)



Se añade en un matraz MeOH (5.4mL) y se enfrían a 0°C con un baño de hielo. Una vez frío, se añade SOCl₂ (0.2 mL, 2.76 mmol) muy lentamente. A continuación, aún en el baño de hielo, se añade el ácido L-Aspártico (103 mg, 781 μmol). Se retira el baño y la mezcla se agita vigorosamente durante 3 horas a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo, se elimina todo el disolvente a presión reducida, obteniéndose el ácido 2-amino-4-metoxi-4-oxobutanoico(7) (89.5 mg, 517 μmol) como un sólido blanco con una pureza del 85% y un rendimiento del 66%.

RMN-¹H (400MHz, CD₃OD) δH ppm = 3.16 (m, CH₂, H_a), 3.78 (s, OMe, H_b), 4.33 (t, CH, H_c)

RMN-¹³C (400MHz, CD₃OD) δ_C ppm=33.47 (C_a), 48.96 (C_b), 51.55 (C_c), 169.02 (C_d), 170.20 (C_e)

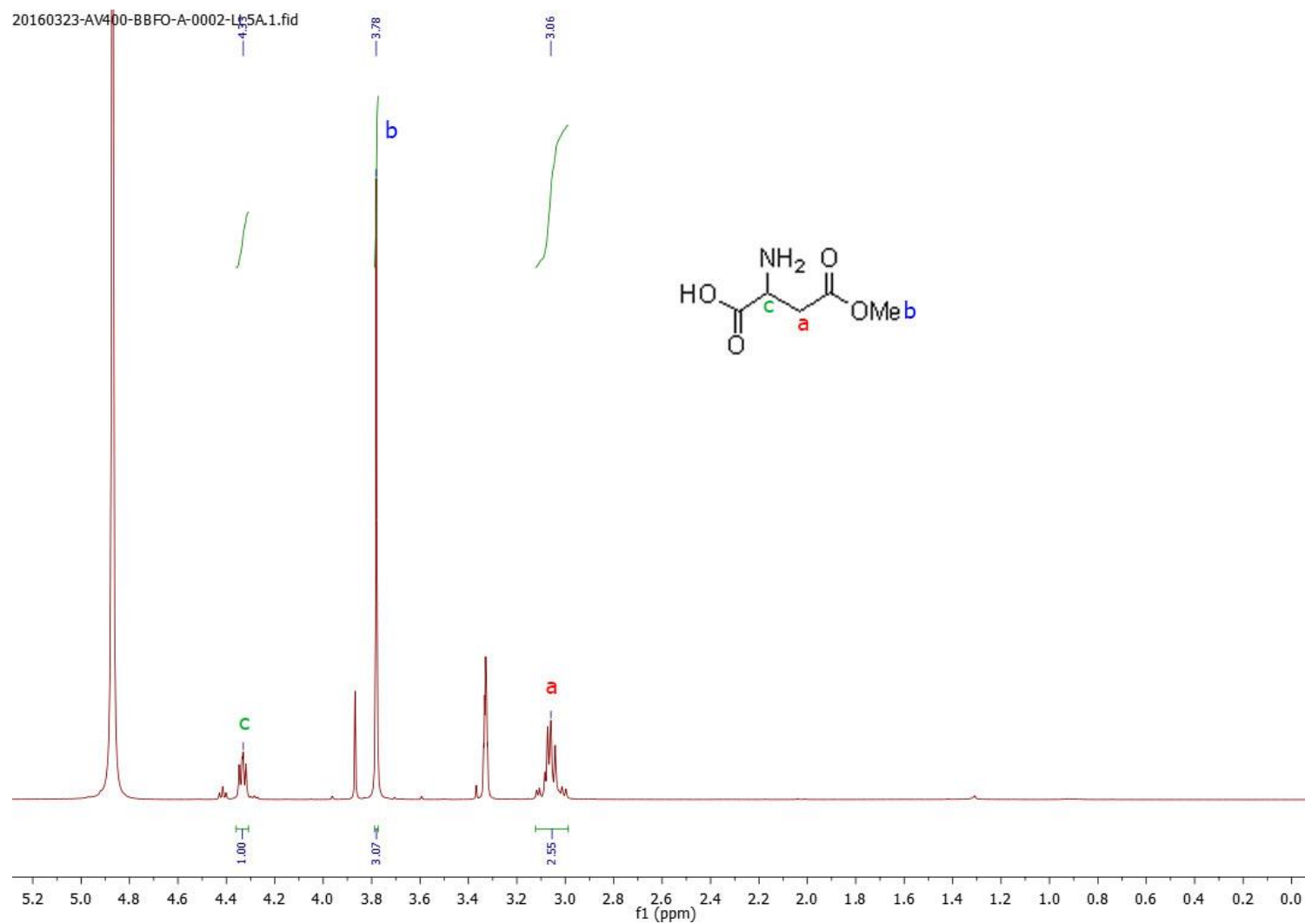


Figura 31 Espectro de RMN-¹H de 7

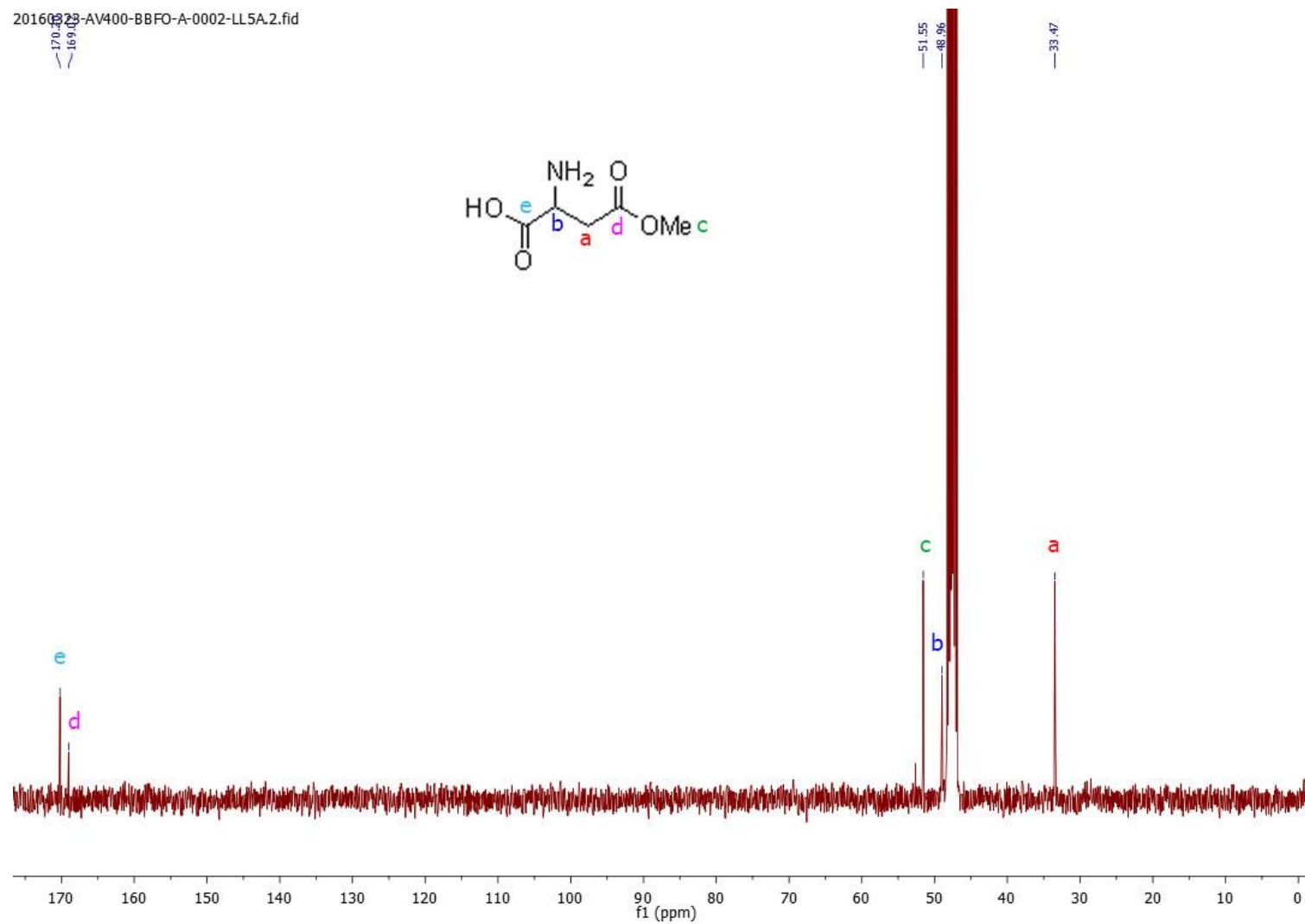
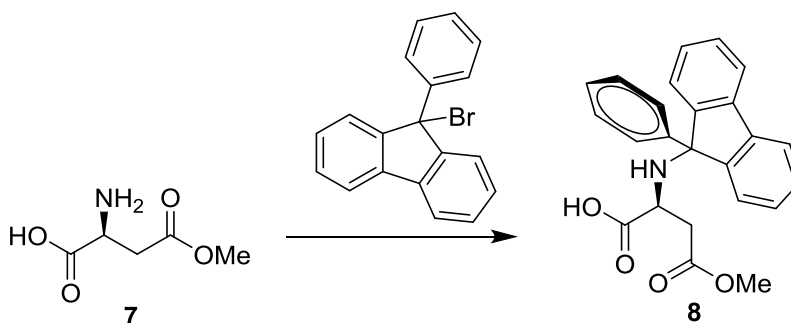


Figura 32 Espectro RMN- ^{13}C de 7

4.7. Síntesis del ácido 4-metoxi-oxo-2-((9-fenil-9H-fluoren-9-il)metil)butanoico (8)



Reacción en condiciones anhidridas

A una disolución de ácido 2-amino-4-metoxi-4-oxobutanoico(**7**) (54.0 mg, 367 μ mol) en $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{CN}$ 3:1 (10mL) se le añade SiMe_3Cl (0.45mL, 355 μ mol) y se agita vigorosamente a temperatura ambiente durante 4 horas.

A continuación, se añade NEt_3 (0.1mL, 717 μ mol) lentamente con jeringuilla y la mezcla se agita durante 15 minutos más. Se añade $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (81.0mg, 244 μ mol) y a continuación se añade una solución preparada previamente de 9 bromo-9-fenilfluoreno (131 mg, 407.82 μ mol) en CHCl_3 (2.5mL).

La mezcla de reacción se agita durante 3 días. Trascurrido este período se añade metanol (0.8mL) y se deja agitar media hora más. Se filtra a gravedad, y el residuo en el papel de filtro se lava con CHCl_3 (2x10mL), y el filtrado naranja se concentra. El sólido se distribulle entre éter (15mL) y ácido cítrico 5%(15mL). La fase acuosa se extrae con éter (2x15mL), se juntan las fases orgánicas y se lavan con "brine"(15mL). La fases orgánica se seca con MgSO_4 , se filtra y se concentra. Se obtiene ácido 4-metoxi-oxo-2-((9-fenil-9H-fluoren-9-il)metil)butanoico(**8**) aunque la muestra tiene muchas impurezas, por lo que la cuantificación no es posible.

RMN^1H (300MHz, CD_3OD) δ H ppm =1.90 (dd, 1H, H_a), 2.79 (dd, 1H, H_b), 2.82-2.89 (m, 1H, H_c), 3.64 (s, 3H, H_d), 7.35-7.85 (m, 13H, H_e)

R_f (hexano/AcOEt 3:2) = 0.35

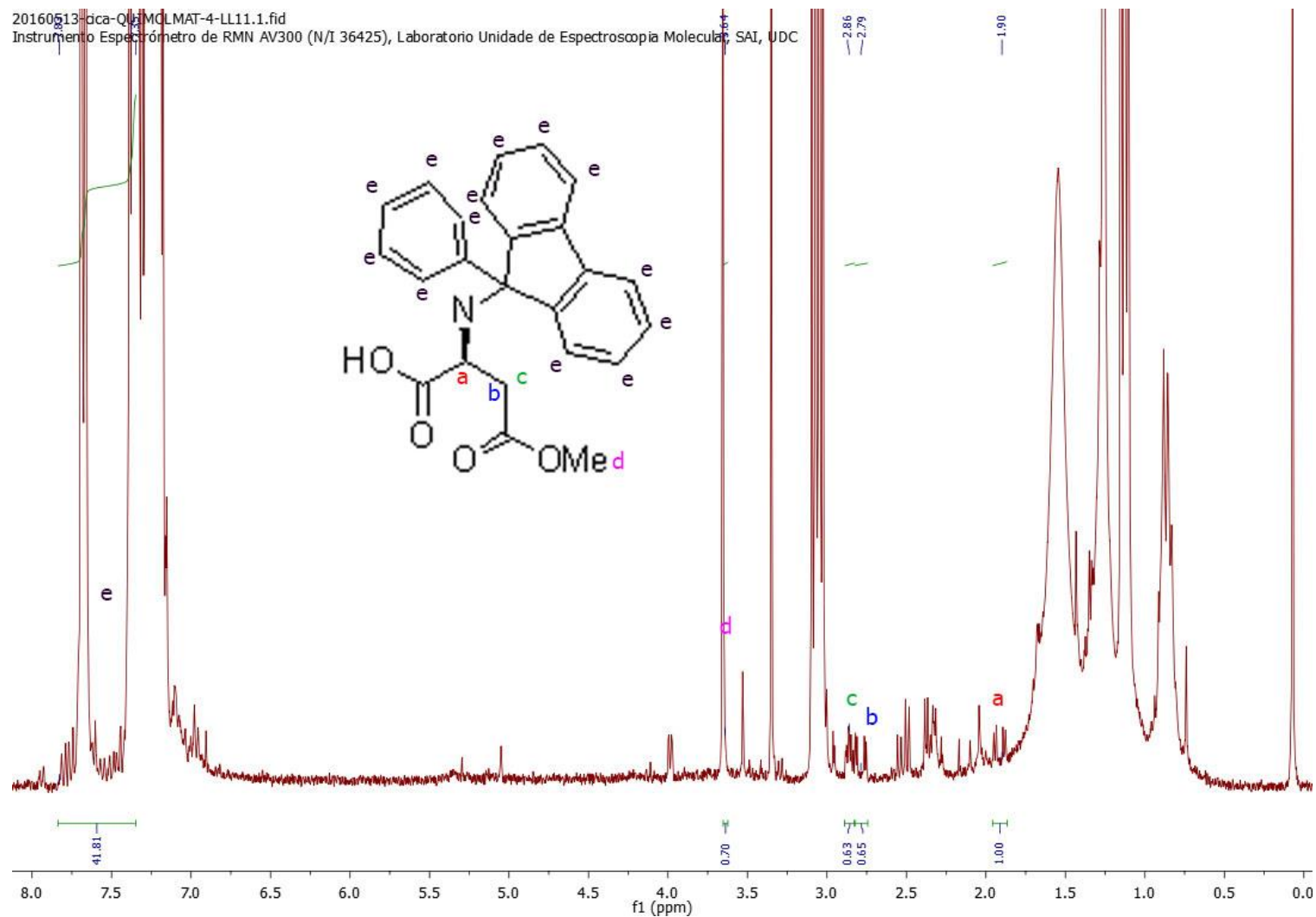


Figura 33 Espectro de RMN- ^1H de 8

5. CONCLUSIONES

Durante la realización de este Trabajo de Fin de Grado se han seguido distintas rutas sintéticas para la obtención de compuestos con interés en el campo de los productos naturales.

En base a los objetivos del Trabajo, se han cumplido los siguientes:

- Síntesis del compuesto intermedio para la posterior obtención del análogo del sideróforo vancrobactina
- Síntesis del β -metil aspartato protegido con el 9-bromo-9-metilfluoreno para que sea utilizado por miembros del grupo de investigación para la síntesis de la 3- metilhomoserina.

La síntesis del intermedio permitirá la obtención de un análogo de vancrobactina que será unido a través de un espaciador a nanopartículas de hierro.

Por otro lado, la propuesta de una ruta sintética para la obtención de la 3- metilhomoserina permitirá su síntesis para obtener un estándar que será utilizado para detectar este aminoácido en estructuras polipeptídicas

Por otra parte, gracias al Trabajo de Fin de Grado, se han adquirido diversas competencias:

- Aprendizaje de nuevas técnicas de síntesis orgánica
- Mejora en el manejo de programas de determinación estructural y capacidad de interpretación de espectros de RMN y de masas.
- Mejora de la capacidad de búsquedas bibliográficas y publicaciones científicas, así como familiarización con las distintas bases de datos.
- Ampliación de los conocimientos acerca de los productos naturales
- Contacto directo con los proyectos en un grupo de investigación

CONCLUSIONS

During this Final Degree Project, different synthetic routes have been followed to obtain compounds of interest in the field of natural products. Based on the goals of project, the following items were reached:

- Synthesis of an intermediate for preparation of the vanchrobactin analogue.
- Synthesis of the protected β -methyloaspartate with 9-phenylfluorene to be used by other members of the research group for the synthesis of 3-methylhomoserine.

The synthesis of the intermediate will allow obtain the vanchrobactin analogue to be attached by a spacer to iron oxide magnetic nanoparticles.

On the other hand, the proposal of a synthetic route for obtaining 3-methylhomoserine will allow the preparation of a standard compound to be used as standard to be detected in polypeptide structures.

Moreover, thanks to this Final Degree Project, some new skills have been acquired:

- Learning new techniques in organic synthesis
- Improving the management of structural determination, using computer programs to make interpretation of the NMR and the mass spectra.
- Improving skills on bibliographic and scientific publication searches, as well as being familiar to different databases.
- To have a deeper understanding about natural products
- Getting direct contact with projects into a research group

Durante a realización deste Traballo de Fin de Grao seguironse as distintas rutas de síntese para a obtención de compostos con interés no campos dos produtos naturais.

En base aos obxectivos do Traballo, alcanzaronse os seguintes:

- Síntese do composto intermedio para a posterior obtención do análogo do sideróforo vancrobactina.
- Síntese do β -metil aspartato protexido co 9-bromo-9-fenilfluoreno para que sexa utilizado polos membros do grupo de investigación para a síntese da 3-metilhomoserina

A síntese do intermedio permitirá a obtención do análogo de vancrobactina que será unido a través dun espaciador a nanopartículas de ferro.

Por outro lado, a proposta da ruta de síntese para a obtención da 3-metilhomoserina permitirá a súa obtención para obter o estándar que será usado para detectar este aminoácido en estruturas polipeptídicas.

Por outra parte, gracias ao Traballo de Fin de Grao, adquiríronse as seguintes competencias:

- Aprendizaxe de novas técnicas de síntese orgánica
- Millora no manexo de programas de determinación estrutural e capacidade de interpretación de espectros de RMN e masas.
- Millora da capacidade de búsquedas bibliográficas e publicacións científicas, así como a familiarización con distintas bases de datos.
- Ampliación dos coñecementos acerca dos produtos naturais.
- Contacto directo cos proxectos nun grupo de investigación.